



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

**DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE DERIVADOS DE XANTONA SOBRE
MEMBRANAS LIPÍDICAS MODELO**

Farmacéutica Pamela Mendioroz

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

Prefacio

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Química de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química de la Universidad Nacional del Sur, INQUISUR (UNS-CONICET), durante el período comprendido entre el 5 de junio de 2018 y el 1 de diciembre de 2023, bajo la dirección del Dr. Darío César Gerbino, Profesor Adjunto de Química Orgánica de la UNS e Investigador Independiente de CONICET, y la Dra. Marcela Morini, Profesora Adjunta de Fisicoquímica de la UNS e Investigadora Adjunta de CONICET.

Las investigaciones desarrolladas fueron financiadas por subsidios de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (SGCyT), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Agradezco al Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur por las facilidades recibidas durante el desarrollo de los estudios expuestos en el presente trabajo. A su vez, deseo expresar mi agradecimiento a la ANPCyT y a CONICET por el otorgamiento de una beca doctoral interna.

Farm. Pamela Mendioroz



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el 26/02/2024 , mereciendo la
calificación de 10 (sobresaliente).

Agradecimientos

Ninguna gota de lluvia cree haber causado el diluvio... Los miro a ustedes, y los responsabilizo (si la ley lo demandase) por la persona en que me he convertido.

A mis viejos, quienes me llevaron de la mano con paciencia y cariño interminable desde el primer día. Siempre conmigo, en el experimento de electrólisis del agua con los lápices que me ayudó a armar mi papá en quinto grado, durante las horas y horas de estudio de química con mi mamá para el ingreso en la uni. A la Tati, el pilar más robusto de mi vida, el que jamás flaqueó. A Tina, compañera de cucheta y aventuras, la hermana con título errado que me dio la vida. A mis tíos, mis segundos padres, acompañando desde que tengo uso de razón.

Nada llena el corazón como encontrar amistad en la familia que te vio crecer, excepto quizás encontrar familia en los amigos con quienes vamos creciendo.

A Lucho, mi hermano del alma, cocinero oficializado del hogar y el que escuchó mis frustraciones, mis desvaríos, mis alegrías. A Nym y Yuri, mis compañeras leales y maquinitas de desparramar pelos por toda la casa para darme una tarea con qué distraerme. A Peche, desde los viajes al arroyo hasta Bahía, sin escalas, probablemente en bici con vos pedaleando por ambos. A Andy, amigo de la vida y compañero de la química, siempre con un consejo cuando lo necesité y una peli de terror bajo la manga.

A Mariana, la primera persona que me abrió las puertas de su laboratorio y me brindó la chance de explorar este mundo. A Mara, quien me enseñó todo lo que sé sobre catálisis y me acompañó en cada paso del trabajo de tesis, brindándome tan generosamente su tiempo y guía. A Darío y Marcela, mis directores, que dieron el salto de fe, me enseñaron tanto y me permitieron ser parte de este proyecto. A Vivi, Romi y Juli, por las horas compartidas al calor de un termito de mate o té, discutiendo la química, discutiendo la vida.

A los que hicieron los días de trabajo más amenos cuando las cosas no salían, y con quienes disfruté compartir aquellos en los que iban mejor: Agus y Sabri, compañeritas del «A» y de charlas de diván; Sebas, guía en el inicio del trabajo de mesada y gurú de la música de los 80s; el Cholo, siempre listo para compartir un mate a mitad de una columna cromatográfica.

A cada uno de ustedes, mi más sincero agradecimiento. Este logro también es suyo, gotitas de lluvia, y cada paso en este viaje ha sido más significativo porque estaban ahí.

« Inexplicable, Warden. »

« Certainly not. Like everything else in this ridiculous conglomeration of cooling gas, it's perfectly explicable, I just need to explic-it. »

- Tamsyn Muir

Publicaciones asociadas a esta investigación

Artículos publicados en revistas indexadas

- Casoni, A. I., Mendioroz, P., Volpe, M. A., & Gutiérrez, V. S. (2020). Magnetic amendment material based on bio-char from edible oil industry waste. Its performance on aromatic pollutant removal from water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(2), 103559.
- Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Diez, A. S., & Gerbino, D. C. (2020). A green nanopalladium-supported catalyst for the microwave-assisted direct synthesis of xanthenes. *Synthesis*, 52(04), 619-628.
- Morini, M. A., Pedroni, V. I., Alarcon, L. M., Verde, A. R., Mendioroz, P., Appignanesi, G. A., & Sierra, M. B. (2020). Interaction of hydroxy-xanthenes with phosphatidylcholines: The effector decreases compressibility and increases the fluidity of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 231, 104938.
- Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Volpe, M. A., & Gerbino, D. C. (2021). Convenient One-Pot Synthesis of 9H-Carbazoles by Microwave Irradiation Employing a Green Palladium-Based Nanocatalyst. *Synthesis*, 53(21), 4048-4058.
- Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Castro, M. J., Volpe, M. A., & Gerbino, D. C. (2022). A Novel Palladium-Based Heterogeneous Catalyst for Tandem Annulation: A Strategy for Direct Synthesis of Acridones. *Synthesis*, 55(04), 692-706.
- Mendioroz, P., Pedroni V. I., Gerbino, D. C., & Morini, M. A. (2023). Unveiling a fresh Perspective: Volumetric Elasticity modulus in liposomal stability research (Trabajo enviado, *Chemistry and Physics of Lipids*).

Trabajos en eventos de ciencia y técnica publicados

- Mendioroz, P., Steingruber, H. S., Diez, A. S., Casoni, A. I., Gutiérrez, V. S., Gerbino, D. C., Volpe, M. A. Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd soportado sobre biocarbones. Argentina. La Plata. 2022. Revista. Artículo Completo. Conferencia.

XXII Congreso Argentino de Catálisis. Asociación Argentina de Investigación Físicoquímica.

- Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Volpe, M. A., Gerbino, D. C. Direct arylation-based synthesis of carbazoles using an efficient palladium nanocatalyst under microwave irradiation. Suiza. Electronic Conference. 2021. Libro. Artículo Breve. Conferencia. 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-24), doi: 10.3390/ecsoc-24-08314.
- Mendioroz, P., Casoni, A. I., Santander, J., Volpe, M. A., Gutiérrez, V. S. Obtención de biocarbones magnéticos mediante pirólisis de residuos agroindustriales. Adsorción de contaminantes en agua. Argentina. La Plata. 2019. Libro. Artículo Completo. Congreso. XXI Congreso Argentino de Catálisis. XX Congreso de Catálisis del Mercosur. Asociación Argentina de Investigación Físicoquímica.
- Mendioroz, P., Gerbino, D.C., Morini, M. A., Sierra, M. B., Pedroni, V., Appignanesi, G. Síntesis de xantonas bioactivas. Estudio físicoquímico de su interacción con membranas de fosfatidilcolinas. Argentina. San Luis. 2019. Libro. Resumen. Simposio. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica.
- Castro, M. J., Vazzana, J., Mendioroz, P., Volpe, M. A., Gerbino, D. C. Novedosa aproximación verde para la síntesis de chalconas. Argentina. Rosario. 2023. Libro. Resumen. Simposio. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica.
- Gonzalez, A., Mendioroz, P., Gerbino, D. C., Buitrago, C. G. Synthesis and evaluation of a xanthone analogue as a new Akt protein inhibitor in skeletal muscle cells. Argentina. Mar del Plata. 2023. Revista ISSN 1669-9106. Resumen. Congreso. LXVIII Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Abreviaturas

βA - Péptido beta amiloide	EI - Impacto electrónico
1-HX - 1-hidroxixantona	EP - Éter de petróleo
1,3-DHX - 1,3,-dihidroxixantona	FT-IR - Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier
1,3,6-THX - 1,3,6-trihidroxixantona	GAL - γ -alúmina
1H3PX - 1-hidroxi-3-preniloxixantona	GSS - Grover, Shah y Shah
1H3,6DPX - 1-hidroxi-3,6-dipreniloxixantona	m - Multiplete
3,6DEAB1HX - 3,6-bis(4-(dietilamino)butoxi)-1-hidroxi-9 <i>H</i> -xanten-9-ona	MAO A - Monoaminoxidasa A
3-HX - 3-hidroxixantona	MAO B - Monoaminoxidasa B
3PX - 3-preniloxixantona	MAOS - Síntesis orgánica asistida por microondas
AChE - Acetilcolinesterasa	mBC - Biocarbón magnético
AcOEt - Acetato de etilo	MLV - Liposomas multilamelares
AMP - Péptidos antimicrobianos	MSD - Desplazamiento cuadrático medio
APP - Proteína precursora del amiloide	NMP - <i>N</i> -metil-2-pirrolidina
BC - Biocarbón	PC - Fosfatidilcolina
br s - Señal ancha	PDI - Índice de polidispersidad
BuChE - Butirilcolinesterasa	PdNPs - Nanopartículas de paladio
CG-EM - Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas	PE - Fosfatidiletanolamina
COL - Colesterol	PG - Fosfatidilglicerol
d - Doblete	POPE - Palmitoiloleoil fosfatidil etanolamina
DEC - Dietilcarbonato	POPG - Palmitoiloleoil fosfatidil glicerol
DLS - Dispersión de luz dinámica	q - Cuarteto
DMA - Dimetilacetamida	RMN - Resonancia Magnética Nuclear
DMF - Dimetilformamida	ROS - Especies reactivas de oxígeno
DMPC - Dimiristoil fosfatidilcolina	s - Singulete
DMSO - Dimetilsulfóxido	SBET - Área de superficie específica
DPPC - Dipalmitoil fosfatidilcolina	SGAL - γ -alúmina sulfatada
DRX - Difracción de rayos X	t - Triplete
DSC - Calorimetría diferencial de barrido	TEM - Microscopía electrónica de transmisión
EE - Eficacia de encapsulamiento	TLC - Cromatografía de capa fina

Resumen

En el desarrollo de este trabajo de tesis, se construyeron una serie de estructuras heterocíclicas «privilegiadas» (acridonas, carbazoles y xantonas) y se exploraron diversas metodologías sintéticas con el fin de mejorar la eficacia para su acceso, basándose en los principios de la química verde y aprovechando las ventajas de una síntesis orgánica más eficiente y selectiva, además de las mejoras provistas desde una perspectiva operacional.

Con este propósito, una serie de catalizadores apropiados basados en nanopartículas de Paladio soportados sobre diferentes materiales (tales como BC y GAL) fueron producidos y caracterizados para cumplir su rol y técnicas de obtención alternativas, tales como el uso de calentamiento por microondas, fueron aplicadas de manera tal de obtener las entidades químicas de interés, que fueron posteriormente caracterizadas.

La unidad farmacofórica de interés, que cuenta con numerosas cualidades atribuidas a lo largo de los años, está compuesta del núcleo xantona al cual se realizaron una serie de funcionalizaciones específicas para cada caso en particular. La interacción fisicoquímica de estas estructuras fue analizada sobre bicapas lipídicas mediante diversas técnicas experimentales y computacionales, sea como efector en una membrana modelo biomimética, o como molécula a transportar dentro de un liposoma.

Los resultados se han utilizado para arrojar luz sobre el comportamiento de este tipo de compuestos dentro de diversos sistemas, en muchos casos brindando perspectivas novedosas a los mismos, en otros permitiendo descubrir nuevas aplicaciones para las técnicas de caracterización utilizadas.

Abstract

In the development of this thesis, a series of privileged heterocyclic scaffolds were constructed (acridones, carbazoles and xanthenes), and several synthetic methodologies were explored in order to improve efficacy in their access based on the principles of green chemistry and taking on the advantages of a more efficient and selective organic synthesis, besides the improvements provided from an operational perspective.

To achieve this goal, a set of suitable catalysts based on Palladium nanoparticles supported on different materials (such as BC and GAL) were produced and characterized to play their role. Alternative methods of obtaining these chemical entities, such as microwave heating, were applied to efficiently synthesize the desired compounds, which were subsequently characterized.

The pharmacophoric unit of interest, possessing numerous attributes accumulated over the years, comprises the xanthone core, subject to specific functionalizations tailored for each particular case. The physicochemical interaction of these structures was analyzed on lipid bilayers through various experimental and computational techniques, either as effectors in a biomimetic model membrane or as molecules transported within a liposome.

The results have been used to shed light on the behavior of this type of compound in diverse systems, often providing novel perspectives, or even affording a new application for the characterization techniques utilized.

Tabla de Contenidos

Prefacio.....	ii
Agradecimientos	iv
Publicaciones asociadas a esta investigación.....	vi
Artículos publicados en revistas indexadas.....	vi
Trabajos en eventos de ciencia y técnica publicados	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Tabla de Contenidos	xi
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1 Síntesis de heterociclos	1
1.1.1 Definición y aplicaciones	1
1.1.2 Catálisis heterogénea	4
1.1.3 Métodos no convencionales	8
1.2 Xantonas.....	11
1.2.1 Estructuras privilegiadas	11
1.2.2 Usos en farmacología	19
1.2.3 Desafíos actuales.....	23
1.3 Liposomas	26
1.3.1 Generalidades	26
1.3.2 Modelo de membrana biológica	31
1.3.3 Transportadores de drogas	32
1.4 Objetivos.....	34
1.4.1 Objetivos generales.....	34

1.4.2	Objetivos específicos.....	34
Capítulo 2:	Técnicas de obtención del andamiaje carbazol.....	35
2.1	Estado del arte.....	35
2.2	Nueva ruta sintética.....	43
2.3	Materiales y métodos.....	51
Capítulo 3:	Técnicas de obtención del andamiaje acridona.....	57
3.1	Estado del arte.....	57
3.2	Nueva ruta sintética.....	64
3.3	Materiales y métodos.....	77
Capítulo 4:	Técnicas de obtención del andamiaje xantona.....	84
4.1	Estado del arte.....	84
4.2	Nueva ruta sintética.....	98
4.3	Materiales y métodos.....	107
Capítulo 5:	Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo.....	112
5.1	Derivados hidroxilados de xantona sobre membranas modelo de DPPC y DMPC.....	112
5.1.1	Introducción.....	112
5.1.2	Materiales.....	120
5.1.3	Métodos.....	122
5.1.4	Discusión.....	125
5.1.5	Resultados.....	Error! Bookmark not defined.
5.2	Derivados anfífilos de xantona sobre membranas modelo bacterianas.....	143
5.2.1	Introducción.....	143
5.2.2	Materiales.....	149
5.2.3	Métodos.....	150

5.2.4	Discusión.....	150
5.2.5	Resultados	Error! Bookmark not defined.
Capítulo 6: Derivados <i>O</i> -prenilados de xantona en liposomas de DPPC y COL.....		154
6.1	Introducción.....	154
6.2	Materiales.....	158
6.3	Métodos	161
6.4	Discusión.....	163
6.5	Conclusiones	177
Capítulo 7: Conclusiones generales.....		178
Referencias		180
Apéndice: Espectros RMN		199
1.	Carbazoles	199
2.	Acridonas.....	221
3.	Xantonas.....	247

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Síntesis de heterociclos

1.1.1 Definición y aplicaciones

Las estructuras de tipo heterocíclico se encuentran profundamente vinculadas a transformaciones bioquímicas y biofísicas que permiten los procesos fundamentales para la existencia de los seres vivos. Desde proveer la base de ensamblaje a la estructura capaz de llevar en sus hombros el oxígeno que alimenta las células, hasta conformar las palabras a través de las que dos células en dos hemisferios distintos de un sistema biológico se comunican, las moléculas heterocíclicas son una de las columnas que sostienen el desarrollo y mantenimiento de la vida.

Un ejemplo de un heterociclo de origen natural que ha sido utilizado durante siglos por sus propiedades medicinales es la artemisinina, o *qinghaosu*. Este compuesto es un sesquiterpeno lactona con un enlace endoperóxido que se encuentra en la planta *Artemisia annua*, conocida comúnmente como ajeno dulce (Figura 1.1). La artemisinina ha sido utilizada tradicionalmente en China para tratar la fiebre, y en la década de 1970 se descubrió que también tiene propiedades antipalúdicas muy potentes.



Figura 1.1. Artemisinina obtenida de la planta *Artemisia annua*.

Cuando se comenzó una investigación para buscar solución al inmenso número de soldados que habían contraído malaria durante la Guerra de Vietnam y la Gran Revolución Cultural

Proletaria, Tu You-You, una científica, médica y farmacéutica china, lideró la investigación que llevó al descubrimiento de la actividad antipalúdica de la artemisinina. Extrayendo la información de relevancia en gran parte de antiguos textos sobre medicina tradicional, Tu trató a los enfermos de la Isla de Hainan con diversos extractos de plantas, incluido el de la especie *Artemisia annua*. El estudio de sus propiedades sobre parásitos, luego del compuesto aislado sobre ratones y, finalmente sobre humanos, fue exitoso y comprobó que habían descubierto un fármaco efectivo contra la malaria.

Sus investigaciones le valieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2015. El descubrimiento de la actividad antipalúdica de la artemisinina llevó al desarrollo de una nueva clase de medicamentos antipalúdicos, conocidos como terapias de combinación de artemisinina, ampliamente utilizada en la actualidad.

En el caso de los heterociclos tricíclicos fusionados, en particular, tratamos con compuestos orgánicos que contienen tres anillos fusionados de forma lineal o angular, donde al menos uno de ellos es un anillo heterocíclico, es decir, que contiene un heteroátomo en su estructura. Estos compuestos tienen una amplia variedad de propiedades biológicas conocidas a la fecha.

Existen numerosos ejemplos, muchos de los cuales datan de siglos de historia, del uso de fuentes naturales de heterociclos en el tratamiento de afecciones. Hoy en día el campo de desarrollo se ha ampliado e incluye numerosas aplicaciones no sólo en la química medicinal, sino también en la síntesis de materiales.

Los heterociclos tricíclicos fusionados poseen una serie de propiedades físicas y químicas únicas de interés. En algunos casos, existe una tendencia a que posean una elevada estabilidad térmica, haciéndolos excelentes candidatos en la síntesis de materiales resistentes al calor y como ligandos en catálisis asimétrica a alta temperatura.^{1,2} La presencia de heteroátomos también puede conferir propiedades electrónicas especiales en procesos que requieran donar o aceptar electrones. Sumado a ello, la combinación de diferentes bloques de construcción π -conjugados en los materiales orgánicos los hace candidatos atractivos para su aplicación en materiales para OLEDs.³ De igual manera, compuestos heteroaromáticos π -conjugados policíclicos son de gran interés para los estudios fundamentales de propiedades moleculares y para aplicaciones potenciales en diversos

dispositivos electrónicos, así como para su utilización como sondas fluorescentes.⁴ Si bien se hace mención sólo a algunas de las muchas cualidades y aplicaciones, para abordar el tema de mayor interés en el desarrollo de esta tesis, haremos hincapié sobre su actividad biológica y su potencial farmacológico.

Muchos de estos compuestos pueden ser obtenidos de fuentes naturales, con lo que sus derivados sintéticos o semisintéticos poseen un elevado potencial desde el punto de vista de la actividad y biocompatibilidad. Esto, sumado a la versatilidad química que estos núcleos confieren, los hace extremadamente útiles en la síntesis de compuestos farmacéuticos (Figura 1.2) para el tratamiento de enfermedades de un rango tan amplio que va desde distintos tipos de carcinomas⁵ y enfermedades infecciosas⁶ al tratamiento de convulsiones⁷ y procesos inflamatorios,⁸ entre otras.⁹

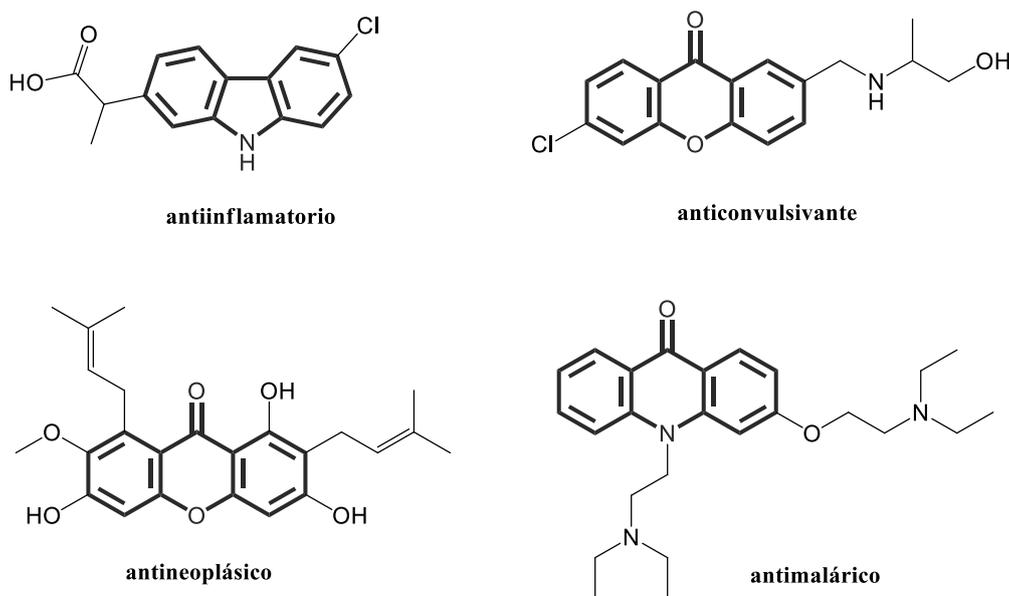


Figura 1.2. Ejemplos seleccionados de heterociclos fusionados con acción terapéutica.

Si bien existen numerosas ventajas en el uso de compuestos naturales en el tratamiento de síntomas e incluso para su uso curativo, este tipo de moléculas suelen traer aparejados una serie de efectos secundarios indeseables y la posibilidad de escalar su producción suele estar notoriamente condicionada. La modernización en las metodologías de adquisición de productos naturales ha logrado disminuir e incluso se ha conseguido hacer desaparecer muchos de los problemas – tales como efectos indeseables o baja solubilidad – que solían acarrear las moléculas naturales, mediante su modificación química. Una alternativa que gana

terreno es la generación de moléculas nuevas, derivadas o con andamiajes similares, que se alteran de acuerdo con sistemas de síntesis racional y predicciones llevadas a cabo mediante simulaciones que pueden realizarse por dinámica molecular o *docking*.

De esta forma, cobra aún mayor relevancia la síntesis orgánica como método de obtención de compuestos bioactivos. Si bien la extracción de sustancias naturales ha sido el camino tradicional para acceder a estas moléculas, la síntesis orgánica ofrece un conjunto de beneficios que no solo agilizan y facilitan el proceso, sino que también abren nuevas posibilidades en la obtención de derivados y análogos con propiedades mejoradas.

Una de las principales ventajas consiste en la capacidad de diseñar y adaptar estructuras moleculares según las necesidades específicas, permitiendo la modificación y optimización de los compuestos para diferentes aplicaciones. La creación de análogos y derivados estructurales conduce a la obtención de compuestos con propiedades mejoradas, mayor actividad biológica, menor toxicidad o mayor selectividad a una diana específica. Además, este enfoque permite la producción de cantidades más significativas de los compuestos deseados, lo que resuelve el problema de la disponibilidad limitada que a menudo se encuentra en la extracción de compuestos naturales.

Otra ventaja clave radica en la pureza de los productos sintéticos obtenidos. La síntesis orgánica proporciona compuestos de mayor pureza y homogeneidad, lo que facilita su caracterización y garantiza una mayor reproducibilidad de los resultados en comparación con la variabilidad inherente a los extractos naturales. Esta flexibilidad y personalización son factores cruciales en la búsqueda de nuevas moléculas para tratamientos médicos y aplicaciones industriales.

1.1.2 Catálisis heterogénea

La catálisis es un fenómeno fundamental en la química con un papel crucial en procesos industriales y biológicos. En esencia, se trata de un proceso que acelera la velocidad de una reacción química al proporcionar una ruta alternativa con menor energía de activación. Esto se logra mediante la presencia de una sustancia conocida como catalizador, que participa en la reacción sin ser consumido en el proceso.

Desde la perspectiva de la fase en que se encuentra el catalizador y los reactivos, la catálisis se clasifica en homogénea, si ambos componentes se encuentran en la misma fase, y heterogénea, si se encuentran en fases distintas. Esta última forma de catálisis presenta diversas ventajas que la convierten en una técnica de gran importancia en la investigación científica, tales como su versatilidad y aplicabilidad en una amplia gama de industrias.

El catalizador heterogéneo, si bien no cuenta con la posibilidad de mezclarse tan íntimamente con los reactivos como su contraparte, destaca por su capacidad de conferir selectividad y eficiencia, dirigiendo reacciones químicas hacia los productos deseados y minimizando la formación de subproductos indeseables. Suele tratarse, además, de catalizadores robustos capaces de adaptarse a diferentes condiciones de temperatura y presión que pueden utilizarse en múltiples ciclos de reacción sin perder su actividad, aumentando la eficiencia del proceso. No menor es la ventaja que confiere la facilidad de separación de los productos de la reacción, al encontrarse el catalizador en una fase diferente a los reactivos y productos, simplificando los pasos de purificación y recuperación, y reduciendo tanto los costos como el impacto ambiental del proceso.

Los beneficios de la catálisis heterogénea en términos de selectividad, eficiencia y facilidad de separación y el desarrollo de nuevos materiales catalíticos, así como la comprensión de sus mecanismos de reacción, abren aún más posibilidades para optimizar procesos químicos, reducir costos y minimizar el impacto ambiental.

En la catálisis heterogénea, las reacciones que ocurren en una superficie sólida siguen una secuencia de pasos fundamentales que influyen en la velocidad de reacción. En primer lugar, los reactivos deben difundir desde la fase fluida hacia la superficie del sólido. Este proceso de difusión es crucial para que los reactivos alcancen los sitios activos del catalizador y puedan participar en la reacción química.

Desde la perspectiva del catalizador, tanto la cantidad como la disponibilidad de sitios reactivos debe ser optimizada, y esto se encuentra en íntima relación con el área superficial del soporte y la efectividad del proceso de inclusión de la fase activa, en caso de no ser parte integral del soporte en sí. La capacidad de un catalizador de contener numerosos sitios activos suele implicar la utilización de materiales altamente porosos como forma de aumentar el área

superficial. Una mayor área disponible va en acuerdo con una mayor dispersión de la fase activa y, por ende, una mayor actividad.

Sin embargo, debe considerarse que un soporte capaz de contener mayor cantidad de sitios activos, no necesariamente los presenta al reactivo que los requiere. Los materiales presentan porosidades de distintos tamaños y niveles de tortuosidad, y la capacidad del reactivo de recorrer estos poros eficientemente para alcanzar los sitios activos, y una vez transformados, volver a través de estos a la fase fluida, es otra de las variables a considerar en la optimización de un catalizador (Figura 1.3).

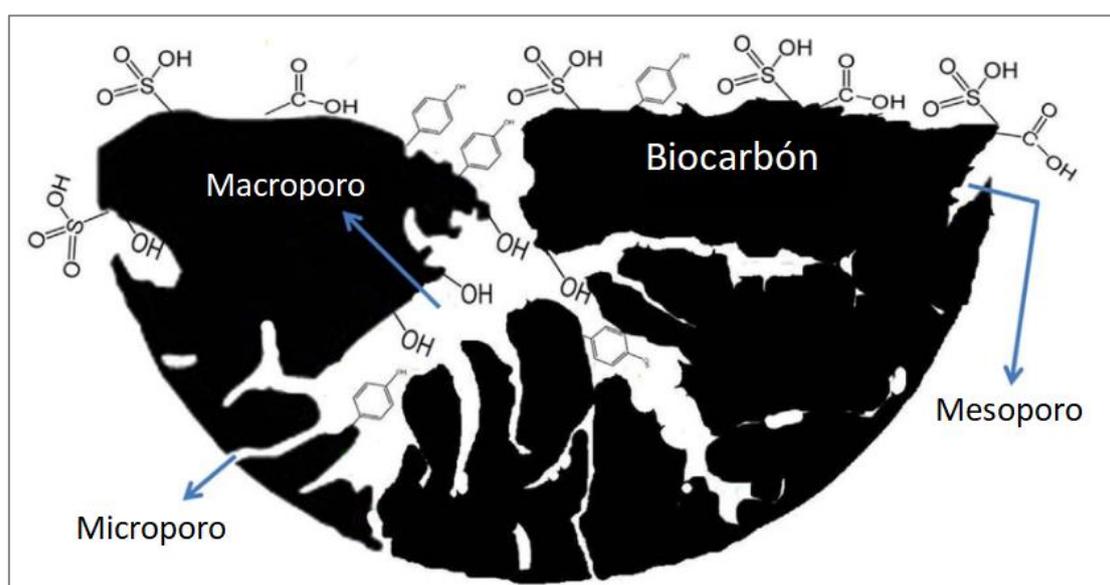


Figura 1.3. Soporte, ejemplo de biocarbón genérico y características de superficie, con algunos grupos funcionales, y porosidad de diversos tipos. Copyright (2017) Elsevier Ltd.

Una vez que los reactivos se encuentran en la superficie del sólido, ocurre la quimi-adsorción o fisi-sorción, en que los reactivos se unen a los sitios activos. Esta etapa es esencial para la formación de complejos intermedios que conducen a la reacción química deseada, por lo que resulta necesario contar con un catalizador que contenga en su superficie grupos funcionales capaces de interactuar con los reactivos de manera adecuada, de tal forma de atraerlos y contenerlos, pero capaz de permitir su liberación tras la transformación química. Si los reactivos o el producto de interés se relacionan muy fuertemente o de manera irreversible con la superficie del catalizador, los rendimientos decrecen por disminución de la cantidad de reactivos o retención del producto, y el catalizador se contamina y pierde actividad.

Al momento de la reacción propiamente dicha, los reactivos adsorbidos reaccionan entre sí para formar productos, que una vez transformados en la superficie, es necesario se desorban y abandonen el catalizador. Este proceso de desorción permite la liberación de los productos hacia la fase fluida. Por último, los productos desorbidos deben difundir desde la superficie del sólido hacia la fase fluida circundante. Esta difusión de productos completa el ciclo de la reacción y permite que los productos sean transportados y recolectados.

Es importante tener en cuenta que el paso más lento será el determinante de la velocidad global de la reacción. Por lo tanto, la optimización de cada etapa, desde la difusión de reactivos hasta la difusión de productos, es fundamental para mejorar la eficiencia. Este enfoque secuencial de los pasos involucrados en una reacción en la superficie sólida proporciona una comprensión más profunda de los mecanismos de catálisis y permite diseñar estrategias para mejorar la actividad y selectividad de los catalizadores heterogéneos.

En reacciones de acoplamiento en síntesis orgánica, el empleo de catalizadores heterogéneos resulta una alternativa atractiva, dadas las ventajas relacionadas con la economía atómica, los principios de la química verde y otras cuestiones prácticas y económicas. Además, se minimiza la contaminación del producto con trazas de metales originadas por el empleo de catalizadores homogéneos,¹⁰ algo de extrema relevancia en la producción de compuestos a ser utilizados en la industria farmacéutica.

El diseño de catalizadores heterogéneos es un área dinámica en la que convergen diferentes disciplinas científicas y tecnológicas. Al combinar los conocimientos de química, ingeniería y ciencia de materiales, se logra optimizar la actividad catalítica y mejorar el diseño. Este enfoque multidisciplinario permite desarrollar catalizadores heterogéneos cada vez más eficientes y selectivos, y optimizar los procesos para que sean a su vez más eficientes y sostenibles. La elección cuidadosa del soporte, por lo general materiales refractarios altamente porosos, y el desarrollo de métodos de preparación efectivos son elementos clave para lograr catalizadores de alto rendimiento.

A lo largo del desarrollo de esta tesis se han generado, caracterizado y aplicado en diferentes procesos de síntesis una serie de nuevos catalizadores heterogéneos para la reacción de acoplamiento cruzado mediante C-H activación. Uno de ellos tiene como soporte una forma de γ -alúmina modificada a través de tratamiento ácido. En los otros dos, el soporte es un

biocarbón que proviene de la pirólisis de biomasa. La biomasa en cuestión proviene de un desecho agroindustrial muy abundante en la zona, como lo es la cáscara de girasol, con lo cual se le brinda valor agregado por dos vías al pirolizarlo. El sólido resultante es utilizado como soporte verde y el bio-oil, puede ser utilizado en numerosas formas y refinado.

El metal soportado es en todos casos es el paladio, el cual se incorpora por método de co-precipitación a los respectivos soportes. La debida caracterización para cada uno de los catalizadores resultantes será informada a lo largo de la presente tesis.

1.1.3 Métodos no convencionales

Durante casi dos siglos, la práctica y los métodos de síntesis orgánica han permanecido en gran medida inalterados. Si bien la instrumentación analítica moderna ha acelerado la acumulación de resultados y ha permitido trabajar con pequeñas cantidades de materiales, la ejecución física de los experimentos ha experimentado pocos avances. Las reacciones aún se realizan en balones de vidrio convencionales, seguidas de procesos habituales de purificación.

En contraste, disciplinas como la biología molecular y la genómica han experimentado cambios paradigmáticos notables en sus metodologías. Sin embargo, la síntesis orgánica de moléculas complejas ha presenciado una limitada desviación de enfoques tradicionales en las últimas cinco décadas.

Aunque los métodos convencionales siguen siendo predominantes, han surgido varias técnicas alternativas que ofrecen nuevas posibilidades para la síntesis orgánica. Esta sección tiene como objetivo explorar estos métodos «no convencionales», proporcionando una breve visión general de la literatura y discusión sobre el estado actual del arte en el campo.

Uno de estos métodos no convencionales implementa el uso del ultrasonido. La síntesis orgánica asistida por ultrasonido, o sonocatálisis, aprovecha las ondas de ultrasonido de alta frecuencia para generar cavitación y condiciones extremas de presión y temperatura en el medio de reacción. Esto facilita la activación de enlaces químicos y acelera las reacciones, lo que ha encontrado aplicaciones en la síntesis de compuestos heterocíclicos y en la activación de enlaces carbono-heteroátomo.

La mecanoquímica es otro enfoque innovador. Esta técnica utiliza fuerzas mecánicas, como la molienda, para promover reacciones químicas. Al evitar el uso de solventes y realizar reacciones en estado sólido se reduce el impacto ambiental, con ventajas en términos de selectividad y escalabilidad.

La fotoquímica es otro método no convencional que utiliza la energía lumínica para desencadenar reacciones químicas. Esta técnica ofrece un control preciso sobre la activación de enlaces y la selectividad en las reacciones. La fotoquímica se ha utilizado con éxito en la síntesis de moléculas complejas, como productos naturales y compuestos farmacéuticos, y ha ampliado su alcance gracias a los avances en la catálisis fotoredox.

Otro método no convencional, uno de particular interés para nuestro trabajo, es el calentamiento por microondas. El uso de irradiación microondas ha revolucionado la síntesis orgánica al permitir un calentamiento rápido y uniforme de las reacciones. Esta técnica ofrece un control preciso sobre las condiciones de reacción, lo que resulta en tiempos de reacción reducidos y una considerable mejora de los rendimientos a través de un aumento de la selectividad. El calentamiento por microondas ha demostrado su eficacia en la síntesis de productos naturales complejos, compuestos farmacéuticos y materiales funcionales. Esta metodología cuenta con numerosas ventajas, tales como una mayor velocidad de reacción, menor consumo de solventes y la posibilidad de llevar a cabo reacciones en fase sólida.

Estos enfoques representan un cambio significativo en la forma en que se lleva a cabo la síntesis orgánica y ofrecen oportunidades interesantes para futuras investigaciones y aplicaciones en este campo.

A diferencia de los métodos convencionales de calentamiento, que transmiten calor a través de conducción o convección, el calentamiento por microondas se basa en la aplicación directa de energía electromagnética en forma de microondas a la muestra. La interacción selectiva de las microondas con las moléculas orgánicas provoca un calentamiento rápido y uniforme, generando condiciones de reacción altamente controladas. Este enfoque permite llevar a cabo reacciones a temperaturas más bajas, lo que resulta en la formación selectiva de productos deseados y la minimización de reacciones secundarias no deseadas.

En los capítulos 2, 3 y 4 de esta tesis, se explorará en mayor detalle la irradiación por microondas como una herramienta poderosa en la síntesis orgánica, acoplado al uso de catálisis heterogénea, cuyas bondades ya han sido discutidas. Se presentarán ejemplos de reacciones clave en las que se ha aplicado esta metodología, así como los potenciales mecanismos subyacentes.

1.2 Xantonas

1.2.1 Estructuras privilegiadas

Las xantonas son un grupo de compuestos con un núcleo dibenzo- γ -pirona, siendo estos dos anillos bencénicos los responsables de su versatilidad química al permitir la sustitución de sus hidrógenos por una amplia variedad de grupos funcionales (Figura 1.4). Se han destacado en los últimos años debido a la extensa gama de actividades biológicas que se les ha adjudicado, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, ¹¹⁻¹³ antimicrobianas ¹⁴ y antihipertensivas. ¹⁵

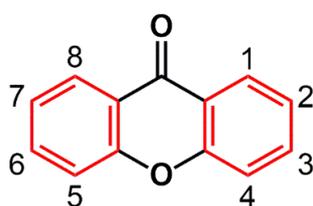


Figura 1.4. Esqueleto xantona y numeración.

Estas propiedades se han atribuido a su «estructura molecular privilegiada», un concepto introducido por Evans y colaboradores ¹⁶ en referencia a fragmentos rígidos que pueden independizarse como subunidades estructurales simples de gran afinidad por dianas biológicas y potencial farmacofórico. ^{17,18} Esta cualidad única, propia de subunidades destacadas, sería la responsable de la interacción selectiva con diferentes proteínas y enzimas, tales como la proteína cinasa C (PKC), ¹⁹ la glicoproteína de la espícula del virus SARS-CoV-2, ²⁰ el receptor nuclear alfa activado por el proliferador de peroxisomas (NR1C1), ²¹ la enzima interconversora de angiotensina II, ²² entre otros. No sólo poseen una función selectiva sobre una diana, lo cual las hace potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades específicas, sino que la selectividad les brinda la ventaja de tener disminuidos efectos secundarios al no interactuar con dianas secundarias, y una mejorada disponibilidad al no perderse compuesto en otras rutas metabólicas.

Numerosas xantonas naturales pueden ser encontradas como metabolitos secundarios en plantas superiores, con rutas biosintéticas y estructuras muy similares a las de los flavonoides. Poseen una amplia variedad de funciones en las plantas, incluyendo la protección contra los rayos UV y la inhibición de ciertas enzimas que pueden dañar a sus células. Por lo general,

estas funciones innatas dentro de las plantas que las producen suelen brindar una idea de su potencial como fármaco al introducirlas en un sistema biológico diferente, y es importante tenerlas como referencia a la hora de hacer estimaciones preliminares. Un ejemplo claro es el de *Garcinia mangostana*, un árbol tropical originario del sudeste asiático también conocido como mangostán, que produce una fruta cuyo pericarpio contiene una xantona prenilada llamada α -mangostina, con reconocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias ²³ (Figura 1.5).

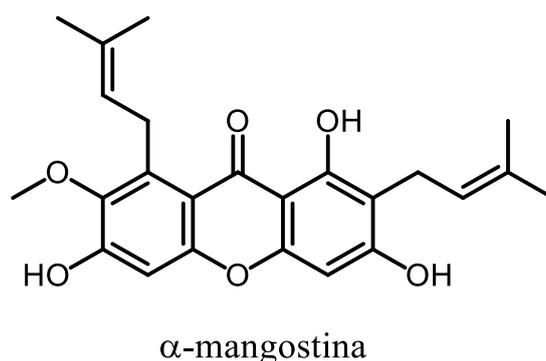


Figura 1.5. Estructura de una xantona destacada con múltiples propiedades farmacológicas.

Desde de la perspectiva de la síntesis orgánica, el acceso a compuestos de tipo xantona en particular, y a varios heterociclos tricíclicos fusionados en general, tales como acridonas y carbazoles, requiere que dos tipos de enlaces sean generados. Las reacciones de acoplamiento cruzado son quienes dirigen la formación de enlaces carbono-carbono (C-C) y carbono-heteroátomo (C-X). En las mismas se accede catalíticamente, por lo general a través de un metal de transición, a la formación de nuevos enlaces de este tipo a partir de una especie nucleófila (**Nu**) y una especie electrófila (**E**), con eliminación de un fragmento que suele de ser de naturaleza inorgánica (Figura 1.6).

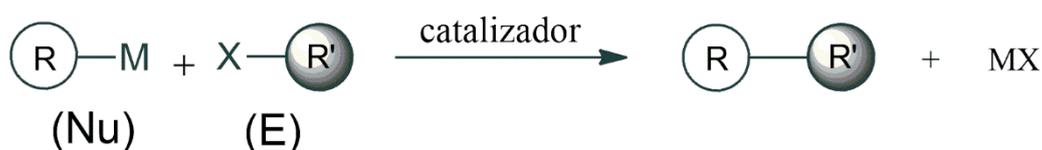


Figura 1.6. Esquema de una reacción de acoplamiento cruzado.

En el acoplamiento cruzado tradicional, se utilizan compuestos orgánicos con grupos funcionales preexistentes (como haluros orgánicos o derivados de organoboranos) como

sustratos y un ligando o aditivo apropiado, junto a un catalizador metálico. El mismo se une a los grupos funcionales del sustrato y los activa para su acoplamiento con un segundo sustrato, formando así el producto deseado. Se trata de una técnica robusta que cuenta con varios referentes en esta forma de adquisición de productos, tales como Heck, Suzuki-Miyaura, Sonogashira, Negishi, Hiyama y Buchwald-Hartwig.²⁴

Por otro lado, en el acoplamiento cruzado mediante C-H activación, se activan los enlaces C-H de los sustratos de manera directa mediante la coordinación con un catalizador metálico, lo que permite su acoplamiento con el segundo sustrato. Dado que el enlace carbono-hidrógeno - tanto en alcanos, como en arilos - posee una reactividad muy baja asociada a la elevada energía requerida para su ruptura, las condiciones de reacción necesarias deberían ser bastante agresivas. Sin embargo, el metal de transición permite que este proceso tenga lugar de forma más afable.

Existen dos mecanismos fundamentales a través de los cuales logra la activación de enlaces C-H. El primero de ellos implica la inserción de un enlace C-H en el ligando de un metal de transición, y se conoce como mecanismo de esfera externa. El segundo mecanismo consiste en la coordinación del enlace C-H con el metal, lo que da lugar a la formación de un complejo organometálico, denominado mecanismo de esfera interna. Los mecanismos de esfera interna tienen lugar a través de tres procesos principales: adición oxidante, metátesis de enlace sigma y activación electrófila (Figura 1.7).

En este proceso, los sustratos no requieren grupos funcionales preexistentes para la reacción, lo que permite una mayor versatilidad en la síntesis de compuestos orgánicos complejos, al mismo tiempo que se optimiza la síntesis desde una perspectiva económica y ecológica al reducir la cantidad de pasos requeridos, la cantidad y variedad de sustratos, y se optimiza la economía atómica, e incluso la severidad de las condiciones de reacción utilizadas.

Mecanismo de Esfera Interna

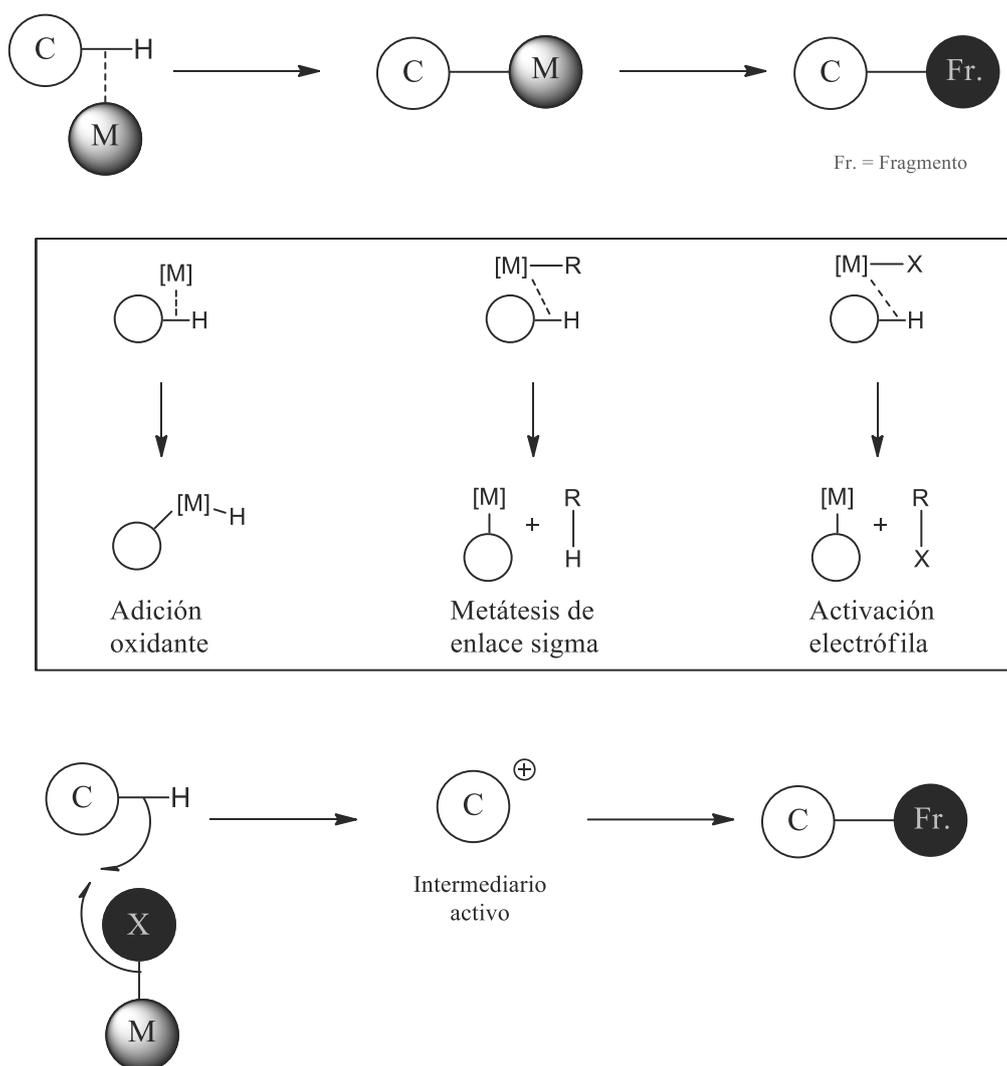
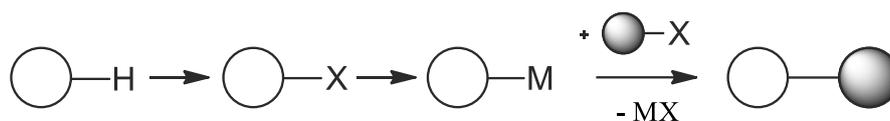


Figura 1.7. Esquema ilustrativo de formas de C-H activación.

En reacciones de acoplamiento cruzado mediante C-H activación se utilizan dos sustratos orgánicos con grupos funcionales compatibles con el catalizador metálico, tales como haluros, triflatos o boronatos. Al someterse a las condiciones apropiadas, el catalizador actúa como mediador entre los dos sustratos permitiendo la transferencia de un fragmento en una serie de etapas. Primero, el catalizador se coordina con el sustrato que contiene el grupo funcional compatible. El segundo sustrato, que contiene el grupo funcional complementario, se coordina al complejo de metal activado. En la última etapa, el catalizador promueve la formación del enlace C-C o C-X entre ambos sustratos, resultando en la formación del producto deseado (Figura 1.8).

Acoplamiento cruzado tradicional



C-H activación/funcionalización

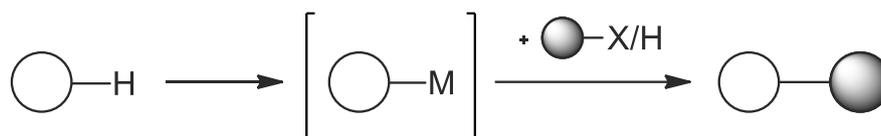


Figura 1.8. Acoplamiento cruzado tradicional y con C-H activación.

En su gran mayoría, reacciones de este tipo proceden mediante catálisis homogénea, y en muchos casos utilizando paladio como metal catalítico. Algunos de los problemas más comunes que surgen de reacciones de acoplamiento cruzado son la necesidad de condiciones de reacción bastante drásticas, así como una pre-funcionalización de reactivos. Suele darse la formación de subproductos con la resignación que implica en la optimización de la economía atómica, y en la mayoría de los casos se debe lidiar con el requerimiento de ligandos o aditivos tales como fosfinas, que son compuestos no sólo tóxicos, sino también de un costo considerable.

El uso de catalizadores de tipo homogéneo acarrea habitualmente la desventaja de la baja o nula posibilidad de recuperación. Una forma de evadir este tipo de inconvenientes en el desarrollo del trabajo metodológico consiste en el uso de dos estrategias: síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS) y catálisis heterogénea.

La síntesis orgánica de xantonas, que son los compuestos de nuestro mayor interés, es un área activa de investigación debido a la importancia biológica de estas moléculas. Se han desarrollado varios métodos sintéticos para la preparación de xantonas, incluyendo los métodos de síntesis tradicionales y más novedosos.²⁵

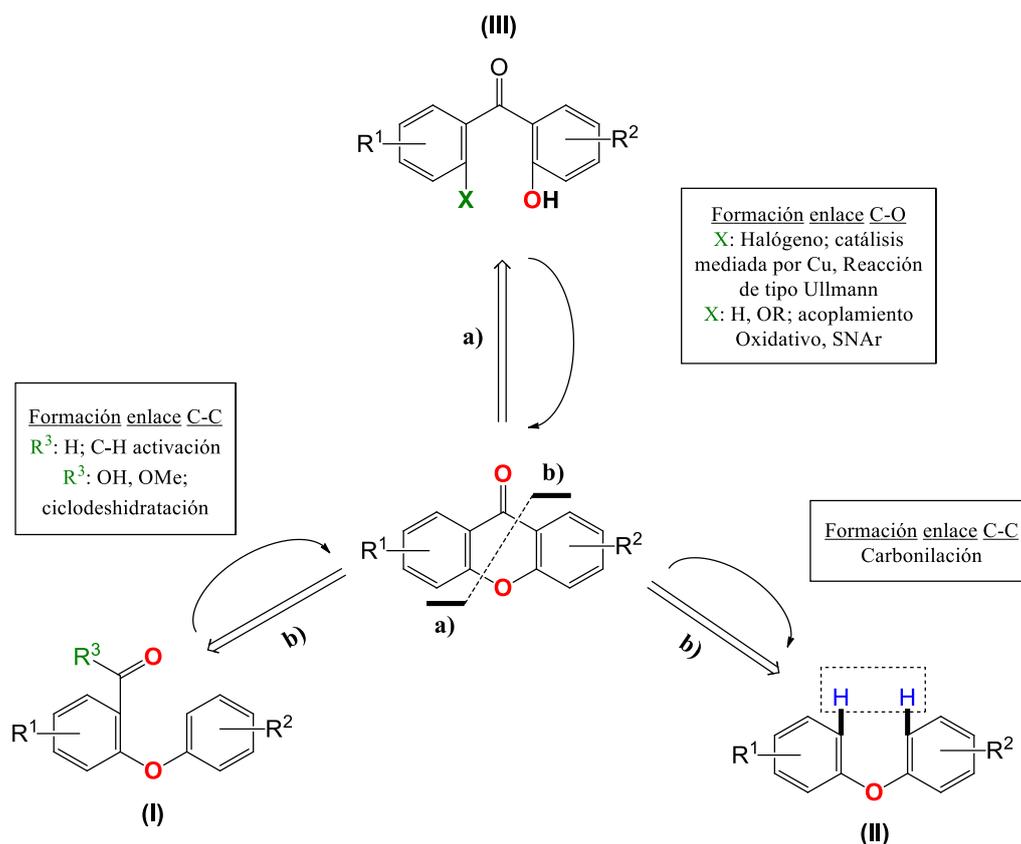


Figura 1.9. Esquema retrosintético y alternativas de acceso a xantonas.

El esquema retrosintético (Figura 1.9) permite vislumbrar un mapeo general de las metodologías de acceso a este tipo de andamiajes mediante diversos precursores. Por un lado, se encuentran los diariléteres de las **rutas b)** y, por otro, la dibenzofenona en la **ruta a)**. En el primer caso, a partir de **I**, el núcleo γ -pirona se forma mediante la acilación intramolecular que requiere el uso de agentes deshidratantes tales como el reactivo de Eaton, ácido polifosfórico, o ácido sulfúrico. De forma alternativa, rutas que requieren una doble C-H activación y carbonilación a partir del diariléter **II** han sido logradas con la utilización de catalizadores de paladio.²⁶ El cierre intramolecular que conduce a la formación C-O a partir de benzofenonas como **III** puede tener lugar bajo catálisis mediada por Cu, acoplamientos oxidantes o sustitución nucleofílica aromática intramolecular.²⁷

Un objetivo altamente atractivo en estos casos es la síntesis de tipo *one-pot*, ya que permite simplificar la síntesis, mejorar la economía atómica y, en algunos casos, optimizar la sostenibilidad ambiental mediante la optimización de las condiciones de reacción.

Este tipo de metodología ha sido objeto de interés en la comunidad científica durante muchos años debido a su eficiencia y simplicidad. De hecho, esta estrategia sintética se ha utilizado desde la antigüedad, aunque de forma empírica, para la síntesis de productos naturales. Un ejemplo interesante de esto es la síntesis de la aspirina, descubierta por Felix Hoffmann en 1897. Hoffmann utilizó una síntesis *one-pot* para obtener ácido acetilsalicílico a partir de ácido salicílico y anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico como catalizador.²⁸

En la actualidad, se ha convertido en una técnica muy utilizada en la síntesis orgánica y en la preparación de compuestos bioactivos. En particular, en la síntesis de xantonas, esta estrategia ha sido muy exitosa, con una alta eficiencia y excelentes rendimientos.

Existen diversas alternativas de síntesis *one-pot* para la formación de esqueletos xantónicos haciendo uso de arenos sustituidos, como se observa en la Figura 1.10, donde destaca el método tradicional de Grover, Shah y Shah (GSS)²⁹ debido a su robustez y simplicidad. GSS (**ruta 1**) permite obtener hidroxixantonas a partir de ácidos salicílicos y derivados de fenoles, en presencia de cloruro de zinc y oxiclorigenato de fósforo.

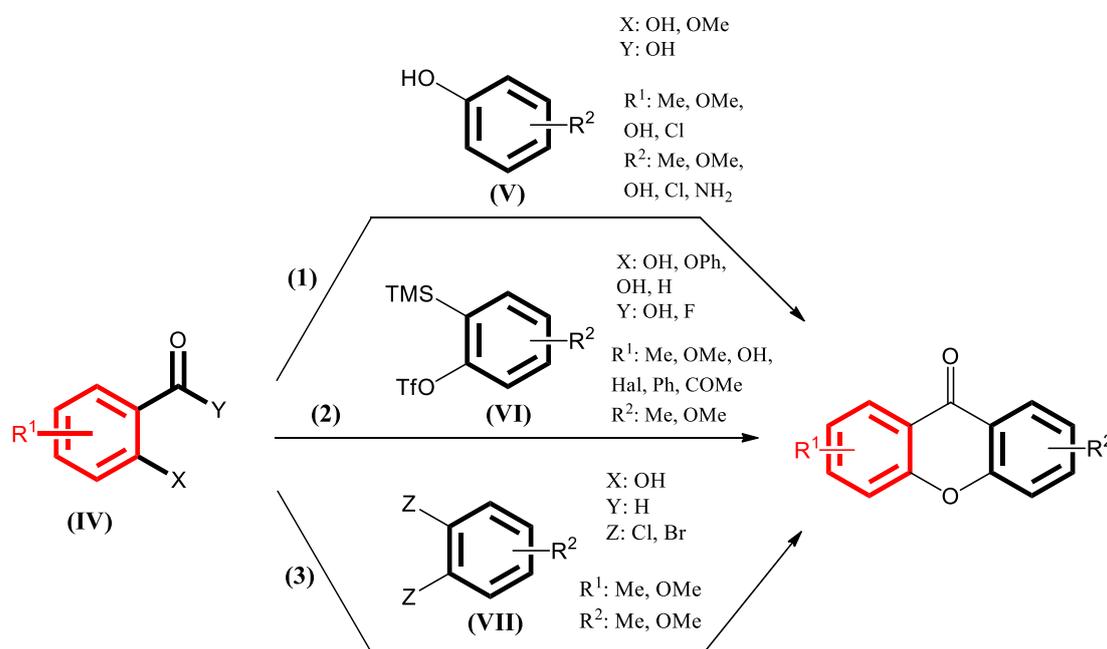


Figura 1.10. Síntesis one-pot de xantonas.

En el año 2005, se reportó la síntesis de xantonas directamente a partir de salicilatos de bencilo o metilo y trimetilsililariltriflatos por Larock y colaboradores (**ruta 2**).³⁰ Esta ruta

utiliza una estrategia en dos pasos en que se genera un intermediario arino altamente reactivo en presencia de fluoruro de cesio. Posteriormente, se lleva a cabo el acoplamiento nucleofílico intramolecular con el salicilato correspondiente y anulación electrofílica regioselectiva, que conduce a la formación del esqueleto xantónico.

La última de las alternativas presentadas corresponde a la ruta propuesta por Wang y Den^{31,32} en la que se emplean salicilaldehídos y 1,2-dihaloarenos en presencia de catalizadores homogéneos de Pd (**ruta 3**). Esta metodología permite la anulación directa entre los compuestos de partida, generando selectivamente el esqueleto xantónico en una sola etapa.

Otras opciones incluyen la utilización de benzaldehídos orto-sustituidos y fenoles en presencia de Cu y Fe³³⁻³⁵ como catalizadores en fase homogénea y heterogénea. Esta ruta sintética ha demostrado ser muy efectiva para la obtención de xantonas, con altos rendimientos y una elevada eficiencia en la formación del enlace carbono-carbono.

En el 2014, nuestro grupo de trabajo desarrolló una propuesta sintética para la adquisición del esqueleto xantónico mediante acoplamiento catalítico utilizando nanopartículas de cobre depositadas sobre sílica magnetizada, o magsilica, a partir de benzaldehídos 2-sustituidos y una serie de fenoles.³³ Como ventaja adicional, la utilización de un catalizador en fase heterogénea facilita y da acceso a su recuperación, lo que aumenta la sostenibilidad del proceso. La propuesta de posible mecanismo de acción se puede observar en la Figura 1.11.

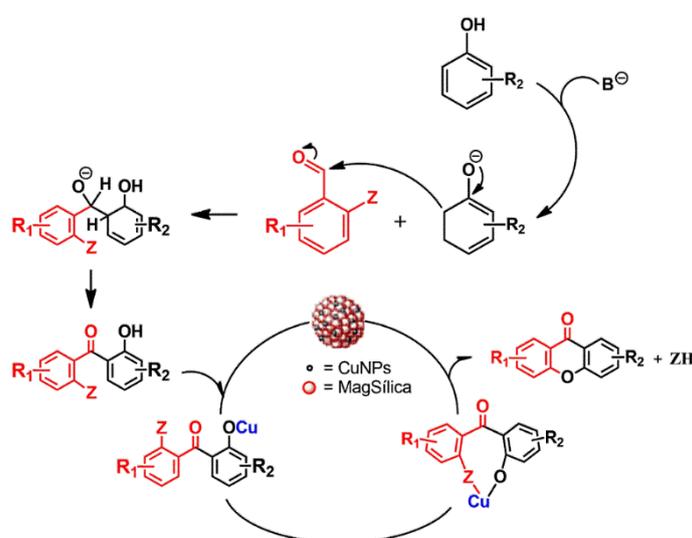


Figura 1.11. Mecanismo de reacción propuesto en la síntesis catalítica de xantonas utilizando nanopartículas de cobre sobre Magsilica.

Numerosos e importantes avances se han logrado en los últimos años en lo que la síntesis de este tipo de compuestos refiere. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, se optimizó una novedosa metodología para la obtención del esqueleto xantona a través de catálisis heterogénea mediante paladio y síntesis asistida por microondas que será desarrollada en detalle a lo largo del capítulo 4.

1.2.2 Usos en farmacología

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) y la capacidad antioxidante endógena del organismo, está implicado en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias. Las xantonas se presentan como una alternativa interesante en el tratamiento de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo.

36

En estrecha relación, la inflamación es un proceso natural del cuerpo que se produce en respuesta a una infección o lesión, pero cuando se produce de manera excesiva o crónica, puede contribuir al desarrollo de enfermedades como la artritis,³⁷ diabetes y la neurodegeneración^{38,39} que se puede observar en los casos de Alzheimer. La α -mangostina, previamente presentada, es una xantona con actividad antiinflamatoria que ha demostrado efectividad en estudios de la proteína cinasa activada por mitógenos (TAK1) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B), como inhibidora de la activación de la vía TAK1-NF- κ B.⁴⁰

Los virus, por otro lado, son agentes infecciosos que pueden causar enfermedades agudas y crónicas en humanos y animales. El desarrollo de nuevos agentes antivirales es un área de investigación importante en la medicina moderna.

La mangiferina, por ejemplo, encontrada en la corteza y las hojas de la planta de mango (*Mangifera indica*), ha demostrado tener actividad antiviral contra virus como el VIH, el herpes y el dengue (Figura 1.12). La mangiferina inhibe la replicación viral al interrumpir la entrada del virus en las células huésped y al suprimir la transcripción y la traducción de los genes virales. Su utilidad ha sido probada frente al virus 1 herpes simplex resistente al aciclovir (HSV-1) con buenos resultados.^{41,42}

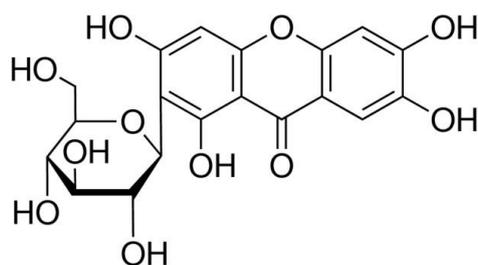


Figura 1.12. Magniferina

En la era del coronavirus, los antivirales capaces de inhibir la replicación viral, interrumpir la entrada del virus en las células huésped y bloquear la expresión de genes virales han cobrado una relevancia incluso mayor a la que se les había asignado hasta la fecha. En estudios recientes, se ha determinado que una serie de hidroxixantonas podrían ser candidatas como agentes antivirales en el tratamiento del coronavirus OC43 en humanos. ⁴³

El tratamiento de infecciones bacterianas, en cambio, se ha planteado como un desafío prevalente en las últimas décadas debido a la aparición de resistencia a los antibióticos existentes. La resistencia antimicrobiana es un fenómeno natural que ocurre cuando las bacterias desarrollan mecanismos de defensa contra los antibióticos, lo que las hace menos susceptibles a su acción. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos en la medicina humana y animal, así como en la agricultura, ha acelerado la aparición de resistencia antimicrobiana a nivel mundial. Por lo tanto, se necesitan nuevos agentes antibacterianos para combatir las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos actuales.

Varios estudios han demostrado que algunas xantonas tienen actividad antibacteriana contra una amplia variedad de bacterias patógenas. Tanto la α -mangostina, como muchos de sus derivados, han demostrado tener actividad antibacteriana contra bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, ⁴⁴ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*. ^{45,46}

Dentro de las patologías de mayor relevancia para las cuáles aún no se tienen tratamientos resolutivos apropiados, se encuentran diversos tipos de carcinomas y una serie de enfermedades neurodegenerativas que aparecen en mayor número debido a un incremento en la esperanza de vida de las poblaciones.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con aproximadamente 10 millones de muertes anuales. El tratamiento del cáncer es un desafío permanente debido a la resistencia a los tratamientos convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia, por lo que se buscan constantemente nuevas estrategias terapéuticas para combatir la enfermedad.

El mecanismo de acción de las xantonas como agentes antitumorales aún no se comprende completamente, los esfuerzos se encuentran direccionados, no sólo a encontrar nuevas moléculas capaces de afectar las vías comprometidas en el desarrollo y mantenimiento de los tumores, sino a comprender estos mecanismos de manera tal de poder dirigirlos de forma selectiva. Se ha demostrado que algunas xantonas inducen la apoptosis, o muerte celular programada, en las células cancerosas. Además, algunas xantonas también han demostrado inhibir la angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que es esencial para el crecimiento de los tumores.

Algunos de los mecanismos que han sido descifrados incluyen la inhibición de la formación de estructuras G-cuádruplex (G4),⁴⁷ asociada a ciertas enfermedades humanas tales como el cáncer. En otro estudio, se demuestra mediante análisis *in vivo* e *in vitro* la capacidad de ciertas xantonas de degradar receptores de andrógenos de la variante AR-V7 en células de carcinoma prostático.⁴⁸ En el cáncer de mama triple negativo (TNBC), se ha estudiado el efecto de la γ -mangostina y se ha determinado por docking molecular que forma complejos con el clúster Interferón gamma/Proteína transcripcional activadora y transductora de señales 1/Homólogo 3 de Notch (INFG/STAT1/NOTCH3),⁴⁹ el cual tiene un rol clave en la oncogénesis relacionada a fibroblastos asociados a cáncer en este tipo de patología.

El envejecimiento de la población ha llevado a un aumento en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson.⁵⁰ Estas enfermedades son caracterizadas por la muerte progresiva de neuronas y la pérdida de la función cerebral, lo que puede afectar significativamente la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

Se ha demostrado que algunas xantonas, tales como la α -mangostina, tienen efectos positivos en la protección de las células neuronales y la prevención de la neurodegeneración en modelos *in vitro* y modelos animales.⁵¹

Por ejemplo, se ha encontrado que la xantona α -mangostina puede prevenir la muerte celular inducida por la toxicidad del β -amiloide en células cerebrales ⁵² y mejorar la memoria en modelos de ratones de Alzheimer. También se ha demostrado que otras xantonas, como la mangiferina previamente mencionada, ⁵³ pueden proteger las células neuronales de la muerte inducida por el estrés oxidativo y la inflamación en modelos de ratones de Parkinson. Otros estudios revelan que diversas xantonas tienen la capacidad de inhibir una serie de enzimas asociadas con este tipo de enfermedades neurodegenerativas, tales como la monoaminoxidasa A y B (MAO A y MAO B), la butirilcolinesterasa y acetilcolinesterasa (BuChE y AChE), ⁵⁴ siendo la inhibición de esta última el enfoque tradicional de las drogas utilizadas en el tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer.

Aunque aún se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos de acción de las xantonas en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas y para determinar su eficacia en ensayos clínicos, la evidencia científica actual sugiere que estas moléculas tienen un gran potencial terapéutico como agentes neuroprotectores pluripotenciales.

Debido a su capacidad de acción sobre un amplio rango de estructuras celulares, su arquitectura planar y potencialidad para sustituyentes variados que le confieren diversos grados de hidrofobicidad, se han estudiado a las xantonas en contexto de su capacidad de interactuar con membranas celulares. Se ha demostrado que las xantonas tienen una afinidad particularmente alta por las membranas lipídicas y que pueden alterar su fluidez y permeabilidad. Estos efectos pueden tener implicaciones importantes para la señalización celular y la regulación de la función de los sistemas biológicos, así como en la capacidad de ser almacenadas en liposomas que serían utilizados como carriers. Parte de nuestras investigaciones sobre este tipo de compuestos fue llevada a cabo en los apropiados modelos de membrana, como sistemas simplificados, para los objetivos propios asignados a cada compuesto.

1.2.3 Desafíos actuales

Los fármacos que caen en las clases II y IV del sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés, Biopharmaceutical Classification System) pueden presentar desafíos en cuanto a su formulación y desarrollo.

La clase II del BCS incluye fármacos con baja solubilidad y alta permeabilidad. Los fármacos de esta clase pueden ser difíciles de incorporar en una forma farmacéutica que permita una rápida y completa absorción en el cuerpo. Esto se debe a que la baja solubilidad puede limitar la cantidad de fármaco que se disuelve en el tracto gastrointestinal, lo que a su vez puede limitar la cantidad que se absorbe en el cuerpo. Además, los fármacos de esta clase pueden ser susceptibles a la formación de precipitados en el tracto gastrointestinal, lo que puede reducir aún más la cantidad que se absorbe.

Uno de los ejemplos más conocidos es el fármaco ciclosporina A, utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide y el trasplante de órganos. La ciclosporina A es un fármaco muy lipofílico y poco soluble en agua, lo que dificulta su absorción y biodisponibilidad. Para solucionar este problema, se han desarrollado diversas formulaciones de la ciclosporina A utilizando sistemas de administración alternativos, como la microemulsión, un sistema coloidal de baja tensión superficial, y los liposomas.

Podemos ver, con relación a la familia de las xantonas en específico, que este suele ser el caso para muchos de ellos, tales como la magniferina.⁵⁵ Existen muchos estudios destinados a encontrar un modo apropiado de administración y distribución para este tipo de compuestos que logre sortear el obstáculo de su elevada lipofilicidad y, en consecuencia, muy baja solubilidad para administración de formas tradicionales.

La Clase III del BCS incluye fármacos con alta solubilidad y baja permeabilidad, lo cual implica que un fármaco es soluble en agua, pero posee una baja permeabilidad a través de las membranas biológicas, como la mucosa intestinal. Esto puede limitar su biodisponibilidad y, por lo tanto, su eficacia terapéutica. La elevada solubilidad en agua puede darse debido a las características fisicoquímicas intrínsecas del fármaco, tales como su polaridad, lo que les permite disolverse fácilmente en los fluidos corporales. Su baja permeabilidad a través de las

membranas biológicas puede deberse a su tamaño, carga o lipofilicidad, lo que dificulta su absorción en el cuerpo.

Para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos de Clase III, se han utilizado diferentes estrategias de formulación, como la modificación de la estructura química del fármaco para mejorar su permeabilidad, el uso de inhibidores de la P-glicoproteína para aumentar su absorción y la formulación en sistemas de administración de fármacos, como microemulsiones, liposomas y nanopartículas.

Un ejemplo claro es el diclofenac, altamente soluble en agua, pero de muy baja permeabilidad a través de las membranas biológicas. Para mejorar su biodisponibilidad se optó por la incorporación del fármaco en nanopartículas lipídicas, la formulación en sistemas de administración de fármacos como los geles tópicos y los parches transdérmicos. La formulación en nanopartículas lipídicas permite una mayor penetración del fármaco a través de la piel y una liberación prolongada en el sitio de acción, lo que mejora la eficacia terapéutica del fármaco. Por otro lado, los geles tópicos y los parches transdérmicos permiten una administración localizada del fármaco, lo que reduce su exposición sistémica y, por lo tanto, sus posibles efectos secundarios.

La Clase IV incluye fármacos con baja solubilidad y permeabilidad, los fármacos de esta clase presentan los mayores desafíos en términos de formulación y desarrollo. Debido a su baja solubilidad y permeabilidad, estos fármacos pueden tener una absorción muy limitada en el cuerpo. Para superar estos desafíos, se pueden utilizar diversas estrategias, como la utilización de sistemas de liberación modificados, la alteración de la estructura química del fármaco para mejorar su solubilidad y permeabilidad, y otras metodologías de formulación alternativas de probada eficacia.

La amiodarona, utilizada en el tratamiento de arritmias cardíacas, tiene baja solubilidad en agua y baja permeabilidad a través de las membranas biológicas. Para mejorar su solubilidad se ha logrado su formulación en microemulsiones, sistemas coloidales que contienen fármaco disuelto en una mezcla de aceite y agua con tensioactivos para formar una emulsión estable, y en complejos de inclusión con ciclodextrinas. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos capaces de formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos. La inclusión de la amiodarona en ciclodextrinas mejora su solubilidad en agua y su biodisponibilidad.

En general, los fármacos que caen en las clases II, III y IV del BCS pueden requerir un enfoque más cuidadoso en cuanto a su formulación y desarrollo para garantizar su eficacia y seguridad. Sin embargo, con la utilización de estrategias de formulación adecuadas, estos fármacos pueden ser implementados con éxito y ser útiles en el tratamiento de diversas enfermedades.

Dentro del tipo de compuestos específicos tratados en el desarrollo de este trabajo de tesis, varios de ellos y principalmente aquellos pertenecientes al grupo de las xantonas, presentan el tipo de inconvenientes que se observan para los compuestos que caen en las categorías explayadas. Esto sumado, y quizás estrechamente relacionado, a los casos de baja biocompatibilidad y toxicidad que presentan algunos de los compuestos naturales, nos pone en la disyuntiva de tener que encontrar una forma de administración alternativa y segura para las xantonas diseñadas y sintetizadas, si se pretende que tengan alguna posibilidad de alcanzar el estatus de potenciales agentes terapéuticos.

Surge como alternativa una tecnología de formulación muy prometedora para mejorar la eficacia y seguridad de los fármacos con problemas de solubilidad y permeabilidad: los liposomas. Debido a que pueden encapsular fármacos hidrofóbicos en su interior, fármacos altamente liposolubles se pueden administrar con un sistema de distribución apropiado que les permite circular y los protege frente al medio acuoso, mejorando así su solubilidad.

La estructura anfifílica de los liposomas les permite interactuar con las membranas celulares, lo que puede mejorar la permeabilidad de los fármacos encapsulados y su absorción en el cuerpo, aumentando su eficacia y reduciendo la cantidad administrada para obtener el efecto terapéutico deseado. La encapsulación en liposomas también puede reducir su toxicidad al limitar su exposición a los tejidos no deseados. Al encapsularlos en las vesículas lipídicas, se puede reducir la liberación no específica en el cuerpo y mejorar su distribución selectiva a los tejidos afectados.

Otra ventaja importante en estos sistemas es la capacidad para controlar la liberación. Los liposomas pueden ser diseñados para liberar el fármaco de manera controlada y sostenida, lo que puede mejorar su eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios asociados con su liberación no controlada.

1.3 Liposomas

1.3.1 Generalidades

Las membranas modelo son herramientas útiles en la investigación de la física y química de las membranas biológicas. Como sistemas artificiales, emulan las propiedades de las membranas biológicas y se utilizan para estudiar procesos como la difusión de lípidos, la interacción de proteínas con la membrana, la formación de poros, la permeabilidad y la fusión de membranas.

Diferentes membranas modelo pueden ser preparadas mediante la formación de bicapas lipídicas sobre superficies sólidas, la formación de vesículas lipídicas o la utilización de polímeros como matrices para la formación de membranas, entre otras técnicas.

Los liposomas son vesículas autoensambladas compuestas de bicapas lipídicas que se utilizan comúnmente como membranas modelo en la investigación biomédica. Se trata de sistemas muy útiles debido a su capacidad para encapsular moléculas hidrófilas y lipofílicas, así como su capacidad para fusionarse con otras membranas lipídicas, lo que los hace ampliamente relevantes en estudios de transporte de membrana, interacciones de membrana y en administración de fármacos.

Cada uno de los lípidos que constituye al liposoma en cuestión cuenta con propiedades únicas, influyendo en la estructura y funcionalidad del liposoma resultante permitiendo adaptar sus características para emular sistemas biológicos y diseñar vehículos de transporte de fármacos (Figura 1.13).

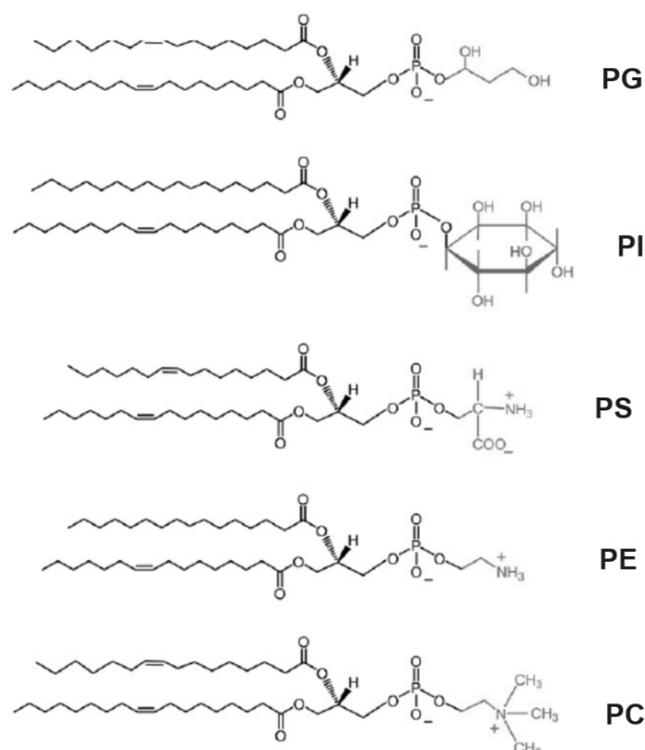


Figura 1.13. Subclasificación de fosfolípidos

Dentro de los grupos de fosfolípidos, encontramos una diversidad de compuestos con funciones cruciales en la construcción de liposomas y la emulsión de sistemas biológicos. Las fosfatidilcolinas (PC), como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y la dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), destacan por su estabilidad y capacidad para formar estructuras, convirtiéndolas en elementos básicos fundamentales para emular las membranas biológicas. La inclusión de moléculas de tipo efector a este tipo de fosfolípidos puede brindar información de relevancia respecto del comportamiento de los modelos de membrana en presencia de un potencial fármaco.

Las fosfatidiletanolaminas (PE), presentes como componentes esenciales de las membranas celulares, aportan diversidad estructural a los liposomas, influenciando tanto su morfología como su capacidad de encapsulación. Este componente resulta esencial en el diseño de liposomas adaptados para la entrega de fármacos en entornos biológicos específicos.

Por otro lado, las fosfatidilserinas (PS) y los fosfatidinosítoles (PI), presentes en membranas celulares y participando en procesos de señalización, permiten recrear condiciones biológicas específicas que facilitan los estudios sobre interacciones membrana-proteína y procesos fisiológicos.

Integrándose a este conjunto, los fosfatidilglicerol (PG), otro subtipo de fosfolípidos, desempeñan un papel importante en la construcción de liposomas. Aunque suelen recibir menos atención que otros fosfolípidos, su presencia en membranas celulares y la capacidad de formar liposomas cargados eléctricamente los convierte en componentes esenciales para replicar propiedades específicas de ciertos entornos biológicos, como las cargas negativas presentes en las membranas bacterianas.

Los lípidos aniónicos como el palmitoiloleoil fosfatidilglicerol (POPG), en conjunto con el lípido palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE) son esenciales en la construcción de liposomas utilizados para simular membranas bacterianas. La combinación de POPG y POPE puede imitar la composición cargada y asimétrica de las membranas bacterianas, proporcionando modelos más realistas para estudiar interacciones liposoma-membrana bacteriana y desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a bacterias. Esta aproximación no solo mejora la comprensión de la biología bacteriana, sino que también facilita el estudio de potenciales fármacos para combatir infecciones bacterianas de manera más eficaz.

Fuera de la línea de los fosfolípidos, el colesterol (COL) desempeña un papel central en la estabilidad y permeabilidad de las membranas. Su inclusión en liposomas modula la fluidez de la bicapa lipídica, influyendo directamente en las propiedades de liberación de fármacos y facilitando el diseño de sistemas de transporte de sustancias terapéuticas.

Esfingolípidos como la esfingomielina (SM) y la ceramida (CER), componentes clave en la estructura y función de membranas, se incorporan en liposomas para recrear condiciones específicas de tejidos. Esto resulta valioso en aplicaciones terapéuticas que requieren una entrega de fármacos focalizada, imitando microentornos biológicos complejos.

En principio, la preparación de liposomas se basa en la capacidad de los lípidos anfifílicos para autoensamblarse en soluciones acuosas formando estructuras de bicapas lipídicas cerradas. Los lípidos son disueltos en un disolvente orgánico, como cloroformo o éter, que luego se evapora para formar una película delgada sobre la superficie del recipiente que los contiene. Finalmente, se rehidrata la película lipídica con agua milliQ o una solución acuosa, tal como buffer fosfato, y se agita la mezcla vigorosamente para inducir la formación de vesículas lipídicas. A partir de este punto, se procede de acuerdo con el tipo de liposoma que se quiere adquirir.

Existen diferentes técnicas para preparar liposomas, como la sonicación, que implica la exposición de la suspensión lipídica a ondas sonoras de alta frecuencia; la extrusión, por paso repetido de la suspensión lipídica a través de una membrana porosa para forzar la formación de liposomas de tamaño uniforme; o el método de congelación-descongelación y el método de electroformación, utilizando una técnica electroquímica.

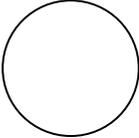
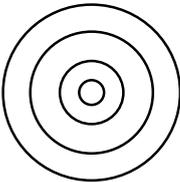
Desde una perspectiva estructural, se puede clasificar a los liposomas en función del número de capas lipídicas que contienen (Tabla 1.1). Los liposomas unilamelares (por sus siglas en inglés, unilamellar vesicles, ULV) contienen una única capa lipídica, mientras que los liposomas multilamelares (multilamellar vesicles, MLV) contienen múltiples capas concéntricas. Los liposomas oligolamelares (oligolamellar vesicles, OLV) contienen un número reducido de capas lipídicas, generalmente entre dos y diez.

A su vez, las vesículas de tipo MLV pueden manifestarse en diferentes configuraciones según su método de preparación y propiedades físicas. En primer lugar, las vesículas REV (reverse phase evaporation vesicles) son un tipo de MLV formadas mediante evaporación controlada de un disolvente orgánico, lo que da como resultado vesículas con una única bicapa lipídica invertida. Por otro lado, las vesículas SPLV (stable plurilamellar vesicles) contienen varias capas lipídicas concéntricas y se forman a través de procesos de agitación o extrusión cuidadosamente controlados. Por último, las MLV tradicionales, o vesículas micromultivesiculares, son estructuras altamente lamelares consistentes en múltiples vesículas pequeñas contenidas dentro de una vesícula madre, lo que las hace ideales para la encapsulación de diferentes cargas terapéuticas.

De acuerdo a su tamaño, se definen los liposomas pequeños (small unilamellar vesicles, SUV) de unos pocos nanómetros a unos pocos cientos de nanómetros, los liposomas medianos (medium-sized unilamellar vesicles, MUV) de varios cientos de nanómetros, y los liposomas grandes (giant unilamellar vesicles, GUV) que puede llegar a medir varios micrómetros.

Es importante destacar que estas clasificaciones no son mutuamente excluyentes y que se pueden combinar para describir con mayor precisión los diferentes tipos de liposomas. Además, la selección de un tipo de liposoma específico dependerá de la aplicación prevista para el mismo, lo que hace que estas clasificaciones sean importantes para seleccionar el tipo de liposoma más adecuado para cada caso.

Tabla 1.1. Clasificación de los liposomas de acuerdo a su tamaño y disposición de las lamelas.

Número de bicapas	Tamaño	Propiedades
Unilamelares (formados por una única bicapa)	SUV (20-80 nm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada proporción de fosfolípidos en la monocapa externa debido a su mayor curvatura • Elevada relación superficie-lípido • Bajo porcentaje de encapsulación
	LUV (80 nm a 1 µm) 	<ul style="list-style-type: none"> • Compartimiento interno de gran volumen • Elevada capacidad de encapsulación
Plurilamelares (formados por varias bicapas)	MLV (400 nm a varios µm) 	REV: Vesículas de evaporación en fase reversa.  SPLV: Vesículas estables plurilamelares  MLV: Liposomas micromultivesiculares 

Los liposomas emergen como una herramienta fundamental en la investigación científica y la industria debido a su versatilidad y aplicabilidad en una amplia gama de áreas. Estos sistemas lipídicos no solo ofrecen una plataforma para estudiar procesos biológicos complejos, como

la administración de fármacos y la entrega de agentes terapéuticos, sino que también representan una herramienta valiosa para comprender mejor la estructura y función de las membranas celulares.

A partir del uso de liposomas, se permite la extracción de un amplio arreglo de propiedades y comportamientos fisicoquímicos de bicapas lipídicas facilitando la manipulación. El análisis puede ser llevado a cabo con precisión y claridad, ya que existe un mayor control experimental y pueden reducirse las variables más aleatorias propias de los sistemas biológicos reales. Sin embargo, esta ventaja debe tenerse presente a la hora de evaluar los resultados, ya que puede resultar en conclusiones que desafían la hipótesis cuando se extiende a pruebas *in vivo* si no es considerada responsablemente.

1.3.2 Modelo de membrana biológica

Las membranas biológicas son sistemas complejos que han atraído la atención en diversas disciplinas de investigación en las últimas décadas. Es de particular interés a la hora de estudiar compuestos con potencial acción antimicrobiana, tanto desde la perspectiva del sistema biológico a neutralizar, ya sea destruyendo o atravesando la membrana de interés para que alcance a su diana, como desde la del huésped al que se quiere regresar al estado de salud, cuyas membranas celulares deberían verse tan mínimamente afectadas como fuera posible.

El desarrollo de nuevas drogas capaces de lidiar con patógenos resistentes requiere un entendimiento de los mecanismos por los cuales estos compuestos afectan a estas membranas, que cumplen el rol de barrera o sitio directo de acción.

Una de las principales características que permite al fármaco discriminar entre membranas bacterianas y aquellas que pertenecen a células de mamífero, es la composición lipídica. Las membranas citoplasmáticas de mamífero se componen principalmente de fosfatidilcolina, esfingomiolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y colesterol. Los fosfolípidos suelen encontrarse distribuidos de forma asimétrica entre la cara interna y externa de la bicapa, tanto la fosfatidilcolina como la esfingomiolina son más abundantes en la cara externa.

Las membranas bacterianas, en cambio, contienen grandes cantidades de fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol o sus derivados, tales como la cardiolipina, pero carecen totalmente de colesterol. A su vez, se encuentran mayores cantidades de PE en la membrana interna de las bacterias Gramnegativas, mientras que las membranas citoplasmáticas de las Grampositivas son más ricas en PG.

A modo de ejemplo, la membrana celular interna de la *Escherichia coli*, una bacteria Gramnegativa que suele desarrollarse en el intestino distal de organismos de sangre caliente, se compone en un 82% de su peso de PE; mientras que los componentes fosfolipídicos predominantes en la membrana de la bacteria Grampositiva *Staphylococcus aureus*, son el PG y sus derivados. Es aparente que esta composición lipídica diferencial va a alterar las propiedades de la membrana, tales como su estructuración, empaquetamiento, densidad, rigidez y carga superficial, por nombrar algunas.

Las mezclas binarias de PE y PG bajo condiciones fisiológicas suelen ser utilizadas como modelo de membranas bacterianas por los motivos explicados. Estos sistemas proveen la estructura fundamental que permite estudiar el cambio en las características propias del modelo al introducirse un compuesto que debe, o bien atravesarla, o bien destruirla.

1.3.3 Transportadores de drogas

Los *drug carriers*, o transportadores de drogas, son sistemas que permiten transportar fármacos a través del cuerpo y dirigirlos hacia el sitio de acción deseado, protegiéndolos de la degradación y eliminación temprana. Estos sistemas tienen la ventaja de aumentar la eficacia terapéutica de los fármacos, reducir sus efectos secundarios y mejorar su farmacocinética.

La eficacia y seguridad de este tipo de sistema para la administración de drogas depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas. Existen una amplia variedad de consideraciones de relevancia a la hora de elegir el sistema más apropiado para una determinada droga. El tamaño y la morfología pueden afectar su biodisponibilidad, permeabilidad, distribución y eliminación. La carga eléctrica puede influir en su capacidad de unirse a las células diana y atravesar las barreras biológicas. Su hidrofobicidad o hidrofiliidad puede afectar su capacidad de solubilizar los fármacos, su afinidad por los tejidos y estabilidad

en el medio biológico. La estabilidad química es también fundamental para garantizar la integridad de los fármacos y prevenir la liberación no deseada. La compatibilidad con la composición de la membrana biológica de la célula diana tiene que ser tan elevada como fuere posible para permitir la fusión y liberación de la droga. Por último, la cantidad de fármaco que puede ser cargado puede afectar la eficacia terapéutica de los mismos.

En el caso de los compuestos que se han estudiado en el contexto de este trabajo de tesis, se ha puesto énfasis en el desarrollo de liposomas de tipo MLV compuestos de dipalmitoilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina-colesterol (DPPC-COL) y se han estudiado de manera experimental, de la forma propuesta en la sección anterior, la carga superficial, el volumen específico y la compresibilidad adiabática del sistema.

Sumado a estas variables analizadas ya en estudios previos,⁵⁶ se estudió también la eficacia de encapsulamiento mediante la técnica de UV-Visible y la estabilidad del sistema en el tiempo utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la distribución del tamaño de partícula mediante Dynamic Light Scattering (DLS).

Finalmente, a través de dinámica molecular se hace una estimación de la potencial ubicación de las moléculas de efector seleccionadas en relación con las diferentes zonas dentro del fosfolípido, considerando una región polar a la altura de las cabezas polares de fosfatos; una región media en la zona de carbonilos; y una región apolar, a la altura de las cadenas carbonadas correspondientes a las colas lipídicas. En forma complementaria, datos sobre el área por lípido y la movilidad de los mismos se utiliza para corroborar información experimental.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos generales

El proyecto tiene como propósito la evaluación de sistemas nanoestructurados de potencial utilización en el área biotecnológica y biomédica. Se propone la exploración de herramientas de diseño racional y síntesis que permitan la construcción eficiente de sistemas heterocíclicos relevantes, particularmente xantonas preniladas y análogos relacionados, en diversos contextos de interés biológico. Los estudios teóricos-experimentales se llevarán a cabo sobre membranas modelo lipídicas caracterizando las interacciones de los ligandos mediante la alteración en las propiedades fisicoquímicas de las membranas, a fin de evaluarlos como potenciales agentes farmacológicos.

1.4.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos del proyecto consisten en:

- I. Sintetizar y caracterizar dibenzo- γ -pironas (xantonas) y sus congéneres nitrogenados (acridonas y carbazoles) a través de la aplicación de metodologías convencionales y no convencionales, que incluyen la síntesis orgánica asistida por microondas y la catálisis heterogénea.
- II. Inserción de cadenas laterales prenilos al esqueleto xantónico a través de aproximaciones modulativas dirigidas a establecer criterios estructurales más eficaces para una determinada acción terapéutica.
- III. Acceder a xantonas y análogos estructurales anfifílicos con secciones complementarias a las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de las moléculas lipídicas, de modo de que sean capaces de incorporarse a membranas lipídicas modelo en general y, en particular, en membranas aniónicas de modo de evaluarlas como potenciales agentes antibacterianos.
- IV. Elucidación estructural de los nuevos compuestos hetero-tricíclicos mediante la aplicación de distintas técnicas espectroscópicas tales como IR, UV, RMN homo- y heteronuclear (^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC), EM (baja y alta resolución).

Capítulo 2: Técnicas de obtención del andamiaje carbazol

2.1 Estado del arte

Como mencionamos en el capítulo introductorio, las plantas medicinales han sido utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades desde la antigüedad y siguen desempeñando un papel importante al momento de cubrir las necesidades básicas de salud en países en vías de desarrollo.⁵⁷ Aún hoy, una gran parte de la población en zonas rurales y urbanas del mundo en desarrollo depende de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Clausena anisata (Figura 2.1), conocida localmente como «olmaa'ii» en Etiopía (en lengua afaan oromo), pertenece a la familia Rutaceae y se utiliza en varias partes de África para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas de la piel, como forúnculos, tiña, candidiasis oral y eczema,⁵⁸ y malaria.⁵⁹



Figura 2.1. Fotografía de *C. anisata* (olmaa'ii).

El análisis fitoquímico del extracto de raíz en diclorometano/metanol (1:1) revela la presencia de varios componentes. Uno de ellos, el alcaloide de carbazol derivado de la heptazolina, muestra una prometedora actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. subtilis* en comparación con la ciprofloxacina,⁶⁰ y parece ser en gran medida responsable de esta actividad medicinal tradicional (Figura 2.2).

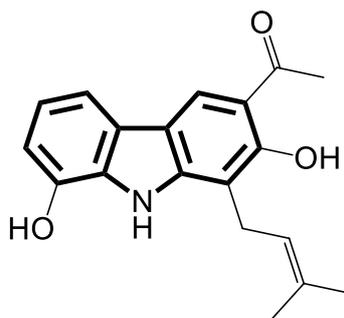


Figura 2.2. Heptazolina, producto natural de *C. heptaphylla*, *C. harmandiana* y *C. excavata*.

El núcleo de la heptazolina se encuentra constituido por un sistema de tipo 9H-carbazol, un compuesto *N*-heterocíclico ubicuo que se encuentra ampliamente distribuido tanto en productos naturales como en productos sintéticos.

Podemos analizar el caso de *Murraya koenigii* (Figura 2.3), conocida comúnmente como «Curry Patta» (hindi), utilizada ampliamente como especia y condimento en India y otros países tropicales. Varias partes de *M. koenigii* se han utilizado en la medicina tradicional o popular para el tratamiento de reumatismo, lesiones traumáticas y mordeduras de serpientes, y se ha informado que tiene actividades antioxidantes, antidiabéticas y antidisentéricas.^{61,62}



Figura 2.3. Fotografía de *M. koenigii*.

La mahanimbina es otro alcaloide de carbazol, presente en las hojas, corteza del tallo y raíz de *M. koenigii* (Figura 2.4). Los alcaloides de carbazol presentes en las hojas le brindan

actividades farmacológicas como estimulantes, tónicos y agentes carminativos para tratar la influenza, la fiebre, el asma bronquial y las mordeduras de animales. ^{63,64}

El uso de remedios y plantas tradicionales en el tratamiento de quemaduras y heridas es un aspecto importante de la gestión de la salud y también es una forma eficiente de promover opciones de atención médica más económicas. ^{65,66} La eliminación y prevención de infecciones son esenciales para una cicatrización rápida y efectiva de heridas. Se han descrito varias plantas y formulaciones para el manejo de cortes, contusiones, quemaduras y heridas en la medicina folclórica, así como en el sistema Ayurvédico de medicina. ^{67,68}

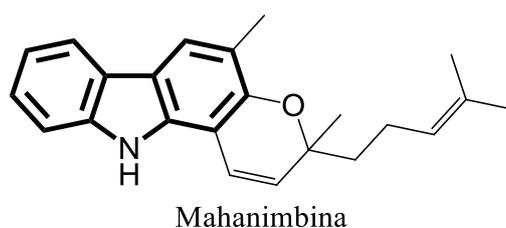


Figura 2.4. Carbazol natural mahanimbina aislado de las hojas de *M. koenigii*.

Como puede apreciarse, los carbazoles encontrados en *C. heptaphylla*, *C. harmandiana* y *C. excavata*, así como en *M. koenigii*, aún como un somero ejemplo presentan un fascinante espectro terapéutico que hace que aún hoy día estén siendo investigados para aplicaciones diversas. A pesar de la amplia distribución de estos alcaloides en la naturaleza, la utilización de productos sintéticos eventualmente surge como una alternativa más prometedora en la búsqueda de compuestos con aplicaciones terapéuticas más específicas y controladas.

Los productos sintéticos derivados de la estructura de carbazol ofrecen ventajas significativas sobre los compuestos naturales y representan el siguiente paso en el desarrollo de compuestos con propiedades farmacocinéticas optimizadas, lo que puede ser crucial para el descubrimiento de fármacos efectivos. La síntesis química permite una modificación precisa de la estructura molecular, lo que puede mejorar la actividad biológica y la selectividad. Las propiedades biológicas y físicas de los derivados del carbazol pueden ser moduladas mediante la introducción de grupos funcionales específicos en su estructura. ^{69,70} Además, la disponibilidad de rutas sintéticas reproducibles garantiza un suministro constante y evita la dependencia de factores ambientales y de cultivo.

Al considerar la evolución en la adquisición y síntesis de carbazoles para su aplicación en farmacología moderna, un ejemplo destacado es el ondansetrón, comercializado como Zofran (1987). Este medicamento sintético, desarrollado por GlaxoSmithKline en la década del 1980 en Londres, ha demostrado ser altamente eficaz en el tratamiento de las náuseas y los vómitos inducidos por la quimioterapia y otros tratamientos médicos para enfermedades tales como el cáncer.⁷¹ El ondansetrón (Figura 2.5) representa un hito en la convergencia entre la química sintética y la medicina, destacando cómo la ingeniería de moléculas puede brindar soluciones médicas precisas y avanzadas.

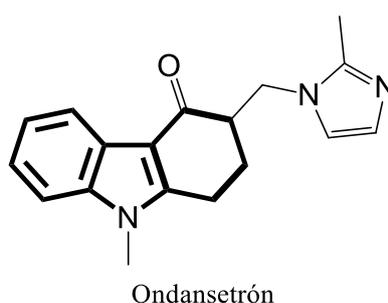


Figura 2.5. Ondansetrón, antagonista competitivo del receptor de serotonina tipo 3.

La exploración de las propiedades terapéuticas de los carbazoles abre un mundo de posibilidades en la búsqueda de soluciones médicas y tecnológicas. A medida que avanzamos hacia un futuro en el que la precisión y la eficacia son esenciales, se hace evidente la necesidad de abordar metodologías novedosas y mejoradas para la adquisición del núcleo carbazol. Estas metodologías no solo encontrarán aplicaciones en la farmacología, sino también en áreas tan diversas como las ciencias de los materiales y la ingeniería, donde la versatilidad de los carbazoles puede brindar avances significativos (Figura 2.6).

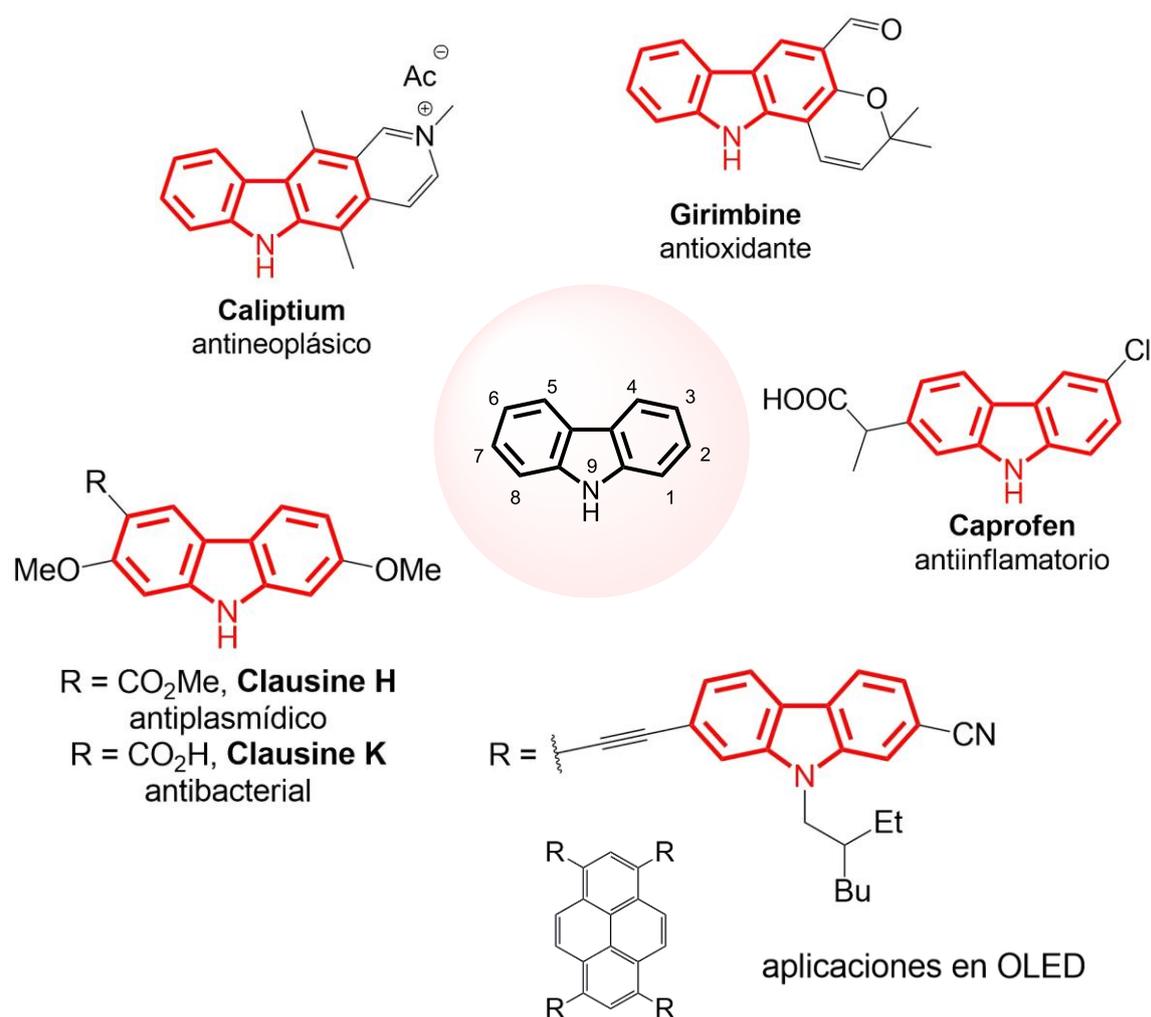


Figura 2.6. El núcleo 9H-carbazol y su relevancia en distintos campos de aplicación.

La estructura privilegiada del carbazol se ha estudiado en contextos fisiopatológicos y se ha comprobado que estos compuestos manifiestan propiedades destacadas en el tratamiento de enfermedades como el cáncer,⁷² el VIH,⁷³ la inflamación,⁷⁴ y las infecciones por hongos y bacterias.^{75,76}

Por otro lado, la unidad de carbazol desempeña un papel primordial como bloque de construcción extensivo en dirección pi (π) para aplicaciones en la electrónica orgánica,³ tales como los diodos emisores de luz poliméricos (PLEDs),⁷⁷ los dispositivos emisores de luz orgánicos (OLEDs)⁷⁸ y los materiales orgánicos de transporte de huecos (HTM).⁷⁹ En virtud de las numerosas e interesantes aplicaciones que el núcleo carbazol presenta se han documentado diversos métodos sintéticos existentes al momento de la escritura de esta tesis para su obtención.⁸⁰

Con el papel protagónico, las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metales de transición desempeñan un papel crucial en la síntesis de heterociclos nitrogenados aromáticos. En particular, la síntesis de carbazoles mediante catalizadores de paladio ha sido objeto de atención en las últimas dos décadas.

En la Figura 2.7, se ilustra el acoplamiento intramolecular de *N,N*-diarilaminas (**ruta I**) a través de la formación de enlaces C-C, el cual puede ser facilitado por catalizadores de paladio en condiciones oxidantes. Asimismo, se ha informado sobre la aminación intramolecular de C-H de derivados de biarilo sustituido (**ruta II**) utilizando diversas fuentes de paladio.

En base a lo propuesto, la síntesis directa de carbazoles representa una alternativa más atractiva y desafiante frente a los métodos convencionales que implican la síntesis previa de precursores complejos.

Ohno y colaboradores, establecieron una ruta sintética para la obtención de carbazoles a partir de anilinas y triflatos de arilo mediante una *N*-arilación seguida de un acoplamiento biarilo oxidativo, utilizando Paladio(II) homogéneo como catalizador (**ruta III**).⁸¹

En un estudio posterior, Woo y colaboradores informaron una síntesis en un solo paso de carbazoles mediante una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki y una consecutiva ciclización reductiva de Cadogan, utilizando *orto*-halonitroarenos y ácidos arilborónicos como precursores (**ruta IV**).⁸²

Ackermann, informó en 2009 una alternativa que consiste en una arilación directa y una reacción de aminación secuencial entre anilinas y 1,2-dihaloarenos como materiales de partida (**ruta V**).⁸³ Los principales inconvenientes de esta metodología están relacionados con el uso de anilinas ricas en electrones, un catalizador de paladio homogéneo no recuperable, tiempos de reacción prolongados (18 h) y la necesidad de fosfinas voluminosas y ricas en electrones para que la reacción tenga lugar.

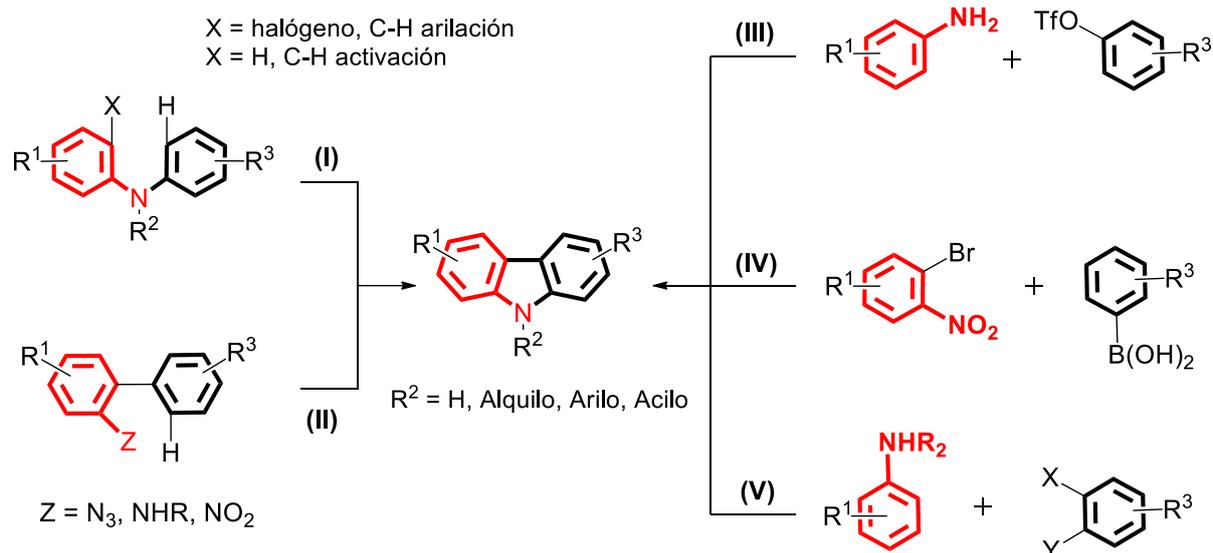


Figura 2.7. Aproximaciones sintéticas conocidas de acceso al núcleo carbazol.

A pesar de los avances significativos logrados con estos protocolos, es necesario emplear aditivos, oxidantes y catalizadores homogéneos costosos bajo condiciones de reacción severas para mejorar los rendimientos y la eficiencia. Además, el uso de catalizadores portadores de metales no recuperables puede resultar en la presencia de trazas de metales como impurezas en el producto final, lo cual puede afectar la efectividad biológica o las propiedades físicas de los compuestos obtenidos.

En este contexto, la aplicación de catalizadores heterogéneos en la síntesis de heterociclos se presenta como una alternativa atractiva debido a ventajas relacionadas con la economía atómica, baja toxicidad y eficiencia. Asimismo, la síntesis orgánica asistida por microondas toma protagonismo como una herramienta poderosa y fuente de energía más verde, reduciendo tiempos de reacción, mejorando rendimientos y disminuyendo la formación de subproductos. La combinación de catalizadores heterogéneos con MAOS se ha convertido en un enfoque simple, sostenible y versátil para la síntesis de heterociclos.

En base a resultados previos de Ackermann (2009), nuestro grupo de investigación desarrolló una alternativa de síntesis directa y respetuosa con el medio ambiente para carbazoles. Con este propósito, se estudió la anulación directa de anilinas y 1,2-dihaloarenos utilizando un catalizador heterogéneo de paladio recuperable magnéticamente, PdNPs/mBC (nanopartículas de paladio soportadas sobre biochar o biocarbón magnético) (Figura 2.8). El uso de biocarbón, proveniente de la pirólisis de cáscaras de girasol como soporte ha

demostrado ser una opción eficiente en la formulación de catalizadores. Además, la magnetización de este biocarbón facilita la manipulación y recuperación del catalizador en medios líquidos.⁸⁴

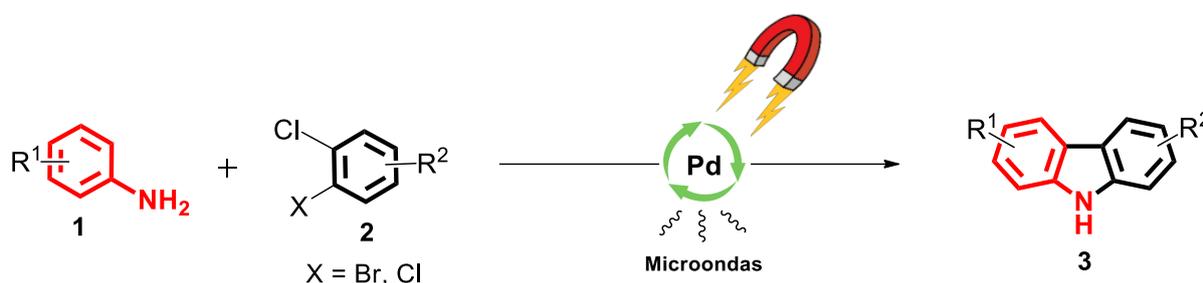


Figura 2.8. Nueva aproximación sintética a 9H-carbazoles.

Para evaluar el alcance de los sustratos electrófilos se estudiaron diferentes 1,2-dihaloarenos comerciales mediante la reacción con anilina (**1a**) como amina aromática modelo bajo las condiciones optimizadas, {[Pd] (15 mol %), DMSO (5 ml), Cs₂CO₃ (3 mmol), 180 °C y 200 W, 25 minutos}.

La presente metodología sintética mostró ser compatible con diferentes grupos funcionales, incluyendo nitro, éster, nitrilo, bromo, cloro, alcoxilo, dioxolo, acilo, alquilo y fenilo. La presencia de grupos ricos en electrones en las anilinas y 1,2-dihaloarenos de partida, como grupos metoxilo, dioxolo y metilo, proporcionó los 9H-carbazoles deseados en rendimientos de buenos a excelentes.

Por otro lado, el uso de diferentes anilinas primarias y 1,2-dihaloarenos funcionalizados que contienen grupos electroattractores, como nitrilo, nitro, éster, cloro, bromo y cetona, permitió la formación de 9H-carbazoles en rendimientos de muy buenos a excelentes.

Es importante destacar que nuestro novedoso PdNPs/mBC permitió el acceso a 9H-carbazoles sustituidos con una amplia variedad de grupos electroattractores, superando así la limitación reportada por los grupos de Ackermann y Woo.^{82,83}

2.2 Nueva ruta sintética

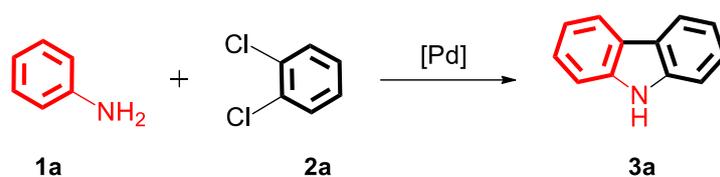
Los estudios de anulación directa catalizada por paladio (Pd) se iniciaron con la utilización de anilina (**1a**) y 1,2-diclorobenceno (**2a**) como materiales de partida. Se evaluó el rendimiento de diferentes fuentes de Pd siguiendo modificaciones en el protocolo informado por Ackermann {[Pd] (5 mol %) *N*-metil-2-pirrolidinona (NMP), K₃PO₄ (3 mmol), 130 °C, 18 h}.

Debido a los tiempos de reacción prolongados, el proceso se llevó a cabo bajo irradiación de microondas. Cuando el catalizador PdNPs/mBC se probó, tanto en condiciones térmicas como de microondas a 130 °C, el carbazol **3a** se obtuvo con un 16% y 25% de rendimiento, respectivamente (Tabla 2.1, entrada 1). Una mejora sustancial (51%) se logró al irradiar con microondas a 180 °C durante 25 minutos (entrada 2).

Se evaluaron diferentes nanocatalizadores de Pd soportados en diversos materiales (entradas 4-9). El uso de PdNPs/BC condujo a una baja conversión a 130 °C (entrada 4), la cual se mejoró al someter a irradiación de microondas a 180 °C (entrada 5). El catalizador basado en nanopartículas soportadas en Al₂O₃ condujo a rendimientos bajos, tanto en condiciones térmicas como de microondas a 130 °C (entrada 6). No se observaron diferencias al aumentar la temperatura a 180 °C después de 18 horas o al someter a irradiación de microondas (entrada 7). PdNPs/PbO también resultó ineficaz en las condiciones de reacción evaluadas a diferentes temperaturas (entradas 8 y 9). Las nanopartículas de Pd no soportadas tampoco condujeron a la formación del producto bajo condiciones térmicas (entradas 10 y 11) y sólo se observó una baja conversión bajo irradiación de microondas a 180 °C (entrada 11).

A continuación, se estudió la eficiencia catalítica de varios catalizadores de Pd homogéneos. Entre los catalizadores comerciales probados a 130 °C, PdCl₂(PPh₃)₂ generó el carbazol con rendimientos bajos (entrada 12), mientras que PdCl₂(MeCN)₂ mostró actividad catalítica baja o nula (entrada 13). Aumentar la temperatura en presencia de PdCl₂(PPh₃)₂ no condujo a mejoras (entrada 14), observándose deposición de paladio negro en la mezcla de reacción. Cuando se estudió la reacción utilizando Pd₂(dba)₃ y Pd(PPh₃)₄, se detectaron productos de homoacoplamiento, sin evidencia de formación del carbazol (entradas 15 y 16). Cuando la reacción se realizó sin catalizador, no se observó progreso alguno (entrada 17).

Tabla 2.1. Evaluación sistemática de catalizadores.



<i>Entrada</i>	<i>[Pd]</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Rendimiento^a</i> (Térmico) ^b	<i>Rendimiento^c</i> (Microondas) ^b
1	PdNPs/mBC	130	16	25
2	PdNPs/mBC	180	25	51 ^d
3	mBC	180	-	-
4	PdNPs/BC	130	11	19
5	PdNPs/BC	180	18	43
6	PdNPs/Al ₂ O ₃	130	Trazas	9
7	PdNPs/Al ₂ O ₃	180	10	12
8	PdNPs/PbO	130	-	Trazas
9	PdNPs/PbO	180	-	Trazas
10	PdNPs	130	-	10
11	PdNPs	180	-	15
12	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	130	Trazas	9
13	PdCl ₂ (MeCN) ₂	130	-	Trazas
14	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	180	Trazas ^e	-
15	Pd ₂ (dba) ₃	130	-	-
16	Pd(PPh ₃) ₄	130	-	-
17	-	180	-	-

^a Condiciones de reacción estándar **1a** (1.2 mmol), **2a** (1 mmol), K₃PO₄ (3 mmol), [Pd] (5 mol%), NMP (5 ml), 18 horas. mBC: Biocarbón magnético; BC: Biocarbón.

^b Rendimiento de producto aislado.

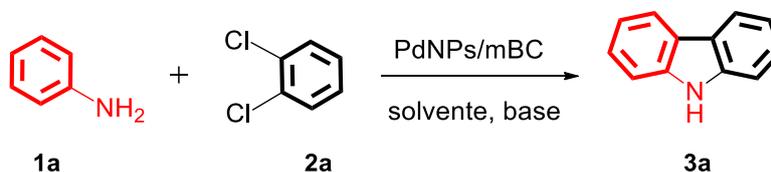
^c La reacción se llevó a cabo a 200 W, por 25 minutos. Monitoreo por TLC y CG-EM.

^d Se detectó 2-cloro-N-fenilamina (10%) en el crudo de reacción.

^e Deposición de paladio negro.

Para optimizar los rendimientos en la síntesis del carbazol se evaluaron varias modificaciones, incluyendo la carga del catalizador, el solvente y la base (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Optimización de las condiciones de reacción.



<i>Entrada</i>	<i>PdNPs/mBC</i> (mol%)	<i>Solvente</i>	<i>Base</i>	<i>Rendimiento (%)^b</i>
1	10	NMP	K ₃ PO ₄	55
2	15	NMP	K ₃ PO ₄	76
3	15	DMSO	K ₃ PO ₄	85
4	15	DMF	K ₂ PO ₄	71
5	15	DMA	K ₃ PO ₄	73
6	15	DMSO	Cs ₂ CO ₃	90
7	15	DMSO	Cs ₂ CO ₃	68 ^c
8	15	DMSO	Cs ₂ CO ₃	90 ^d
9	15	DMSO	K ₂ CO ₃	84
10	15	DMSO	KOAc	80
11	15	DMSO	Na ₂ CO ₃	81
12	15	DMSO	NaOt-Bu	77

^a Condiciones de reacción: **1a** (1.2 mmol), **2a** (1 mol), base (3 mmol), solvente (5 ml) a 180°C bajo radiación microondas de 200 W por 25 minutos. Tiempo de reacción monitoreado por TLC y CG-EM.

^b Rendimiento de producto aislado.

^c La reacción se llevó a cabo en presencia de Cs₂CO₃ (2.5 mmol)

^d La reacción se llevó a cabo en presencia de Cs₂CO₃ (4 mmol)

Se estableció que 15 mol % de PdNPs/mBC (16 mg de Pd), anilina (1.2 mmol) y 1,2-dihalobenceno (1 mmol) en presencia de Cs₂CO₃ (3 mmol) y dimetilsulfóxido (DMSO, 5 mL) a 180 °C bajo irradiación de microondas durante 25 minutos exhibe la mayor actividad catalítica para la síntesis directa del 9*H*-carbazol. Cabe destacar que, bajo las condiciones de reacción optimizadas, la actividad no se limitó al uso de aditivos, ligandos fosfina, ni preactivación de los materiales de partida, como se informa en la mayoría de los trabajos para este tipo de transformación, y no se observaron subproductos del acoplamiento de los 1,2-dihaloarenos.

A continuación, se evaluó la quimio y regioselectividad del proceso en presencia de 1,2-dihaloarenos asimétricamente sustituidos con grupos electrodonores y electroattractores. Los grupos cloro, éster metílico y nitro en la posición *para* del 1,2-diclorobenceno proporcionaron los productos deseados con regioselectividad completa y rendimientos buenos. Por otro lado, la presencia de grupos electrodadores condujo a los dos posibles productos en una proporción isomérica de 1:1. Las limitaciones provenientes de este comportamiento, se superaron mediante el uso de 1-bromo-2-clorobenceno para su acoplamiento directo con la amina correspondiente. Este enfoque en tándem también se aplicó a la síntesis directa y regioselectiva del 9*H*-carbazol clausenaleno, un compuesto bioactivo, a partir de 3,4-(metilenodioxi)anilina y 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno con un rendimiento alto (89%).

La purificación del producto crudo consistió en una serie de pasos relativamente simple que comienza con el agregado de acetato de etilo a la mezcla de reacción. El catalizador se recuperó utilizando un imán de neodimio permanente y, una vez separado, se lavó varias veces con acetato de etilo. La mezcla de reacción se lavó dos veces con solución saturada de NaCl y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el 9*H*-carbazol deseado se purificó mediante cromatografía en columna utilizando silica gel 60 como adsorbente. Las estructuras de todos los 9*H*-carbazoles sintetizados se elucidaron en base a sus datos espectroscópicos.

Como forma de verificar el mecanismo por el cual tiene lugar la catálisis, se comenzó con un estudio de la reciclabilidad del catalizador PdNPs/mBC utilizando nuestro modelo de reacción. Se parte de la idea de que un catalizador heterogéneo debe mantener sus propiedades y su capacidad catalítica en ciclos sucesivos. Como se muestra en la Figura 2.9, no se observó una pérdida significativa de eficiencia catalítica hasta cinco ciclos.

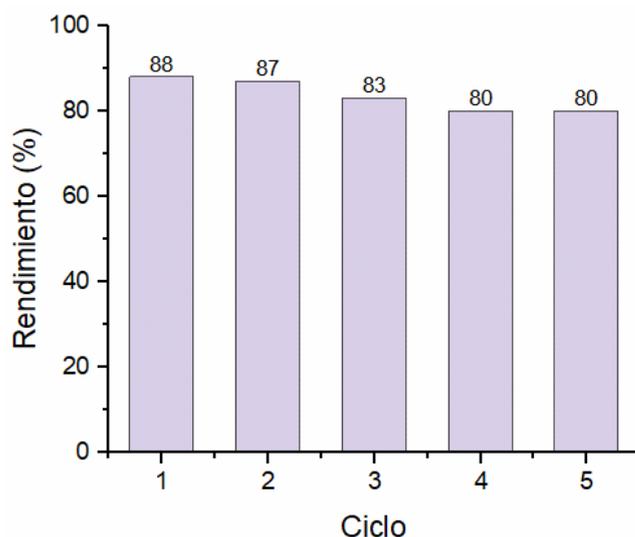


Figura 2.9. Reciclabilidad del catalizador.

A continuación, se verificó la lixiviación del metal del sistema PdNPs/mBC. Después de la separación del sólido en las condiciones de reacción elegidas, se determinó si existía presencia de Pd en la mezcla de reacción mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica. Se encontró que el 0.001% del metal lixivió en la solución después del segundo ciclo, lo cual no es considerado una cantidad significativa. Los catalizadores frescos y utilizados fueron estudiados tanto por microscopía electrónica de transmisión (TEM), como por difracción de rayos X (DRX) (Figura 2.10), y se encontró que no hubo cambios en la naturaleza antes y después de la reacción.

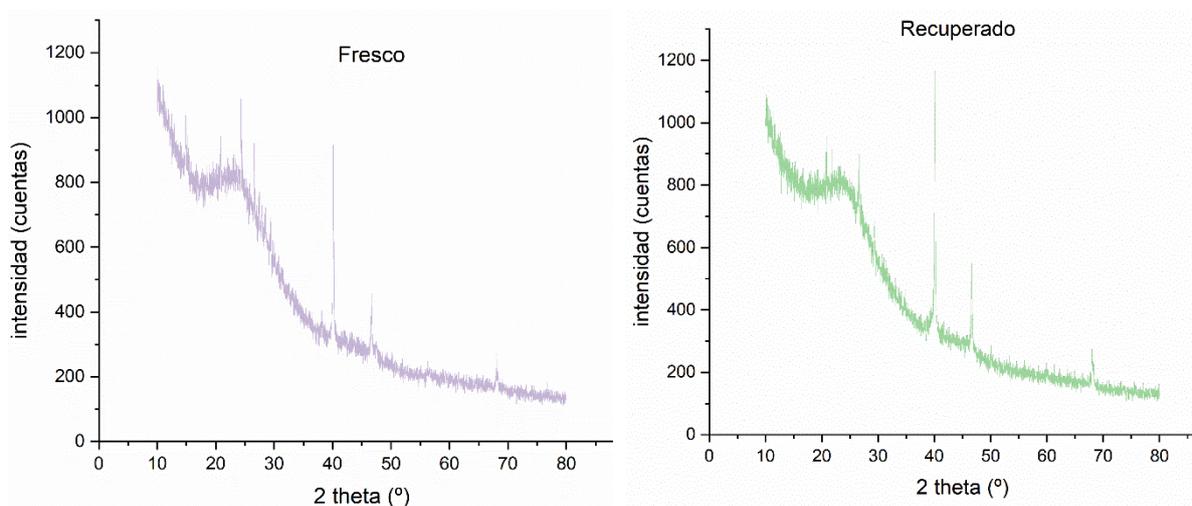


Figura 2.10. Patrones de DRX del catalizador antes y luego de ser utilizado.

Mediante TEM se confirmó que el tamaño de partícula de los nanocristales de Pd no cambia después de la reacción. El tamaño medio de partícula correspondiente a la muestra recién preparada (Figura 2.11a) fue de 3.5 nm, mientras que después de los ciclos catalíticos (Figura 2.11b) fue de 3.6 nm.

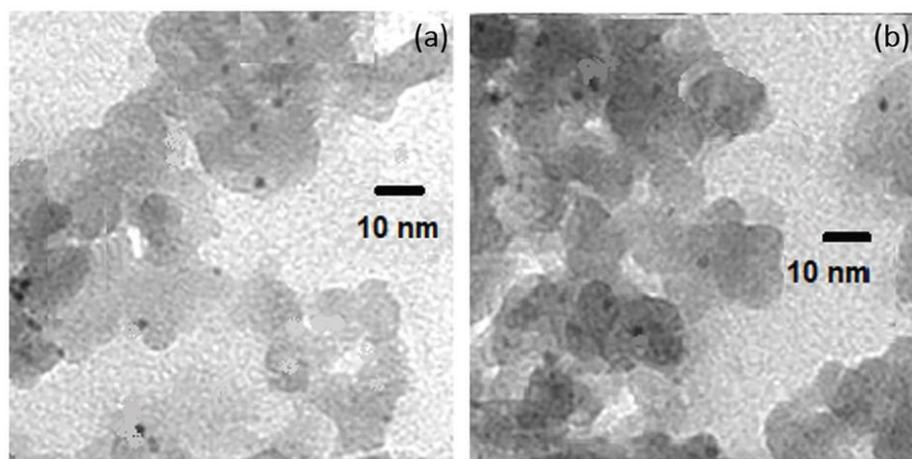


Figura 2.11. Imágenes TEM del PdNPs/mBC como: (a) muestra sin uso, (b) muestra recuperada.

El área de superficie específica (SBET) del catalizador fresco fue bastante elevada (163 m²/g), y se concluyó del análisis de la isoterma BET correspondiente (Figura 2.12a) que existe presencia de micro- y mesoporosidades como parte de su estructura. La muestra reciclada (Figura 2.12b) es bastante similar a la fresca, con una SBET de 157 m²/g y un perfil de isoterma similar.

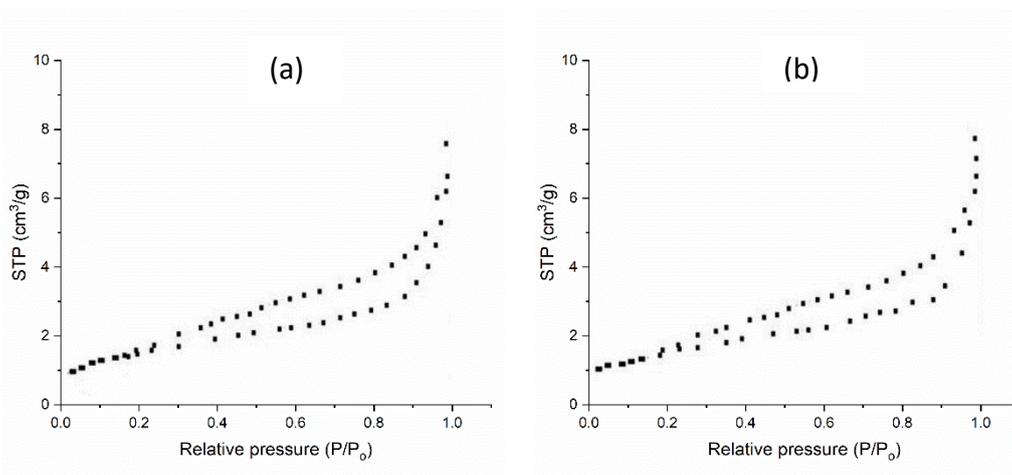


Figura 2.12. Isothermas BET del PdNPs/mBC como: (a) muestra sin uso, (b) muestra recuperada.

Para evaluar la escalabilidad y la aplicación sintética de nuestro protocolo optimizado, se llevó a cabo una reacción a escala de gramos del clausenaleno utilizando 1.0 g de 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno y 3,4-(metilendioxi)anilina. La reacción a mayor escala proporcionó el 9H-carbazol bioactivo con un rendimiento del 80% después de 25 minutos bajo irradiación de microondas (Figura 2.13).

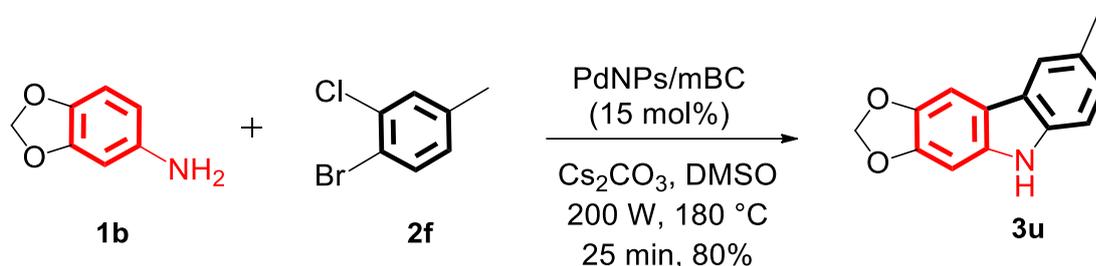


Figura 2.13. Síntesis a escala de gramo del clausenaleno utilizando el catalizador PdNPs/mBC recuperable.

En base a precedentes de la literatura, se sugiere un mecanismo de reacción plausible, como se ilustra en la Figura 2.14.

El primer paso del ciclo catalítico implica la adición oxidante de partículas de Pd soportadas al enlace C-X del 1,2-dihaloareno **2**, lo que conduce a la formación del complejo intermedio de Pd **A**. Posteriormente, una aminación de Buchwald-Hartwig a través del acoplamiento cruzado de la anilina **1** con el intermedio **A**, conduciría a la formación del complejo de Pd **B**, que seguida por la acción de una base y posterior eliminación reductora a partir del intermediario **C** promovería la formación de la diarilamina **D**.

En la segunda etapa, la activación del enlace C-H mediada por Pd impulsaría la generación del complejo de diarilpaladio **E**. Finalmente, un paso de eliminación reductora llevaría al carbazol deseado **3** con la regeneración del catalizador de Pd. No se puede descartar que las especies de soporte jueguen un rol importante en el ciclo catalítico. El soporte mBC muestra una amplia variedad de grupos funcionales, que podrían participar potencialmente en cualquiera de los pasos del ciclo. Sin embargo, desentrañar el papel de tales sitios es complejo y está más allá del alcance del presente estudio.

2.3 Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se obtuvieron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Los solventes se secaron y destilaron de acuerdo con el procedimiento estándar.⁸⁵ Las reacciones se monitorearon mediante TLC en placas de gel de sílice (60F-254) visualizadas bajo luz UV y/o utilizando ácido fosfomolibdico al 5% en etanol.

Todos los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron a temperatura ambiente en CDCl_3 , acetona- d_6 o $\text{DMSO}-d_6$ en un espectrómetro Bruker Avance ARX-300. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm desde el TMS utilizando la resonancia del solvente residual. Se utilizaron abreviaturas estándar para denotar multiplicidades como se denota: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto (quartet), m = multiplete, br s = señal ancha (broad signal).

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro FT-IR PerkinElmer Paragon 1000 en modo ATR a temperatura ambiente.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato Büchi 510 y no están corregidos.

Los espectros de masas (EI) se obtuvieron a 70 eV en un instrumento HP-5890 CG-EM de Hewlett Packard equipado con un detector de masas selectivo HP-5972.

La pureza de los compuestos volátiles y los análisis cromatográficos se determinaron con un CG Shimadzu (GC-14B) con un detector de ionización de llama equipado con una columna HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) utilizando N_2 como gas portador.

Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un equipo Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL (para EI) y Finnigan MAT 95 (para ESI).

La cromatografía en columna flash se realizó utilizando gel de sílice MN Macherey Nagel 60M (0.040-0.063 mm/230-240 mesh ASTM).

Las reacciones de microondas se realizaron utilizando un horno de microondas CEM Discover en recipientes de reacción sellados.

La carga de paladio del catalizador se determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo PerkinElmer AAnalyst 700.

Las muestras se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando un aparato Joel 100 CX2 (Tokio, Japón). Se midieron aproximadamente cien partículas de paladio para realizar la distribución del tamaño de partícula y obtener el tamaño promedio de partícula (d).⁸⁶

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno se midieron en un equipo Quantachrome nova 1200e. Las áreas de superficie específica SBET se obtuvieron aplicando el método BET.

9H-carbazol (3a)

Preparado a partir de anilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido blanco; rendimiento: 150 mg (90%, 0.90 mmol); punto de fusión: 245–246 °C.

IR (KBr): 3392 (N–H), 3049, 1625, 1449, 1327, 1240 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, ArH), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, ArH), 7.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H, ArH), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, ArH), 11.26 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 110.9, 118.6, 120.2, 122.5, 125.5, 139.8.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₂H₉N: 167.0735; encontrado: 167.0738.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸⁷

1,3-dimetil-9H-carbazol (3b)

Preparado a partir de 2,4-dimetilanilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 13:1); sólido blanco; rendimiento: 100 mg (81%, 0.81 mmol); punto de fusión: 90–92 °C.

IR (KBr): 3432 (N–H), 3051, 2921, 1605, 1452, 1305, 1229 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.53 (d, *J* = 4.4 Hz, 6 H, 2 × CH₃), 7.09 (s, 1 H, ArH), 7.23–7.26 (m, 1 H, ArH), 7.38–7.45 (m, 2 H, ArH), 7.74 (s, 1 H, ArH), 7.86 (br s, 1 H, NH), 8.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 17.1, 21.6, 110.9, 117.7, 119.5, 119.6, 120.6, 123.2, 123.9, 125.7, 128.1, 129.1, 137.3, 139.9.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₃N: 195.1048; encontrado: 195.1045.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸³

3-metoxi-9H-carbazol (3c)

Preparado a partir de 4-metoxianilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido blanco; rendimiento: 152 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión: 148–150 °C.

IR (KBr): 3404 (N–H), 3053, 2925, 1612, 1460, 1310, 1255, 1032 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 7.05 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, ArH), 7.25–7.19 (m, 1 H, ArH), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, ArH), 7.41 (d, *J* = 3.6 Hz, 2 H, ArH), 7.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, ArH), 7.91 (br s, 1 H, NH), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 56.2, 103.2, 110.9, 115.2, 111.5, 119.2, 120.4, 123.4, 123.9, 125.9, 134.5, 140.4, 153.9.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₁NO: 197.0738; encontrado: 197.0736.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸⁸

1-metoxi-9H-carbazol (3d)

Preparado a partir de 2-metoxianilina y 1-bromo-2-clorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido blanco; rendimiento: 163 mg (83%, 0.83 mmol); punto de fusión: 69–71 °C.

IR (KBr): 3405 (N–H), 3050, 2924, 1507, 1457, 1311, 1234, 1030 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.02 (s, 3 H, OCH₃), 6.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.12–7.29 (m, 2 H, ArH), 7.40–7.48 (m, 2 H, ArH), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.27 (br s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 55.7, 106.0, 111.0, 113.0, 119.5, 119.9, 120.7, 123.8, 124.4, 125.8, 129.9, 139.3, 145.8.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₁NO: 197.0768; encontrado: 197.0771.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸⁹

3-metil-9H-carbazol (3e)

Preparado a partir de 4-metilanilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido blanco; rendimiento: 140 mg (71%, 0.71 mmol); punto de fusión: 169–171 °C.

IR (KBr): 3404 (N–H), 3051, 2921, 1459, 1333, 1217 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.54 (s, 3 H, CH₃), 7.17–7.28 (m, 2 H, ArH), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.40 (d, *J* = 3.6 Hz, 2 H, ArH), 7.89 (s, 1 H, ArH), 7.94 (br s, 1 H, NH), 8.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.6, 110.4, 110.7, 119.3, 120.3, 120.4, 123.3, 123.6, 125.8, 127.3, 128.9, 137.8, 139.9.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₁N: 181.0814; encontrado: 181.0819.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁰

2-metil-9H-carbazol (3f)

Preparado a partir de 3-metilanilina y 1-bromo-2-clorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido incoloro;

rendimiento: 170 mg (80%, 0.80 mmol); punto de fusión: 245–246 °C.

IR (KBr): 3397 (N–H), 3052, 2921, 1652, 1510, 1365, 1244 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.53 (s, 3 H, CH₃), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.18–7.24 (m, 2 H, ArH), 7.35–7.42 (m, 2 H, ArH), 7.95 (d, *J* = 7.9 Hz, 2 H, ArH), 8.03 (s, *J* = 7.8 Hz, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.7, 110.6, 110.9, 118.3, 119.8, 119.9, 120.0, 120.1, 122.5, 124.9, 135.0, 139.8, 140.2.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₁N: 181.0891; encontrado: 181.0894.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁰

2-metil-9H-carbazol (3f) y 4-metil-9H-carbazol (3g)

La purificación mediante cromatografía en columna (EP/AcOEt 9:1) proporcionó una mezcla 1:1 de 3f y 3g; rendimiento: 150 mg (83%, 0.83 mmol); sólido amarillo.

IR (KBr): 3397 (N–H), 3051, 2920, 1606, 1453, 1325 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.53 (s, 3 H, CH₃), 2.89 (s, 3 H, CH₃), 7.03 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, ArH), 7.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, ArH), 7.16–7.48 (m, 9 H, ArH), 7.90 (br s, 1 H, NH), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, ArH), 8.08 (br s, 1 H, NH), 8.19 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.1, 22.0, 110.1, 110.3, 110.4, 110.5, 110.7, 119.4, 119.9, 120.9, 125.1, 125.2, 125.6, 133.4, 136.0, 139.4, 139.9. Obtenido como una mezcla 1:1 de isómeros, lo que resulta en un conjunto doble de señales.

11H-benzo[*a*]carbazol (3h)

Preparado a partir de 1-naftilamina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido incoloro; rendimiento: 150 mg (71%, 0.71 mmol); punto de fusión: 226–227 °C.

IR (KBr): 3431 (N–H), 3042, 1598, 1449, 1324, 1239 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.61–7.68 (m, 3 H, ArH), 8.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 8.17 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 8.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArH), 8.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, ArH), 12.20 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.7, 117.2, 119.1, 119.4, 119.6, 121.2, 121.8, 123.1, 124.5, 125.1, 125.4, 128.5, 131.8, 135.1, 138.7.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₁N: 218.0964; encontrado: 218.0966.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸⁸

2-fenil-9H-carbazol (3i)

Preparado a partir de [1,1'-bifenil]-3-amina y 1-bromo-2-clorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido incoloro; rendimiento: 168 mg (69%, 0.69 mmol); punto de fusión: 242–244 °C.

IR (KBr): 3404 (N–H), 3040, 1600, 1459, 1331, 1273 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, acetona-*d*₆): δ = 7.21 (t, *J* = 8.2, 4.3 Hz, 1 H, ArH), 7.32–7.57 (m, 6 H, ArH), 7.71–7.80 (m, 3 H, ArH), 8.14 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H, ArH), 8.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, ArH), 10.50 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 108.9, 111.1, 117.9, 118.9, 120.3, 120.7, 121.9, 122.2, 125.7, 127.1, 127.2, 128.9, 137.9, 140.3, 140.4, 141.3.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₈H₁₃N: 243.0418; encontrado: 243.0420.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁰

3-bromo-9H-carbazol (3j)

Preparado a partir de 4-bromoanilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido blanco; rendimiento: 182 mg (74%, 0.74 mmol); punto de fusión: 195–196 °C.

IR (KBr): 3403 (N–H), 3043, 2922, 1597, 1456, 1334, 1270, 735 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, acetona-*d*₆): δ = 7.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.43–7.50 (m, 1 H, ArH), 7.51–7.60 (m, 3 H, ArH), 8.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 8.34 (s, 1 H, ArH), 10.54 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, acetona-*d*₆): δ = 111.0, 111.1, 112.6, 119.3, 120.4, 122.0, 122.7, 125.0, 126.4, 128.0, 138.7, 140.5.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₂H₈BrN: 244.9765; encontrado: 244.9767.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹¹

1-(9H-carbazol-3-il)etan-1-ona (3k)

Preparado a partir de 1-(4-aminofenil)etan-1-ona y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 143 mg (71%, 0.71 mmol); punto de fusión: 177–178 °C.

IR (KBr): 3294 (N–H), 3048, 2924, 1660 (C=O), 1599, 1329, 1246, 1015 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.73 (s, 3 H, CH_3), 7.25–7.33 (m, 1 H, ArH), 7.42–7.47 (m, 3 H, ArH), 8.03–8.10 (m, 2 H, ArH), 8.50 (br s, 1 H, NH), 8.75 (d, J = 1.5 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 26.9, 110.4, 111.2, 120.5, 120.7, 122.0, 123.2, 123.5, 126.8, 126.9, 129.4, 140.2, 142.6, 198.1.

HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}$: 197.0841; encontrado: 197.0839.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹²

3-carbonitrilo-9H-carbazol (3l)

Preparado a partir de 4-aminobenzonitrilo y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 6:4); sólido incoloro; rendimiento: 130 mg (68%, 0.68 mmol); punto de fusión: 188–189 °C.

IR (KBr): 3293 (N–H), 3097, 2220 (C≡N), 1605, 1465, 1326, 1242, 1127 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.25 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 7.48 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 8.24 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.71 (s, 1 H, ArH), 11.81 (br s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 100.2, 111.6, 112.1, 119.9, 120.7, 121.0, 121.6, 122.7, 125.7, 127.0, 128.7, 140.3, 141.7.

HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2$: 192.0585; encontrado: 192.0588.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹³

5H-[1,3]dioxolo[4,5-*b*]carbazol (3m)

Preparado a partir de 3,4-(metilenodio)anilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 8:2); sólido blanco; rendimiento: 170 mg (80%, 0.80 mmol); punto de fusión: 119–121 °C.

IR (KBr): 3403 (N–H), 3041, 2922, 1601, 1459, 1040 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 6.03 (s, 2 H, OCH₂O), 7.02–7.09 (m, 2 H, ArH), 7.24 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.62 (s, 1 H, ArH), 7.96 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, ArH), 11.08 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 91.1, 99.3, 100.6, 110.7, 115.4, 118.2, 119.2, 122.8, 123.8, 135.1, 139.6, 141.5, 146.7.

HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2$: 211.0633; encontrado: 211.0635.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁴

3-metil-9H-carbazol (3e) y 2-metil-9H-carbazol (3f)

La purificación por cromatografía en columna (EP/AcOEt 9:1) proporcionó una mezcla 1:1 de 3e y 3f; rendimiento: 130 mg (73%, 0.73 mmol); sólido amarillo; obtenido como una mezcla 1:1 de isómeros, resultando en un doble juego de señales. IR (KBr): 3466 (N–H), 3059, 2951, 2873, 1651, 1589, 1455, 1214 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.54 (s, 3 H, CH_3), 2.55 (s, 3 H, CH_3), 7.08 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 7.20–7.26 (m, 2 H, ArH), 7.18 (s, 1 H), 7.27–7.34 (m, 2 H, ArH), 7.35–7.45 (m, 3 H, ArH, y 1 H, NH residual), 7.85–7.90 (m, 2 H, ArH, y 1 H, NH residual), 7.96 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 8.01–8.10 (m, 2 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.2, 21.9, 110.2, 110.4, 110.5, 110.7, 119.2, 119.3, 119.9, 120.0, 120.2, 120.3, 121.0, 121.1, 123.2, 123.4, 123.5, 125.2, 125.6, 127.1, 128.8, 136.0, 137.8, 139.5, 139.8, 140.1.

2,3-dimetoxi-9H-carbazol (3n)

Preparado a partir de anilina y 1,2-dicloro-4,5-dimetoxibenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 9:1); sólido blanco; rendimiento: 186 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión: 185–187 °C.

IR (KBr): 3332 (N–H), 3052, 2912, 1602, 1409, 1334, 1219, 1090 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 3.85 (s, 3 H, CH_3), 3.86 (s, 3 H, CH_3), 7.04 (s, 1 H, ArH), 7.08 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, ArH), 7.26 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.66 (s, 1 H, ArH), 7.99 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, ArH), 10.98 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 56.9, 57.6, 95.9, 104.7, 112.1, 115.6, 119.4, 120.6, 124.3, 125.0, 135.9, 140.9, 145.1, 150.4.

HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 227.0946; encontrado: 227.0948.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁵

3-cloro-9H-carbazol (3o)

Preparado a partir de 4-cloroanilina y 1,2-diclorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 7:3); sólido blanco; rendimiento: 150 mg (76%, 0.76 mmol); punto de fusión: 197–198 °C.

IR (KBr): 3405 (N–H), 3047, 1600, 1488, 1333, 1268, 812 (C–Cl) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.15–7.19 (m, 1 H, ArH), 7.28–7.50 (m, 4 H, ArH), 8.06–8.22 (m, 2 H, ArH), 11.43 (br s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 111.2, 112.4, 118.9, 119.8, 120.7, 121.6, 122.8, 123.7, 125.3, 126.3, 138.1, 140.3.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClN}$: 201.0418; encontrado: 201.0422.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸⁷

Metil-9H-carbazol-3-carboxilato (3p)

Preparado a partir de anilina y metil 4-bromo-3-clorobenzoato; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 6:4); sólido blanco; rendimiento: 160 mg (71%, 0.71 mmol); punto de fusión: 170–172 °C.

IR (KBr): 3409 (N–H), 3048, 2947, 1710 (C=O), 1590, 1497, 1327, 1286, 1244, 1119 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.92 (s, 3 H, CH₃), 7.25–7.29 (m, 1 H, ArH), 7.44–7.48 (m, 1 H, ArH), 7.58 (dd, J = 8.3, 3.5 Hz, 2 H, ArH), 8.09 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 8.26 (d, 1 H, J = 7.8 Hz, ArH), 8.82 (s, 1 H, ArH), 10.9 (br s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 51.9, 110.1, 110.9, 120.3, 120.6, 121.4, 122.9, 123.1, 123.3, 126.5, 127.4, 139.9, 142.3, 167.9.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 225.0863; encontrado: 225.0865.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁸³

3-nitro-9H-carbazol (3q)

Preparado a partir de anilina y 1,2-dicloro-4-nitrobenzato; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 129 mg (61%, 0.61 mmol); punto de fusión: 211–213 °C.

IR (KBr): 3412 (N–H), 3067, 1643, 1488, 1459 (N–O), 1311, 1084, 814, 724 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6): δ = 7.35 (dd, J = 11.2, 3.9 Hz, 1 H, ArH), 7.49–7.58 (m, 1 H, ArH), 7.61–7.72 (m, 2 H, ArH), 8.35 (ddd, J = 11.3, 8.4, 1.5 Hz, 2 H, ArH), 9.10 (dd, J = 1.5, 0.8 Hz, 1 H, ArH), 11.10 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6): δ = 110.8, 111.8, 116.9, 120.6, 120.9, 121.2, 122.8, 122.9, 127.3, 140.7, 141.3, 143.5.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$: 212.0658; encontrado: 212.0655.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁵

9H-pirido[2,3-b]indol (3r)

Preparado a partir de 2-aminopiridina y metil 2-bromo-1-clorobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 40:1); sólido blanco; rendimiento: 133 mg (79%, 0.79 mmol); punto de fusión: 214–215 °C.

IR (KBr): 3400 (N–H), 3048, 1615, 1403, 1328, 1275 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.17–7.25 (m, 2 H, ArH), 7.42–7.48 (m, 1 H, ArH), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.15 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, ArH), 8.41 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 8.49 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 11.80 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 111.2, 114.9, 115.2, 119.4, 120.4, 121.2, 126.6, 128.4, 138.8, 146.1, 151.9.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2$: 168.0766; encontrado: 168.0769.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁵

3-nitro-6-metoxi-9H-carbazol (3s)

Preparado a partir de 4-metoxianilina y 1,2-dicloro-4-nitrobenzato; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 145 mg (60%, 0.60 mmol); punto de fusión: 181–183 °C.

IR (KBr): 3420 (N–H), 3052, 2825, 1636, 1605, 1490, 1483 (N–O), 1295, 1171, 1032 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.87 (s, 3 H, OCH₃), 7.14 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1 H, ArH), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, ArH), 7.41 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, ArH), 7.58 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 8.31 (dd, J = 9.0, 2.0 Hz, 1 H, ArH, y 1 H, NH residual), 8.96 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 56.2, 103.5, 110.6, 112.0, 117.3, 117.6, 121.4, 121.8, 123.9, 135.3, 141.4, 143.4, 155.2.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$: 241.0613; encontrado: 241.0617.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁶

metil-6-metoxi-9H-carbazol-3-carboxilato

(3t)

Preparado a partir de 4-metoxianilina y metil-4-bromo-3-clorobenzoato; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 9:1); sólido incoloro; rendimiento: 190 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión: 148–149 °C.

IR (KBr): 3404 (N–H), 3047, 2948, 1716 (C=O), 1611, 1440, 1321, 1283, 1117, 1020 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.91 (s, 3 H, OCH₃), 3.97 (s, 3 H, OCH₃), 6.89–6.92 (m, 2 H, ArH), 8.70 (s, 1 H, ArH), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 7.98 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 8.06 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1 H, ArH), 8.18 (br s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 51.6, 55.9, 103.3, 111.6, 110.2, 115.9, 120.9, 122.9, 123.1, 123.8, 127.2, 134.7, 143.0, 154.5, 167.8.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$: 255.0968; encontrado: 255.0973.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.⁹⁷

8-metil-5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]carbazol

(3u)

Preparado a partir de 3,4-(metilendioxo)anilina y 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno; purificado mediante cromatografía sobre SiO_2 (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 200 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión 223–224 °C.

IR (KBr): 3396 (N–H), 3045, 2910, 2850, 1687, 1585, 1484, 1458, 1378, 1297, 1189, 1151, 1036 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6): δ = 2.45 (s, 3 H, CH₃), 5.99 (s, 2 H, OCH₂O), 6.97 (s, 1 H, ArH), 7.09 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1 H, ArH), 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, ArH), 7.49 (s, 1 H, ArH), 7.75 (s, 1 H, ArH), 10.04 (br s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6): δ = 21.9, 92.9, 99.8, 101.8, 111.4, 116.8, 119.8, 124.5, 126.1, 128.4, 136.7, 139.3, 142.9, 148.0.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 225.0863; encontrado: 225.0865.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{94,97}

Capítulo 3: Técnicas de obtención del andamiaje acridona

3.1 Estado del arte

La obra conocida como «Los Polvos de la Condesa», escrita por Ricardo Palma, es una crónica de la época del decimocuarto virrey del Perú que relata la historia de la virreina Francisca Henríquez de Ribera. La virreina enferma de la llamada «fiebre terciaria», enfermedad que luego sería conocida como malaria, y que aparecía, como su nombre lo indica, al tercer día.

El virrey había llegado a Lima en enero de 1639, y dos meses más tarde su bellísima y joven esposa doña Francisca Henríquez de Ribera, a la que había desembarcado en Paita para no exponerla a los azares de un probable combate naval con los piratas. Algún tiempo después se sintió la virreina atacada de esa fiebre periódica que se designa con el nombre de terciana y que era conocida por los incas como endémica en el valle del Rímac (Palma, 2000).

Se narra, también, la historia del indio Pedro de Leyva, que utilizó las aguas en cuyas orillas crecían árboles de quina para someter su fiebre. Del mismo río hizo beber a otros enfermos en cántaros de agua con raíces de este árbol, causando que el conocimiento se esparciera. Los jesuitas aprendieron y guardaron el secreto de este remedio por algunos años, utilizando los polvos de la corteza de quina para tratar a aquellos afectados de «tercianas» y haciendo que esta preparación se conociese con el nombre de «polveros de los jesuitas».

La quinina o chinchona (Figura 3.1), nombrada así por Carlos Linneo en honor de Francisca Henríquez de Ribera, segunda esposa del Conde de Cinchón, es un alcaloide encontrado en la corteza del árbol de quina capaz de eliminar al microorganismo conocido como «Plasmodium», transmitido por el zancudo Anopheles, causante de la malaria.

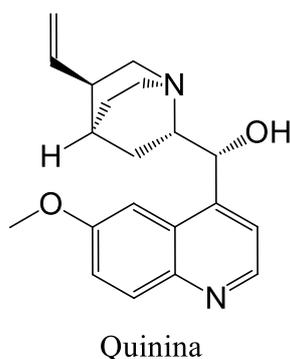


Figura 3.1. Quinina, alcaloide natural con propiedades antipiréticas, antipalúdicas y analgésicas.

En 1941, al comienzo de la Segunda Guerra Mundial, una orden presidencial en Estados Unidos inició las investigaciones sobre drogas para el tratamiento de la malaria con el llamado «Proyecto Manhattan Biológico». Se trató de un objetivo de guerra dado que las plantaciones de árbol de la quina en la Indonesia holandesa suponían el 97% del comercio mundial de quinina y estaban en peligro de caer en manos japonesas, lo que ocurrió poco después del Pearl Harbor. El programa incluía el ensayo de compuestos químicos con posible actividad antimalárica.⁹⁸



Figura 3.2. «Estos hombres no tomaron su Atebrina», cartel en un campamento militar de los Estados Unidos, durante la Segunda Guerra Mundial.

Con la cooperación de compañías farmacéuticas y de sus programas de síntesis de nuevos compuestos, para el final del programa en 1945, se habían ensayado más de 16000 compuestos. La Quinacrina, también conocida como atebrina (Figura 3.3), se sintetizó en 1930 y se comercializó en 1932. Se trata de un análogo sintético de la quinina que durante la Segunda Guerra Mundial fue declarado como el fármaco de elección para la profilaxis de la malaria.⁹⁹ Dado que numerosos soldados con lupus o artritis reumatoide mejoraron indirectamente por utilización de este medicamento, se determinó por serendipia su efectividad en el tratamiento de conectivopatías.¹⁰⁰

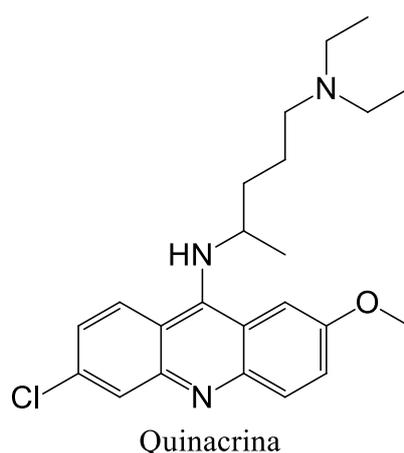


Figura 3.3. Quinacrina, una acridina, congénere sintético de la Quinina.

Tras el impacto de la atebrina, y con el impulso del proyecto Manhattan, así como de otros que se inspiraron en el mismo, los investigadores comenzaron a explorar más a fondo las propiedades y aplicaciones de diversos tipos de compuestos.

La estructura fundamental de la atebrina, perteneciente al grupo de las 9-aminoacridinas, proporcionó una base sólida para la síntesis de una variedad de derivados químicos con potencial terapéutico. Los avances en la comprensión de la estructura-actividad permitieron a los científicos ajustar los grupos funcionales y las características de estas moléculas, ampliando así su rango de aplicaciones.

Desde la malaria hasta aplicaciones en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios, las acridonas emergieron como una clase diversa de compuestos con prometedoras propiedades terapéuticas. La conexión histórica entre la atebrina y las acridonas resalta cómo los descubrimientos del pasado siguen influyendo en la investigación

y desarrollo de fármacos en el presente, impulsando la innovación y la exploración continua en el campo de la medicina y la química.

Las acridonas, que son las moléculas de nuestro interés, constituyen una destacada clase de compuestos heteroaromáticos, que se definen químicamente como sistemas dibenzo-4-piridonas (ver Figura 3.4), siendo consideradas una subclase de las acridinas. Estos compuestos poseen una estructura tricíclica fusionada que está presente en numerosos productos naturales y sintéticos, los cuales han exhibido un amplio espectro de potencial biomédico debido a su capacidad para interactuar con diversos mecanismos de acción.¹⁰¹

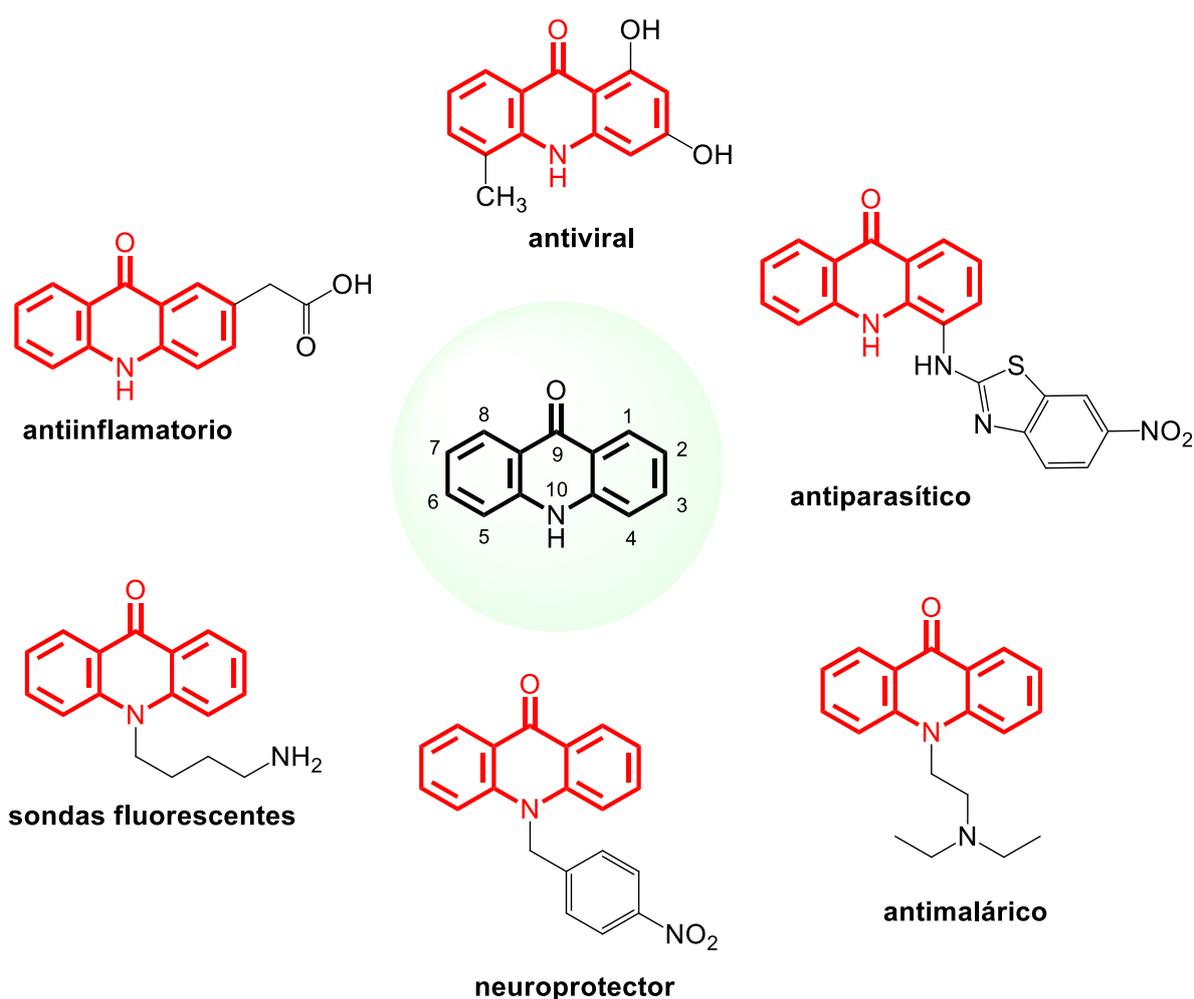


Figura 3.4. El núcleo acridin-9-ona y sus principales aplicaciones.

Hasta la fecha, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para estudiar las actividades farmacológicas de las acridonas, destacando sus propiedades como agentes antiparasitarios, antivirales, antimalariales y antiinflamatorios (Figura 3.4). Además de su relevancia biomédica, las acridonas también desempeñan un papel importante como bloques de construcción de semiconductores orgánicos,^{102,103} tinturas y marcadores fluorescentes.^{4,104–107}

Como resultado, se ha dedicado un esfuerzo considerable a la búsqueda de nuevos protocolos para sintetizar estas moléculas. Una recolección bibliográfica de rutas sintéticas para la síntesis del núcleo acridona se muestra en la Figura 3.5.

Por lo general, la construcción de esta estructura implica una ciclación intramolecular de los ácidos, amidas o cetonas *N*-aril sustituidas correspondientes (Figura 3.5, ruta **I**)^{108–112}.

También se han empleado estrategias de formación intramolecular de enlaces C-N a partir de 2-aminobenzofenonas (rutas **II** y **III**).^{113–115}

En 2017, Lei y colaboradores reportaron un protocolo intermolecular para la síntesis de acridonas mediante carbonilación oxidante de difenilaminas con CO catalizada por paladio/cobre (ruta **IV**).¹¹⁶

Más recientemente, el grupo de Zhang desarrolló un protocolo de reacción en cascada mediada por Cu(II) para *o*-aminoacetofenonas y ácidos arilborónicos (ruta **V**), que procede mediante reorganización simultánea de los intermediarios isatina.¹¹⁷

Se ha reportado, de igual forma, la reacción de anulación intramolecular de derivados del éster del ácido antranílico con arino, o sales de ariliodonio (ruta **VI** y **VII**).^{118,119}

Shu y colaboradores reportaron el acceso a acridonas mediante aminación electrofílica catalizada por Cu(I) y anulación oxidante del antranilo con ácidos arilborónicos mediada por Ag(I) (ruta **VIII**).¹²⁰

Otras rutas sintéticas para la generación de acridonas se describen en trabajos de este estilo.^{121–124}

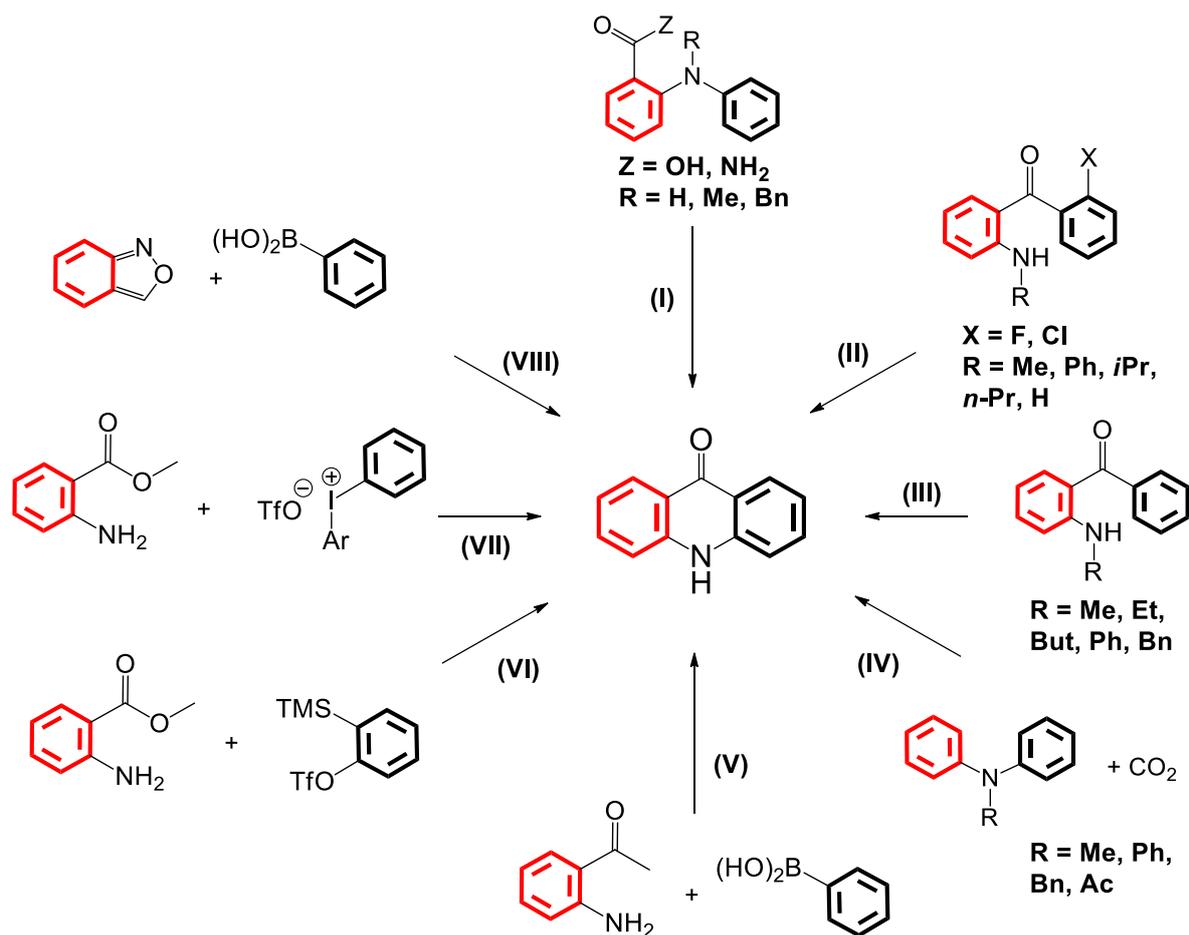


Figura 3.5. Aproximaciones sintéticas conocidas de acceso al núcleo acridona.

Si bien los protocolos mencionados permiten la formación exitosa de acridonas funcionalizadas, la mayoría de estas estrategias tienen claros defectos tales como la severidad de las condiciones de reacción, o bien el requerimiento de sustratos de elevado costo, o que deben ser pre-tratados. De tal forma, el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis del andamiaje acridona se encuentran en elevada demanda.

Uno de los desafíos de la síntesis, que implica la construcción de moléculas complejas a través de varios pasos, es el de aumentar la sostenibilidad de los procesos al simplificar los procesos de separación y purificación, así como la optimización de tiempo y recursos.

En este contexto, el uso de la catálisis heterogénea asistida por microondas, así como el desarrollo de reacciones de tipo *one-pot* en tándem, son clave para la mejoría de la eficiencia y simplicidad operacional de procesos sintéticos desde una perspectiva de química más amigable con el medio ambiente.¹²⁵

Varios ejemplos han mostrado que sistemas catalíticos multifuncionales pueden reducir el número de pasos sintéticos mediante la generación de procesos catalíticos secuenciales dentro de una operación.^{126,127} Este tipo de procesos *one-pot* pueden ser llevados a cabo en un único recipiente sin pasos intermedios de purificación para las diferentes reacciones que tienen lugar, evitándose así síntesis pausadas y brindando ventajas tanto económicas, como ambientales.

En una continuación de nuestras investigaciones llevadas a cabo en síntesis de tipo *one-pot* con catalizadores de paladio,^{128,129} durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se presentó lo que es a la fecha y de acuerdo a nuestro conocimiento, una técnica de reacción dominó catalizada por un novedoso catalizador de Pd para la síntesis directa de una biblioteca de acridonas, por irradiación con microondas (Figura 3.6).¹³⁰

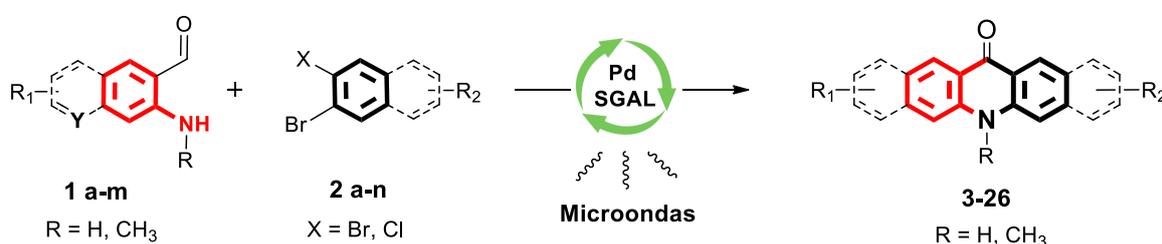


Figura 3.6. Nueva aproximación sintética a acridonas.

Esta aproximación sintética implica una aminación de Buchwald-Hartwig en tándem,¹³¹⁻¹³⁴ con una subsecuente reacción de acoplamiento arílico mediante ruptura de un enlace C-H de aldehídos, utilizando 2-aminobenzaldehídos y 1,2-dihaloarenos comercialmente disponibles como materiales de partida, bajo condiciones libres de ligando.¹³⁵ Para este propósito, se generó un nuevo catalizador heterogéneo constituido de nanopartículas de Pd soportado sobre γ -alúmina (PdNPs/SGAL).

La motivación detrás del trabajo que se explicará en la sección siguiente fue el desarrollo de un método más amigable con el medio ambiente, de tipo *one-pot*, que permitiera acceso rápido y reproducible a las acridonas.

3.2 Nueva ruta sintética

Las condiciones de reacción para la anulación directa catalizada por paladio fueron optimizadas utilizando 2-aminobenzaldehídos (**1a**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**) como reactivos para una reacción modelo, de tal manera de sintetizar acridin-9(10*H*)-ona. La elección de precursores se basó en el bajo costo y elevada disponibilidad comercial, en comparación a la mayoría de los materiales de partida reportados a la fecha para las dibenzo-4-piridonas. En una serie de experimentos control preliminares, se evaluó la actividad catalítica de diversos catalizadores de paladio bajo las condiciones de reacción reportadas por nuestro grupo para la formación de enlaces C-N y C-C, que se determinaron en el trabajo de carbazoles, {[Pd] (15 mol%), DMSO, Cs₂CO₃ (2 mmol), 150 °C, 200 W, 30 minutos}.¹²⁹

La lista y una breve descripción de los catalizadores estudiados se puede ver en la Tabla 3.1. Es de notoriedad que la mayoría de los catalizadores que se utilizaron en este estudio exploratorio han sido probados en trabajos previos de nuestro grupo para la construcción de otras estructuras heterocíclicas privilegiadas, excepto el caso de PdNPs/SGAL, que fue evaluado por primera vez en este trabajo.

Teniendo presente que las partículas soportadas en γ -alúmina sin tratamiento permitieron adquirir el compuesto deseado, aunque con muy bajos rendimientos, nos propusimos incorporar otras especies sobre el soporte con potenciales propiedades catalíticas.

En este contexto, se concibió la formulación de un nuevo catalizador multifuncional, el PdNPs/SGAL. Este catalizador presentaría sitios redox correspondientes al metal noble, junto a otros relacionados a especies de azufre. El empleo de la catálisis multifuncional es necesario para rutas sintéticas de varios pasos de manera de simplificar, como mencionamos previamente, los procesos de separación y purificación, además de dar lugar a un proceso de síntesis más efectivo en el contexto de la química verde.¹³⁶ Es así que PdNPs/SGAL fue preparado por un método sencillo, soportando sobre la γ -alúmina especies de paladio y azufre de tal forma de tener una muestra bifuncional.

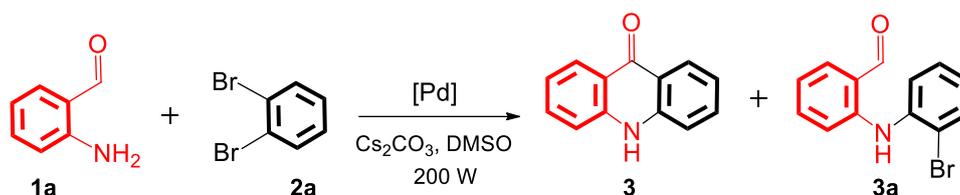
El catalizador PdNPs/SGAL fue preparado soportando nanopartículas de paladio sobre γ -alúmina sulfatada (SGAL). Se comenzó por sulfatar la alúmina comercial siguiendo un protocolo ya reportado.¹³⁷ Aproximadamente 1 g de alúmina fue expuesto a impregnación

en solución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y transcurrido el tiempo apropiado, se calcinó en aire a 873K por 4 horas. El soporte sulfatado fue embebido en una solución ácida de PdCl_2 a 80 °C con agitación magnética. Posteriormente, se agregaron una solución al 37% de formaldehído y solución acuosa de NaOH al 30% a modo de llevar a pH básico, para precipitar las nanopartículas sobre el soporte. El sólido se filtró y lavó hasta pH neutro con agua destilada, y se secó a 100 °C por 2 horas.

Estudios preliminares mostraron que cuando el nuevo catalizador se utilizó a 150 °C, la formación de la acridona deseada tenía lugar en tan sólo un 15% (Tabla 3.1, entrada 3). Un rendimiento bastante superior, del 54%, se logró al aumentar la temperatura a 180 °C (entrada 4), también se detectó la formación de 2-((2-bromofenil)amino)benzaldehído (**3a**) en un 12%. No hubo variación al continuar aumentando la temperatura (entrada 5). No se observó formación del producto deseado al utilizar el soporte SGAL bajo las mismas condiciones (entrada 6). A continuación, otros nanocatalizadores de paladio soportados en diferentes materiales, tales como PbO y biocarbón, fueron evaluados (entradas 7-10). PdNPs/PbO fue completamente inefectivo (entrada 7), bajos rendimientos se encontraron al utilizar $\text{PdNPs}/\text{C}^{17}$ (entrada 8), marginalmente mayores para PdNPs/BC (entrada 9) y sin mayores diferencias para PdNPs/mBC (entrada 10). Cuando la transformación se estudió para nanopartículas no soportadas de paladio, se generó el producto deseado con muy bajos rendimientos (entrada 11).¹³⁸

La eficiencia catalítica de cuatro catalizadores homogéneos comerciales se probó a modo comparativo. Ninguno de los catalizadores evaluados (entradas 12-16) permitió un incremento de la formación de la acridin-9(10H)-ona bajo las condiciones de reacción estudiadas. El uso de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ dio lugar a rendimientos muy bajos y a la formación de productos de homoacoplamiento del dihaloareno, 2,2'-dibromo-1,1'-bifenilo. $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ no mostraron actividades catalíticas bajo las condiciones de reacción estudiadas, mismo resultado que se obtuvo para $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, para las que además se detectó deposición de paladio negro.

Tabla 3.1. Evaluación sistemática de catalizadores.



Entrada	[Pd]	Temperatura (°C)	Rendimiento ^b (%)	Comentarios
1	PdNPs/GAL	150	7	Referencia ¹³⁹
2	PdNPs/GAL	180	12	Referencia ¹³⁹
3	PdNPs/SGAL	150	15	Este trabajo
4	PdNPs/SGAL	130	54 ^c	Este trabajo
5	PdNPs/SGAL	200	55	Este trabajo
6	SGAL	180	-	Sin paladio
7	PdNPs/PbO	180	Trazas	Referencia ^{128,129}
8	PdNPs/C	180	15	Comercial
9	PdNPs/BC	180	19	Referencia ¹⁴⁰
10	PdNPs/mBC	180	23	Referencia ¹⁴¹
11	PdNPs	180	8	Partículas desnudas
12	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	180	7 ^d	Comercial
13	PdCl ₂ (MeCN) ₂	180	-	Comercial
14	Pd(OAc) ₂	180	-	Comercial
15	Pd ₂ (dba) ₃	180	- ^e	Comercial
16	Pd(PPh ₃) ₄	180	- ^e	Comercial
17	PdNPs/SGAL	180	16 ^f	Este trabajo
18	-	180	-	Control

^a Condiciones de reacción 1a (1.2 mmol), 2a (1 mmol), Cs₂CO₃ (2 mmol), [Pd] (15 mol%, 12.4 mg de Pd), DMSO (5 ml), 200 W, 30 min. Monitoreo por TLC y CG-EM.

^b Rendimiento de producto aislado.

^c Subproducto difenilamina 3a (12 %) detectado en el crudo de reacción.

^d Producto de homoacoplamiento (10%) detectado en el crudo de reacción.

^e Deposición de paladio negro.

^f Reacción llevada adelante por tratamiento térmico convencional en baño de aceite.

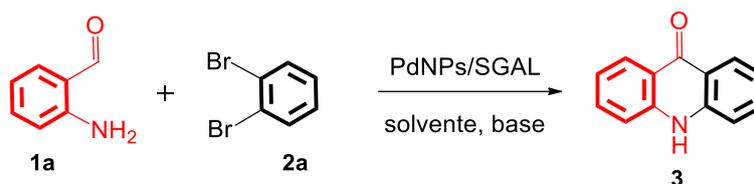
De los primeros estudios exploratorios, se concluyó que el catalizador PdNPs/SGAL permitió la adquisición de los mejores resultados en términos de rendimiento para la anulación directa que permite la formación del esqueleto acridona. La presencia de especies de azufre, junto a aquellas de paladio, tendrían un rol vital en la eficacia del catalizador.

Cuando la reacción se llevó adelante en forma tradicional en baño de aceite a 180 °C por 30 minutos, se logró un rendimiento del 16% (entrada 17). Tiempos de reacción más prolongados en condiciones térmicas no mostraron mejoría en los rendimientos, lo cual nos lleva a suponer que la irradiación de microondas es fundamental para este tipo de anulación directa. Además, el experimento control indicó que el catalizador de paladio era necesario para esta transformación (entradas 6 y 18).

De manera tal de aumentar la conversión, se llevaron a cabo una serie de modificaciones que incluyen la carga del catalizador, solvente de reacción y base utilizados (Tabla 3.2).

Inicialmente, cuando la reacción fue planteada utilizando 20 mol% de catalizador, no hubo aumentos notorios de conversión evidenciados, observándose en su lugar la formación del producto de homoacoplamiento. Se concluye que estos bajos rendimientos relativos observados en la entrada 1 de la Tabla 3.2 se deberían a limitaciones de difusión de reactivos y productos a través de la estructura porosa del catalizador. NPs/SGAL posee un área de superficie específica elevada, con volumen de poros relativamente alto (121 m²/g y 0.31 cm³/g, respectivamente). Una disminución de la carga del catalizador a 10 mol% llevaría una difusión libre de masa para reactivos y productos que conlleva un aumento en el rendimiento de la reacción, sin generación de productos de homoacoplamiento. Mayores disminuciones en la carga de catalizador condujeron a menores rendimientos y a la formación de un 21% de la diarilamina, 2-((2-bromofenil)amino)benzaldehído.

Tabla 3.2. Optimización de las condiciones de reacción.



Entrada	PdNPs/mBC (mol%)	Solvente	Base	Rendimiento (%) ^b
1	20 ^c	DMSO	Cs ₂ CO ₃	57 ^d
2	10 ^e	DMSO	Cs ₂ CO ₃	78
3	8 ^f	DMSO	Cs ₂ CO ₃	61 ^g
4	10	DMSO	K ₂ CO ₃	51
5	10	DMSO	NaOt-Bu	65
6	10	DMSO	NaOH	39
7	10	DMSO	NaOAc	42
8	10	DMSO	K ₃ PO ₄	85
9	10	DMSO	K ₃ PO ₄	71 ^h
10	10	DMSO	K ₃ PO ₄	84 ⁱ
11	10	DMSO	-	- ^j
12	10	DMF	K ₃ PO ₄	79
13	10	NMP	K ₃ PO ₄	90
14	10	DMA	K ₃ PO ₄	76
15	10	DEC	K ₃ PO ₄	65
16	10	<i>n</i> -BuOH	K ₃ PO ₄	69

^a Condiciones de reacción: **1a** (1.2 mmol), **2a** (1 mol), base (2 mmol), solvente (5 ml) a 180°C bajo radiación microondas de 200 W por 30 minutos. Tiempo de reacción monitoreado por TLC y CG-EM.

^b Rendimiento de producto aislado.

^c PdNPs/SGAL (20 mol%, 16.4 mg de Pd).

^d 2,2'-dibromo-1,1'-bifenilo (15 %) detectado, producto de homoacoplamiento.

^e PdNPs/SGAL (10 mol%, 8.2 mg de Pd).

^f PdNPs/SGAL (8 mol%, 6.6 mg de Pd).

^g 2-((2-bromofenil)amino)benzaldehído **3a** (21 %) detectado.

^h La reacción se llevó a cabo en presencia de K₃PO₄ (1.5 mmol).

ⁱ La reacción se llevó a cabo en presencia de K₃PO₄ (3 mmol).

^j La reacción se llevó a cabo en ausencia de base.

Se examinó a continuación la eficiencia de diferentes bases, resumidas en la Tabla 3.2, entradas 4-8. El uso de 2 mmol de K_3PO_4 en presencia de DMSO dio lugar a los mejores resultados para esta transformación (entrada 8), mientras las otras bases tales como K_2CO_3 , $NaOt-Bu$, $NaOH$ y $NaOAc$ no lograron mejorar los rendimientos de la reacción. Al disminuir la concentración de la base de mejor rendimiento, disminuyó la conversión (entrada 9), aunque un aumento en la cantidad de la misma no aumentó el rendimiento (entrada 10). Se llevó a cabo también una reacción control sin base, para la que se observó una conversión mínima por presencia de trazas de la acridona deseada (entrada 11). Esto implicaría que la base tiene un rol fundamental en el proceder de esta transformación en tándem.

A continuación, la reacción fue estudiada desde la perspectiva del solvente. En la Tabla 3.2 se muestran los resultados para solventes como la *N,N*-dimetilformamida, *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), *N,N*-dimetilacetamida (DMA), dietilcarbonato (DEC) y *n*-butanol (entradas 12-16). Dentro de los solventes utilizados, NMP resultó ser la más efectiva para esta transformación.

Finalmente, se evaluó la incidencia de la irradiación por microondas en el tiempo de reacción, a diferentes valores de potencia. Para este propósito, se utilizó el reactor CEM-Discover a 180 °C, monitoreando el progreso de reacción mediante TLC y CG-EM. La conversión total del 1,2-bromobenceno (**2a**), pudo observarse transcurridos 20 minutos, a 200 W y 180 °C. Tiempos de reacción menores llevaron a una transformación incompleta de los reactivos, mientras que tiempos mayores no mostraron mejorías en término de rendimiento. La irradiación a 100, 250 y 300 W de potencia dio lugar a conversiones menores y/o tiempos de reacción mayores. En base a estos resultados, se estableció que una potencia de 200 W a 180 °C por 30 minutos daría lugar a las condiciones de reacción más óptimas y eficientes para la formación del producto deseado.

En conclusión, los estudios colectivos han mostrado que las condiciones de reacción óptimas para la síntesis *one-pot* de acridin-9(10*H*)-ona requiere de 2-aminobenzaldehído (**1a**, 1.2 mmol), 1,2-dibromobenceno (**2a**, 1 mmol), PdNPs/SGAL (10 mol%, 8.2 mg de Pd) como catalizador, K_3PO_4 (2 mmol) y NMP (5 ml) a 180 °C bajo irradiación con microondas a 200W por 30 minutos. Estas condiciones, notoriamente, no implican el uso de aditivos, o ligandos fosfina, ni pre-activación de los materiales de partida que se ven reportados para trabajos de este tipo en procesos en tándem. También cabe destacar que no se observó formación del

subproducto biarilo, generado por homoacoplamiento del dihaloareno catalizado por paladio, lo cual denota un nivel elevado de selectividad para la metodología presentada.

El alcance de la reacción se llevó a cabo una vez determinadas las condiciones de reacción óptimas, utilizando diferentes 1,2-dihalobencenos **2a-d** y obteniéndose rendimientos de moderados a excelentes. Para el precursor 1,2-diiodobenceno, la reacción dio lugar a la formación de productos de homoacoplamiento. Sin embargo, este no fue el caso para el resto de los dihaloarenos estudiados. El mejor resultado en términos de conversión y rendimiento se observó para el 1,2-dibromobenceno (**2a**), a partir del cual se continuaron estudiando el alcance y las limitaciones de esta metodología.

La estrategia sintética presentada se mostró compatible con diferentes grupos funcionales, dando lugar a los productos de interés con rendimientos que van de moderados a excelentes. La reacción avanzó de muy buena forma con 2-aminobenzaldehídos con sustituyentes neutros o ricos en electrones, mientras que grupos electroattractores dieron lugar a, si bien ligeramente inferiores, aún muy buenos rendimientos. La incorporación de halógenos en la estructura de la acridona, bien tolerada por este tipo de reacción, es de particular interés para síntesis de compuestos más complejos que requieren mayor funcionalización.

Por otro lado, cuando la reacción se llevó a cabo con dihaloarenos funcionalizados, los rendimientos fueron de buenos a muy buenos, con resultados similares a los obtenidos para el rango de reactivos probados para los 2-aminobenzaldehídos derivados. La utilización de 1,2-dibromo-4-metilbenceno (**2g**) y 2-aminobenzaldehído (**1a**) dio lugar a una mezcla equimolar de los dos regioisómeros correspondientes, tal como era de esperarse, lo cual denota un bajo control de selectividad. Sin embargo, se observó un elevado nivel de regioselectividad en la anulación directa del 2-aminobenzaldehído (**1a**) con dihalobencenos del tipo 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno (**2e**) y 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno (**2f**), para los que se obtuvieron los regioisómeros puros con buenos rendimientos. La quimio y regioselectividad fueron evaluadas en presencia de otros 1,2-dihaloarenos asimétricamente sustituidos, con grupos cloro, flúor, nitrilo y nitro en posición *para*, y se obtuvieron los productos esperados con completa regioselectividad y rendimientos buenos.

Finalmente, se generaron mediante esta metodología una serie de acridonas *N*-alquiladas con muy buenos rendimientos, lo que permitió extender el alcance y generalidad de este protocolo.

El *work-up* y aislamiento del producto consistió en la adición de acetato de etilo a la mezcla de reacción. El catalizador se recuperó por filtración y fue lavado con el solvente de reacción. El filtrado fue lavado varias veces con solución saturada de NaCl y luego secado sobre Na₂SO₄ anhidro. El solvente se removió a continuación mediante presión reducida en rotaevaporador y la acridona fue purificada por cromatografía en columna utilizando silica gel 60 como adsorbente. La elucidación estructural de los compuestos fue confirmada basada en datos espectroscópicos de RMN y FT-IR.

La reciclabilidad del catalizador PdNPs/SGAL se evaluó con la reacción modelo para la síntesis de acridin-9(10*H*)-ona, bajo las condiciones de reacción optimizadas. Los resultados se resumen en la Figura 3.7, no hubo pérdida de eficiencia catalítica transcurridos 4 ciclos catalíticos. El aumento de rendimiento del ciclo 3 al 4, si bien no se considera significativo, podría estar asociado a una reestructuración de la superficie catalítica al someter el catalizador a las condiciones de reacción. Se ha comentado respecto de este tipo de fenómenos, basados en la caracterización de la superficie catalítica bajo condiciones operativas.¹⁴²

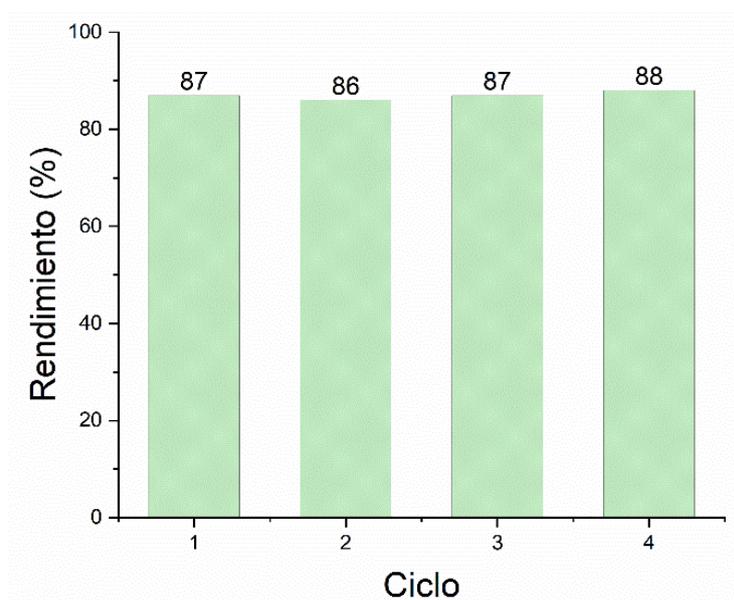


Figura 3.7. Reciclabilidad de PdNPs/SGAL en la síntesis directa de acridin-9(10*H*)-ona.

Confirmar la estabilidad del catalizador es de extrema importancia a la hora de definir qué tan fuertemente ligado se encuentra el metal noble a la superficie del soporte, de forma tal de evitar contaminación en el medio. Para esta determinación, se evaluó la posibilidad de desprendimiento de metal mediante lixiviación del PdNPs/SGAL bajo las condiciones de reacción. Tras la separación del catalizador del medio de reacción bajo las condiciones térmicas de reacción, el filtrado fue analizado mediante espectroscopía de absorción atómica y se observó tan sólo un 0.001% de paladio en solución luego del segundo ciclo. La cantidad de paladio en el catalizador, determinada en un 3.3%, se mantuvo constante a lo largo de todo el proceso de estudio de reciclabilidad.

A pesar de que el mecanismo no se encuentra completamente esclarecido, basado en resultados previos del grupo ^{128,129} y los datos extraídos de literatura, ^{143,144} se propuso un mecanismo de reacción plausible en la Figura 3.8. Se sugiere que la reacción tiene lugar en dos etapas, de las cuales la primera implica la formación de la diarilamina mediante aminación de Buchwald-Hartwig, mientras que la segunda parte del ciclo implicaría el acoplamiento arílico con ruptura del enlace C-H del aldehído.

El Pd(0) en el catalizador PdNPs/SGAL primero sufre una inserción oxidante en uno de los enlaces del dihaluro **2**, generando el complejo aril-Pd(II) designado como **A**. Este intermediario, tras reaccionar con el derivado del 2-aminobenzaldehído **1**, da lugar al complejo protonado **B** por desplazamiento nucleófilo, tras lo cual por acción de la base se promueve la formación de **C**. Una eliminación reductora produciría el intermediario **D** y restituye el paladio a su estado de oxidación original.

En la segunda etapa, el Pd(0) se reinsertaría en el enlace haluro de la diarilamina **D** produciendo el complejo de acil-paladio **E**. En presencia de la base, la ciclación intramolecular ocurre vía ruptura del enlace C-H de la función aldehído y convierte al intermediario **E**, en el complejo de paladio **F**. Finalmente, la eliminación reductora de **F** provee la acridona, con regeneración simultánea del catalizador de Pd(0).

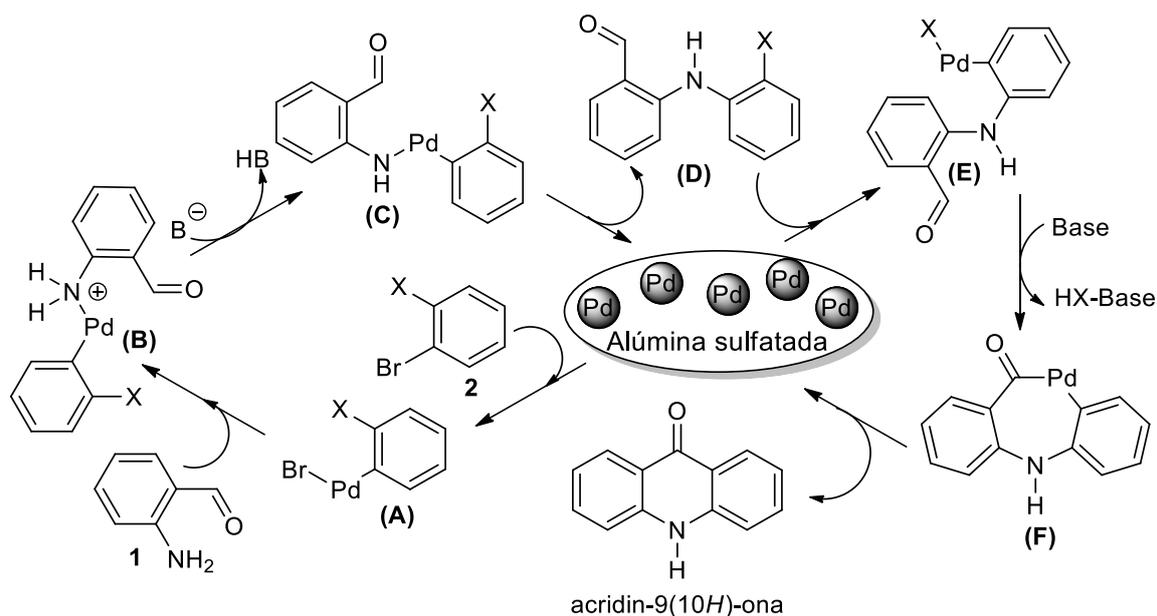
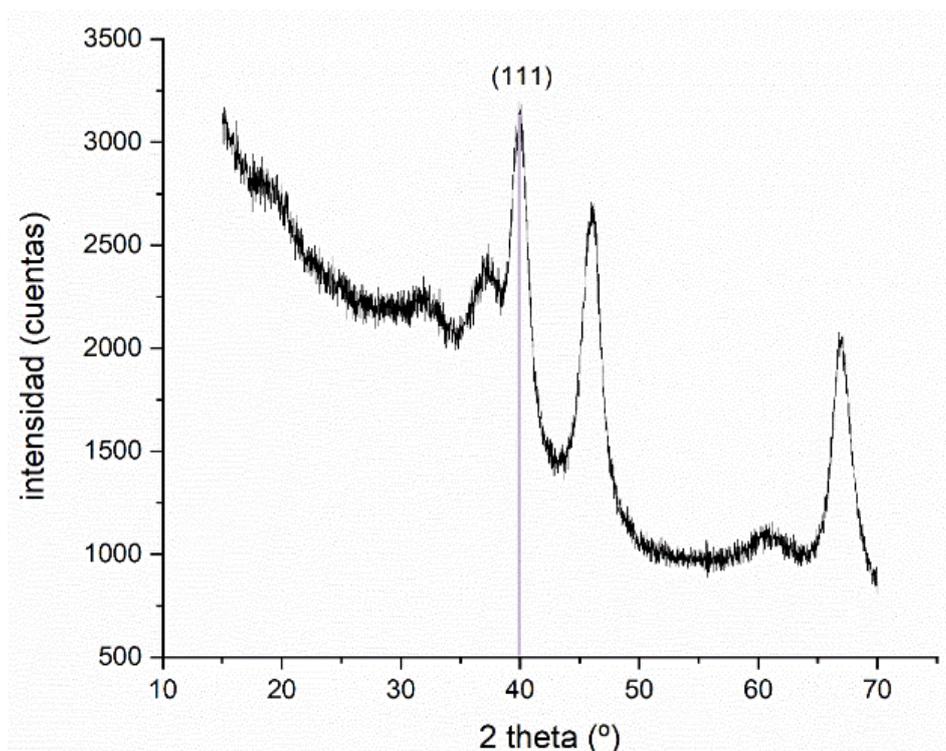


Figura 3.8. Mecanismo propuesto para la formación en tandem de acridona.

Dado que las PdNPs soportadas en alúmina sulfatada mostraron mejores rendimientos que aquellas soportadas en alúmina libre de azufre, es claro que las especies de azufre soportadas no son completamente inertes. Una caracterización del catalizador fue llevada a cabo mediante DRX y FT-IR a fines de intentar esclarecer el rol de las especies de azufre presentes.

Los patrones de difracción de rayos X en la Figura 3.9 muestran picos correspondientes al plano del paladio (111) en $2\theta = 40.5^\circ$.¹⁴⁵ Este pico fue utilizado para estimar el tamaño de partícula mediante la aproximación de Scherrer, determinando un tamaño de cristal para el metal de 5.9 nm.



Capítulo 1: Figura 3.9. Patrón de DRX del catalizador PdNPs/SGAL.

El análisis mediante TEM del catalizador confirma los valores de tamaño de partícula de paladio. Los resultados obtenidos concuerdan con lo estimado mediante la aproximación de Scherrer, con un valor de 6.1 nm. La microfotografía se puede observar en la Figura 3.10.

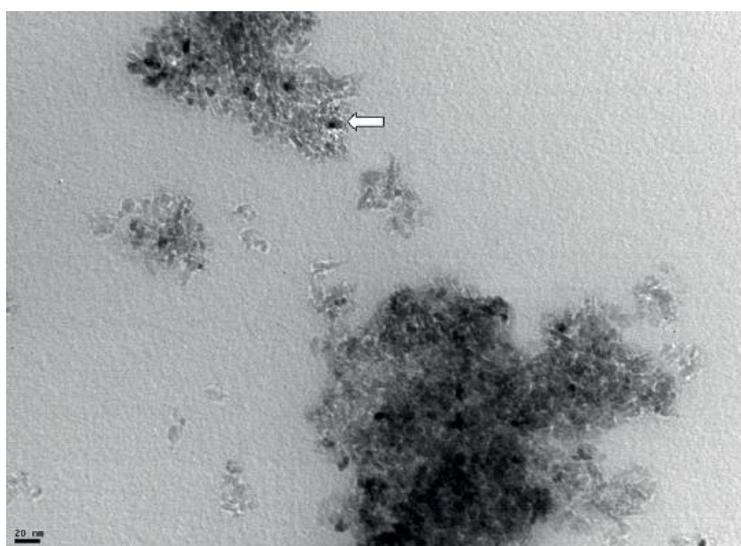


Figura 3.10. Microfotografía TEM del catalizador PdNPs/SGAL, con la flecha señalando la nanopartícula de Paladio.

Se continuó con el análisis mediante FT-IR del soporte y el catalizador, los resultados pueden observarse en la Figura 3.11. La banda asignada en 1446 cm^{-1} corresponde a los grupos S=O en estado de asociación a la alúmina (Figura 3.11 (a)). Tras incorporar el paladio, una banda aguda aparece a 1397 cm^{-1} , que estaría relacionada a la interacción del metal noble con las especies de azufre soportadas (Figura 3.11 (b)).

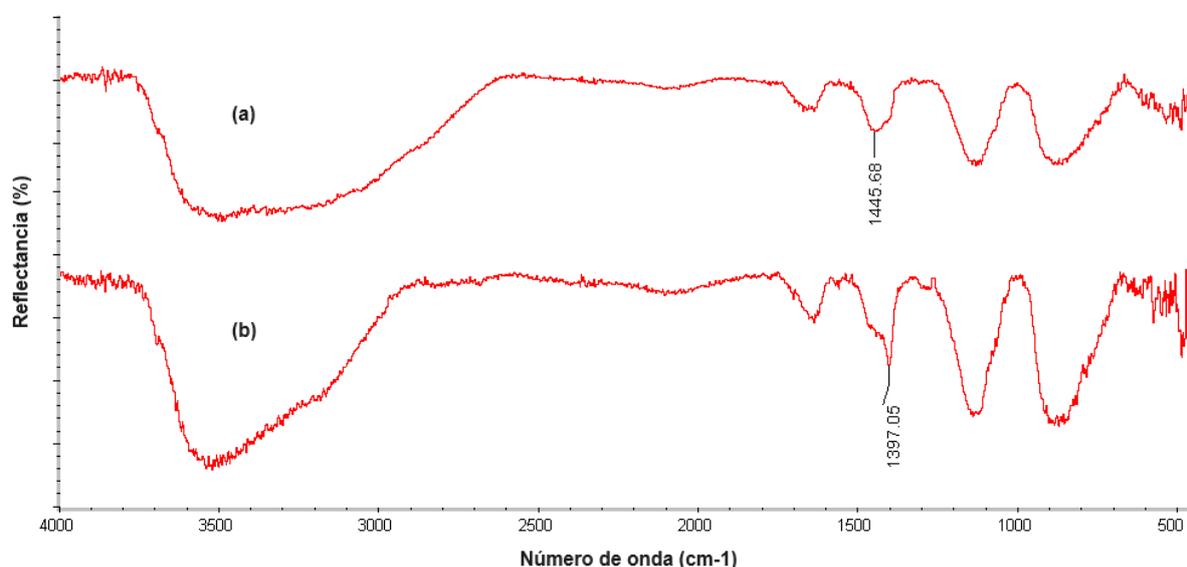


Figura 3.11. Espectros de FT-IR de: (a) soporte del catalizador (b) catalizador PdNPs/SGAL.

A pesar de que el efecto exacto de esta interacción no es revelador con respecto al mecanismo propuesto, se puede estimar que las características peculiares de las PdNPs soportadas en la alúmina sulfatada son determinantes en la alta eficiencia del catalizador PdNPs/SGAL.

Finalmente, una isoterma de adsorción-desorción se midió a fines de determinar el área de superficie específica del catalizador. Aplicando el método BET, se calculó un área de $210\text{ m}^2/\text{g}$.

En resumen, la metodología desarrollada permite la síntesis directa de forma efectiva, rápida y conveniente, de acridonas utilizando un sistema catalítico sencillo y reciclable basado en nanopartículas de Pd sobre alúmina sulfatada. El novedoso catalizador puede ser preparado con relativa facilidad a partir de químicos comercialmente disponibles, y puede ser reciclado y reutilizado hasta cuatro veces sin pérdida de actividad. La caracterización del catalizador muestra que el metal noble interactúa con las especies de azufre soportadas, una peculiaridad que estaría relacionada a la elevada eficiencia del mismo para la síntesis de acridonas.

La aproximación convergente presentada demostró muy buena compatibilidad con reactivos neutros, ricos y deficientes en carga electrónica permitiendo el acceso a una biblioteca de acridonas con rendimientos aceptables a excelentes a partir de 1,2-dihaloarenos y 2-aminobenzaldehídos como materiales de partida sencillos y comercialmente disponibles. La transformación en tándem, con una formación secuencial de enlaces C-N y C-C, tiene lugar en una única operación libre de ligandos en tan sólo 30 minutos por irradiación con microondas.

El potencial sintético del proceso y las simples condiciones de reacción requeridas, combinado al bajo costo de los materiales de partida, podrían encontrar aplicación en el campo de la química medicinal, en perfilados de estructura-actividad e incluso para aplicaciones sintéticas más amplias que requirieran el acceso al sistema acridona mediante procedimientos eficientes en relación a la cantidad de pasos requeridos.

3.3 Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se obtuvieron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Los solventes se secaron y destilaron de acuerdo con el procedimiento estándar.⁸⁵ Las reacciones se monitorearon mediante TLC en placas de gel de sílice (60F-254) visualizadas bajo luz UV y/o utilizando ácido fosfomolibdico al 5% en etanol.

Todos los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron a temperatura ambiente en CDCl_3 , acetona- d_6 o $\text{DMSO}-d_6$ en un espectrómetro Bruker Avance ARX-300. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en partes por millón (ppm) desde el TMS utilizando la resonancia del solvente residual. Se utilizaron abreviaturas estándar para denotar multiplicidades como se indicó en 2.4.

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Nexus 470/670/870 a temperatura ambiente.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato Büchi 510 y no están corregidos.

Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV en un instrumento HP-5890 CG-EM de Hewlett Packard equipado con un detector de masas selectivo HP-5972.

La pureza de los compuestos volátiles y los análisis cromatográficos se determinaron con un CG Shimadzu (CG-14B) con un detector de ionización de llama equipado con una columna HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) utilizando N_2 como gas portador.

Los espectros de masas de alta resolución se registraron en Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL.

La cromatografía en columna flash se realizó utilizando gel de sílice MN Macherey Nagel 60M (0.040-0.063 mm/230-240 mesh ASTM).

Las reacciones de microondas se realizaron utilizando un horno de microondas CEM Discover en recipientes de reacción sellados.

La carga de paladio del catalizador se determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo PerkinElmer AAnalyst 700.

Los patrones de DRX se determinaron con un difractómetro Philips PW1710 BASED operando a 45 kV y 30 mA, equipado con un monocromador con radiación de $\text{Cu K}\alpha 1$ (λ $\frac{1}{4}$ 0.15406 nm).

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno se midieron en un equipo Quantachrome nova 1200e. Las áreas de superficie específica y volumen de poro se obtuvieron aplicando el método BET.

Las muestras se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, utilizando un aparato Joel 100 CX2 (Tokio, Japón). Se midieron aproximadamente cien partículas de paladio para realizar la distribución del tamaño de partícula y obtener el tamaño promedio de partícula (d).⁸⁶

Acridin-9(10H)-ona (3)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 175 mg (90%, 0.90 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3440 (N–H), 2986, 1630 (C=O), 1556, 1471, 752 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, ArH), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H, ArH), 7.75 (t, *J* = 7.1 Hz, 2 H, ArH), 8.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 2 H, ArH), 11.75 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 117.3, 120.5, 121.0, 126.0, 133.6, 140.9, 176.8.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₉NO: 195.0684; encontrado: 195.0686.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁰⁴

4-metilacridin-9(10H)-ona (4)

Preparado a partir de 2-amino-3-metilbenzaldehído (**1b**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 167 mg (80%, 0.80 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3440 (N–H), 3068, 2996, 1635 (C=O), 1599, 1162, 751 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.61 (s, 3 H, CH₃), 7.18 (t, *J* = 7.4, 1 H, ArH), 7.28 (t, *J* = 7.1, 1 H, ArH), 7.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, ArH), 7.74 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 7.94 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 8.13 (t, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, ArH), 10.64 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 23.1, 123.4, 125.5, 125.8, 125.9, 126.5, 129.2, 130.5, 130.9, 138.5, 138.3, 144.7, 146.3, 182.3.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₁NO: 209.0841; encontrado: 209.0845.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁶

3-metoxiacridin-9(10H)-ona (5)

Preparado a partir de 2-amino-5-metoxibenzaldehído (**1c**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 187 mg (83%, 0.83 mmol); punto de fusión: 280–282 °C. IR (KBr): 3437 (N–H), 1632 (C=O), 1573, 1156, 1037, 754 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 7.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.39–7.42 (m, 1H, ArH), 7.51–7.55 (m, 2H, ArH), 7.63 (d, *J* = 2.8 Hz,

1 H, ArH), 7.75–7.71 (m, 1 H, ArH), 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 11.77 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 60.3, 110.3, 122.4, 123.8, 124.5, 125.9, 126.4, 129.6, 131.2, 138.3, 140.9, 145.7, 159.2, 181.3.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₁NO₂: 225.0790; encontrado: 225.0792.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁶

3-metoxiacridin-9(10H)-ona (6)

Preparado a partir de 2-amino-4-metoxibenzaldehído (**1d**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 185 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión: 259–261 °C. IR (KBr): 3435 (N–H), 2952, 1629, 1155, 1032, 756 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.91 (s, 3 H, OCH₃), 6.80–6.87 (m, 2 H, ArH), 7.25 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.50 (t, *J* = 8.2 Hz, 1 H, ArH), 7.70 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, ArH), 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 11.58 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.9, 98.4, 111.9, 115.5, 117.5, 121.1, 121.4, 126.4, 128.5, 133.5, 141.4, 143.3, 163.8, 176.3.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₁NO₂: 225.0790; encontrado: 225.0793.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁵

1,2,3-trimetoxiacridin-9(10H)-ona (7)

Preparado a partir de 6-amino-2,3,4-trimetoxibenzaldehído (**1e**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 248 mg (87%, 0.87 mmol); punto de fusión: 162–163 °C.

IR (KBr): 3234 (N–H), 2823, 1629 (C=O), 1475, 1240, 1032 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 6.76 (s, 1 H, ArH), 7.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, ArH), 7.63–7.70 (m, 1 H, ArH), 8.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 11.46 (s, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.9, 61.2, 61.7, 94.3, 109.8, 116.6, 120.9, 121.4, 116.1, 126.1, 132.8, 137.2, 140.1, 140.4, 153.3, 157.7, 175.1.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₅NO₄: 285.1001; encontrado: 285.1003.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁶

Benzo[c]acridin-7(12H)-ona (8)

Preparado a partir de 1-amino-2-naftaldehído (**1f**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 179 mg (73%, 0.73 mmol); punto de fusión > 300 °C. El derivado de acridona **8** también fue sintetizado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1-bromo-2-cloronaftaleno (**2l**) dando lugar a un sólido amarillo; rendimiento: 174 mg (0.71 mmol, 71%).

IR (KBr): 3423 (N–H), 3052, 1631 (C=O), 1608, 1486, 1128, 1085 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH), 7.38 (s, 1 H, NH), 7.55-7.65 (m, 3 H, ArH), 7.64-7.68 (m, 1 H, ArH), 7.78-7.80 (m, 1 H, ArH), 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, ArH), 8.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, ArH), 8.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 117.2, 121.5, 122.3, 122.5, 123.2, 124.0, 124.6, 127.2, 128.1, 128.9, 133.2, 137.4, 144.1, 145.9, 177.7.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₇H₁₁NO: 245.0841; encontrado: 245.0846.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁷

Benzo[b][1,10]fenantrolin-7(12H)-ona (9)

Preparado a partir de 8-aminoquinolein-7-carbaldehído (**1g**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido blanco; rendimiento: 172 mg (70%, 0.70 mmol); punto de fusión: 271-273 °C.

IR (KBr): 3438 (N–H), 3022, 1637 (C=O), 1579 (C=N), 1084 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, ArH), 7.70 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, ArH), 7.79 (ddd, *J* = 8.6, 6.9, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 7.85 (dd, *J* = 8.3, 4.3 Hz, 1 H, ArH), 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 8.30 (dd, *J* = 8.3, 5.1 Hz, 2 H, ArH), 8.54 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1 H, ArH), 9.11 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1 H, ArH), 12.45 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 118.3, 119.1, 119.7, 122.1, 122.2, 123.1, 124.4, 125.6, 130.0, 133.0, 136.7, 138.5, 138.8, 140.2, 149.0, 176.2.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₀N₂O: 246.0866; encontrado: 246.0870.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁸

3-cloroacridin-9(10H)-ona (10)

Preparado a partir de 2-amino-4-clorobenzaldehído (**1h**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado

mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 161 mg (70%, 0.70 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3422 (N–H), 2917, 1634 (C=O), 1024, 820 (C–Cl), 757 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.25-7.39 (m, 2 H, ArH), 7.50-7.63 (m, 2 H, ArH), 7.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 8.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, ArH), 11.79 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.8, 117.9, 119.6, 121.1, 121.8, 122.1, 126.5, 128.9, 134.3, 138.5, 141.3, 142.1, 176.6.

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₈CINO: 229.0294; encontrado: 229.0296.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁹

2-fluoracridin-9(10H)-ona (11)

Preparado a partir de 2-amino-fluorobenzaldehído (**1i**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 175 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión > 300 °C. El derivado de acridona **11** también fue sintetizado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromo-4-fluorobenceno (**2k**) dando lugar a un sólido amarillo; rendimiento: 151 mg (0.71 mmol, 71%).

IR (KBr): 3445 (N–H), 1630 (C=O), 1604, 1478, 754 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.58-7.66 (m, 2H), 7.76 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 8.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 11.94 (s, 1 H, NH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 109.7 (d, *J* = 21.9 Hz), 117.4, 119.6, 120.0 (d, *J* = 7.9 Hz), 121.0 (d, *J* = 6.6 Hz), 121.2, 122.3 (d, *J* = 25.4 Hz), 125.9, 133.6, 137.7, 140.8, 156.9 (d, *J* = 238.1 Hz), 176.1 (d, *J* = 2.5 Hz).

HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₃H₈FNO: 213.0590; encontrado: 213.0592.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁰⁹

metil 9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carboxilato (12)

Preparado a partir de 4-amino-3-formilbenzoato (**1j**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido blanco; rendimiento: 182 mg (72%, 0.72 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3441 (N–H), 2921, 1725 (C=O, éster), 1639 (C=O), 1023 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.97 (s, 3 H, CO_2CH_3), 7.29-7.35 (m, 1 H, ArH), 7.56 (dd, J = 14.7, 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.77 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1 H, ArH), 8.10-8.24 (m, 2 H, ArH), 8.85 (d, J = 2.4, 1 H, ArH), 12.11 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 52.5, 117.8, 118.0, 119.7, 121.0, 121.9, 122.2, 126.2, 128.7, 133.1, 134.2, 140.9, 143.8, 165.9, 176.9.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{NO}_3$: 253.0739; encontrado: 253.0742.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁹

2,3-dimetoxiacridin-9(10H)-ona (13)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromo-4,5-dimetoxibenceno (**2n**); purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 196 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3433 (N-H), 2912, 1630 (C=O), 1600, 1409, 1219, 1090 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.88 (s, 6 H, OCH_3), 7.11 (s, 1 H, ArH), 7.22 (t, J = 8.0, 1 H, ArH), 7.51-7.63 (m, 3 H, ArH), 8.24 (d, J = 8.0, 1 H, ArH), 12.23 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 57.0, 57.6, 98.2, 105.1, 114.1, 117.1, 119.9, 120.7, 125.8, 132.5, 137.2, 140.4, 145.2, 154.6, 175.6.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3$: 255.0895; encontrado: 255.0897.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁷

[1,3]Dioxolo[4,5-b]acridin-10(5H)-ona (14)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 5,6-dibromobenzo[*d*][1,3]dioxol (**2m**); purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 6:4); sólido amarillo; rendimiento: 172 mg (72%, 0.72 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3430 (N-H), 2950, 1631 (C=O), 1601, 1459, 1040 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.15 (s, 2 H, OCH_2O), 6.97 (s, 1 H, ArH), 7.20 (t, J = 7.5, 1 H, ArH), 7.49-7.54 (m, 2 H, ArH), 7.68 (t, J = 7.5, 1 H, ArH), 8.19 (d, J = 8.1, 1 H, ArH), 11.76 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 95.9, 101.1, 102.2, 115.5, 117.2, 120.5, 121.2, 125.8, 132.8, 138.6, 141.3, 143.9, 152.8, 175.2.

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$: 239.0582; encontrado: 239.0584.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁰

2-metilacridin-9(10H)-ona (15) y

3-metilacridin-9(10H)-ona (16)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromo-4-metilbenceno (**2g**); purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 8:2) dando lugar a una mezcla 1:1 de **15** y **16** como mezcla de isómeros que resulta en dobles señales; sólido amarillo; rendimiento: 156 mg (75%, 0.75 mmol).

IR (KBr): 3434 (N-H), 3041, 2985, 1633 (C=O), 1600, 1161, 751 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.46 (s, 3 H, CH_3), 2.50 (s, 3 H, CH_3), 7.05 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 7.24-7.32 (m, 2 H, ArH, y 1 H, NH residual), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.44-7.46 (m, 2 H, ArH, y 1 H, NH residual), 7.63 (s, 1 H), 7.67-7.70 (m, 2 H), 8.24 (s, 1 H), 8.33 (s, 1 H, ArH), 8.41 (d, J = 0.9, 1 H, ArH), 8.51-8.54 (m, 2 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 20.9, 22.8, 114.8(2), 114.8(4), 114.9(2), 114.9(3), 114.9(4), 120.6, 121.1, 121.3, 122.4, 122.5, 122.6, 123.2, 127.1, 127.7, 127.8, 127.9, 131.0, 133.7, 135.4, 140.0, 142.5, 142.6, 142.9, 144.9, 177.9, 178.2.

2-metilacridin-9(10H)-ona (15)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno (**2f**); purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 6:2); sólido amarillo; rendimiento: 153 mg (73%, 0.73 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3437 (N-H), 3071, 1633 (C=O), 1601, 1159, 753 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.43 (s, 3 H, CH_3), 7.21 (t, J = 8.0, 1 H, ArH), 7.48 (d, J = 8.0, 1 H, ArH), 7.51-7.59 (m, 2 H, ArH), 7.73 (t, J = 7.2, 1 H, ArH), 8.02 (s, 1 H, ArH), 8.21 (d, J = 8.0, 1 H, ArH), 11.73 (s, 1 H, NH).

HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}$: 209.0841; encontrado: 209.0843.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁵⁰

3-metilacridin-9(10H)-ona (16)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno (**2e**); purificado mediante cromatografía en SiO_2 (EP/AcOEt 6:2); sólido amarillo claro; rendimiento: 150 mg (72%, 0.72 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3424 (N-H), 3027, 1639 (C=O), 1588, 1152, 754 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.46 (s, 3 H, CH₃), 7.06 (d, J = 8.3, 1 H), 7.23 (t, J = 7.5, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 7.50 (d, J = 8.4, 1 H), 7.67 (m, 1 H, ArH), 8.08 (s, 1 H, ArH), 8.19 (d, J = 8.1, 1 H, ArH), 11.58 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 22.1, 117.0, 117.7, 119.1, 121.1, 121.4, 123.4, 126.5, 126.6, 133.7, 141.4, 144.3, 177.0.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₁NO: 210.0913; encontrado: 210.0916.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁷

3-metilacridin-9(10H)-ona (17)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromo-4-clorobenceno (**2h**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido blanco; rendimiento: 172 mg (75%, 0.75 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3432 (N-H), 2918, 1629 (C=O), 1600, 1024, 824 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.25 (t, J = 8.0, 1 H, ArH), 7.54-7.76 (m, 2 H, ArH), 7.74 (s, 2 H, ArH), 8.14 (s, 1 H, ArH), 8.21 (d, J = 8.0, 1 H, ArH), 12.04 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 116.8, 118.0, 119.6, 121.2, 121.9, 122.1, 126.5, 128.9, 134.3, 138.5, 141.4, 142.1, 176.6.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₃H₈CINO: 229.0294; encontrado: 229.0297.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁶

9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carbonitrilo

(18)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 3,4-dibromobenzonitrilo (**2i**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 147 mg (67%, 0.67 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3435 (N-H), 2221 (C≡N), 1630 (C=O), 1602, 1155, 1032 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.39 (t, J = 7.5, 1 H, ArH), 7.64 (d, J = 8.3, 1 H, ArH), 7.69 (d, J = 8.8, 1 H, ArH), 7.85 (d, J = 7.6, 1 H, ArH), 8.06 (d, J = 8.7, 1 H, ArH), 8.24 (d, J = 8.1, 1 H, ArH), 8.52 (s, 1 H, ArH), 12.44 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 103.1, 118.0, 119.1, 119.2, 120.1, 121.1, 122.6, 126.3, 132.3, 134.6, 135.2, 140.8, 143.3, 176.0.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₄H₈N₂O: 220.0637; encontrado: 220.0640.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁰

2-nitroacridin-9(10H)-ona (19)

Preparado a partir de 2-aminobenzaldehído (**1a**) y 1,2-dibromo-4-nitrobenceno (**2j**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 7:3); sólido amarillo; rendimiento: 156 mg (65%, 0.65 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3442 (N-H), 3045, 1636 (C=O), 1600, 1456 (N-O), 1084 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.16-7.28 (m, 1 H, ArH), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, ArH), 7.65 (d, J = 9.4 Hz, 1 H, ArH), 7.82 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.6 Hz, 1 H, ArH), 8.25 (d, J = 8.2, 1 H, ArH), 8.50 (d, J = 9.4, 1 H, ArH), 8.95 (d, J = 2.7, 1 H, ArH), 12.33 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 118.9, 119.8, 120.0, 121.7, 123.9, 124.0, 127.0, 128.3, 135.6, 141.5, 141.6, 145.4, 177.5.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₃H₈N₂O₃: 240.0535; encontrado: 240.0537.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁵¹

8-metil[1,3]dioxolo[4,5-*b*]acridin-10(5H)-ona (20)

Preparado a partir de 2-amino-5-metilbenzaldehído (**1b**) y 5,6-dibromobenzo[*d*][1,3]dioxol (**2m**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 202 mg (80%, 0.80 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3440 (N-H), 3050, 1628 (C=O), 1605, 1436, 1035 cm⁻¹.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.38 (s, 3 H, CH₃), 6.12 (s, 2 H, OCH₂O), 6.92 (s, 1 H, ArH), 7.40 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, ArH), 7.50 (s, 2 H, ArH), 7.95 (s, 1 H, ArH), 11.54 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 21.2, 96.1, 102.5, 115.7, 117.5, 120.4, 125.3, 130.6, 133.5, 138.9, 144.2, 153.1, 175.2.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₅H₁₁NO₃: 253.00739; encontrado: 253.0742.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹⁰

9-metilbenzo[*c*]acridin-7(12H)-ona (21)

Preparado a partir de 1-amino-2-naftaldehído (**1f**) y 1-bromo-2-cloro-4-metilbenceno (**2f**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 200 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión: 186-187 °C.

IR (KBr): 3443 (N–H), 3038, 2960, 1631 (C=O), 1594, 1261, 1028 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.48 (s, 3 H, CH₃), 7.05 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, ArH), 7.20 (s, 1 H, ArH), 7.57 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 7.64 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, ArH), 7.66–7.72 (m, 1 H, ArH), 8.11 (s, 1 H, ArH), 8.34 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, ArH), 8.46 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, ArH), 8.67 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 11.81 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 102.1, 111.2, 115.2, 116.1, 119.3, 125.1, 125.2, 125.3, 126.8, 128.6, 129.4, 133.4, 135.1, 136.1, 143.8, 157.1, 173.2.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₈H₁₃NO: 259.0997; encontrado: 259.1000.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁷

7-metoxi-9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carbonitrilo (22)

Preparado a partir de 2-amino-5-metoxibenzaldehído (**1c**) y 3,4-dibromobenzonitrilo (**2i**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 8:2); sólido amarillo; rendimiento: 190 mg (76%, 0.76 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3435 (N–H), 2220 (C≡N), 1650, 1630 (C=O), 1155, 1090 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 2 H, ArH), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, ArH), 8.56 (d, J = 1.9 Hz, 1 H, ArH), 12.12 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 55.9, 103.4, 105.5, 119.3, 119.4, 119.5, 120.2, 122.1, 126.4, 132.7, 134.8, 135.3, 142.7, 155.5, 175.2.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₅H₁₀N₂O₂: 259.0742; encontrado: 259.0745.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁵²

6-metoxi-2-nitroacridin-9(10H)-ona (23)

Preparado a partir de 2-amino-4-metoxibenzaldehído (**1d**) y 1,2-dibromo-4-nitrobenceno (**2j**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 9:1); sólido amarillo; rendimiento: 170 mg (63%, 0.63 mmol); punto de fusión > 300 °C.

IR (KBr): 3441 (N–H), 2843, 1632 (C=O), 1481, 1455 (N–O), 1062 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.91 (s, 3 H, OCH₃), 6.91–7.06 (m, 2 H, ArH), 7.59 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, ArH), 8.14 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, ArH), 8.41 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, ArH), 8.93 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, ArH), 12.04 (s, 1 H, NH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 56.1, 99.0, 113.0, 115.6, 119.0, 119.9, 123.3, 127.5, 128.6, 141.2, 143.1, 145.0, 164.7, 174.9.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₀N₂O₄: 270.0641; encontrado: 270.0643.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁵²

2-cloro-10-metilacridin-9(10H)-ona (24)

Preparado a partir de 5-cloro-2-(metilamino)benzaldehído (**1k**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 6:2); sólido amarillo; rendimiento: 180 mg (74%, 0.74 mmol); punto de fusión: 171–172 °C.

IR (KBr): 3439 (N–H), 3247, 2988, 1633 (C=O), 1559, 1354, 1161, 824 (C–Cl) cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.81 (s, 3 H, CH₃), 7.24 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, ArH), 7.37 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, ArH), 7.46 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, ArH), 7.56 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1 H, ArH), 7.70 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, ArH), 8.40 (d, J = 2.8 Hz, 1 H, ArH), 8.47 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 33.8, 114.9, 116.6, 121.6, 122.2, 123.1, 126.7, 127.1, 127.7, 133.8, 134.1, 140.8, 142.3, 176.9.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₄H₁₁ClNO: 244.0524; encontrado: 244.0519.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁵³

3-metoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (25)

Preparado a partir de 4-metoxi-2-(metilamino)benzaldehído (**1l**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); purificado mediante cromatografía en SiO₂ (EP/AcOEt 6:2); sólido amarillo claro; rendimiento: 184 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión: 174–176 °C.

IR (KBr): 3434 (N–H), 1597 (C=O), 1515, 1282, 750 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.83 (s, 3 H, CH₃), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 6.84 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, ArH), 6.88 (dd, J = 8.9, 2.2 Hz, 1 H, ArH), 7.26–7.30 (m, 1 H, ArH), 7.47 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 1 H, ArH), 7.62–7.69 (m, 1 H, ArH), 8.50 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, ArH), 8.54 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1 H, ArH),

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃): δ = 33.7, 55.6, 97.9, 109.6, 114.0, 114.6, 121.2, 126.9, 127.6, 129.9, 133.4, 142.7, 144.5, 164.2, 177.1.

HRMS (EI): m/z [M]⁺ calculado para C₁₅H₁₄NO₂: 240.1019; encontrado: 240.1013.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹¹¹

1,2,3-trimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (26)

A una solución de la acridona **7** (142 mg, 0.50 mmol) en DMF anhidro a 0 °C se agregó lentamente NaH (60% en aceite mineral, 0.60 mmol) bajo atmósfera de N₂. Concluido el burbujeo, se agrega gota a gota CH₃I (140 mg, 1 mmol) a la solución y se agita a temperatura ambiente por 4 horas. El progreso de la reacción fue monitoreado por TLC y CG-EM. Al completarse, la solución se vertió en agua-hielo (300 ml) y el sólido amarillo se recolectó por filtración y se secó al vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía en SiO₂ (CH₂Cl₂/MeOH 9.9:0,1); sólido amarillo; rendimiento: 123 mg (85%, 0.42 mmol); punto de fusión: 143-144 °C. IR (KBr): 3051, 2925, 1632 (C=O), 1596, 1471, 1251, 1086 cm⁻¹. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.75 (s, 3 H, CH₃), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 4.01 (s, 3 H, OCH₃), 6.90 (s, 1 H, ArH), 7.24-7.28 (m, 1 H, ArH), 7.70-7.72 (m, 2 H, ArH), 8.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, ArH). RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.8, 56.2, 61.1, 94.3, 111.2, 115.7, 121.2, 123.1, 126.4, 133.2, 137.2, 141.7, 153.5, 157.8, 175.0. HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₇H₁₇NO₄: 299.1158; encontrado: 299.1155. Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁶

Síntesis directa de 1,2,3-trimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (26)

Siguiendo el mismo protocolo general desarrollado previamente, se preparó la acridona **26** a partir de 2,3,4-trimetoxi-6-(metilamino)benzaldehído (**1m**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**); rendimiento: 221 mg (74%, 0.74 mmol). Las propiedades físicas y datos espectroscópicos se encontraron en concordancia con los reportados.

1-hidroxi-2,3-dimetoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (Arborinina)

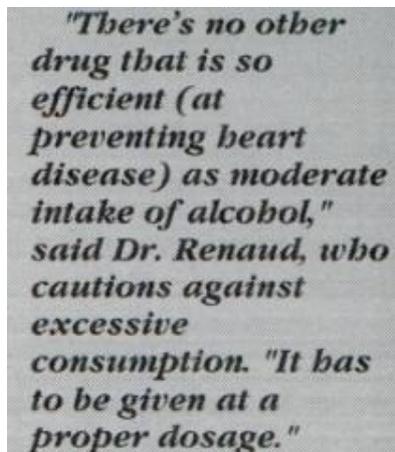
La solución de **26** (145.9 mg, 0.50 mmol) en MeOH (2 ml) y HCl concentrado (0,37 ml, 10 mmol) se mantuvo a reflujo por 12 horas. El progreso de la reacción fue monitoreado por TLC y CG-EM. Al completarse, la solución se vertió en agua-hielo y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de NaCl y luego se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica fue luego concentrada y el residuo crudo, purificado por cromatografía en SiO₂ (CH₂Cl₂/MeOH 9.5:0,5); sólido amarillo; rendimiento: 117 mg (82%, 0.41 mmol); punto de fusión: 167-169 °C. IR (KBr): 3448 (O-H), 2931, 1638 (C=O), 1595, 1556, 1253, 1082 cm⁻¹. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.84 (s, 3 H, CH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 4.01 (s, 3 H, OCH₃), 6.31 (s, 1 H, ArH), 7.26-7.33 (m, 1 H, ArH), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, ArH), 7.74-7.76 (m, 1 H, ArH), 8.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 14.66 (s, 1 H, OH). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 34.1, 59.1, 60.7, 86.6, 105.3, 114.6, 120.2, 121.3, 126.0, 129.8, 133.8, 140.1, 141.5, 155.6, 159.0, 180.2. HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₆H₁₅NO₄: 285.1001; encontrado: 285.1005. Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.¹⁴⁶

Capítulo 4: Técnicas de obtención del andamiaje xantona

4.1 Estado del arte

Existe una interesante observación epidemiológica que dictamina que los franceses, siendo más sedentarios, consumiendo más grasas y fumando más que los estadounidenses, tienen un índice de mortalidad por enfermedades cardiovasculares marcadamente menor.

Serge Renaud, quien en 1991 presentó los resultados de este estudio científico desde la Universidad de Burdeos, declaró que la idea surgió debido a la cantidad de personas longevas con las que se encontraba viviendo en el viñedo de sus bis y tatarabuelos. De acuerdo a sus palabras, era común encontrarse con personas de 80 a 90 años que bebían vino a diario.¹⁵⁴ Tras extender estas observaciones y presentarlas con su equipo, que incluía al cardiólogo Michel de Lorgeril y a la nutricionista Patricia Salen, se determinó que las dietas ricas en omega-3 y antioxidantes, muy comunes en la cocina mediterránea, darían lugar a una disminución en la incidencia de casos de cáncer, infección de miocardio y enfermedad cardiovascular.¹⁵⁵



"There's no other drug that is so efficient (at preventing heart disease) as moderate intake of alcohol," said Dr. Renaud, who cautions against excessive consumption. "It has to be given at a proper dosage."

Figura 4.1. « No hay otra droga tan eficiente (en prevenir enfermedades del corazón) como una ingesta moderada de alcohol, » dice el Dr. Renaud¹⁵⁶.

Esta singularidad, conocida como la Paradoja Francesa («paradoxe français»), se debería entonces, en gran parte, al consumo regular y moderado de una cantidad considerable de polifenoles con acción antioxidante, tales como aquellos presentes en el vino.

Las xantonas, procedentes de las plantas y comúnmente utilizadas en medicina tradicional china, son compuestos polifenólicos con rutas biosintéticas similares a aquellas de los flavonoides. Algunas hierbas, como *Swertia davidi* Franch (*Gentianaceae*), han sido utilizadas en el tratamiento de procesos inflamatorios y alérgicos por un largo tiempo. El género *Swertia* es tan rico en compuestos de tipo xantona que ha dado lugar a varias reseñas sobre el tema ^{157–159}. Hoy día, las xantonas y sus derivados, sean obtenidas y aisladas a partir de organismos vivos o producidas sintéticamente en el laboratorio, cuentan con numerosos estudios indagando sus actividades biológicas y farmacológicas.

Tal como se explicó en el capítulo introductorio 1.2.1, las xantonas o xanten-9*H*-onas constituyen una unidad farmacológica privilegiada formada por una estructura de dibenzo- γ -pirona. La arquitectura plana de esta clase de heterociclos oxigenados les otorga una amplia variedad de actividades biológicas y otras propiedades farmacológicas interesantes, como la acción antiinflamatoria, cardioprotectora, antimicrobiana y antitumoral (Figura 4.2).

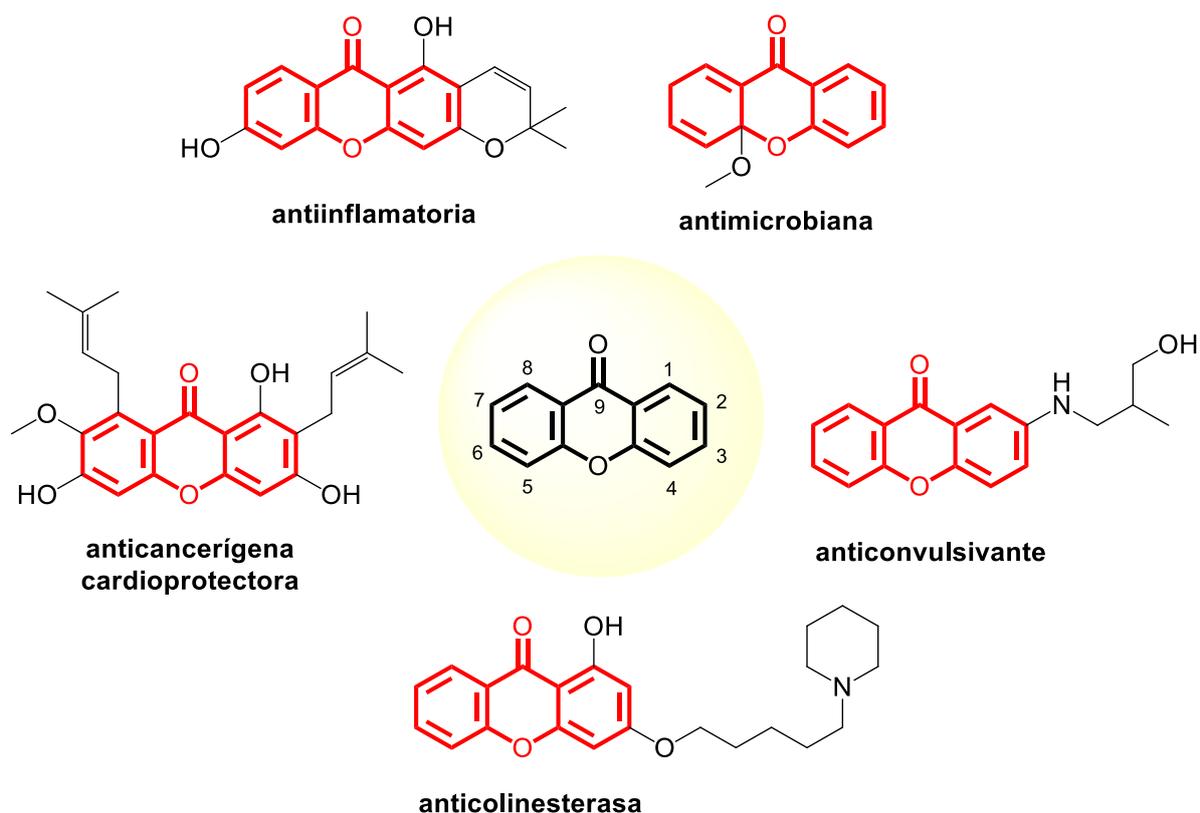


Figura 4.2. El núcleo xantona y su relevancia bioactiva.

Al igual que para otros compuestos presentados en esta tesis, la capacidad de incorporar una diversidad de grupos funcionales sobre los anillos bencénicos brinda a estas estructuras flexibilidad desde el punto de vista químico, ya que a través de su modelado se permite la interacción optimizada y diferencial con sistemas diana, componentes del sistema de delivery, órganos o tejidos que darían lugar a efectos indeseados, e incluso entre sí mismos. Como podremos ver en capítulos subsiguientes, y como es razonable esperar, la selección de los grupos funcionales que actuarán como sustituyentes tiene un rol clave en la forma en que se relacionará con diversas dianas biológicas y biomoléculas.

Las xantonas preniladas, entre las que destaca la α -mangostina y sus congéneres, son compuestos naturales que han demostrado una sorprendente versatilidad en cuanto a sus propiedades farmacológicas. Como se ha explicado, los derivados de xantona destacan por sus notables actividades citotóxicas, su capacidad para combatir el cáncer, sus efectos antioxidantes, sus propiedades antimicrobianas y su capacidad para mitigar la inflamación, entre otros beneficios terapéuticos. Sin embargo, lo que hace que estos compuestos sean aún más fascinantes es su potencial capacidad para abordar múltiples aspectos de patologías tales como la enfermedad de Alzheimer.

Mientras que otras sustancias pueden mostrar eficacia en un solo frente terapéutico, las xantonas, en particular la α -mangostina, destacan por su capacidad de actuar de manera simultánea con diversos blancos terapéuticos. Esta cualidad las convierte en auténticos fármacos pluripotenciales, capaces de atacar no solo las manifestaciones más evidentes de la enfermedad de Alzheimer, como las disfunciones del sistema colinérgico, sino también otros aspectos clave, como la inflamación cerebral, el estrés oxidativo y la agregación de oligómeros de la vía del β amiloide.

La importancia de este tipo de acercamiento terapéutico radica en que, a la fecha, ciertas afecciones tales como la enfermedad de Alzheimer no tienen forma de prevención definitiva o cura, y las drogas aprobadas no tratan la etiología de la enfermedad, sino la sintomatología causada por el detrimento del neurotransmisor acetilcolina. Este tipo de tratamientos sintomatológicos dan lugar a una mejoría cognitiva temporal por inhibición de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa -un coregulador degradatorio-, aumentando la disponibilidad de acetilcolina.

Es importante, entonces, encontrar un enfoque diferente a la hora de atacar la terapéutica que permita modular, simultáneamente, múltiples blancos. De esta manera, sería posible modificar el curso de la enfermedad por acción sobre colinesterasas, agregación de β A, especies reactivas de oxígeno, iones metálicos; reduciendo o suprimiendo complicaciones neurotóxicas, y se podría aumentar la eficacia de la farmacoterapia.¹⁶⁰ En base a este paradigma, la estrategia de ligandos multitarget (MTDL, por sus siglas en inglés, Multitarget-Directed Ligands) busca diseñar moléculas híbridas que exhiban varias funciones farmacológicas simultáneas, usando dos o más características estructurales de compuestos con actividad específica y aplicándolos a una única molécula para lograr efectos duales o múltiples biológicamente complementarios.

Una de las herramientas a disposición a la hora de analizar la problemática desde una perspectiva más amplia, es la relativamente reciente hipótesis de la cascada amiloidea.¹⁶¹ Se parte de la base de que los depósitos de péptido β -amiloide y acumulación de proteína Tau anómala en ovillos neurofibrilares en ciertas regiones del cerebro son las dos lesiones bandera de la enfermedad de Alzheimer que provocan disfunción sináptica, efectos proinflamatorios y tóxicos en células neuronales.

De acuerdo a la hipótesis de la cascada amiloidea (Figura 4.3), por un lado, la AChE promueve la agregación del péptido β -amiloide (β A o A β , por sus siglas en inglés) tras unirse al sitio de unión aniónico periférico. Por el otro, el estrés oxidativo cumple un rol clave en la patogénesis y es uno de los mecanismos más importantes tras la neurotoxicidad causada por β A. Varios estudios sugieren, a su vez, que β A se agrega en presencia de iones metálicos redox-activos como cobre, zinc y hierro, generando acumulación intracelular de ROS, por lo que drogas con actividad antioxidante y quelante podrían ser de utilidad en estrategias terapéuticas a fin de inhibir el efecto neurotóxico inducido por β A.

Se busca una reformulación del diseño de drogas con fin de encarar este paso particular en la cascada neurotóxica: la agregación del péptido β A. Se cuenta con conocimientos que datan de la medicina tradicional que registra un sin número de xantonas naturales utilizadas en el tratamiento de disfunciones neurológicas por décadas debido a la gran variedad de actividades biológicas que han demostrado poseer. Algunos ejemplos son los extractos de

diversas partes de *Hypericum perforatum*, *Mangifera* y *Garcinia mangostana*, empleados sobre todo por sus propiedades antidepresivas y antioxidantes.¹⁶²⁻¹⁶⁴

En el análisis de la capacidad de este tipo de compuestos para afectar las diversas facetas relacionadas a la enfermedad, se utiliza como referencia el compuesto α -mangostina dado que existe una gran cantidad de información bibliográfica al respecto. Entre estas facetas a considerar, mencionamos como las de mayor relevancia la presencia de ROS y otras especies oxidantes, los procesos inflamatorios que dan lugar a las mismas, y la agregación de la proteína τ (tau) y el péptido β -amiloide, en íntima relación con los desórdenes metabólicos y desbalance de las enzimas colinesterasa y monoamino oxidasa.¹⁶⁵

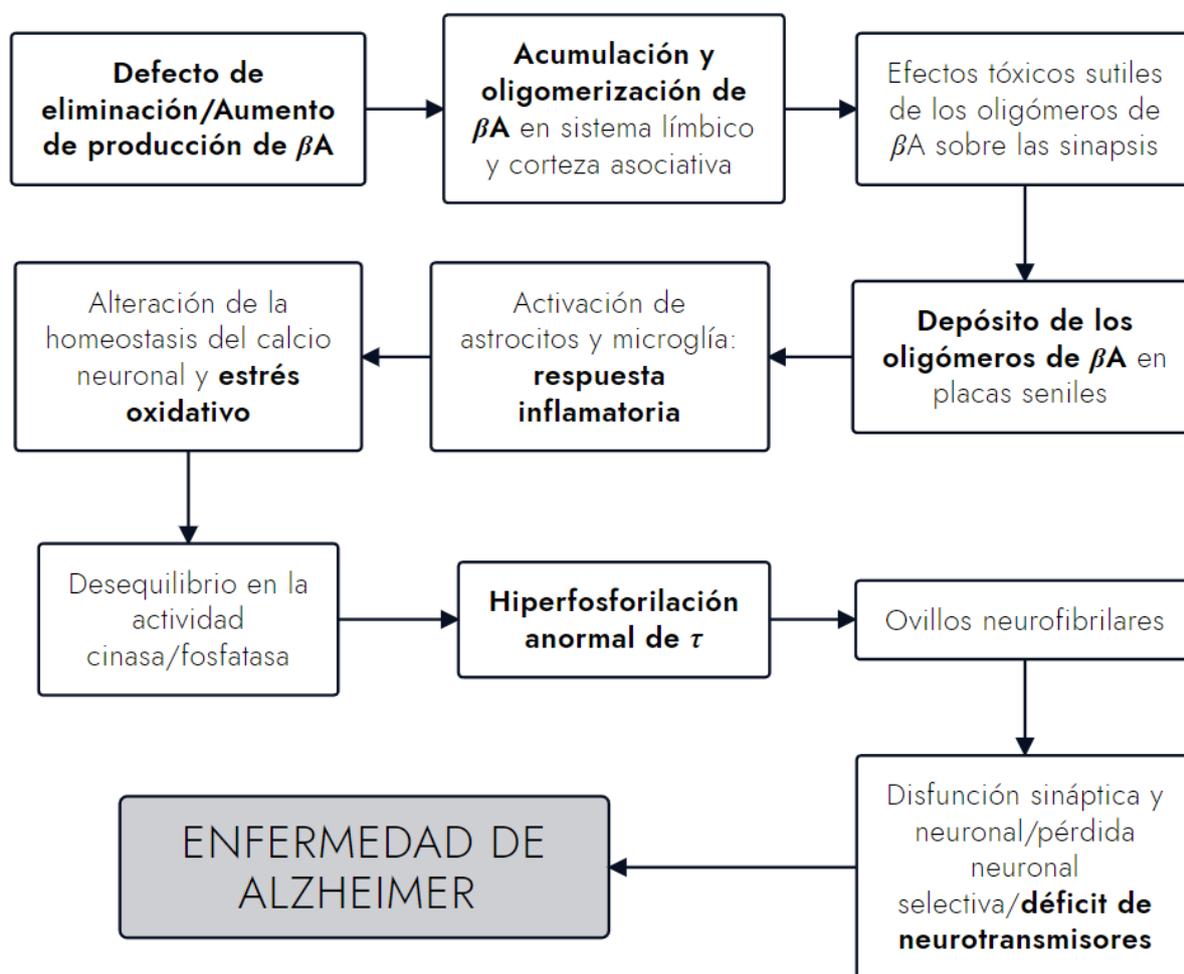


Figura 4.3. Hipótesis de la cascada amiloide.¹⁶⁶

Las placas seniles consisten en depósitos extracelulares que contienen neuritas afectadas, células gliales activadas y sobre todo βA , que proviene de la proteína precursora del amiloide

(por sus siglas en inglés, Amyloid Precursor Protein, APP). A mediados de la década de 1980 se identificó la naturaleza química de estas placas, compuestas principalmente por β A. La hipótesis de la cascada amiloidea sostiene, entonces, que el desequilibrio entre la producción y la eliminación de β A, seguido de su acumulación, desencadena una serie de eventos adversos, como disfunción sináptica, inflamación glial, hiperfosforilación y la formación de ovillos de proteína tau. Estos eventos conducen en última instancia a la muerte de las neuronas.

El procesamiento de la APP involucra dos vías distintas, una amiloidogénica y otra no amiloidogénica (Figura 4.4).

En la no amiloidogénica, la enzima α -secretasa escinde la proteína, liberando un fragmento soluble llamado sAPP α y un fragmento C83, que luego es procesado por la γ -secretasa, dando lugar a p3 y al dominio intracelular de la APP. En la vía amiloidogénica, la enzima β -secretasa libera un fragmento soluble llamado sAPP β y el fragmento C99. La γ -secretasa, en este caso, escinde C99, produciendo un dominio intracelular y al péptido β A (en sus varias versiones, incluyendo β A40/ β A42), a partir del cual se formarán oligómeros, agregados y placas seniles. Además de la γ -secretasa, otro elemento clave en el procesamiento de la APP es la β -secretasa o BACE-1, la cual compite con la α -secretasa en diversas etapas celulares. ¹⁶⁶

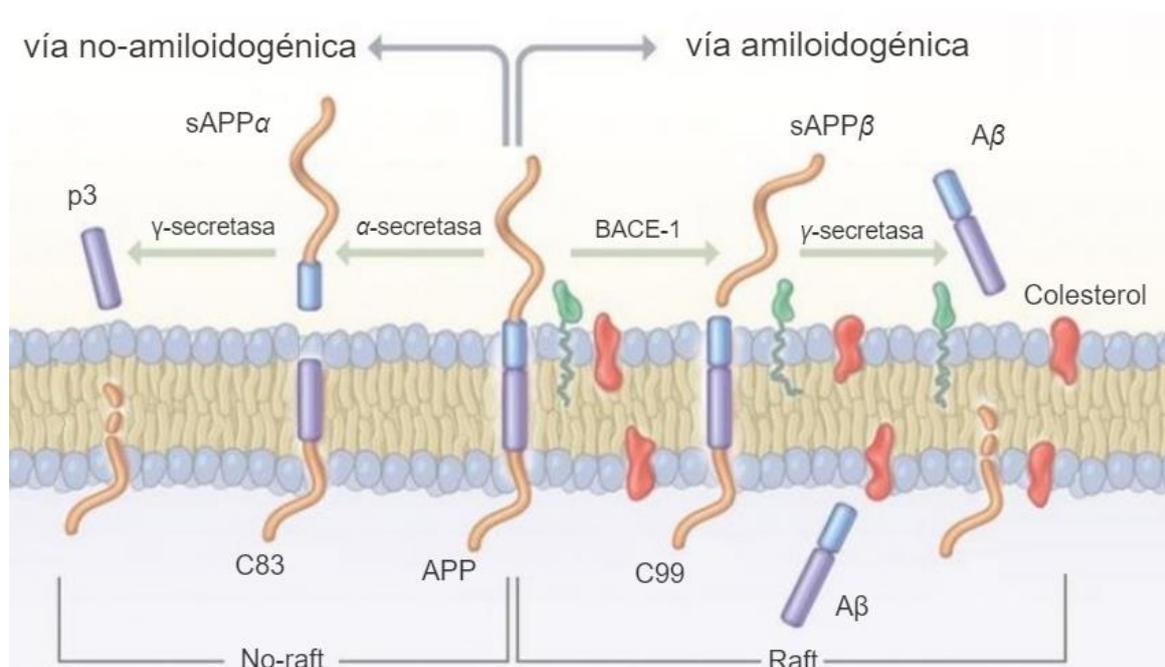


Figura 4.4. Vía amiloidogénica y no amiloidogénica. ¹⁶⁶

Un metabolismo celular alterado, la excitotoxicidad y la formación de especies reactivas de oxígeno en el sistema nervioso central son representativos de eventos fisiopatológicos que terminan llevando al estrés oxidativo, el cual es acompañado por una serie de alteraciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas. La defensa primaria contra daño mediado por ROS (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, dentro de las enzimáticas, y α -tocoferol, vitamina C, urato, entre otras no enzimáticas) suele estar afectada o disminuida en condiciones patológicas.

Estudios realizados para examinar los efectos de la α -mangostina sobre el tejido nervioso, específicamente en homogenados de cerebro de ratas y fracciones P2 de sinaptosomas, al ser expuestos a diversos agentes tóxicos sugieren un efecto antioxidante fuerte. Los agentes estudiados incluyen generadores de radicales libres, como el sulfato ferroso, agentes excitotóxicos como el quinolinato, y toxinas mitocondriales como el 3-nitropropionato, así como combinaciones de los mismos.

Se concluye a partir de los resultados obtenidos que la α -mangostina posee, además de su poder inhibitorio de la peroxidación lipídica basal sin efectos de saturación, una elevada capacidad para atrapar radicales libres, lo que podría desempeñar un papel importante en procesos neurotóxicos relacionados con el estrés oxidativo.

La α -mangostina también prevendría la disrupción de la función mitocondrial causada por el ácido quinolínico y el ácido 3-nitropropiónico en las fracciones sinaptosomales P2, sugiriendo una relación entre el daño lipoperoxidativo y la disfunción mitocondrial. Esto la convierte en un candidato prometedor para futuras investigaciones sobre su uso terapéutico en modelos de neurodegeneración mediada por ROS.³⁶

A su vez, citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquina-1 (IL-1) causan la *up*-regulación de la expresión de la molécula de adhesión celular (ICAM-1) en células endoteliales, que da lugar a intermediarios fuertemente oxidantes y con ello, al inicio del proceso inflamatorio. El TNF- α incrementa la producción de intermediarios reactivos de oxígeno tales como superóxidos, peróxidos de lípidos y óxido nítrico; segundos mensajeros durante la expresión de ICAM-1 inducida por TNF- α . Las lipoproteínas oxidadas y especies reactivas de oxígeno llevan a la activación de factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B) que es un factor de transcripción de respuesta a estrés oxidativo, activado

principalmente por peróxidos. Las xantonas poseen actividad antiinflamatoria, inhibiendo la peroxidación lipídica microsomal y modulando la expresión de ICAM-1 por TNF- α .³⁹

Al analizarse el efecto sobre las enzimas afectadas en este tipo de enfermedad neurodegenerativa, si bien no hay información de relevancia respecto de la α -mangostina en particular, las xantonas como familia se han planteado como posibles inhibidores de la monoaminooxidasa, butiril y acetilcolinesterasa. En un trabajo teórico del grupo de Ji en 2006, se llevó a cabo un estudio QSAR para determinar los modelos apropiados en la inhibición de la MAO A, MAO B y AChE,⁵⁴ y nuestro grupo de investigación, en 2017, llevó a cabo la evaluación de la capacidad inhibitoria de una serie de compuestos derivados de xantonas como agentes inhibidores de la AChE y BuChE.¹⁶⁷

En un estudio más reciente, se investigó la capacidad de la α -mangostina para atenuar la neurotoxicidad causada por oligómeros de β A al inhibir su agregación. Esto es relevante ya que, como se ha explicado, los oligómeros β A se asocian con la toxicidad celular y la disminución de la función cerebral en la enfermedad de Alzheimer. La α -mangostina demostró su capacidad para revertir los efectos negativos de los oligómeros β A en células neuronales, lo que la convierte en un posible agente neuroprotector.

La sumatoria de sus cualidades hace de estos compuestos candidatos interesantes para modificar su estructura química y moldearlos a fines de estudiar su comportamiento en relación a diferentes dianas, tales como los agregados de β A. En este contexto, es fundamental explorar más a fondo cómo la α -mangostina y sus congéneres pueden representar una esperanza real en la búsqueda de terapias efectivas y multifacéticas para abordar esta enfermedad neurodegenerativa tan compleja (Figura 4.5).

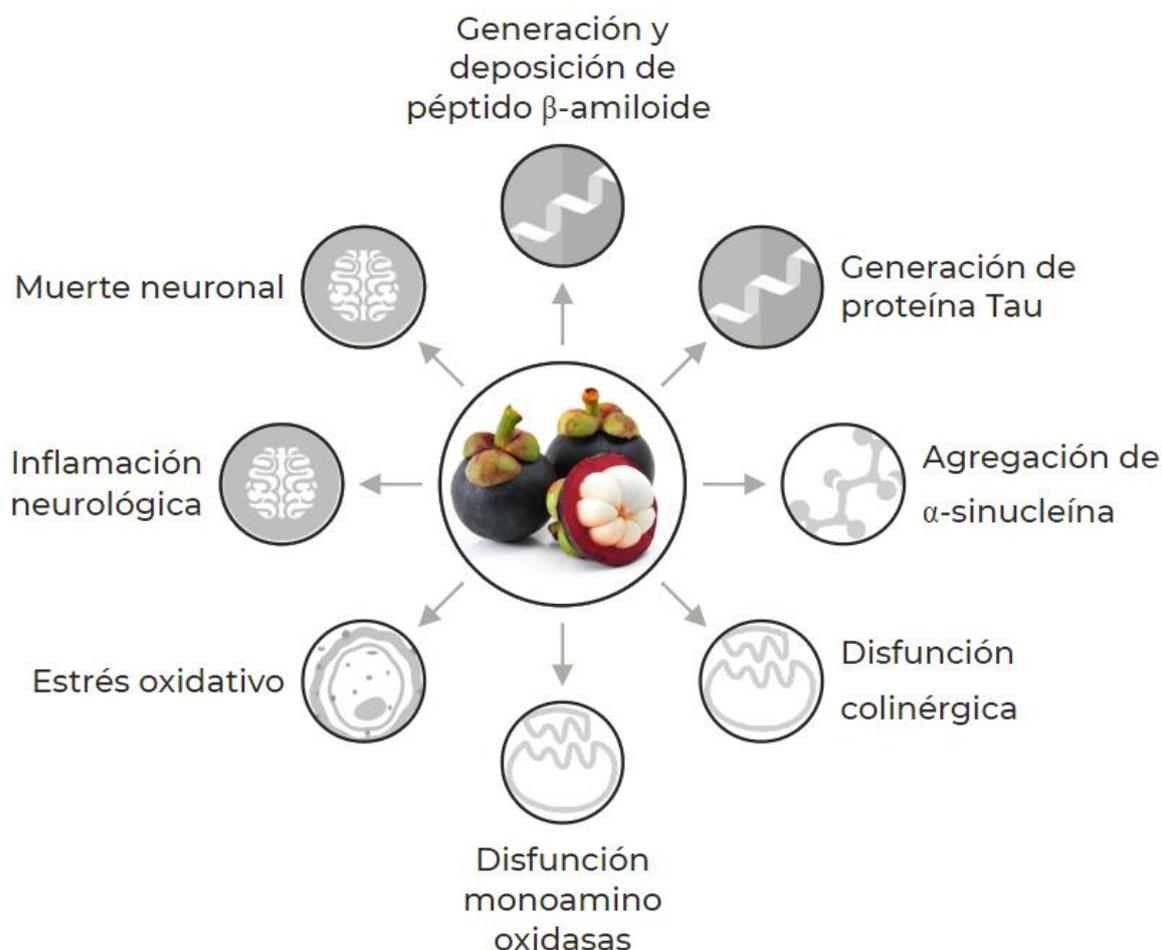


Figura 4.5. α -mangostina y congéneres como potenciales fármacos pluripotenciales.

Como ya hemos destacado para otros tipos de compuestos, si bien es posible obtener estas xantonas a partir de fuentes naturales, el tipo y posición de los sustituyentes alrededor de los anillos se ven limitados a las cascadas impuestas por las vías biosintéticas. Se propone la síntesis orgánica como una herramienta que permitiría obtener nuevos compuestos con diferente naturaleza estructural, ampliando la diversidad de sus actividades biológicas y selectividad, de tal manera atenuándose la posibilidad de darse efectos adversos o secundarios no deseados.

En lo que se refiere a los procedimientos sintéticos de este tipo de estructura, por lo general involucran un intermediario benzofenona o diariléter, y se utilizan condiciones de reacción bastante severas, con baja tolerancia de grupos funcionales, y/o empleo de ácidos fuertes o metales tóxicos. ¹⁶⁸⁻¹⁷²

El método tradicional de obtención de polihidroxicantonas con el que se trabajó es el desarrollado por Grover Shah y Shah, y requiere la utilización de ácidos *o*-hidroxibenzoicos y fenoles reactivos en presencia de agentes condensantes como el cloruro de zinc fundido y el cloruro de fosforilo (**ruta I y II**).¹⁷¹

Se utilizaron, además, otras dos hidroxicantonas en el desarrollo de los trabajos sobre membranas modelo para cuya obtención se siguió el método de Suksamrarn y colaboradores, en el caso de la 1-hidroxicantona,¹⁷³ y el método de Cheng y colaboradores, para la obtención de la 3-hidroxicantona.¹⁷⁴

El primero consiste en la utilización de ácido salicílico y resorcinol como reactivos con ZnCl₂ anhidro, sometiendo a calentamiento por 6 horas, seguido de cromatografía en columna con EP/AcOEt (99:1) (**ruta III**).

El segundo, es un protocolo en dos etapas que incluye la generación de la dibenzofenona en el primer paso, seguido de la ciclación intramolecular para la obtención del compuesto de interés, que puede ser recristalizado en su forma pura desde AcOEt. En la preparación de la benzofenona, se utiliza ácido 2-clorobenzoico y resorcinol en presencia de ZnCl₂ anhidro, a 140 °C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, y tras constatar que la reacción se completa, se filtra y lava con solución saturada de NaHCO₃. El sólido recuperado se disuelve en DMSO y se somete a una ciclodeshidratación a temperatura con NaOH a lo largo de 3 horas, a 120 °C. La reacción se desactiva por neutralización a pH neutro con ácido sulfúrico en hielo, para luego recristalizar el compuesto puro a partir de acetato de etilo (**ruta IV**).

Finalmente, la última alternativa de síntesis planteada es mediante el reactivo de Eaton, mediante el que se puede acceder a la 1-hidroxicantona, 1,3-dihidroxicantona y 1,3,6-trihidroxicantona. Este método requiere la utilización de ácido *o*-hidroxibenzoico y fenoles en presencia del reactivo de Eaton, que se compone de P₂O₅ y ácido metansulfónico. La reacción se lleva a cabo a 80 °C durante 45 a 90 minutos. La mezcla de reacción se vuelca en agua hielo y el filtrado se lava con solución saturada de NaHCO₃ (**ruta V**).

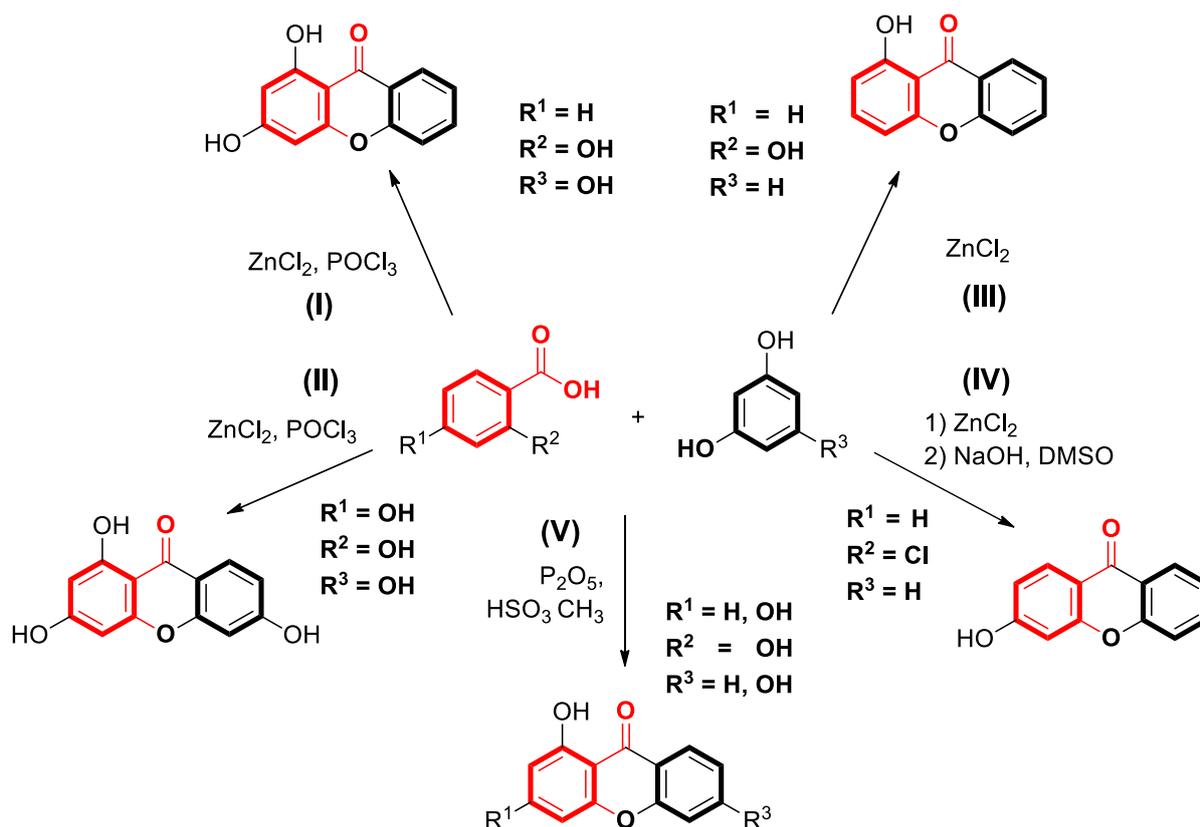


Figura 4.6. Síntesis de xantonas hidroxiladas.

Varios trabajos de investigación recientes ponen de manifiesto una relación directa entre la actividad biológica y la existencia de grupos prenilos (3-metil-2-butenilo) en posiciones claves del esqueleto dibenzo- γ -pirona.^{15,175-178} La presencia de tales grupos se convierte en un factor estructural importante para la interacción de xantonas y análogos relacionados con ciertos receptores biológicos, posibilitando un incremento en la potencia y selectividad de su actividad. Esta peculiaridad, a su vez, puede considerarse doble al tener en cuenta su influencia en las propiedades físico-químicas, incluyendo interacciones lipofílicas e hidrofílicas, así como también efectos estéricos en la interacción con las dianas terapéuticas. En base a lo expuesto, se desarrollaron una serie de experimentos utilizando no sólo las hidroxixantonas mencionadas, sino también sus derivados *O*-alilados y *O*-prenilados.

El acceso a las xantonas *O*-preniladas y *O*-aliladas se logró por una eterificación de Williamson dirigida al hacer reaccionar las hidroxixantonas con bromuro de prenilo y alilo, utilizando K₂CO₃ como base, en presencia de acetona anhidra y a temperatura ambiente (Figura 4.7).

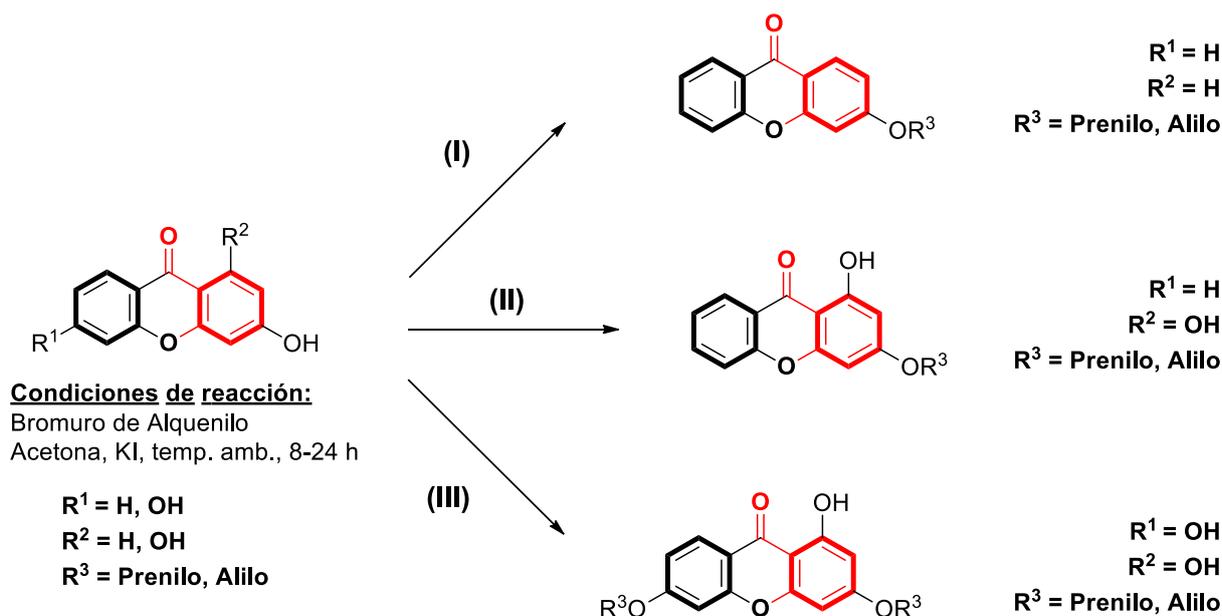


Figura 4.7. Síntesis de xantonas O-preniladas y O-aliladas.

Las hidroxixantonas generadas son valiosas por sí mismas y como compuestos intermedios en la síntesis de productos químicos más complejos. Si bien el método desarrollado por GSS, ²⁹ Eaton ¹⁷⁹ y otros de su estilo han destacado por su versatilidad y eficiencia en la generación de estas hidroxixantonas, presentan una serie de limitaciones a superar desde una perspectiva metodológica y de alcance. Muchas alternativas se han dado a conocer a lo largo de la última década, aunque en general los nuevos protocolos de síntesis suelen requerir precursores complejos, catalizadores de elevado valor no recuperables, o el uso de ligandos fosfina y/o aditivos. ^{25,26,30–32,34,118,180–194}

El desarrollo de un protocolo de síntesis novedoso y más eficiente requeriría, por empezar, de una menor cantidad de pasos y de condiciones menos drásticas.

En años recientes, se ha reportado la acilación de haluros de arilo catalizada por paladio con benzaldehídos 2-sustituídos como método de obtención de xantonas y sus congéneres. ^{144,195–199} En 2009, Peng y colaboradores reportaron una síntesis *one-step* de xantonas por acoplamiento intermolecular de 1,2-dibromoarenos con diversos salicilaldehídos en DMF a 130 °C en presencia de un catalizador homogéneo PdCl₂(PPh₃)₂, utilizando K₃PO₄ como base. ³² Más recientemente, Shen y Wu desarrollaron un protocolo selectivo para la síntesis directa de xantonas a partir de 2-bromofluorobencenos y salicilaldehídos comercialmente

disponibles utilizando Pd(OAc)₂ como catalizador, en presencia de ligandos de tipo fosfina (Figura 4.8, ruta I).³¹

Alternativamente, en el 2014 nuestro grupo de investigación desarrolló una estrategia eficiente y versátil para la construcción del andamiaje xantona a través de un acoplamiento intermolecular libre de ligandos entre benzaldehídos *orto*-sustituidos y una amplia variedad de fenoles. Para este propósito, se hizo uso de un catalizador heterogéneo de cobre soportado en un material inorgánico, Magsilica (Figura 4.8, ruta II).³³

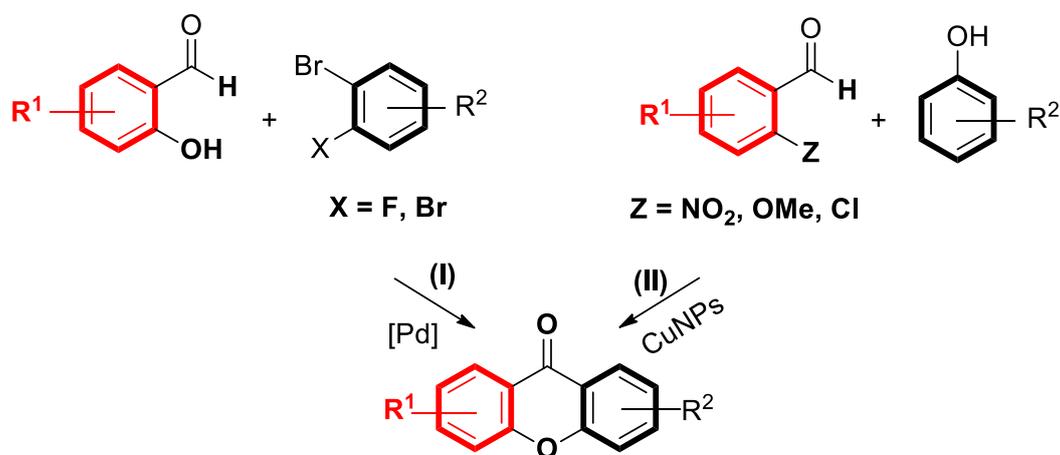


Figura 4.8. Síntesis directa de xantonas a partir de benzaldehídos *orto*-sustituidos.

Tal como se ha discutido anteriormente en la sección 1.1.2 y 1.1.3 del capítulo introductorio, una forma de optimizar este tipo de proceso es la utilización de catalizadores de alta eficiencia y selectividad basados en metales de transición. El desarrollo de un catalizador apropiado permite lograr una adecuada economía atómica, baja toxicidad y una mayor eco-compatibilidad, de forma tal de respetar tanto como sea posible los principios de la química verde. La capacidad de recuperar dichos catalizadores, así como de diseñarlos y modificarlos para un propósito expreso, aumentando su actividad e incluso disminuyendo sus costos, constituye una premisa atractiva cuando se planea la generación de pequeñas bibliotecas de productos con andamiaje con probadas funciones terapéuticas en la industria farmacéutica.

De igual forma, la síntesis orgánica asistida por microondas se presenta como una herramienta poderosa y versátil que puede ser aplicada en un amplio rango de reacciones químicas, con ventajas que se extienden desde el uso de menores tiempos de reacción, una limitación en la generación de subproductos, y en forma consecuente, un aumento en los

rendimientos y conversiones del producto deseado. La utilización combinada de MAOS y catalizadores metálicos ofrece ventajas significativas sobre métodos tradicionales, dado que el gradiente inverso de temperatura generado lleva a un aumento en la vida útil de los catalizadores por eliminación del efecto de pared.²⁰⁰

De las propuestas estudiadas, sólo dos utilizan 1,2-dihaloarenos y salicilaldehídos como materiales de partida^{31,32} y presentan una serie de dificultades, incluyendo la necesidad de salicilaldehídos activados con grupos electrodonadores, elevados tiempos de reacción de hasta 12 horas, y el requerimiento de uso de ligandos de tipo fosfina, aún sin considerar la imposibilidad de recuperación y reutilización de los catalizadores.

Usando estos resultados como inspiración, se propuso un método rápido, conveniente y alternativo para la reacción de acoplamiento de dihaluros de arilo con salicilaldehídos catalizada por paladio heterogéneo bajo irradiación por microondas. El mismo permite el acceso a una pequeña biblioteca de xantonas a través de un proceso en un paso. Para tal fin, se utilizó un catalizador novedoso soportado en biocarbón, al que nos referiremos como PdNPs/BC (Pd NanoParticles/BioChar (Figura 4.9)).^{140,201}

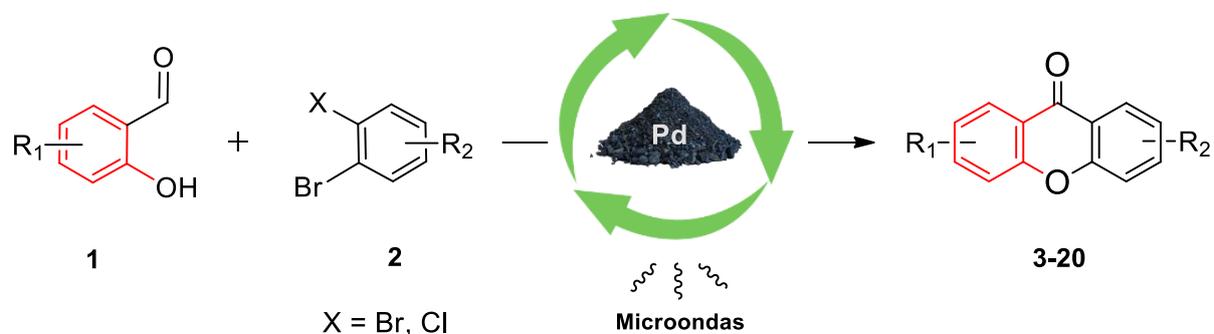


Figura 4.9. Nueva aproximación sintética para xantonas.

4.2 Nueva ruta sintética

Las condiciones de reacción para la anulación intermolecular catalizada por paladio fueron optimizadas utilizando salicilaldehído (**1a**) y 1,2-dibromobenceno (**2a**) como sustratos modelo (Tabla 4.1). En una primera aproximación, se evaluó la actividad catalítica de siete catalizadores de paladio en base a las condiciones propuestas por Peng {[Pd] (5 mol%, DMF, K₂CO₃, 130 °C, 12 h)}.³² Teniendo en cuenta los tiempos prolongados de reacción, se consideró el uso de irradiación por microondas para aumentar la eficiencia del proceso.

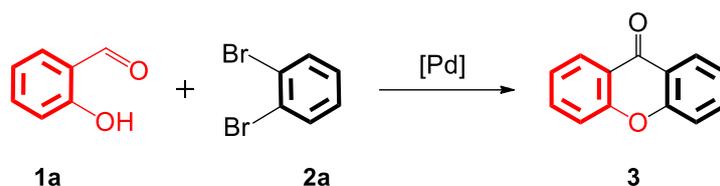
Como se desprende del análisis de la Tabla 4.1, no se detectó progreso de la reacción en ausencia de catalizador (entrada 1). Al incorporar el catalizador PdNPs/BC bajo irradiación microondas (250 W, 130 °C), el progreso de la reacción fue evidente incluso en tiempos de reacción cortos de 30 minutos (entrada 2). Cuando la reacción se llevó a cabo con tratamiento térmico tradicional, una baja proporción del producto de interés (15%) se detectó luego de 12 horas. Se observó un aumento significativo de formación de xantona **3** al aumentar la temperatura, en el tratamiento con microondas, a 150 °C (entrada 3). Por otro lado, la actividad catalítica de nanopartículas de paladio desnudas bajo condiciones térmicas (entradas 5 y 6) no dio lugar a avance en la reacción. Cierta progresión (25%) tuvo lugar con el mismo sistema catalítico, utilizando irradiación con microondas a 150 °C (entrada 6).

Otros nanocatalizadores soportados en diferentes materiales inorgánicos tales como Al₂O₃ (entrada 8) y PbO (entrada 9), permitieron acceder al producto **3** con bajos rendimientos al utilizar el tratamiento con microondas. En este caso, el aumento de temperatura pareció no tener un efecto positivo en términos de conversión.

De acuerdo a lo observado, el catalizador PdNPs/BC tuvo la mejor eficiencia (entrada 4), mientras que PdCl₂(PPh₃)₂ mostró menor conversión de los reactivos.

El uso de catalizadores comerciales de paladio (entradas 9-11) no derivó en una mejoría en la generación de **3** para las condiciones de reacción estudiadas. Tampoco se observó generación de producto al utilizar otros catalizadores comerciales homogéneos tales como Pd(OAc)₂ o PdCl₂(MeCN)₂ (entradas 12 y 13).

Tabla 4.1. Evaluación sistemática de catalizadores.



Entrada	[Pd]	Temperatura (°C)	Rendimiento ^c (T. térmico) ^b	Rendimiento ^c (T. Microondas) ^b
1	-	130	-	-
2	PdNPs/BC	130	15	44
3	PdNPs/BC	150	46	89
4	PdNPs/BC	150	44	88 ^d
5	PdNPs	130	-	12
6	PdNPs	150	Trazas	25
7	PdNPs/Al ₂ O ₃	130	Trazas	18
8	PdNPs/Al ₂ O ₃	150	Trazas	25
9	PdNPs/PbO	130	Trazas	10
10	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	130	61	48
11	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	150	Trazas ^e	-
12	Pd(OAc) ₂	130	-	-
13	PdCl ₂ (MeCN) ₂	130	-	-

^a Condiciones de reacción estándar **1a** (1 mmol), **2a** (1 mmol), K₂CO₃ (2 mmol), [Pd] (5 mol%), DMF (5 ml), 12 horas. BC: Biocarbón.

^b La reacción se llevó a cabo a 250 W, 30 min. Monitoreo por TLC y CG-EM.

^c Rendimiento aislado.

^d Reacción llevada a cabo con una carga de 3 mol% de PdNPs/BC.

^e Deposición de paladio negro.

A continuación, se optimizó la carga de catalizador utilizando las condiciones de irradiación con microondas a 250 watts de potencia y 150 °C. Tal como se muestra en la Tabla 4.1, se inició el estudio con 5 mol% de PdNPs/BC, obteniéndose un 89% de rendimiento. Al disminuir la carga a 3 mol%, la reacción procedió con la misma eficiencia y selectividad (entrada 4). La reducción de la carga de catalizador por debajo de 3 mol% tuvo un efecto negativo en el

rendimiento, mientras que una carga superior a 5 mol% no mejoró significativamente la reacción en términos de tiempo y rendimiento.

Una vez definidas la naturaleza y carga de catalizador más apropiadas, se procedió a explorar la incidencia de la potencia de la irradiación microondas a valores de 100, 200, 250 y 300 W. Para este propósito, se utilizó un reactor CEM Discover a 150 °C. Las reacciones fueron monitoreadas por TLC y CG-EM a diferentes tiempos. La conversión completa de salicilaldehído se detectó a los 30 minutos a 250 W y 150 °C. Cabe señalar que tiempos menores de reacción llevaron a transformaciones incompletas de los materiales de partida, mientras que un incremento en el mismo no condujo a mejores rendimientos de reacción. La irradiación con microondas a 100, 200 y 300 W de potencia llevaron a una menor conversión de los materiales de partida a los 30 minutos de reacción, en base a esto, se determinaron como óptimas las condiciones de 250 W de potencia y 150 °C.

El uso de diferentes solventes, tales como *N,N*-dimetilacetamida, *N*-metil-2-pirrolidona y dimetilsulfóxido no mostraron mejorías en los rendimientos. Por otro lado, el uso de solventes menos polares como tolueno o dioxano dieron lugar a una conversión mínima de los materiales de partida.

En forma complementaria, se hizo una exploración de bases tales como K_3PO_4 , Na_2CO_3 y Cs_2CO_3 , así como una reacción de control sin base que no resultó en una transformación apreciable de los reactivos, observándose tan sólo trazas del producto deseado. De todas las bases estudiadas, K_2CO_3 resultó ser la más efectiva.

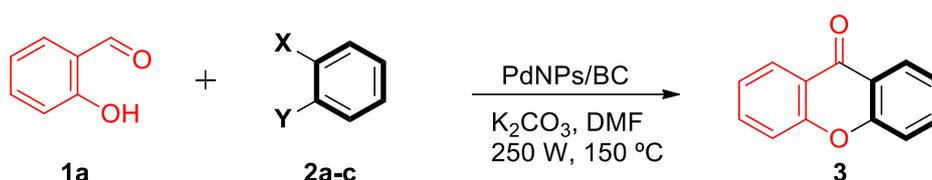
De tal forma, se determinó que las condiciones óptimas para la generación de la xantona **3** requieren el uso de salicilaldehído (1 mmol), 1,2-dibromobenceno (2 mmol), PdNPs/BC (3 mol%, equivalente a 4 mg de Pd) como catalizador, K_2CO_3 (2 mmol) y DMF (5 ml) a 150 °C bajo irradiación con microondas a 250 W de potencia, por 30 minutos.

Es importante destacar que, bajo estas condiciones de reacción optimizadas, no fue necesaria la presencia de fosfinas y otros aditivos o ligandos para el progreso exitoso de la reacción. También es de relevancia señalar que la formación del subproducto biarilo proveniente del

homoacoplamiento del dihaloareno precursor no fue detectado, denotándose la selectividad de la metodología para la anulación directa de **1a** y **2a**.

Para evaluar el alcance del sustrato electrófilo, diferentes 1,2-dihaloarenos se hicieron reaccionar con salicilaldehído (**1a**) bajo las condiciones de reacción optimizadas. En todos los casos, los 1,2-dihaloarenos produjeron el esqueleto xantona **3** con buenos a muy buenos rendimientos (88% para dibromobenceno, 82% para 1-bromo-2-clorobenceno y 67% para diclorobenceno, Tabla 4.2). Si bien el sistema catalítico no está limitado al uso de bromuros como grupos salientes, sino que también admite el uso de bencenos clorados menos reactivos, el uso de bromo como grupo saliente dio los mejores resultados en términos de rendimiento.

Tabla 4.2. Alcance del sustrato electrófilo en la síntesis de 9H-xanten-9-ona^a.



Entrada	Salicilaldehído	1,2-dihaloareno	Xantona	Rendimiento (%) ^b
1				88
2	1a		3	82
3	1a		3	67

^a Condiciones de reacción: salicilaldehído (1 mmol), 1,2-dihaloareno (2 mmol), PdNPs/BC (3 mol%), K₂CO₃ (2 mmol), DMF (5 ml) a 150 °C bajo irradiación con microondas por 30 minutos.

^b Rendimiento aislado.

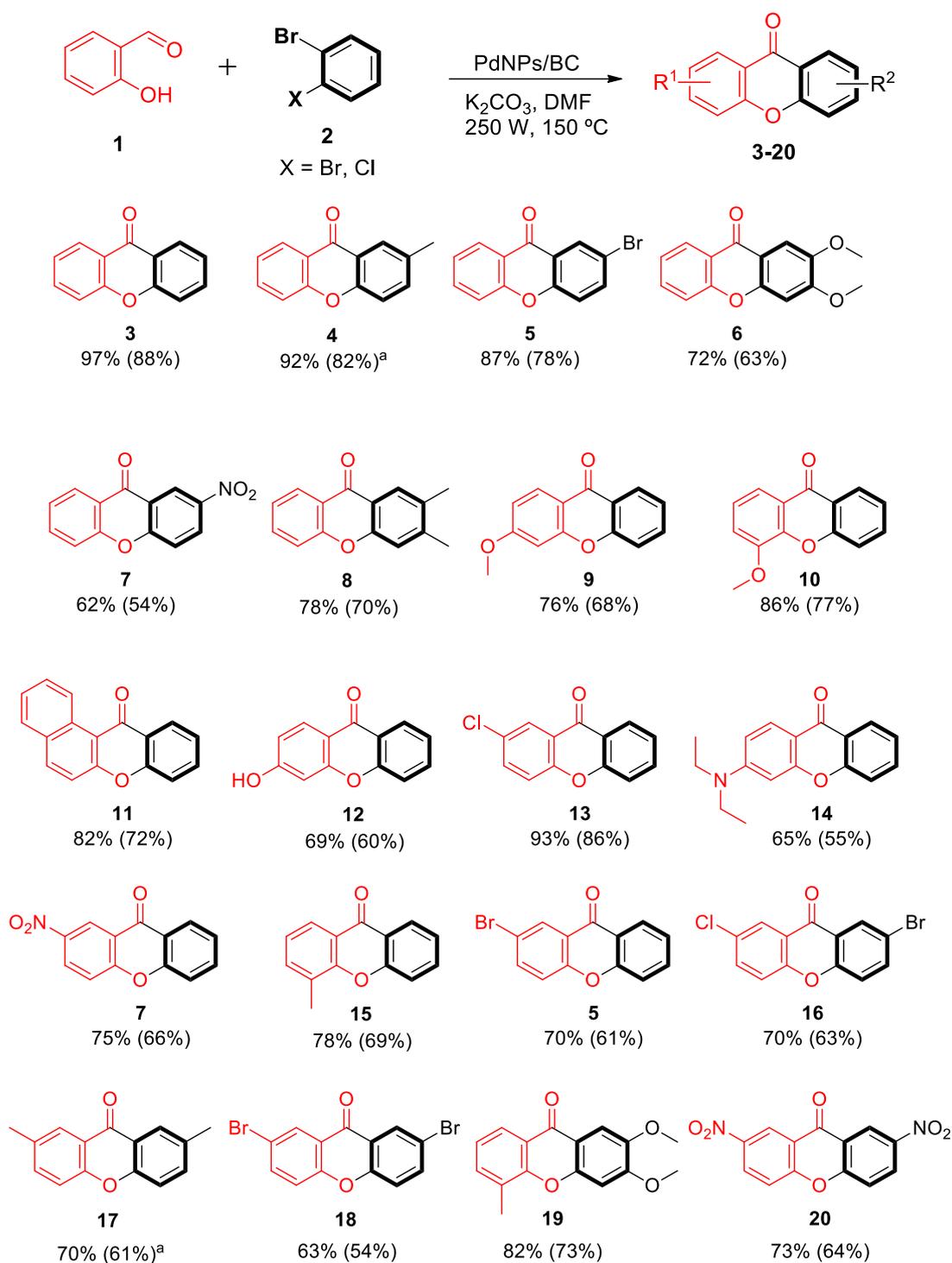
La evaluación del alcance y limitaciones de la reacción se continuó explorando a través del uso de diferentes salicilaldehídos (Tabla 4.3). Los resultados muestran con claridad que esta nueva metodología sintética es compatible con una amplia variedad de grupos funcionales presentes en los salicilaldehídos de partida, incluyendo grupos funcionales tales como nitro, bromo, cloro, metoxilo, alquilo, alquilamino y un grupo hidroxilo fenólico libre con conversiones de buenas a excelentes. Sin embargo, cuando un grupo fuertemente electrodonador como el dietilamino o hidroxilo fue introducido, los rendimientos disminuyeron notoriamente. Las condiciones de reacción mostraron una robusta tolerancia a la presencia de grupos ricos y pobres en electrones en los 1,2-dihaloarenos sustituidos simétricamente.

Finalmente, se analizó la quimio y regioselectividad de la metodología sintética utilizando 1,2-dihaloarenos asimétricamente sustituidos. La anulación intermolecular del 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno sucedió en forma quimio y regioselectiva, produciendo la xantona **4** con muy buenos rendimientos. También se observó una elevada regioselectividad para los 1,2-dibromobenzenos asimétricamente sustituidos. La *O*-arilación de 4-NO₂ y 4-Br 1,2-dibromobenzenos ocurrió selectivamente en posición *para*. Sin embargo, cuando el 1,2-dibromo-4-metilbenceno se hizo reaccionar con salicilaldehídos funcionalizados, se identificó una distribución equimolar de isómeros (1:1) por ¹H RMN en el crudo de reacción, indicando un bajo control de la regioselectividad.

Vale la pena destacar que este nuevo nanocatalizador heterogéneo de paladio permitió la síntesis directa de xantonas a partir de salicilaldehídos y 1,2-dihaloarenos con fuertes grupos electroattractores en su estructura, superando las limitaciones reportadas por los grupos de Peng y Wu.

El *work-up* y aislamiento a partir del producto crudo consistió en añadir acetato de etilo a la mezcla de reacción. El catalizador es recuperado en esta instancia por filtración y lavado con el solvente. El filtrado se lava, entonces, dos veces con solución saturada de NaCl y luego se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Se remueve el solvente a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía en columna usando silica gel 60 como adsorbente. Las estructuras de las xantonas aisladas se confirmaron en base a sus datos espectroscópicos.

Tabla 4.3. Alcance de la síntesis directa de xantonas funcionalizadas.



Reactivos y condiciones: salicilaldehído (1 mmol), 1,2-dibromobenceno (1 mmol), K₂CO₃ (2 mmol), PdNPs/BC (3 mol%) en DMF a 150 °C bajo irradiación con microondas (250 W) por 30 min. Cuantificado por análisis de cromatografía gaseosa usando el método del estándar interno. Rendimiento aislado luego de la purificación (en paréntesis).

^a La reacción se llevó a cabo en presencia de 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno. Al hacerla con 1,2-dibromo-4-metilbenceno, una proporción isomérica de 1:1 fue detectada por ¹H NMR del producto crudo.

Para comprobar la reciclabilidad del catalizador PdNPs/BC, se seleccionó la síntesis de la xantona **3** como reacción modelo bajo las condiciones optimizadas. Los resultados se resumen en la Figura 4.10. Tras completarse la reacción, monitoreada por TLC, el nanocatalizador se separó por filtración y se lavó, para finalmente secar en vacío y ser utilizado en una nueva reacción. No hubo pérdida de eficiencia catalítica visible hasta luego de 4 ciclos de uso. La leve disminución en la actividad catalítica del primer al cuarto ciclo es consistente con pequeñas pérdidas de masa del catalizador durante los procedimientos de lavado.

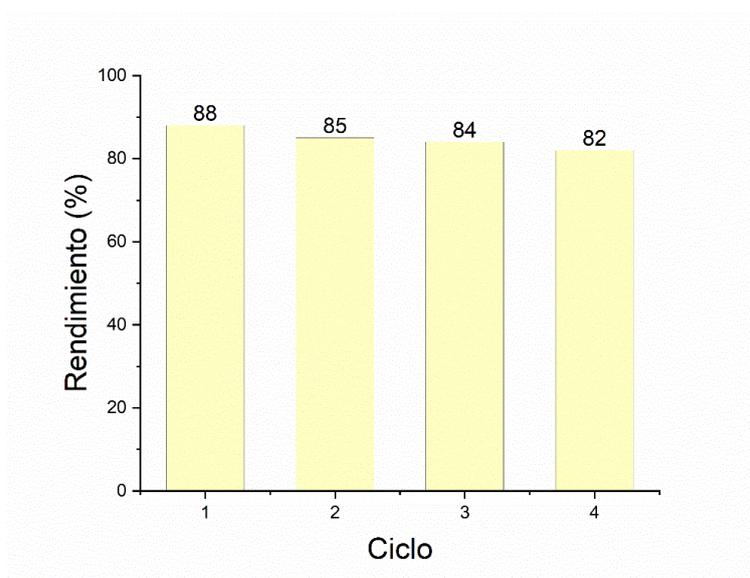


Figura 4.10. Reciclabilidad de PdNPs/BC en la síntesis one-step de la xantona 3.

El catalizador reciclado se analizó mediante DRX y se determinó que no hubo cambio en el patrón previo y posterior a la reacción, mostrando que la naturaleza del mismo no fue modificada bajo las condiciones de reacción establecidas. Los patrones, tanto del catalizador fresco como utilizado, fueron consistentes con los valores de referencia.

A continuación, se evaluó la posibilidad de que hubiese lixiviación del metal a la fase acuosa y se estudió mediante espectroscopía de absorción atómica. El análisis se llevó a cabo sobre el filtrado extraído en condiciones operativas durante la reacción y se encontró un 0.001% de metal en solución luego del segundo ciclo, con lo cual se concluye que no existe una cantidad significativa de lixiviación. Esto se ve confirmado por los datos espectroscópicos comparativos entre el catalizador fresco y usado, que se mantienen constantes.

Los patrones de DRX mostraron picos asociados al material amorfo del biocarbón y otros correspondientes a las especies de paladio. El área específica de superficie fue medida por metodología BET y fue de $65\text{m}^2/\text{g}$. Un análisis mediante microscopia TEM se llevó a cabo para determinar el tamaño de la nanopartícula de Pd. Se determinó una alta dispersión de nanopartículas esféricas sobre el BC, con un tamaño observado promedio de 2.0 nm. (Figura 4.11)

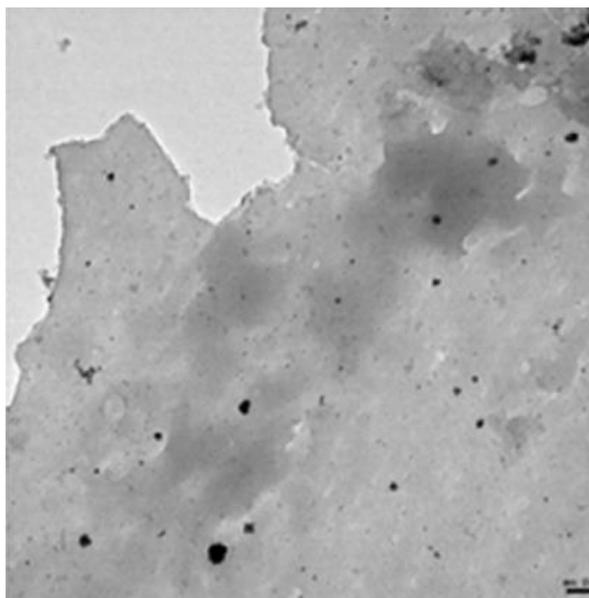


Figura 4.11. Microfotografía TEM de PdNPs/BC.

En base a los resultados obtenidos, se propone un posible mecanismo de reacción en la Figura 4.12. El 1,2-dihaloareno **2** primero sufre una adición oxidante del Paladio(0) catalizador. Luego, el intermediario aril-paladio(II) **A** reacciona con el salicilato **1** generado en condiciones básicas, desplazando al haluro y llevando a la formación del intermediario aril(ariloxi)paladio(II) **B**. Subsecuentemente, **B** sufre una C-H activación del enlace C-H del aldehído dando lugar al intermediario cíclico **C**. Finalmente, la β -eliminación de **C** seguida de una sustitución nucleofílica aromática intramolecular da lugar a la xantona deseada.

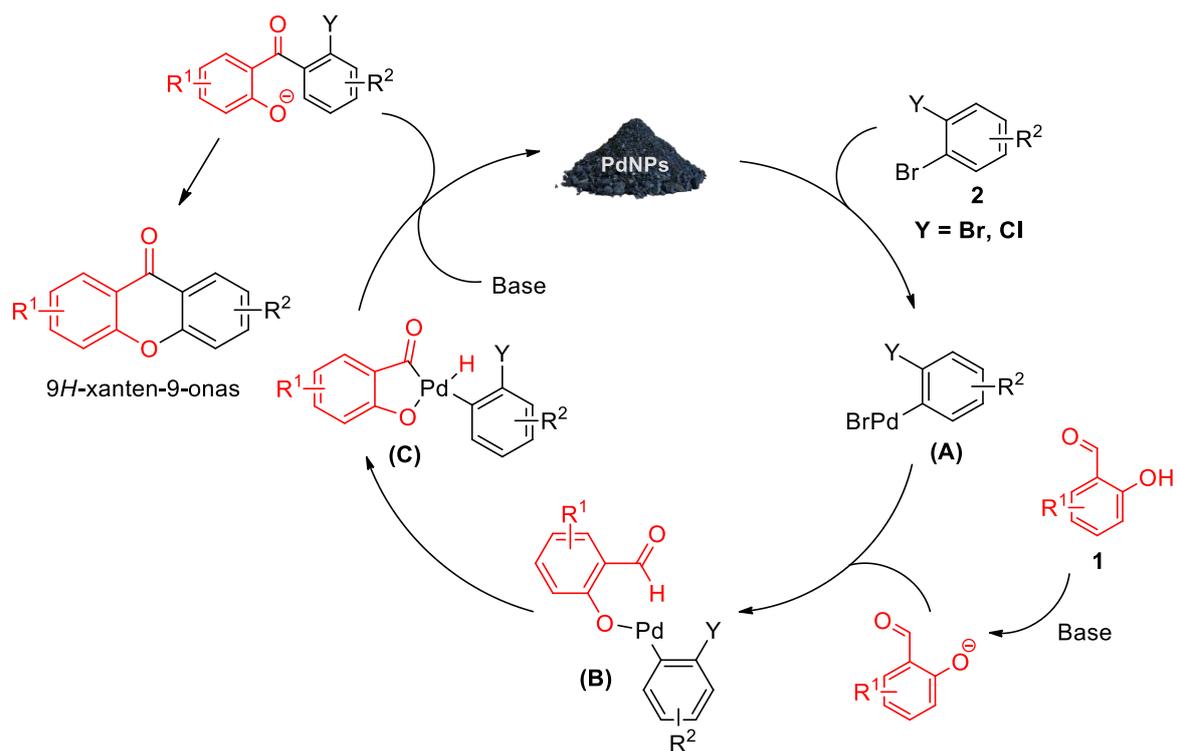


Figura 4.12. Mecanismo propuesto para el ciclo catalítico en la síntesis directa de xantonas.

4.3 Materiales y métodos

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se obtuvieron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Los solventes se secaron y destilaron de acuerdo con el procedimiento estándar.⁸⁵ Las reacciones se monitorearon mediante TLC en placas de gel de sílice (60F-254) visualizadas bajo luz UV y/o utilizando ácido fosfomolibdico al 5% en etanol.

Todos los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron a temperatura ambiente en CDCl_3 , acetona- d_6 o $\text{DMSO}-d_6$ en un espectrómetro Bruker Avance ARX-300. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en partes por millón (ppm) desde el TMS utilizando la resonancia del solvente residual. Se utilizaron abreviaturas estándar para denotar multiplicidades como se indicó en 2.4.

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro FT-IR Perkin-Elmer Paragon 1000 en modo ATR (Reflectancia Total Atenuada) a temperatura ambiente.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato Büchi 510 y no están corregidos.

Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV en un instrumento HP-5890 CG-EM de Hewlett Packard equipado con un detector de masas selectivo HP-5972.

La pureza de los compuestos volátiles y los análisis cromatográficos se determinaron con un GC Shimadzu (GC-14B) con un detector de ionización de llama equipado con una columna HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) utilizando N_2 como gas portador.

Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un equipo Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL (para EI) y un Finnigen MAT 95 (para ESI).

La cromatografía en columna flash se realizó utilizando gel de sílice MN Macherey Nagel 60M (0.040-0.063 mm/230-240 mesh ASTM).

Las reacciones de microondas se realizaron utilizando un horno de microondas CEM Discover en recipientes de reacción sellados.

La carga de paladio del catalizador se determinó mediante espectrometría de absorción atómica en un equipo PerkinElmer AAnalyst 700.

Los patrones de DRX se determinaron con un difractómetro Philips PW1710 BASED operando a 45 kV y 30 mA, equipado con un monocromador con radiación de $\text{Cu K}\alpha 1$ (λ $\frac{1}{4}$ 0.15406 nm).

Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K se midieron en un equipo Quantachrome nova 1200e. Las áreas de superficie específica y volumen de poro se obtuvieron aplicando el método BET.

Las muestras se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, utilizando un aparato Joel 100 CX2 (Tokio, Japón). Se midieron aproximadamente cien partículas de paladio para realizar la distribución del tamaño de partícula y obtener el tamaño promedio de partícula (d).⁸⁶

9H-xanten-9-ona (3)

Preparado a partir de salicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 12:1); sólido blanco; rendimiento: 170 mg (88%, 0.88 mmol); punto de fusión: 172–173 °C.

IR (película): 3070, 2914, 2874, 1654, 1456 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 2 H, ArH), 7.48 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, ArH), 7.70-7.4 (m, 2 H, ArH), 8.33 (dd, *J* = 6.0 Hz, 1.2 Hz, 2 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 117.9, 121.8, 123.9, 126.7, 134.8, 156.1, 171.1.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₉O₂: 197.0603; encontrado: 197.0608.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{25,118}

2-metil-9H-xanten-9-ona (4)

Preparado a partir de salicilaldehído y 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 10:1); sólido blanco; rendimiento: 170 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión: 149–151 °C.

IR (película): 3062, 2915, 2871, 1657, 1450 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.39 (s, 3 H, CH₃), 7.27-7.32 (m, 2 H, ArH), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 7.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArH), 7.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 8.04 (s, 1 H, ArH), 8.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 19.8, 116.7, 120.5, 120.8, 122.7, 125.0, 125.7, 132.7, 133.6, 135.0, 153.4, 155.2, 176.3.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₄H₁₁O₂: 211.0759; encontrado: 211.0764.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{25,118}

2-bromo-9H-xanten-9-ona (5)

Preparado a partir de salicilaldehído y 1,2,4-tribromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/ AcOEt 14:1); sólido blanco; rendimiento: 170 mg (82%, 0.82 mmol); punto de fusión: 176–178 °C.

IR (película): 3075, 2919, 1663, 1451 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.58-7.61 (m, 2 H, ArH), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, ArH), 7.98-8.01 (m, 2 H, ArH), 8.30 (dd, *J* = 8.6 Hz, 1.4 Hz, 1 H, ArH), 8.42 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 117.3, 118.3, 120.2, 121.8, 123.3, 124.5, 127.0, 129.4, 135.5, 137.8, 155.1, 156.2, 176.1.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₈BrO₂: 274.9708; encontrado: 274.9712.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰²

2,3-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (6)

Preparado a partir de salicilaldehído y 1,2-dibromo-4,5-dimetoxibenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/ AcOEt 10:1); líquido oleoso incoloro; rendimiento: 160 mg (63%, 0.63 mmol).

IR (fase sólida): 3065, 2940, 2834, 1648, 1466 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 3.94 (s, 3 H, OCH₃), 6.85 (s, 1 H, ArH), 7.30 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.60 (s, 1 H, ArH), 7.63 (m, 1 H, ArH), 8.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 55.3, 55.4, 98.6, 104.4, 113.9, 116.6, 120.5, 122.7, 125.5, 132.9, 145.7, 151.4, 154.4, 155.0, 175.0.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₅H₁₃O₄: 257.0814; encontrado: 257.0819.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{25,118}

2-nitro-9H-xanten-9-ona (7)

Preparado a partir de salicilaldehído y 1,2-dibromo-4-nitrobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/ AcOEt 20:1); sólido incoloro; rendimiento: 130 mg (54%, 0.54 mmol); punto de fusión: 153–154 °C. El derivado de xantona **7** también fue sintetizado a partir de 5-nitrosalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno dando lugar a un sólido incoloro; rendimiento: 160 mg (66%, 0.66 mmol).

IR (película): 3077, 1667, 1611, 1452 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.75-7.77 (m, 2 H, ArH), 7.98 (dd, *J* = 9.2 Hz, 0.3 Hz, 1 H, ArH), 8.01-8.05 (m, 1 H, ArH), 8.40-8.42 (m, 1 H, ArH), 8.85 (dd, *J* = 9.1 Hz, 2.8 Hz, 1 H, ArH), 9.21-9.22 (m, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 118.4, 119.9, 121.6, 121.9, 123.8, 125.5, 127.2, 129.4, 136.1, 156.1, 159.5, 175.9.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₈NO₄: 242.0453; encontrado: 242.0459.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰³

2,3-dimetil-9H-xanten-9-ona (8)

Preparado a partir de salicilaldehído y 1,2-dibromo-4,5-dimetilbenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/ AcOEt 10:1); líquido oleoso incoloro; rendimiento: 160 mg (70%, 0.70 mmol).

IR (fase sólida): 3062, 2955, 2851, 1654, 1450 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.35 (s, 3 H, CH₃), 2.39 (s, 3 H, CH₃), 7.23-7.44 (m, 3 H, ArH), 7.67 (m, 1 H, ArH), 8.04 (s, 1 H, ArH), 8.32 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1.4 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 19.4, 20.8, 118.1, 118.3, 119.9, 122.1, 123.8, 126.5, 126.9, 133.3, 134.6, 145.7, 154.9, 156.3, 177.3$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_2$: 225.0916; encontrado: 225.0920.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³⁴

3-metoxi-9H-xanten-9-ona (9)

Preparado a partir de 4-metoxisalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/AcOEt 10:1); sólido incoloro; rendimiento: 150 mg (68%, 0.68 mmol); punto de fusión: 112–114 °C.

IR (película): 3068, 2950, 2843, 1650, 1455 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.92$ (s, 3 H, OCH_3), 6.86 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, ArH), 6.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, ArH), 7.34-7.38 (m, 1 H, ArH), 7.43 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, ArH), 7.66-7.70 (m, 1 H, ArH), 8.27 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, ArH), 8.31 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 56.1, 100.4, 113.5, 116.0, 117.9, 122.2, 124.2, 126.9, 128.5, 134.5, 156.4, 158.3, 165.3, 176.5$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3$: 227.0708; encontrado: 227.0713.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³²

4-metoxi-9H-xanten-9-ona (10)

Preparado a partir de 3-metoxisalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/AcOEt 12:1); sólido incoloro; rendimiento: 170 mg (77%, 0.77 mmol); punto de fusión: 110–112 °C.

IR (película): 3026, 2951, 2849, 1660, 1450 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.03$ (s, 3 H, OCH_3), 7.22-7.31 (m, 2 H, ArH), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, ArH), 7.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, ArH), 7.71-7.75 (m, 1 H, ArH), 7.90 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1.5 Hz, 1 H, ArH), 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 56.7, 115.5, 117.8, 118.5, 121.9, 122.9, 123.7, 124.3, 126.9, 135.1, 146.7, 148.8, 156.2, 177.4$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3$: 227.0708; encontrado: 227.0712.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³²

12H-bezo[a]xanten-12-ona (11)

Preparado a partir de 2-hidroxi-1-naftaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/AcOEt 10:1); sólido blanco; rendimiento: 180 mg (72%, 0.72 mmol); punto de fusión: 145–147 °C.

IR (película): 3073, 1663, 1600, 1455 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.39$ (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H, ArH), 7.48-7.55 (m, 3 H, ArH), 7.65-7.74 (m, 2 H, ArH), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, ArH), 8.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H, ArH), 8.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 113.6, 116.5, 117.0, 122.6, 123.3, 125.1, 125.7, 125.9, 127.3, 128.6, 129.2, 130.2, 132.9, 135.7, 153.7, 156.6, 177.5$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_2$: 247.0759; encontrado: 247.0764.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³²

3-hidroxi-9H-xanten-9-ona (12)

Preparado a partir de 2,4-hidroxisalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/AcOEt 2:1); sólido blanco; rendimiento: 130 mg (60%, 0.60 mmol); punto de fusión: 253–255 °C.

IR (película): 3455, 3073, 1667, 1601, 1452, 1120 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 2.44$ (s, 1 H, OH), 6.94 (dd, $J = 7.5$ Hz, 1.4 Hz, 1 H, ArH), 6.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1.4 Hz, 1 H, ArH), 7.49-7.51 (m, 2 H, ArH), 7.78 (td, $J = 7.5$ Hz, 1.4 Hz, 1 H, ArH), 7.94 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, ArH), 8.15-8.17 (m, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 103.1, 114.0, 118.7, 122.3, 123.9, 126.1, 128.2, 133.9, 134.5, 155.2, 158.9, 164.8, 175.5$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_3$: 213.0552; encontrado: 213.0557.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰⁴

2-cloro-9H-xanten-9-ona (13)

Preparado a partir de 5-clorosalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/AcOEt 40:1); sólido blanco; rendimiento: 200 mg (86%, 0.86 mmol); punto de fusión: 169–171 °C.

IR (película): 3078, 1662, 1602, 1460, 1316 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.40$ (ddd, $J = 8.1$ Hz, 7.2 Hz, 1.1 Hz, 1 H, ArH), 7.44-7.52 (m, 2 H, ArH), 7.67 (dd, $J = 8.9$ Hz, 2.6 Hz, 1 H, ArH), 7.75 (ddd, $J = 8.7$ Hz, 7.1 Hz, 1.8 Hz, 1 H, ArH), 8.30 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H, ArH), 8.33 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.7 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 118.0, 119.8, 121.5, 122.7, 124.3, 126.0, 126.8, 129.7, 134.9, 135.2, 154.5, 156.1, 176.1$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClO}_2$: 231.0213; encontrado: 231.0217.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³⁴

4-(dietilamino)-9H-xanten-9-ona (14)

Preparado a partir de 4-(dietilamino)salicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 20:1); líquido oleoso negro; rendimiento: 150 mg (55%, 0.55 mmol).

IR (película): 3067, 2960, 2880, 1663, 1601, 1449 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 6 H, CH₃), 3.35-3.41 (m, 4 H, CH₂), 6.42 (s, 1 H, ArH), 6.60-6.63 (m, 1 H, ArH), 7.19-7.25 (m, 1 H, ArH), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH), 7.52-7.56 (m, 1 H, ArH), 8.05 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, ArH), 8.21-8.23 (m, 1 H, ArH)

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 11.5, 43.8, 95.1, 108.4, 110.2, 116.3, 121.3, 122.3, 125.5, 127.1, 132.5, 151.8, 155.1, 157.6, 174.6.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₇H₁₈NO₂: 268.1338; encontrado: 268.1343.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³²

4-metil-9H-xanten-9-ona (15)

Preparado a partir de 3-metilsalicilaldehído y 1,2-dibromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 40:1); líquido oleoso negro; rendimiento: 150 mg (69%, 0.69 mmol).

IR (película): 3071, 2990, 1665, 1600, 1453 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.54 (s, 3 H, CH₃), 7.25 (dd, *J* = 7.6 Hz, 7.0 Hz, 1 H, ArH), 7.36 (dd, *J* = 7.6 Hz, 7.0 Hz, 1 H, ArH), 7.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, ArH), 7.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, ArH), 8.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 8.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, ArH), 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 16.0, 118.3, 121.8, 121.9, 123.6, 124.1, 126.9, 127.5, 134.9, 134.9, 135.9, 152.6, 154.7, 177.8.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₄H₁₁O₂: 211.0759; encontrado: 211.0764.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.³²

2-bromo-7-cloro-9H-xanten-9-ona (16)

Preparado a partir de 5-clorosalicilaldehído y 1,2,4-tribromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 10:1); sólido blanco; rendimiento: 190 mg (63%, 0.63 mmol); punto de fusión: 202–203 °C.

IR (película): 3071, 1665, 1603, 1455 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, ArH), 7.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, ArH), 7.69 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 1 H, ArH), 7.82 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.5 Hz, 1 H, ArH), 8.28 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H, ArH), 8.44 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 114.6, 119.7, 120.1, 120.9, 121.6, 126.8, 128.8, 130.3, 132.7, 134.8, 152.9, 154.2, 174.6.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₇BrClO₂: 308.9318; encontrado: 308.9322.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰⁵

2,7-dimetil-9H-xanten-9-ona (17)

Preparado a partir de 5-metilsalicilaldehído y 2-bromo-1-cloro-4-metilbenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 40:1); sólido blanco; rendimiento: 140 mg (61%, 0.61 mmol); punto de fusión: 128–130 °C.

IR (película): 3059, 1661, 1609, 1480 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.46 (s, 6 H, CH₃), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.52 (ddd, *J* = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 0.6 Hz, 2 H, ArH), 8.12 (dt, *J* = 1.4 Hz, 0.7 Hz, 2 H, ArH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 22.7, 77.1, 117.8, 122.3, 126.4, 134.5, 136.0, 154.9, 177.8.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₅H₁₂O₂: 225.0916; encontrado: 225.0921.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰⁶

2,7-dibromo-9H-xanten-9-ona (18)

Preparado a partir de 5-bromosalicilaldehído y 1,2,4-tribromobenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 25:1); sólido blanco; rendimiento: 190 mg (54%, 0.54 mmol); punto de fusión: 192–193 °C.

IR (película): 3059, 1660, 1608, 1458 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H, ArH), 7.81 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H, ArH), 8.42-8.43 (m, 2 H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 117.6, 120.2, 122.9, 129.5, 138.2, 155.0, 174.9.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₇Br₂O₂: 271.0970; encontrado: 271.0975.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.²⁰⁶

2,3-dimetoxi-5-metil-9H-xanten-9-ona (19)

Preparado a partir de 3-metilsalicilaldehído y 1,2-dibromo-4,5-dimetoxibenceno; purificado mediante cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 15:1); líquido oleoso incoloro; rendimiento: 200 mg (73%, 0.73 mmol).

IR (estado sólido): 3075, 2945, 2860, 1666, 1601, 1454 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.46 (s, 3 H, CH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 6.86 (s, 1 H, ArH), 7.16-7.20 (m, 1 H, ArH), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 1

H, ArH), 7.58 (s, 1 H, ArH), 8.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.8, 55.3, 55.5, 98.7, 104.4, 113.7, 120.3, 122.2, 123.1, 125.9, 133.8, 145.7, 151.3, 153.5, 154.4, 175.4$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 271.0970; encontrado: 271.0975.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{194,207}

2,7-dinitro-9H-xanten-9-ona (20)

Preparado a partir de 5-nitrosalicilaldehído y 1,2-dibromo-4-nitrobenzeno; purificado mediante cromatografía en SiO_2 (hexano/ AcOEt 18:1); sólido amarillo; rendimiento: 180 mg (64%, 0.64 mmol); punto de fusión: 232–234 °C.

IR (estado sólido): 3058, 2917, 1667, 1605, 1463, 1345 cm^{-1} .

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.65\text{-}7.69$ (m, 2 H, ArH), 8.52-8.56 (m, 2 H, ArH), 9.07-9.12 (m, 2 H, ArH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 120.1, 121.2, 123.3, 129.9, 144.5, 158.6, 174.3$.

HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_6$: 286.0226; encontrado: 286.0230.

Los datos espectrales concuerdan con los reportados en la literatura.^{194,207}

Capítulo 5: Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo

5.1 Derivados hidroxilados de xantona sobre membranas modelo de DPPC y DMPC

5.1.1 Introducción

La comprensión actual de la estructura y dinámica de las membranas biológicas se basa en un hito histórico en la biología celular. En la década de 1970, los visionarios científicos J. Singer y G. Nicolson propusieron un modelo revolucionario conocido como el «mosaico fluido».²⁰⁸ Este modelo fue influenciado por ideas anteriores, como el modelo de Danielli y Davson de 1935, que ya sugería que la bicapa de fosfolípidos era el elemento estructural clave de las biomembranas.²⁰⁹ Sin embargo, fue la propuesta de Singer y Nicolson la que se convirtió en un punto de inflexión en la investigación. (Figura 5.1).

Cuatro décadas después, el modelo de Singer-Nicolson se mantiene como un elemento constante en el capítulo de Membranas de todos los libros de Bioquímica y Biología Celular. Su modelo no solo simplificó una gran cantidad de observaciones experimentales y conceptos previos de las décadas de 1950 y 1960, muchos de los cuales parecían incongruentes en ese momento, sino que también se convirtió en un pilar fundamental en la biología molecular y celular. Este legado no solo destaca la importancia de comprender las características intrínsecas y la dinámica de las membranas, sino que también sirve como un punto de partida esencial para continuar estudiando y comprendiendo este tipo de sistemas.

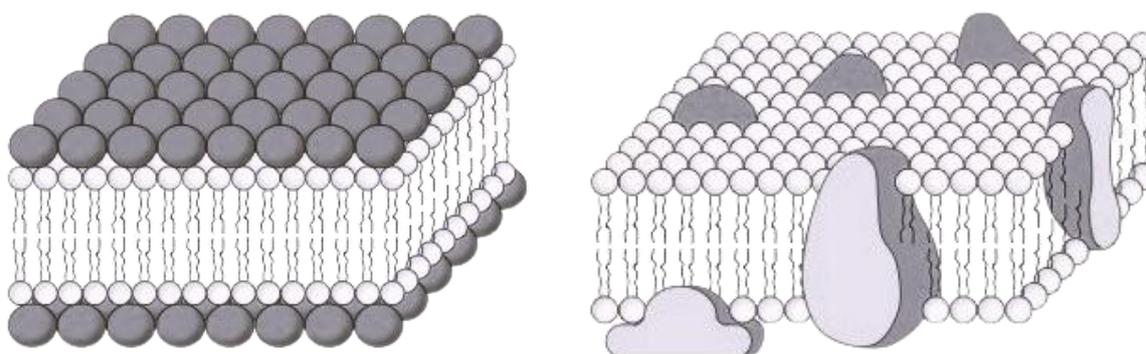


Figura 5.1. Modelos de membrana plasmática de Danielli y Davson (1935), a la izquierda, y de Singer y Nicolson (1972), a la derecha. Desde el modelo «de sandwich» al modelo de «mosaico fluido».

El conocimiento de la estructura básica de las membranas proporciona los cimientos para desentrañar comportamientos más complejos y específicos. Las membranas, que definen la integridad celular, no solo actúan como barreras físicas, sino que también desempeñan roles fundamentales en la señalización y el transporte de moléculas. Este papel dinámico y esencial surge de la capacidad intrínseca de las membranas para adaptarse y responder a estímulos específicos, ya sean de origen biológico o artificial.

Así, la evolución desde el «mosaico fluido» hasta el conocimiento actual de las propiedades y comportamientos de las membranas refleja una progresión natural en nuestra comprensión, donde la estructura primordial proporciona las bases necesarias para explorar las complejidades de los procesos celulares y moldear el futuro de la investigación biomolecular.

Desde una perspectiva aplicada, la manipulación de las características de las membranas se presenta como una estrategia prometedora en el diseño de terapias y enfoques terapéuticos innovadores. La capacidad de ajustar las propiedades específicas de las membranas podría conducir al desarrollo de sistemas biomiméticos altamente eficientes o a la creación de membranas artificiales con funciones especializadas para aplicaciones biomédicas.

En este contexto de la investigación biomolecular, la velocimetría y densitometría se han revelado como herramientas invaluable a la hora de proporcionar información mecánica y termodinámica que también arrojan luz sobre los misterios de las membranas, tanto artificiales como biológicas.²¹⁰ A través de estas herramientas, se desentrañan aspectos cruciales de la respuesta de las membranas a cambios en su entorno, contribuyendo así a una comprensión más profunda de los fenómenos celulares y a la optimización de las aplicaciones prácticas en ingeniería biomolecular.

Este enfoque preciso en las propiedades mecánicas y termodinámicas ha revelado que la regla general, respecto de las propiedades mecánicas de las membranas lipídicas, es que la compresibilidad de la membrana aumenta en presencia de un efector respecto de aquellas constituidas por el lípido puro,^{210,211} mientras que en sistemas más particulares la presencia del efector hace a la membrana menos compresible.²¹² Es decir, se plantea que el efecto de compresibilidad depende del estado de fase del lípido^{213–215} y de la proporción en relación al efector. En lo que concierne al comportamiento termodinámico de la membrana, la presencia

de un efector tiende a disminuir el valor de la temperatura de transición del lípido, tornando a la membrana más fluida.

Efectores de gran interés, dadas sus amplias y reconocidas virtudes terapéuticas, son aquellos pertenecientes a la familia de las xantonas. La xantona y sus derivados han sido objeto de interés constante en la investigación científica debido a su diversidad de propiedades farmacológicas y su potencial aplicación en diversas áreas de la medicina y la química.

La historia de estas moléculas se remonta a la antigua medicina ayurvédica de la India, donde se utilizaban en la preparación de remedios naturales, destacando su rica herencia terapéutica que abarca siglos. Desde su redescubrimiento en el siglo XIX, las xantonas han desempeñado un papel fundamental en la búsqueda de compuestos bioactivos. Algunas de estas moléculas se encuentran disponibles como metabolitos secundarios en plantas superiores, tales como la α -, β - y γ -mangostina, y otras pueden ser diseñadas y adquiridas a través de síntesis o semisíntesis orgánica.²¹⁶⁻²²² La contribución de estas moléculas a la farmacología y la investigación biomolecular ha sido invaluable, y su versatilidad las ha convertido en candidatas ideales para aplicaciones médicas y farmacéuticas de vanguardia.

Las hidroxixantonas, en particular, han surgido como agentes antioxidantes destacados en investigaciones recientes debido a su papel preventivo frente a enfermedades originadas por la presencia de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Aunque las hidroxixantonas se encuentran en la naturaleza, su aislamiento directo de plantas se considera desfavorable debido a los bajos rendimientos, con valores tan bajos como el 0,02 al 0,1 % en el caso de *Garcinia* y sumando menos del 0,007 % en algunos isómeros de la α -mangostina,²²³ lo cual no sólo implica procedimientos costosos y laboriosos, sino también un perjuicio mayor desde la perspectiva ecológica. En vistas de estas limitaciones, se ha explorado la vía de la síntesis como una alternativa más ventajosa.

Estudios han revelado que algunas de estas sustancias, tales como la 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (1,3-DHX), la 3,4,6-trihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (3,4,6-THX) y la 1,3,6-trihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (1,3,6-THX) (Figura 5.2), poseen efectos antioxidantes incluso más potentes que las conocidas vitaminas C y E.²²⁴ Estos compuestos han sido sometidos a pruebas de actividad antirradical para evaluar su capacidad de eliminar radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidrazilo), comparándolos con sustancias estándar como la quercetina y el ácido ascórbico. Los resultados revelaron notables propiedades antioxidantes, sugiriendo una correlación entre la actividad y la posición y el número de sustituyentes hidroxilo en su estructura central. Además, cabe destacar que todos estos compuestos demostraron ser efectivos y seguros en pruebas de toxicidad *in vitro*, consolidando así su potencial.²²⁵

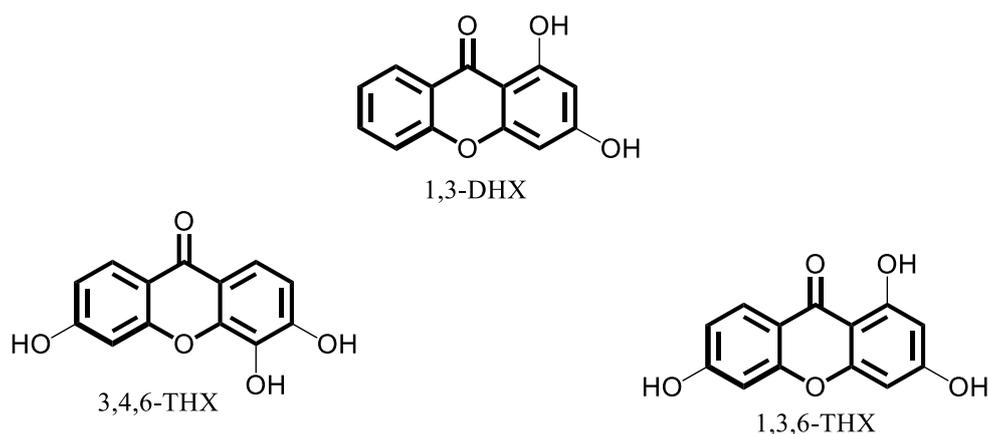


Figura 5.2. Xantonas hidroxiladas con actividad antioxidante.

Dada su elevada seguridad y relevancia farmacológica, junto a sus cualidades terapéuticas y su potencial para interactuar con membranas biológicas e incluso atravesarlas, estas moléculas han sido identificadas como agentes terapéuticos interesantes. Este tipo de compuestos se definen, entonces, como candidatos prometedores para su estudio sobre membranas modelo de fosfatidilcolinas, siendo estas consideradas como componentes lipídicos mayoritarios y esenciales en la regulación de las membranas celulares.

En trabajos previos del grupo, se había estudiado la interacción de xantonas con DPPC mediante potencial zeta, calorimetría diferencial de barrido y simulaciones computacionales, determinando la relación de hidroxixantonas con regiones específicas de las bicapas de fosfatidilcolinas y la potencial disposición de las mismas (Figura 5.3).²²⁶

Se determinó que las xantonas polihidroxiladas se reubicarían al pasar de la fase líquido-cristalino a la fase sólido-cristalina, mientras que la que presenta menos hidroxilos se mantendría en la misma posición. Todas las xantonas estudiadas aumentaron la fluidez de la membrana, con un mayor efecto por parte de la xantona polihidroxilada en la fase fluida, mientras que para la monohidroxilada el efecto se ve más pronunciado en la fase sólido-

crystalina. Con estas bases, sería natural esperar que las hidroxixantonas también alteren las propiedades dinámicas y mecánicas de las membranas.

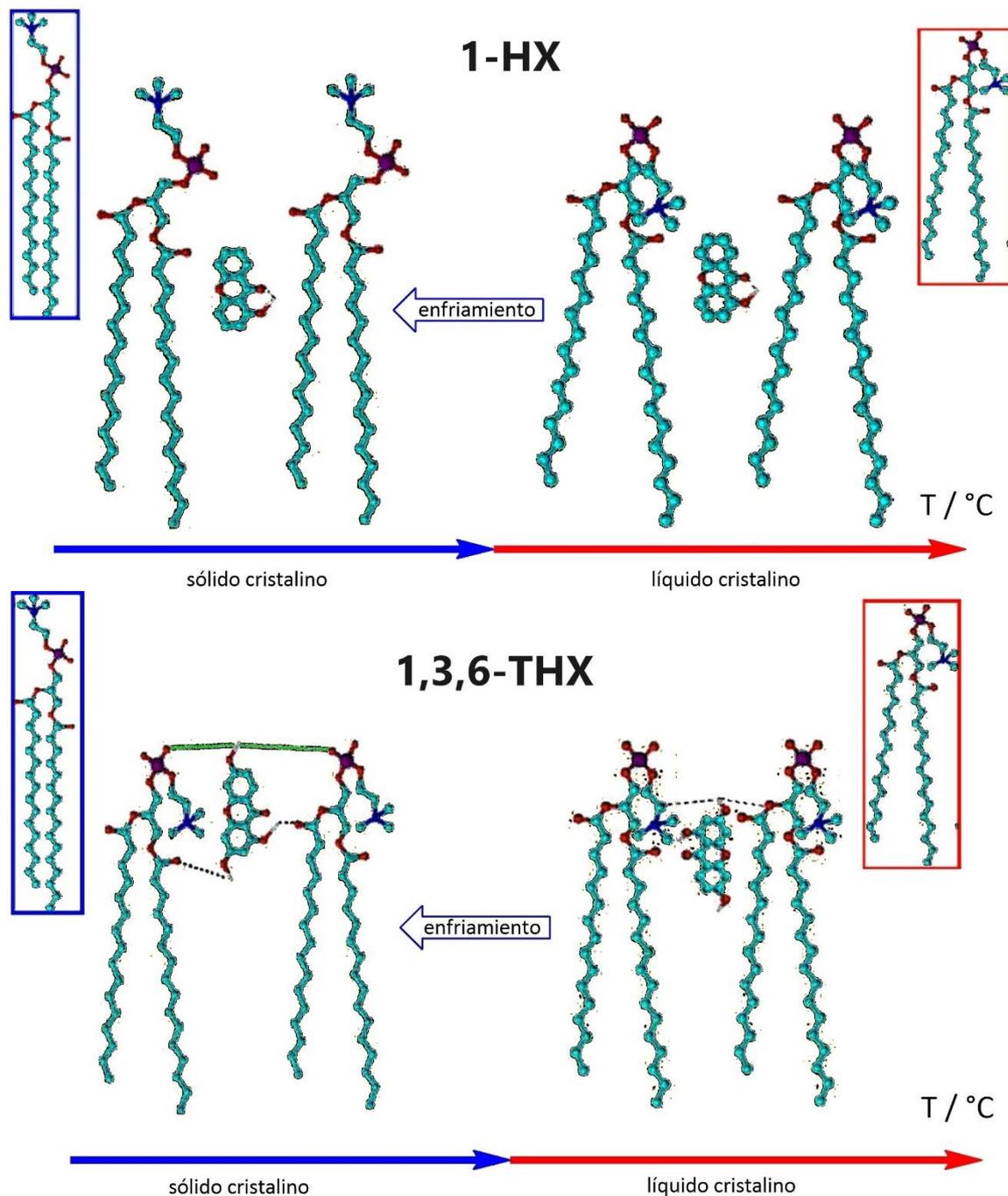


Figura 5.3. Configuración propuesta para los sistemas DPPC-Xa.

Rybar y colaboradores, indicaron que la técnica de velocimetría y densitometría por ultrasonido proveía información física más detallada para vesículas en comparación a

métodos tradicionales como DSC, a la vez brindando evidencia del grado de compresibilidad de la membrana.²¹⁰ Un beneficio extra de esta técnica, comparada con los así llamados métodos microscópicos tales como ESR (resonancia paramagnética electrónica), RMN o espectroscopía de fluorescencia, consiste en el hecho de que la compresibilidad representa una cualidad macroscópica cuantificable derivada de las propiedades físicas de la bicapa como un todo. Las conclusiones extraídas mediante este tipo de estudio se verían menos afectadas por perturbaciones locales.²²⁷

De tal forma, se evaluaron las propiedades termodinámicas y mecánicas de bicapas de DPPC y DMPC en presencia de hidroxixantonas, tanto desde una perspectiva experimental, como computacional. El objetivo fue contrastar medidas de compresibilidad con medidas de fluidez a modo de contestar el siguiente interrogante: ¿están los cambios en el orden estructural, compresibilidad y fluidez correlacionados de manera trivial?

Para comprender la importancia de las propiedades de las bicapas lipídicas en este estudio, es fundamental adentrarnos en algunos conceptos clave. Uno de los conceptos fundamentales es el de fluidez, que refiere a la capacidad de los lípidos que componen la bicapa de moverse y reorganizarse constantemente. Otro aspecto crucial, que tradicionalmente se considera en relación directa al primero, es el orden estructural de la bicapa, relacionado a la disposición y orientación de los lípidos y a sus interrelaciones.

La temperatura de transición es un punto fundamental en la dinámica de las bicapas que afecta tanto a la fluidez como al orden estructural de la membrana. Esta temperatura marca el cambio entre diferentes fases en las que la bicapa lipídica puede encontrarse. En un extremo, se encuentra la fase sólido-cristalino (L_{β}), donde la bicapa es más rígida y ordenada. En el otro extremo, se encuentra la fase líquido-cristalino (L_{α}), donde la bicapa es más fluida y los lípidos tienen una mayor movilidad. Además, existe una fase intermedia conocida como «fase ripple» (P_{β}), que presenta ondulaciones o deformaciones en la bicapa (Figura 5.4).²²⁸

La modulación de estas fases es crítica para regular la fluidez y la permeabilidad de la membrana y desempeñan un papel esencial en su función y en su interacción con compuestos como las xantonas.

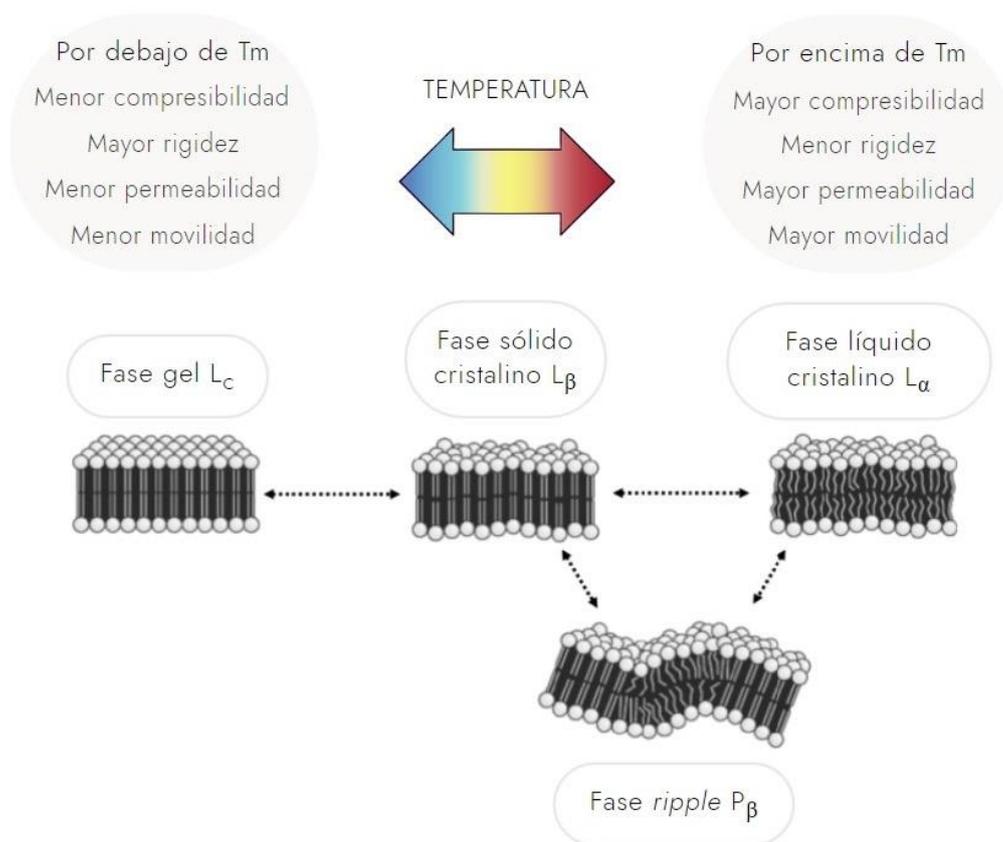


Figura 5.4. Esquema del comportamiento de la bicapa lipídica en sus distintos estados de fase.

El aceptado general en lo que a efectores refiere, es que los mismos se intercalan entre las cadenas de los lípidos, induciendo un desorden estructural que aumenta la fluidez y así, disminuye la temperatura de transición, por debilitamiento de las interacciones metileno-metileno entre las colas hidrocarbonadas. De igual forma, este desorden aumenta la compresibilidad de la membrana. Sin embargo, en el caso de algunos efectores de geometría particular y elevada hidrofobicidad tales como las xantonas estudiadas, se presume que el comportamiento sería más complejo y rico que el planteado para el escenario general.

En los capítulos anteriores, el énfasis se puso en el desarrollo de metodologías para la síntesis de núcleos farmacofóricos; ahora, la atención se dirigirá hacia la aplicación de estos compuestos en modelos de membrana. En este capítulo, se explorará cómo los derivados hidroxilados de xantona interactúan con membranas modelo de DPPC y DMPC. Este enfoque nos permitirá comprender mejor cómo los efectores de esta naturaleza pueden afectar las

Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
Capítulo 5: Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo

propiedades de las membranas celulares, lo que es fundamental para entender su potencial impacto en procesos biológicos y, por lo tanto, su aplicabilidad terapéutica. El conocimiento y comprensión de las características mecánicas de una bicapa de lípidos no solo amplía nuestro entendimiento de las propiedades fisicoquímicas, cualidades y limitaciones de este tipo de materiales, sino que también nos permite predecir cómo una sustancia interactúa con ellos y por qué, permite diseñar formulaciones más óptimas para la administración de fármacos y proporcionar explicaciones a los comportamientos observados en sistemas biológicos de interés.

Este capítulo servirá como un puente entre la síntesis de compuestos prometedores y su evaluación en un entorno biológico simulado, representando un paso crucial en el camino hacia la traducción de la investigación química en aplicaciones médicas y farmacéuticas.

5.1.2 Materiales

1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DPPC) y 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosforilcolina (DMPC) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). Las xantonas sintetizadas, caracterizadas y purificadas fueron la 1-hidroxixantona, 1-HX, and 1,3,6-trihidroxixantona, 1,3,6-THX. La obtención de xantonas se llevó a cabo utilizando un enfoque sintético basado en la metodología de Khammee y colaboradores para la 1-HX, y utilizando el reactivo de Eaton para la síntesis de 1,3,6-THX.

En la preparación de la 1-HX, se parte ácido salicílico y resorcinol. La reacción se lleva a cabo en presencia de $ZnCl_2$ como catalizador a una temperatura de aproximadamente 170 °C durante 6 horas. Durante esta reacción, el ácido salicílico se combina con el resorcinol en un proceso de condensación con el $ZnCl_2$ actuando como ácido de Lewis, catalizando la formación de enlaces. En el caso de la utilización del reactivo de Eaton, la reacción se lleva a cabo a 80 °C, durante 75 minutos. El método sintético involucra la activación del ácido salicílico derivado mediante la formación de su correspondiente éster, que permite la posterior reacción con el floroglucinol. Una vez completadas las reacciones, se procede a aislar y purificar las xantonas obtenidas. Este proceso implica técnicas de separación y purificación, incluyendo la cromatografía en columna y la recristalización.

El proceso implica la reacción de ácidos salicílicos derivados y fenoles derivados para generar las xantonas deseadas. El caso de la metodología de Khammee se utiliza $ZnCl_2$ y elevadas temperaturas,¹⁷³ mientras que por la metodología de Pillai se utiliza el reactivo de Eaton, con temperaturas y tiempos de reacción notoriamente inferiores²²⁹ (Figura 5.5).

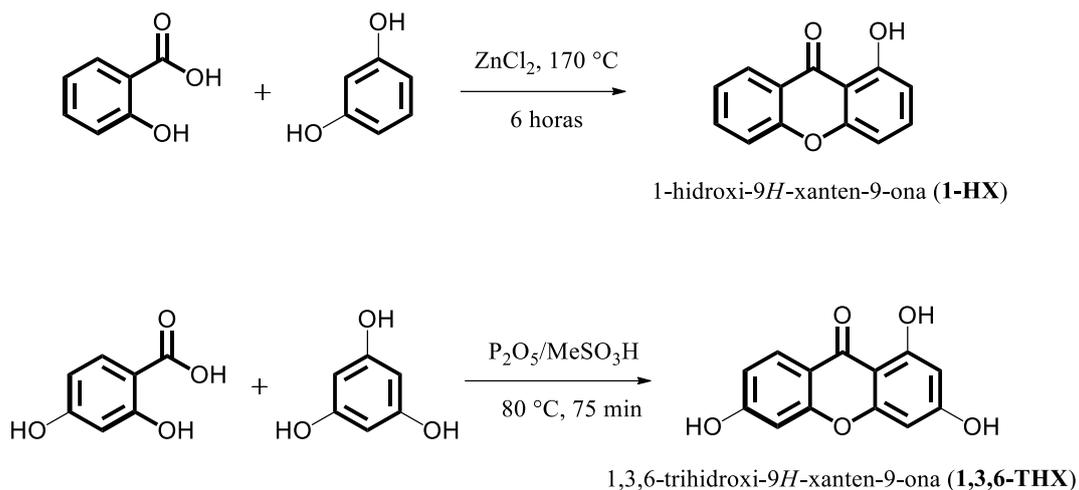


Figura 5.5. Obtención de hidroxixantonas

Los liposomas de DPPC-XAs y DMPC-XAs fueron preparados con una fracción molar de xantona de 0.3, sin considerar al solvente. La cantidad de efector se ajusta en base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio que, a su vez, coinciden con los encontrados en bibliografía.²³⁰ Las mezclas de DMPC y DPPC con xantonas se disolvieron en una mezcla de cloroformo-metanol que fue removida por evaporación en flujo de nitrógeno de forma tal de obtener un film lipídico seco. El solvente remanente se eliminó mediante alto vacío, 2 horas adicionales en un Thermo Scientific Speed Vac SPD11V. El film lipídico seco se hidrató con 3 mL de agua milliQ a 10 °C por encima de la temperatura de transición de cada lípido y fue homogeneizado mediante ciclos de vórtex. Esta combinación del uso de vórtex y temperatura permitió adquirir una población polidispersa de MLVs de concentración final aproximada de 2.4 mg.ml⁻¹ para medidas de densidad y velocidad de ultrasonido y 3 mM para cada experimento de potencial zeta. Antes de llevar a cabo las medidas de densidad y velocidad de ultrasonido, la suspensión acuosa de vesículas requirió desgasificación utilizando una bomba de vacío de agua.

5.1.3 Métodos

La rigidez y el nivel de orden estructural de los sistemas puros y dopados se estudió mediante medidas de densidad (ρ) y velocidad de ultrasonido (u), las cuáles a través de un tratamiento matemático dan lugar a valores de volumen específico y compresibilidad adiabática específica. Los valores de densidad y velocidad de ultrasonido para las distintas muestras fueron obtenidos en forma simultánea y automática mediante un instrumento comercial Anton-Paar DSA 5000 Densimeter and Sound Velocity Analyzer. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo por enfriamiento progresivo, dado el método de preparación. No se observaron diferencias significativas utilizando un método de calentamiento continuo. Ya que los valores de velocidad del sonido y densidad dependen fuertemente de la temperatura, esta variable se mantuvo a valores constantes ($\pm 10^{-2}$ K) utilizando el método de Peltier. Las medidas fueron altamente reproducibles (superior a $\pm 5 \cdot 10^{-6}$ g.cm⁻³ y $\pm 10^{-2}$ m.s⁻¹, respectivamente) y cada serie de mediciones se realizó por triplicado.

Tal como se mencionó en la introducción de este capítulo, las determinaciones de velocidad de ultrasonido permiten la evaluación de las propiedades elásticas de un medio acuoso y suspensiones como en el caso de estas vesículas.^{215,231-234}

Generalmente, la velocimetría ultrasónica provee información de velocidad del sonido, más específicamente como incrementos en la concentración de la misma,^{235,236} en la forma en que se presenta en la ecuación 1:

$$[u] = \frac{u - u_0}{u_0 \cdot c}$$

Donde c es la concentración de lípido en mg.ml⁻¹ y u_0 indica la velocidad del sonido del agua pura. A partir de datos de densidad, se extraen los valores de volumen específico, φ_v , como se presenta en la ecuación 2:

$$\varphi_v = \left[1 - \frac{\rho - \rho_0}{c} \right] \cdot \frac{1}{\rho_0}$$

Donde ρ_0 es la densidad del agua. A partir de una combinación de valores de volumen específico aparente e incremento de concentración de velocidad del sonido, se estima la compresibilidad adiabática específica del sistema, φ_k/β_0 , mediante la ecuación 3:

$$\frac{\varphi_k}{\beta_0} = -2[u] - \frac{1}{\rho_0} + 2\varphi_V$$

Donde β_0 representa el coeficiente de compresibilidad adiabática y ρ_0 es la densidad del agua. El valor de φ_k/β_0 representa los cambios en el volumen de compresibilidad de las vesículas relativo al solvente.

Para verificar los valores de temperatura de transición para cada uno de los diferentes sistemas, se midió el potencial zeta como función de la temperatura ²³⁷ para el DPPC, DPPC-XAs, DMPC y DMPC-XAs en un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK). Las determinaciones se llevaron a cabo por calentamiento progresivo de las muestras, permitiendo que alcancen el equilibrio en cada una de las temperaturas medidas, cada 2°C con períodos de estabilización de 5 minutos (a $\pm 10^{-1}$ K de temperatura constante de acuerdo al método de Peltier). Cada serie fue analizada por triplicado.

Por otro lado, para los sistemas estudiados se realizaron estudios de dinámica molecular a fines de confirmar el cambio en la compresibilidad de sistemas lipídicos en membranas modelo con y sin efectores, y se compararon con los resultados obtenidos mediante estudios experimentales para esos mismos sistemas.

Las simulaciones de dinámica molecular de las bicapas de DPPC fueron llevadas a cabo con el pack de simulación de AMBER16,²³⁸ con campo de fuerza Lipid17.²³⁹ Los enlaces, ángulo y torsión y parámetros de Lennard-Jones en Lipid17 fueron adquiridos de manera directa del General Amber Force Field (GAFF),²⁴⁰ como una actualización de torsión y parámetros de Lennard-Jones.

Se construyó la primera bicapa de 128 moléculas de lípidos (DPPC o DMPC, de acuerdo al tipo de membrana), 64 por cada monocapa en un arreglo de 8x8. Las moléculas se ubicaron a 9 Å la una de la otra en una organización de cuadrado. Luego, 9 moléculas de lípido fueron removidas y reemplazadas por 18 moléculas de xantonas en cada monocapa, aleatoriamente orientadas en proximidad a las posiciones de equilibrio final a modo de disminuir los tiempos

de simulación. Otras simulaciones fueron llevadas a cabo en sistemas similares con xantonas originalmente ubicadas en medio acuoso, y tras largos tiempos de simulación alcanzaron sus ubicaciones de equilibrio dentro de la membrana.

La membrana de DPPC fue estabilizada a 293 K y 323 K, y para la membrana de DMPC, a 283 K y 303 K, de manera de cubrir temperaturas que contengan el estado sólido y líquido-cristalino, respectivamente. Luego se solvataron con 10964 moléculas de agua TIP3P, correspondiente a condiciones de hidratación total.^{241,242}

La minimización consistió en dos pasos, ambos a volumen constante. Primero, el solvente fue minimizado con la membrana y xantonas fijas. Luego, el sistema se libera para minimizarlo en su totalidad. Las dimensiones y densidad del sistema fueron equilibradas tras estabilizar la temperatura mediante un termostato de Langevin,²⁴³ manteniendo la membrana fija. Finalmente, todas las ligaduras se liberan y la membrana es libre de alcanzar la distancia de equilibrio lípido-lípido.

Más corridas de calibración de al menos 300 ns fueron llevadas a cabo para asegurar el equilibrio apropiado de las bicapas de DPPC-XAs con un paso de integración de 2 fs. Ambas corridas, de establecimiento del equilibrio y de producción, se condujeron bajo condiciones de NpT ensemble con SHAKE activado para enlaces de hidrógeno, utilizando condiciones de límite periódico con el mesh de partícula Ewald para el tratamiento de electrostática de largo rango²⁴⁴ y un corte de espacio real de 10 Å.

El análisis de compresibilidad se llevó a cabo determinando el módulo de compresibilidad isotérmico (k_A)²³⁹ que se obtiene mediante la siguiente ecuación 4:

$$k_A = \frac{2k_B T \langle A_L \rangle}{n_{\text{lípido}} \sigma_A^2}$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura de simulación, $\langle A_L \rangle$ el área media por lípido, σ_A^2 la varianza del área por lípido y $n_{\text{lípido}}$ el número de lípidos en la membrana. El área por lípido es calculada como una propiedad de la membrana en su conjunto. Representa el área promedio que un fosfolípido individual ocupa en una interfase, independientemente de la presencia de un efector. Se calculó como se ve en la ecuación 5:

$$\text{Área por lípido} = \frac{(\text{dimensión de caja } X)(\text{dimensión de caja } Y)}{\text{Número de fosfolípidos por capa}}$$

De forma tal de estudiar la fluidez de la membrana lipídica en respuesta a la presencia de efectores en la bicapa, se calculó el desplazamiento medio de cuadrados bidimensional (2D-MSD; siendo el desplazamiento medio de cuadrados en el plano de la membrana, ortogonal a la dirección de las cadenas de los lípidos). El MSD es una medida de la diferencia promedio de la posición de los átomos pesados de un lípido con respecto de una posición de referencia en función del tiempo, definido como se observa en la ecuación 6:

$$MSD = \langle (x - x_0)^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (x_n(t) - x_n(0))^2$$

Donde N es el número total de átomos, $x_n(0)$ y x_0 representan la posición de referencia para cada átomo, y $x_n(t)$ es la posición del átomo a tiempo t.

La fluidez, entonces, se estableció en relación a valores de desplazamiento cuadrático medio (MSD) de los lípidos en una bicapa. Un sistema más fluido, mostraría valores de MSD mayores que su contraparte. Estas simulaciones fueron contrastadas con ensayos experimentales mediante análisis de potencial zeta en función de la temperatura, que permitieron determinar las temperaturas de transición correspondientes para los sistemas implementados y corroboraron los resultados obtenidos de manera teórica para el parámetro de fluidez.

5.1.4 Discusión

Se estudió la velocidad de ultrasonido y densidad para las dispersiones de vesículas de DPPC y DMPC, con y sin hidroxixantonas, en función de la temperatura. Se calcularon valores de volumen específico y compresibilidad adiabática para las bicapas lipídicas.

Las medidas de densidad permiten calcular el volumen específico de la membrana y, en tanto, la compresibilidad adiabática específica de acuerdo a la ecuación 3. Los resultados de incremento de concentración de la velocidad de ultrasonido [u], volumen específico, φ_v , y el coeficiente de compresibilidad adiabática específica, φ_K/β_0 , en función de la temperatura se presentan en las Figura 5.6Figura 5.7Figura 5.8 para las diferentes dispersiones de MLVs.

Cuando se estudia el incremento de concentración para la velocidad del sonido, [u], podemos ver que una disminución del valor suele ir aparejada a una disminución del orden de las bicapas, relacionado en este caso a la potencial mejoría de libertad conformacional en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

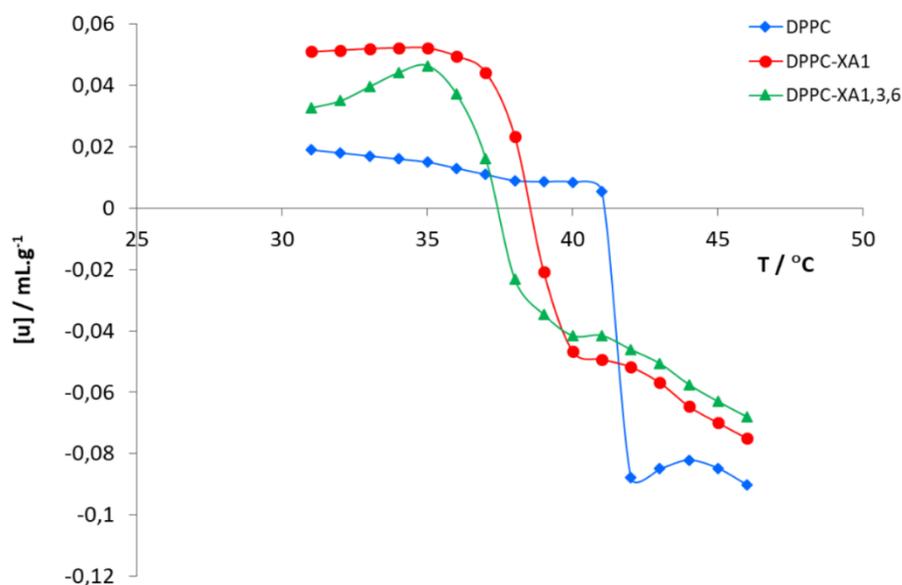


Figura 5.6. Gráfico de incremento de la concentración de velocidad de ultrasonido, [u] versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs de DPPC sin hidroxixantonas (◆), con una fracción molar de 0.3 de DPPC-1-HX (●) y DPPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Una característica típica del gráfico de [u] en función de la temperatura es un mínimo en el punto en que tiene lugar la temperatura principal de transición de fase (T_m),^{245–247} como se puede apreciar en la Figura 5.6, curva azul. Los valores de velocidad del sonido exhiben una caída característica a la temperatura de transición. Para el rango de temperaturas por debajo de la T_m del DPPC, es decir, para $T < 41$ °C, el valor de [u] cae lentamente a medida que la temperatura aumenta. Como se ha mencionado, esta tendencia resultaría de una disminución en el orden de la bicapa, relacionada a una mejoría en la libertad conformacional de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.²¹² Esta forma característica del gráfico de [u] vs. T, junto a la naturaleza del mínimo del valor de [u], ha sido documentada en varios trabajos enfocados a estudios de transiciones de fase inducidos por temperatura mediante velocimetría de ultrasonido para suspensiones de vesículas compuestas por fosfolípidos saturados.^{210,215,245,248}

Como se puede observar en la Figura 5.6, curvas roja y verde, el descenso típico de la curva desaparece para las membranas de DPPC que contienen hidroxixantonas, mientras el incremento de concentración es más fuerte que para las membranas que sólo contienen DPPC. La esfera de hidratación rodeando a los lípidos y xantonas también se volvería más compresible a medida que la temperatura aumenta, un hecho consistente con investigaciones previas de Hianik y colaboradores al estudiar fosfatidilcolinas con otros dopantes.²¹²

Esta contribución representa una pieza de información sumamente atractiva; dado que los cambios en $[u]$ incluyen cambios en la compresibilidad tanto de la bicapa como de la esfera de hidratación. Un análisis más profundo de las propiedades mecánicas de la membrana requiere tener en consideración los cambios de volumen específico de los liposomas, lo cual puede ser llevado a cabo por determinación de la densidad de las suspensiones.²¹²

Con tales valores de densidad y empleando la ecuación 2, el volumen específico, φ_v , de las vesículas de DPPC fue determinado y graficado en función de la temperatura y puede observarse en la Figura 5.7.

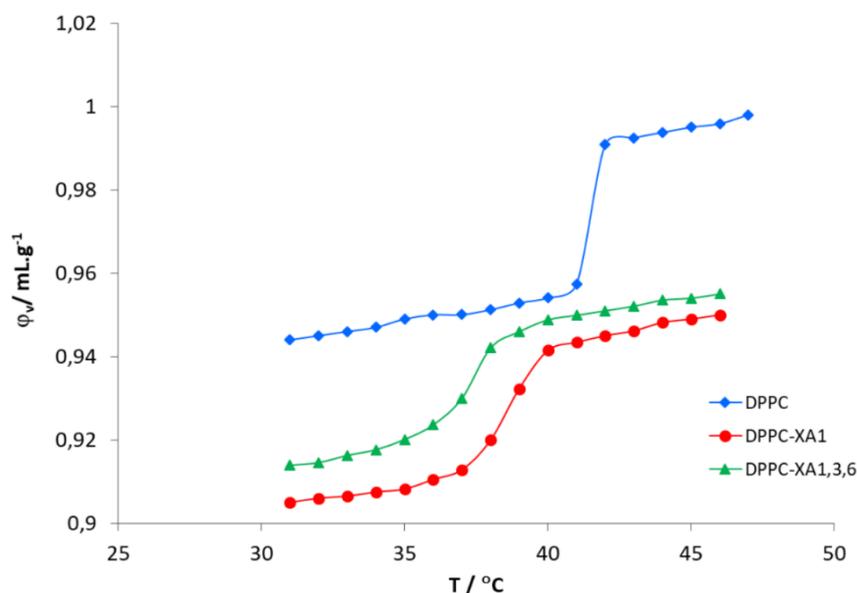


Figura 5.7. Gráfico de volumen específico, $[\varphi_v]$ versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs de DPPC sin hidroxixantonas (◆), con una fracción molar de 0.3 de DPPC-1-HX (●) y DPPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Podemos, entonces, definir que el volumen específico tiende a aumentar con la temperatura. Notoriamente, φ_v muestra un incremento más rápido en el rango de temperatura cercano a la T_m , indicando un aumento del volumen de las moléculas de fosfolípido al pasar de la fase sólido a líquido-cristalino.

A pesar de que los gráficos de φ_v vs. T muestran una tendencia de perfil similar, el volumen específico de las vesículas que contienen hidroxixantonas es menor que para aquellas que no la contienen, en todo el rango de temperaturas. Un volumen específico menor de los liposomas que contienen hidroxixantonas a las proporciones estudiadas, en comparación con membranas no modificadas, sería indicativo de una estructura de bicapa lipídica más compacta. Se percibe que a medida que el número de grupos hidroxilo en la xantona aumenta, el cambio en la transición de fase de los fosfolípidos se da hacia menores temperaturas, estos resultados se expresan en la Tabla 5.1 y se correlacionan a resultados obtenidos en estudios anteriores.²²⁶

Tabla 5.1. Valores de temperatura de transición obtenidos mediante las técnicas de densitometría y velocidad del ultrasonido y potencial zeta.

<i>Sistema</i>	<i>Temperatura de transición / °C</i>	
	<i>Densitometría</i>	<i>Potencial Zeta</i>
<i>DPPC</i>	41.54 ± 1.20	42.1 ± 0.9
<i>DPPC-1-HX</i>	38.60 ± 1.10	39.3 ± 0.8
<i>DPPC-1,3,6-THX</i>	37.14 ± 1.00	36.5 ± 1.1
<i>DMPC</i>	23.55 ± 0.70	23.7 ± 0.6
<i>DMPC-1-HX</i>	20.91 ± 0.60	21.6 ± 0.5
<i>DMPC-1,3,6-THX</i>	18.03 ± 0.40	17.9 ± 0.5

A partir de los valores de $[u]$ y φ_v obtenidos, se calculó la compresibilidad adiabática específica φ_k/β_0 mediante la ecuación 3 y los resultados se muestran en la Figura 5.8.

Para el caso del DPPC, por debajo de T_m , se observa que a medida que la temperatura aumenta, también lo hace monótonicamente en forma proporcional el valor de φ_k/β_0 hasta

su máximo, y luego disminuye para $T > 41$ °C. Un aumento de la compresibilidad adiabática específica con la temperatura es evidente para todos los sistemas, y refleja un estado de desorden en incremento en los liposomas, principalmente debido al comportamiento de la fase hidrofóbica de la bicapa, y al crecimiento de la compresibilidad de la esfera de hidratación.²¹²

Las curvas de dependencia de φ_k/β_0 para DPPC con hidroxixantonas y aquellas correspondientes al DPPC puro para el estado sólido-cristalino, difieren en forma y magnitud. En la fase líquido-cristalina, el valor de φ_k/β_0 para las vesículas que contienen hidroxixantonas crece lentamente. En este estado, es notable que a pesar de que las curvas de DPPC-XAs difieren de aquellas que muestran el comportamiento del lípido puro, no se presentan mayores diferencias entre ellas. Sin embargo, en la fase sólido-cristalina, DPPC-1-HX muestra menor compresibilidad que DPPC-1,3,6-THX.

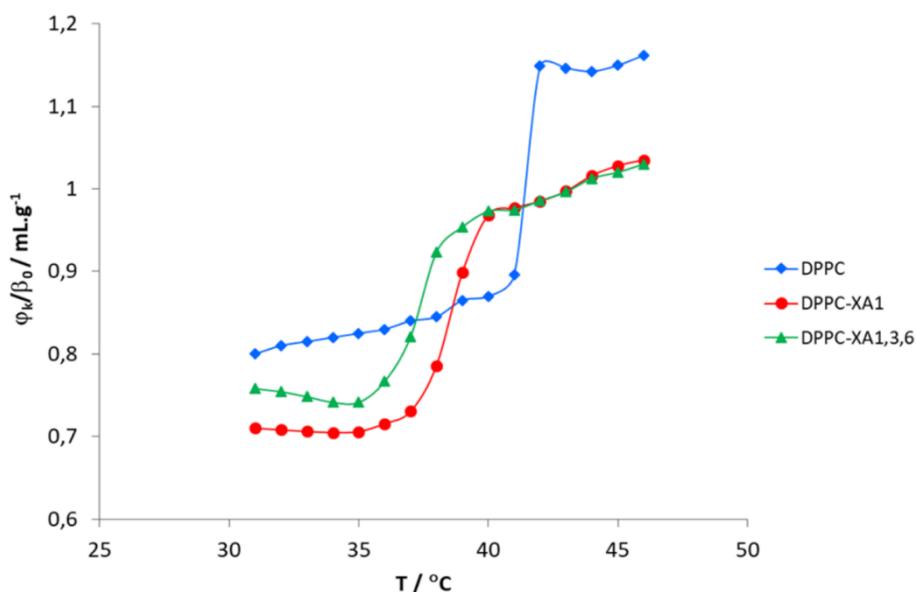


Figura 5.8. Gráfico de la compresibilidad adiabática específica aparente, φ_k/β_0 , versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs compuestas de DPPC sin hidroxixantonas (♦), con una fracción molar de 0.3 de DPPC-1-HX (●) y DPPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Esto pone en evidencia el hecho de que las hidroxixantonas están modificando el estado estructural de las bicapas lipídicas. Específicamente, estos efectores inducen un estado de orden tanto en el estado sólido-cristalino, como en el estado de líquido cristalino.

En estudios previos, se verificó un aumento de fluidez tras la transición de fase.²²⁶ Los resultados obtenidos a partir de estos análisis muestran concordancia dado que, dentro de la bicapa, el grado de orden refleja la anisotropía en el movimiento molecular, y en un análisis riguroso, la fluidez se encuentra relacionada al grado de movimiento. Por lo tanto, cambios en el orden estructural no necesariamente implican de manera forzosa un cambio en la fluidez.²⁴⁹

En resumen, los resultados obtenidos implican que un aumento en la proporción de hidroxixantonas en las vesículas promueve un incremento en la concentración de velocidad del sonido $[u]$ y una disminución tanto del volumen específico, como de la compresibilidad aparente específica, con lo cual se deduce que se trataría de un sistema más rígido.

El comportamiento del DMPC puede observarse en la Figura 5.9 para el gráfico de $[u]$ versus temperatura, en el cual se muestra el perfil típico con el mínimo en la temperatura correspondiente a la de transición de fase. A diferencia a lo que se observa para las vesículas de DPPC, en el caso de los liposomas de DMPC con y sin hidroxixantonas, los comportamientos y valores de $[u]$ son muy similares.

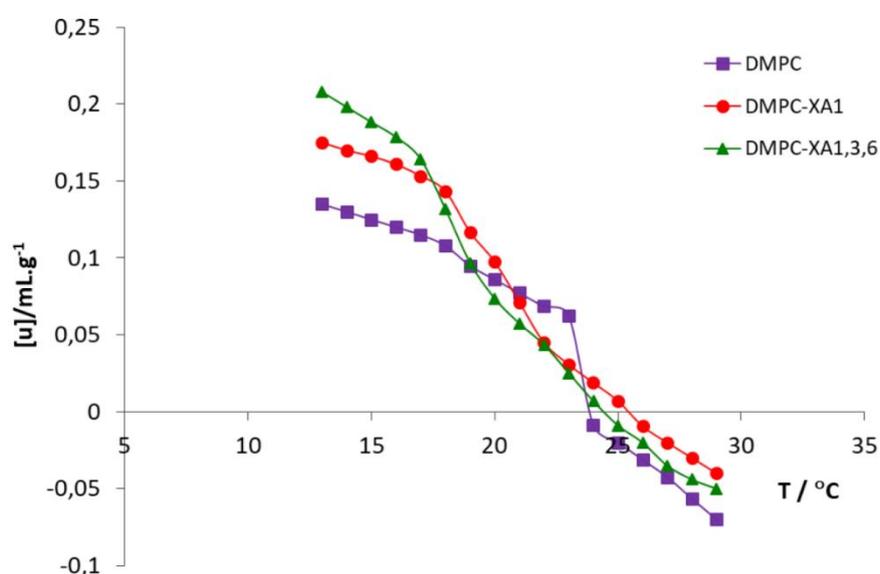


Figura 5.9. Gráfico de incremento de la concentración de velocidad de ultrasonido, $[u]$ versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs de DMPC sin hidroxixantonas (◆), con una fracción molar de 0.3 de DMPC-1-HX (●) y DMPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Los gráficos de volumen específico, ϕ_v , vs. Temperatura para los liposomas de DMPC se presentan en la Figura 5.10. A pesar de que los perfiles generales son similares, el volumen específico de las vesículas que contienen hidroxixantonas es menor que para aquellas de DMPC puro, tanto en fase sólido-cristalina como en fase líquido-cristalina.

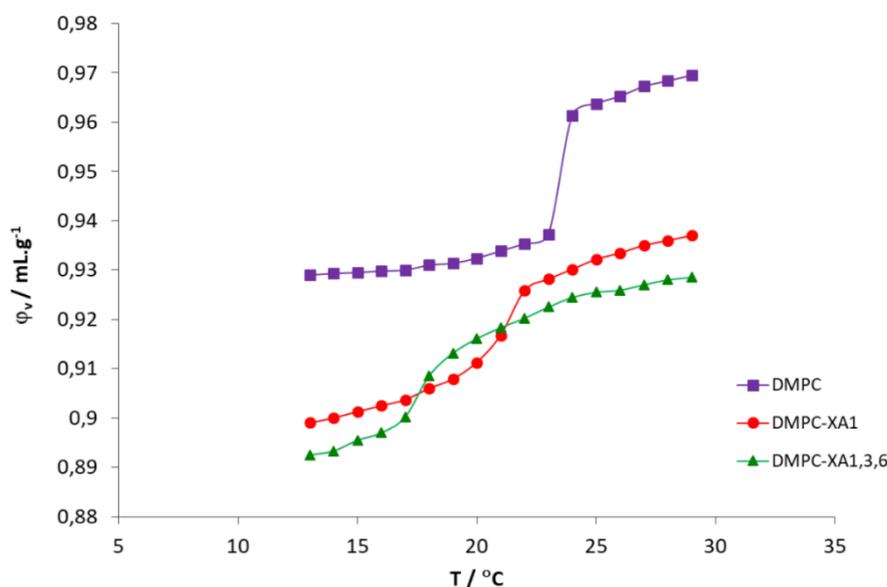


Figura 5.10. Gráfico de volumen específico, ϕ_v versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs de DMPC sin hidroxixantonas (◆), con una fracción molar de 0.3 de DMPC-1-HX (●) y DMPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Se calculan los valores de ϕ_k/β_0 de las dispersiones liposomales en función de la temperatura y los resultados se exponen en la Figura 5.11. En el estado líquido cristalino, es notable que a pesar de que las curvas de DMPC-XAs difieren respecto de las de DMPC puro, no parecen presentar diferencias notorias entre ellas. En la fase de sólido-cristalino, sin embargo, DMPC-1,3,6-THX muestra una menor compresibilidad que DMPC-1-HX. Los valores de temperatura de transición se extrapolan de las curvas de ϕ_v versus T, y se confirman luego a través de las curvas de enfriamiento continuo en medidas de potencial zeta,²³⁷ ambos valores con buena concordancia se encuentran presentados en la Tabla 5.1.

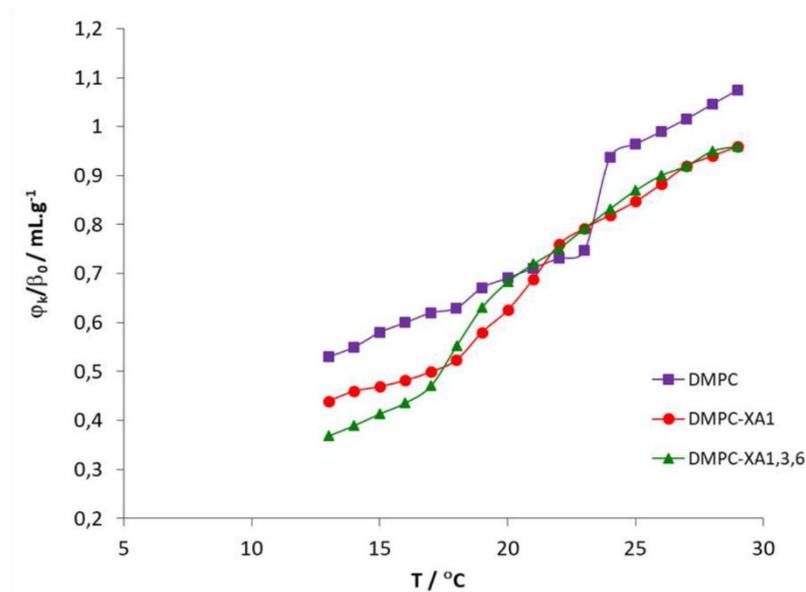


Figura 5.11. Gráfico de la compresibilidad adiabática específica aparente, ϕ_K/β_0 versus temperatura para una suspensión acuosa de MLVs compuestas de DMPC sin hidroxixantonas (♦), con una fracción molar de 0.3 de DMPC-1-HX (●) y DMPC-1,3,6-THX (▲). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% para datos correspondientes a 3 réplicas.

Otros datos de relevancia pueden extraerse del gráfico de ϕ_v versus temperatura son la amplitud media de transición, ΔT_m ; el cambio de volumen a dicha temperatura, $\Delta\phi_v$, y la expansividad térmica, α_m , ($\alpha_m = (\delta V/\delta T)$) a T_m .²⁵⁰ Estos parámetros se pueden observar en la Tabla 5.2 tanto para las vesículas de DPPC, como de DMPC, con y sin las diferentes hidroxixantonas.

Podemos concluir que, si bien la temperatura de transición principal para los liposomas dopados disminuye en todos los casos, la amplitud media de la transición aumenta en concordancia con el número de grupos hidroxilo en la xantona para ambos lípidos. Lo opuesto es observado para la expansividad térmica en la transición principal, lo cual es evidencia de la disminución de cooperatividad en la fase de transición en presencia de las hidroxixantonas. La disminución de cooperatividad durante la transición principal para fosfolípidos en presencia de hidroxixantonas también se ve reflejada en los mayores valores de $\Delta\phi_v$ y α_m para los MLVs puros. Los valores de α_m para los liposomas sin modificar de DMPC y DPPC se encuentran en concordancia con lo reportado previamente.²⁵⁰ Es interesante denotar que las xantonas polihidroxiladas tienen un efecto depresor mayor en los liposomas de DMPC.

Tabla 5.2. Valores de temperatura de transición, T_m , amplitud media de transición, ΔT_m , cambio de volumen, $\Delta\phi_v$, y expansividad térmica, α_m , a la temperatura de la transición principal para mezclas de DPPC y DMPC con xantonas en agua.

<i>Sistema</i>	$T_m / ^\circ\text{C}$	ΔT_m	$\Delta\phi_v \cdot 10^5 / \text{ml.g}^{-1}$	$\alpha_m \cdot 10^5 / \text{ml.g}^{-1}$
<i>DPPC</i>	41.51	0.51	4320	8500
<i>DPPC-1-HX</i>	38.60	1.11	3750	3400
<i>DPPC-1,3,6-THX</i>	37.14	1.42	3700	2600
<i>DMPC</i>	23.55	0.45	3400	7500
<i>DMPC-1-HX</i>	20.91	1.61	3070	1900
<i>DMPC-1,3,6-THX</i>	18.03	2.26	3000	1300

A modo complementario, se incluyen los resultados de las simulaciones de dinámica molecular, conducidas de manera tal de tener correlación con los resultados experimentales sobre compresibilidad y fluidez de los sistemas estudiados. De acuerdo con los mismos, el módulo de compresibilidad no presentó variaciones significativas al comparar las membranas puras y dopadas de DMPC. En el caso del DPPC, se observa que tanto 1-HX, como 1,3,6-THX promueven un incremento más significativo de k_A , implicando que estos sistemas son menos compresibles que sus congéneres puros. Por ejemplo, 1,3,6-THX en la fase líquido-cristalina incrementa el módulo de compresibilidad en un 27% para el caso del DPPC, mientras que para el DMPC la diferencia es tan solo el 4%.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos de manera experimental solo en forma cualitativa, principalmente debido a que el módulo calculado de esta forma es claramente dependiente del tamaño del sistema y sólo un número finito de lípidos puede ser incluido en las simulaciones.²⁵¹ No se espera, entonces, que el método reproduzca valores absolutos, sino que permita observar tendencias cualitativas y comportamiento relativos.

Para calcular el módulo de compresibilidad, el área por lípido se obtuvo para membranas puras y dopadas. El valor constituye un indicativo de cómo afecta la presencia de xantonas al volumen parcial específico de la membrana por encima de la temperatura de transición.

Como se muestra en la Tabla 5.3, tanto para membranas de DPPC como de DMPC, la presencia de xantonas reduce el área por lípido entre un 10 y 15%, respectivamente, en comparación con las membranas de lípido puro. Esto implica que la presencia de xantonas hace a las membranas más compactas, una tendencia similar a la observada a través de los cambios de volumen en la transición principal que se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.3. Área por lípido para bicapas de DPPC y DMPC puras y dopadas, por encima de la temperatura de transición, correspondiente a 323 K para las de DPPC y 303 K para las de DMPC.

<i>Bicapa lipídica</i>	<i>Área del lípido / Å²</i>
<i>DPPC</i>	61.5
<i>DPPC-1-HX</i>	53.1
<i>DPPC-1,3,6-THX</i>	52.3
<i>DMPC</i>	60.4
<i>DMPC-1-HX</i>	50.9
<i>DMPC-1,3,6-THX</i>	52.6

De forma tal de estudiar la fluidez de la membrana lipídica y su respuesta a la presencia de xantonas, los desplazamientos cuadráticos medios (2D-MSD) fueron calculados. La Figura 5.12 muestra que las membranas de DPPC que contienen 1-HX o 1,3,6-THX exhiben valores de MSD mayores comparados a aquellos de la membrana de DPPC puro a T=323 K. Este comportamiento indica que la presencia de este tipo de efector, tendería a aumentar la fluidez la membrana. Especialmente, la 1,3,6-THX induce un incremento mayor. A modo ilustrativo, solo se presentan las curvas para DPPC, ya que el DMPC muestra un comportamiento muy similar.

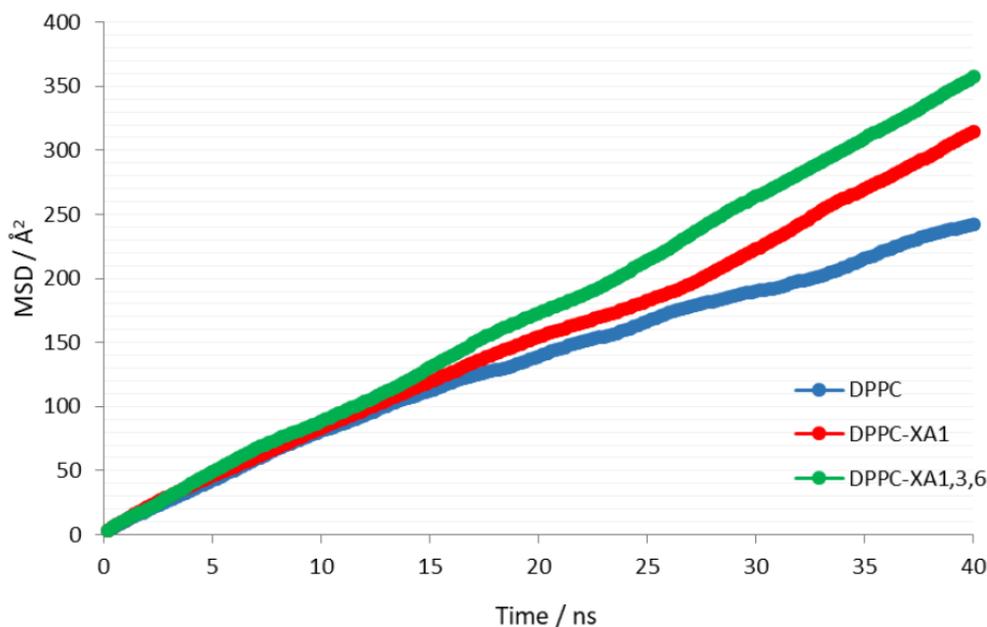


Figura 5.12. Desplazamiento cuadrático medio bidimensional en función del tiempo para una bicapa de DPPC puro (línea azul), DPPC-1-HX (línea roja) y DPPC-1,3,6-THX (línea verde) a 323 K.

Para determinar la posible ubicación de ambos tipos de moléculas de xantona dentro de las bicapas de DMPC y DPPC, en la Figura 5.13 se muestran los perfiles de densidad para los grupos funcionales de la membrana de DPPC; fosfatos y carbonilos, agua y el centro de masa de las xantonas, a ambas temperaturas estudiadas. La Figura 5.14 muestra la situación correspondiente para las membranas de DMPC.

Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
 Capítulo 5: Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo

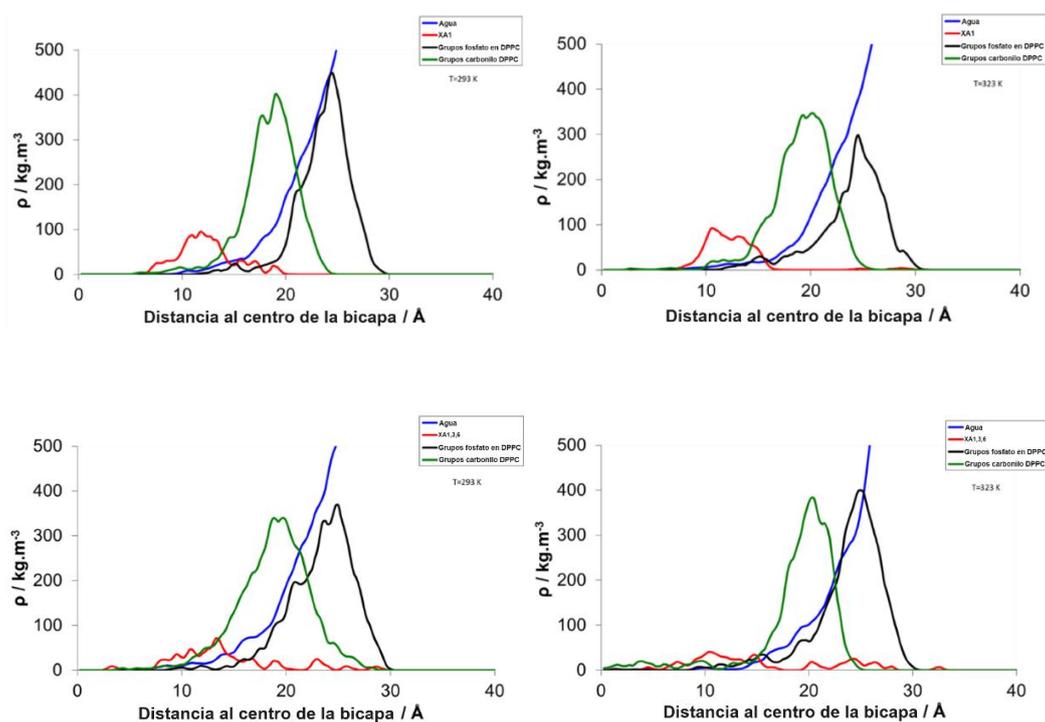


Figura 5.13. Perfiles de densidad en el eje Z para el agua (línea azul), grupos carbonilos (línea verde), grupos fosfatos (línea negra) y xantonas (línea roja, 1-HX arriba y 1,3,6-THX abajo) en DPPC a 293 K (izquierda) y 323 K (derecha)

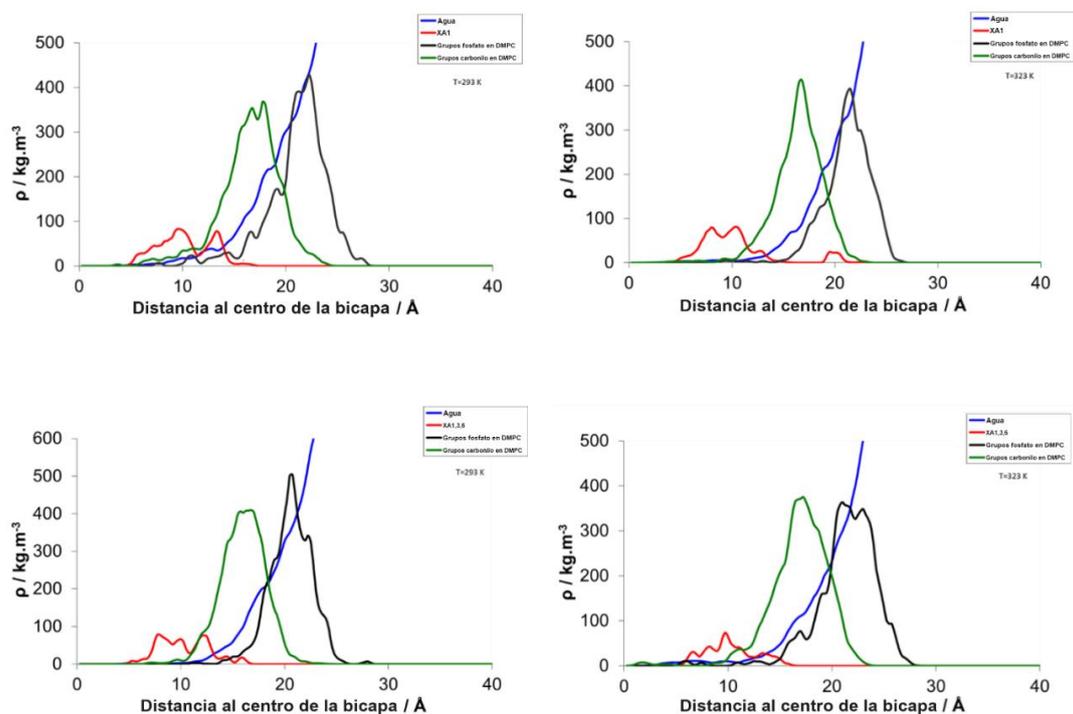


Figura 5.14. Perfiles de densidad en el eje Z para el agua (línea azul), grupos carbonilos (línea verde), grupos fosfatos (línea negra) y xantonas (línea roja, 1-HX arriba y 1,3,6-THX abajo) en DMPC a 293 K (izquierda) y 323 K (derecha)

En base a los resultados obtenidos, se propone que 1-HX y 1,3,6-THX se encontrarían ubicadas debajo de los grupos carbonilos de las membranas de DMPC, a ambas temperaturas. Para el caso de las membranas de DPPC, los resultados son similares en el caso de 1-HX a ambas temperaturas, mientras que para 1,3,6-THX no se percibe la misma ubicación preferencial. Esta última se encuentran ubicadas sobre la región del carbonilo/fosfato en ambas fases del DPPC, ya que son capaces de interactuar con estos grupos polares mediante sus hidroxilos (Figura 5.15).

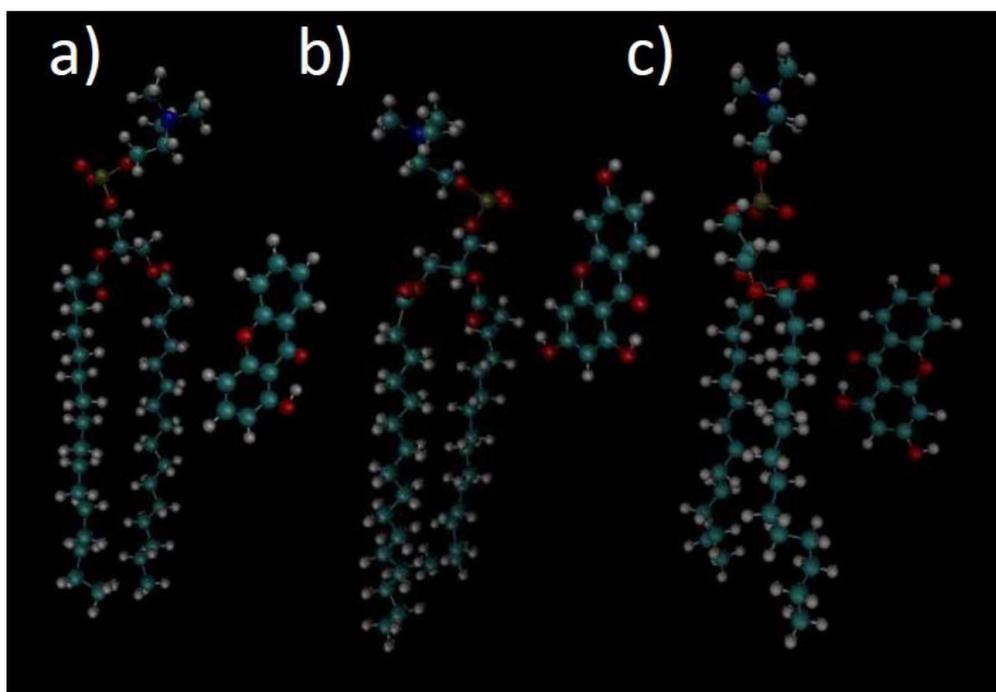


Figura 5.15. Ubicación de las xantonas respecto de los sistemas lipídicos. a) 1-HX en la bicapa de DPPC, b) 1,3,6-THX en la bicapa de DPPC y c) 1,3,6-THX en la bicapa de DMPC. Las tres membranas se encuentran en fase líquido-cristalina y el tiempo de simulación fue de 15 ns post-equilibrio.

La situación es compleja en el caso de las membranas de DMPC. La ubicación de 1-HX en DPPC es diferente de resultados previos de simulación del grupo, ²⁵² ya que las xantonas se desplazan más profundo y se posicionan entre las cadenas carbonadas, cerca de los grupos carbonilos. Esta diferencia podría deberse a la concentración de xantona utilizada en este trabajo, diferente a la utilizada en instancia previas. El número de xantonas por capa es de 18, el doble que las utilizadas entonces. La presencia de un número mayor de xantonas, y la influencia que pueden tener por encontrarse más cerca las unas de otras, podría tener un efecto incrementado también sobre el ambiente de la cadena lipídica.

La Figura 5.16 muestra la membrana completa de DPPC, sin las moléculas de agua para mejor visualización, con las xantonas 1,3,6-THX (a) y 1-HX (b).

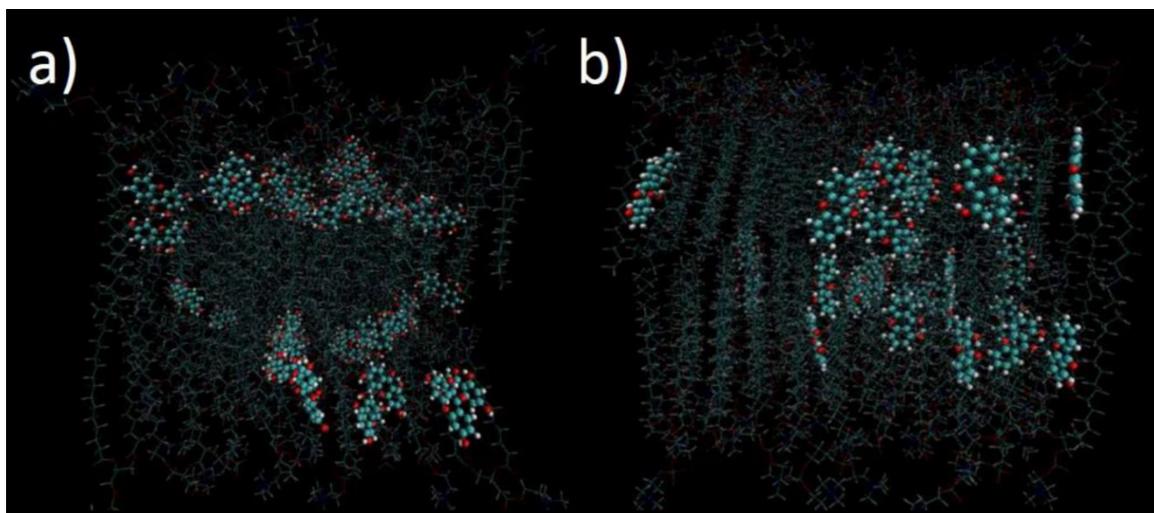


Figura 5.16. a) 1,3,6-THX en DPPC y b) 1-HX en DPPC en fase líquido-cristalina por 15 ns luego de alcanzado el equilibrio.

5.1.5 Conclusiones

En este trabajo, densitometría y velocidad de ultrasonido se combinaron con simulaciones de dinámica molecular en el estudio de propiedades estructurales de membranas modelo de DPPC y DMPC, con y sin efectores de tipo hidroxixantona. El objetivo principal del estudio fue determinar la relación entre compresibilidad y fluidez a partir del análisis termodinámico y de respuesta mecánica de dos membranas de fosfatidilcolinas de diferentes espesores, en presencia de xantonas que difieren en el número de hidroxilos que en su estructura.

Las propiedades termodinámicas de las vesículas de DPPC y DMPC con hidroxixantonas que se derivaron del estudio de volumen específico fueron similares a las obtenidas a partir del experimento de potencial zeta en función de la temperatura. Con estas técnicas, se observó la disminución de la temperatura de transición principal y el aumento en la amplitud de la transición de fase. La disminución de la temperatura de transición, así como de la cooperatividad en la misma, se ha considerado un resultado indirecto de la presencia del efector en la bicapa lipídica.²⁵³ 1,3,6-THX fue el compuesto que disminuyó la temperatura de

transición en mayor proporción para ambos lípidos. En el caso del DMPC, el efecto es incluso más notorio.

Estas consideraciones acerca de la fluidez han sido corroboradas por resultados de MSD obtenidos a partir de dinámica molecular. Las diferencias que se encontraron entre los efectores sobre la fluidez de la membrana, pueden ser atribuidas no solo al volumen del efector, sino también a su ubicación dentro de la membrana, tal como se infiere por los resultados de dinámica molecular. Los mismos muestran que para el sistema DPPC-1,3,6-THX, el efector tiene la posibilidad de particionarse entre las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, por lo que su presencia causa un menor disturbio en la zona hidrofóbica en relación al sistema DMPC-1,3,6-THX.

Tanto el DPPC como el DMPC mostraron un comportamiento similar respecto de sus volúmenes aparentes en presencia y ausencia del efector; en ambos casos los sistemas que incluyen hidroxixantonas presentan valores menores respecto de los sistemas de lípido puro. Esto podría relacionarse a la existencia de restricciones de fluctuación de volumen adicionales para los fosfolípidos impuestas por las xantonas. Los valores de velocidad del sonido son mayores para las membranas de DPPC que contienen xantona que para aquellas de DPPC puro, mientras que la diferencia se ve menos pronunciada cuando el lípido en cuestión es el DMPC.

Se evaluaron el incremento de concentración de velocidad del sonido $[u]$ y el volumen específico de los fosfolípidos, φ_v , y la compresibilidad adiabática específica de la bicapa lipídica, φ_k/β_0 . Este último constituye una propiedad mecánica considerada un parámetro macroscópico, que se vuelve fundamental a la hora de discernir la magnitud de influencia de la xantona en la bicapa que la rodea, de tal manera alterando sus propiedades físicas.

En los gráficos correspondientes a las figuras Figura 5.8 y Figura 5.11 se puede observar que las respuestas mecánicas de las membranas dopadas son diferentes a aquellas de las membranas de lípidos puros. Las diferencias de compresibilidad son ligeramente más evidentes para el DPPC, especialmente en la fase líquido-cristalina. Las curvas de las membranas que contienen efectores mantienen el perfil de su forma pura, mientras que en

el caso del DMPC, el perfil de la membrana mixta se ve más suavizado que el de su contraparte.

La disminución de la compresibilidad adiabática refleja la existencia de una disminución de desorden en los liposomas, principalmente en la fase hidrofóbica de la bicapa.²¹² El comportamiento de compresibilidad de membranas conteniendo ambos efectores estudiados es similar en el estado líquido cristalino, pero no en la fase sólido cristalina. En el caso del sistema DPPC-XA, la xantona que compacta más notoriamente la membrana es la 1-HX. Mientras que para el sistema de DMPC-XA, se trata de la 1,3,6-THX. Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos de volumen específico y los módulos de compresibilidad determinados por dinámica molecular.

Las diferencias entre ambos lípidos en términos de compactación de la membrana podrían ser explicados con los resultados de ubicación de la xantona dentro de cada tipo diferente de liposoma obtenido mediante simulaciones de dinámica molecular. Estos resultados nos muestran que, para la xantona monohidroxilada, la ubicación no depende del tipo de membrana. Tanto para DPPC como para DMPC, la xantona se posiciona debajo de la línea de carbonilos. Esto es, se encuentra en el área diferencial entre la zona polar y no polar del lípido, tanto en estado líquido como sólido cristalino.

Un comportamiento diferente se observa para la xantona polihidroxilada, cuya ubicación depende del tipo de lípido que constituye la bicapa. En el caso del DMPC, la ubicación preferencial es por debajo de los carbonilos, de manera similar a la 1-HX. En el caso del sistema DPPC-1,3,6-THX, el efector muestra la capacidad de una ubicación más heterogénea, oscilando entre la zona hidrofóbica debajo de los grupos carbonilo y la zona más superficial, donde se hallan los grupos más polares. La ubicación diferencial de la xantona polihidroxilada en DPPC, respecto de aquella en DMPC, podría estar relacionada a la disposición de los grupos polares en ambos lípidos.²⁵⁴

Es notorio que, respecto de la compresibilidad, ambas xantonas presentan un comportamiento similar incluso cuando parecen ocupar diferentes ubicaciones. Esto permitiría concluir que la ubicación de la molécula en la membrana no tendría un rol estelar en la forma en que se exhiben las propiedades mecánicas para este tipo de sistemas.

Debido a la particular estructura geométrica de la xantona, siendo que se trata de una molécula de núcleo plano, su incorporación dentro de la membrana podría estar induciendo un empaquetamiento particularmente efectivo que incrementaría la compactación, disminuyendo la compresibilidad. Sin embargo, la intercalación de la xantona entre las cadenas lipídicas sigue alterando las interacciones metileno-metileno, e incluso disruptiéndolas, lo cual incrementaría finalmente la fluidez de la membrana. El «desorden» se da a un nivel de interacción, más que a un nivel estructural.

Resultados similares respecto de fluidez y compresibilidad fueron encontrados por el grupo de Yoshida y colaboradores, ²⁵³ quienes trabajaron con otro derivado de xantonas. De acuerdo a ellos, la mangostina (1,3,6-trihidroxi-7-metoxi-2,8-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-9H-xanten-9-ona) solubilizada en bicapas de DPPC, disminuye la fluidez del grupo acilo y aumenta la microviscosidad, dando lugar a empaquetamientos más ensamblados de los lípidos.

Es importante tener presente, tal como mencionan Ehringer y colaboradores, ²⁴⁹ que el grado de orden es una medida de la anisotropía en el movimiento molecular dentro de la membrana, mientras que estrictamente, la fluidez está relacionada al grado de motilidad. Por lo cual, un aumento o disminución en el orden estructural no implica, a priori, una correspondiente disminución o incremento en la fluidez como sería de esperar.

En resumen, a pesar que en términos termodinámicos ambos efectores probados disminuyen la temperatura de la transición principal para cada lípido, se da en paralelo la inducción de un estado de empaquetamiento más compacto en ambos tipos de membranas.

Es de esperarse que el esqueleto planar de la xantona brinde a estas moléculas la capacidad de empaquetarse efectivamente entre los lípidos, disminuyendo la compresibilidad, al mismo tiempo que se genera un disturbio de las interacciones laterales de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos causando un cierto nivel de «desorden» en las interacciones más que en la estructura en sí, dando lugar a un aumento de fluidez y disminución de la temperatura de transición.

Como nota final, una combinación de los resultados termodinámicos y mecánicos para las membranas, tanto experimentales como computacionales, han permitido resolver el interrogante planteado en un inicio: el orden estructural de la membrana, modificado por las

Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
Capítulo 5: Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo

alteraciones introducidas por el efector, no presenta una relación trivial con las características de compresibilidad y fluidez.

5.2 Derivados anfífilos de xantona sobre membranas modelo bacterianas

5.2.1 Introducción

Los antimicrobianos, en particular los antibióticos, constituyen una categoría de fármacos que desempeñan un papel crucial en el tratamiento de infecciones bacterianas. Esta diversa gama de compuestos se clasifica según sus mecanismos de acción y estructuras químicas, lo que permite abordar de manera efectiva diferentes tipos de bacterias.

Las tetraciclinas y aminoglucósidos, como la estreptomina y gentamicina, comparten la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas al unirse a los ribosomas bacterianos. En cambio, los macrólidos, como la eritromicina y azitromicina, también afectan la síntesis proteica, pero a través de un mecanismo distinto al interferir con la translocación del ribosoma. Existen numerosos mecanismos de acción, y con ellos numerosos fármacos en uso actualmente, algunos de ellos se ilustran en la Figura 5.17.

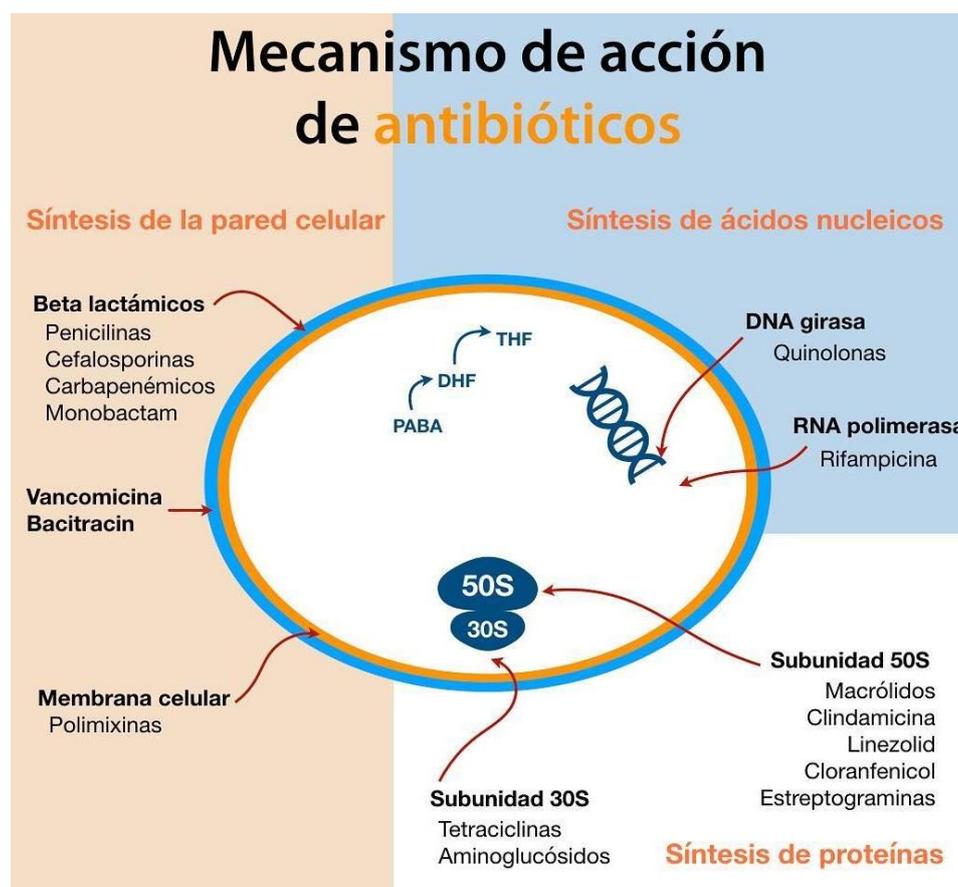


Figura 5.17. Mecanismos de acción de diversos antibióticos. Imagen de SpotlightMed™.

Un grupo ampliamente utilizado son las penicilinas, que actúan interfiriendo con la síntesis de la pared celular bacteriana, debilitando y eventualmente destruyendo la estructura protectora de las bacterias. Las cefalosporinas, otra clase importante, comparten similitudes con las penicilinas al también dirigirse a la síntesis de la pared celular. Estos antibióticos han demostrado eficacia contra una amplia variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas.

El uso de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana aprovecha la vulnerabilidad estructural única de las bacterias para ejercer su acción terapéutica, dirigiéndose a componentes específicos de la pared, como el peptidoglicano, una estructura crucial que confiere resistencia y forma a la membrana celular bacteriana. Al interferir con la síntesis o la integridad del peptidoglicano, los antibióticos afectan directamente la arquitectura de la pared bacteriana, debilitándola y volviendo a la bacteria más susceptible al estrés osmótico.

Debido a su enfoque, tienen un impacto selectivo en las bacterias, ya que las células humanas carecen de paredes bacterianas y, por lo tanto, no se ven afectadas por estos medicamentos. Esto reduce significativamente la toxicidad y los efectos secundarios asociados con muchos antibióticos, lo que mejora la tolerabilidad del tratamiento.

Sin embargo, su uso extensivo genera presión selectiva, propiciando el desarrollo de resistencia bacteriana mediante mutaciones genéticas o transferencia horizontal de genes, entre otras estrategias adaptativas naturales o adquiridas (Figura 5.18). El uso inapropiado y la prescripción indebida aumentan este riesgo. La capacidad de algunas bacterias para persistir en presencia de antibióticos y la transferencia rápida de genes de resistencia son preocupaciones adicionales. Este escenario destaca la necesidad de un uso responsable para abordar la creciente amenaza de la resistencia bacteriana, y a pesar de las extensas campañas de concientización, continúa siendo un problema prevalente incluso dentro del ámbito profesional.

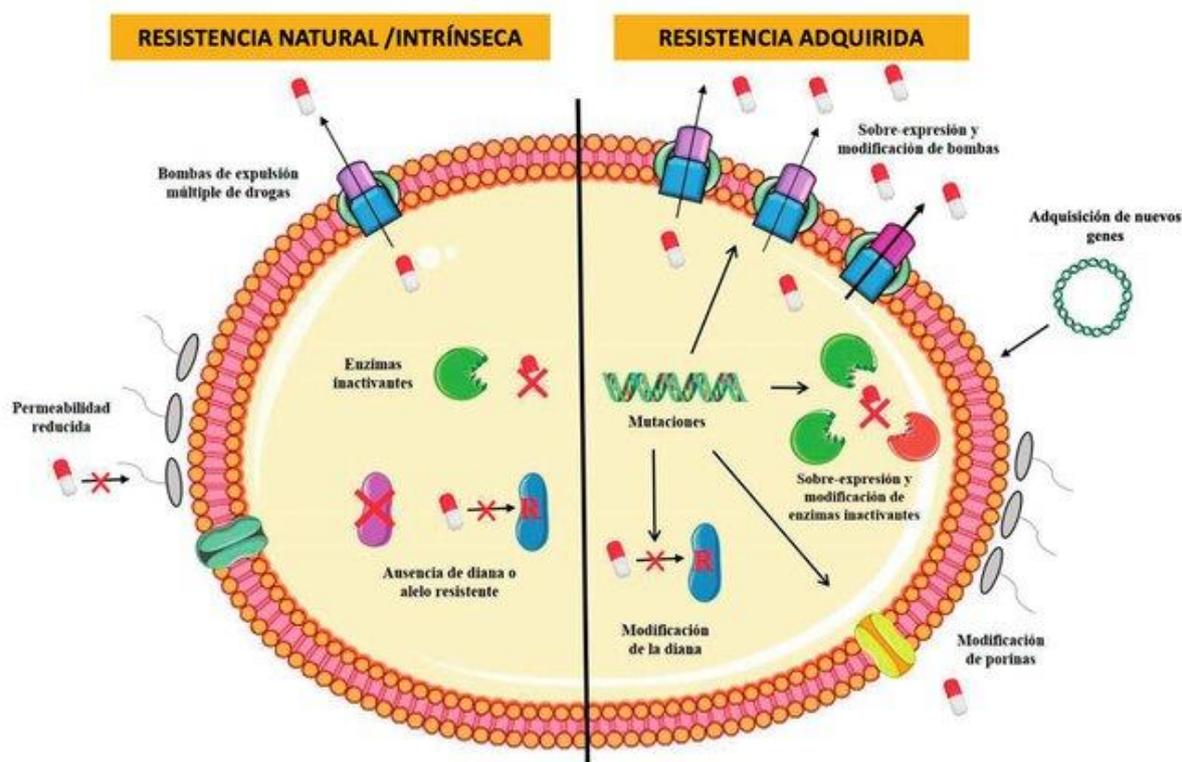


Figura 5.18. Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida en bacterias. ²⁵⁵

La clase de antibióticos conocidos como betalactámicos, por su estructura química, enfrentan un desafío de inactivación debido a la aparición de enzimas llamadas betalactamasas, que son generadas como forma de resistencia por parte de algunas bacterias. Las betalactamasas son especialmente problemáticas porque actúan como «tijeras moleculares» que cortan el anillo betalactámico característico de estos antibióticos, desactivándolos y volviéndolos ineficaces. La presencia de estas enzimas en bacterias confiere a los microorganismos la capacidad de resistir los efectos de los betalactámicos, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones.

Para abordar este problema, se han desarrollado inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico. Este compuesto se utiliza en combinación con antibióticos betalactámicos, como la amoxicilina, para potenciar su acción. El ácido clavulánico actúa como señuelo para las betalactamasas: se une a estas enzimas antes de que tengan la oportunidad de desactivar los antibióticos. Al unirse a las betalactamasas, el ácido clavulánico las inhibe, preservando la acción de los antibióticos betalactámicos y superando así la resistencia generada por estas enzimas.

La combinación de ácido clavulánico con antibióticos betalactámicos ha demostrado ser una estrategia efectiva para combatir bacterias resistentes y ampliar el espectro de acción de estos medicamentos por un largo período de tiempo. Sin embargo, tanto esta como muchas otras estrategias comienzan a mostrarse insuficientes, y es necesario seguir trabajando para desarrollar nuevos fármacos con acción bactericida o bacteriostática, manteniendo la tecnología un paso delante de la capacidad evolutiva de los microorganismos.

En este contexto, los antimicrobianos de acción sobre la membrana bacteriana representan una alternativa prometedora en la lucha contra la resistencia a antibióticos. La resistencia generalizada se ha convertido en un problema de salud global.^{256,257} Se han encontrado patógenos resistentes contra cada clase de antibióticos, incluyendo vancomicina y fármacos recientemente aprobados como linezolid y daptomicina. Como resultado, el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes, como *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), presenta desafíos sustanciales.

258–260

Los antimicrobianos de acción sobre la membrana,²⁶¹ como los péptidos antimicrobianos (AMP)^{262,263} y los peptidomiméticos sintéticos^{264,265}, podrían ofrecer una solución a este problema, ya que estas moléculas actúan sobre la membrana bacteriana, que es evolutivamente conservada y vuelve difícil para las bacterias el desarrollar resistencia. En contraste, los antibióticos tradicionalmente utilizados interfieren con la biosíntesis bacteriana, centrándose en proteínas que son fácilmente mutadas, lo que resulta en la pérdida de reconocimiento del «sitio de acoplamiento» por parte del antibiótico, y con esto se vuelven ineficaces.

Varios estudios experimentales y de simulación han demostrado que tanto las interacciones hidrofóbicas como electrostáticas son importantes en las interacciones de los AMP con la membrana bacteriana.^{266–268} Esto se debe a que la mayoría de los AMP son anfipáticos y pueden insertar sus partes hidrofóbicas en la región de la cola lipídica de la membrana bacteriana, mientras que sus grupos catiónicos interactúan con los grupos aniónicos de la cabeza. Para imitar la estructura anfipática de los AMP, basándose en diferentes andamios hidrofóbicos, se han informado varios peptidomiméticos sintéticos en la última década.

Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
Capítulo 5: Interacción fisicoquímica de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo

Por ejemplo, utilizando un andamio de arilamida, Tew y colaboradores, han diseñado una serie de foldámeros antimicrobianos catiónicos, como PMX-30016 y PMX-30063, para imitar la interacción de la Maganina con las membranas bacterianas.²⁶⁹ Utilizando la porfirina como andamio hidrofóbico, Ooi y colaboradores, añadieron dos grupos catiónicos y desarrollaron un nuevo antimicrobiano activo en la membrana, XF-73, con rápida eliminación bacteriana y excelente actividad antimicrobiana.²⁷⁰ Otros andamios hidrofóbicos también se han utilizado en el desarrollo de peptidomiméticos activos en la membrana, como LTX-109,²⁷¹ CSA-13²⁷² y BPMTAs.²⁷³

Utilizando un enfoque similar, se seleccionó a las xantonas como andamiaje hidrofóbico, debido a su alta afinidad por la membrana.²²⁰ El compuesto se modificó agregando grupos anfifílicos de manera tal de obtener análogos anfipáticos (Figura 5.19).

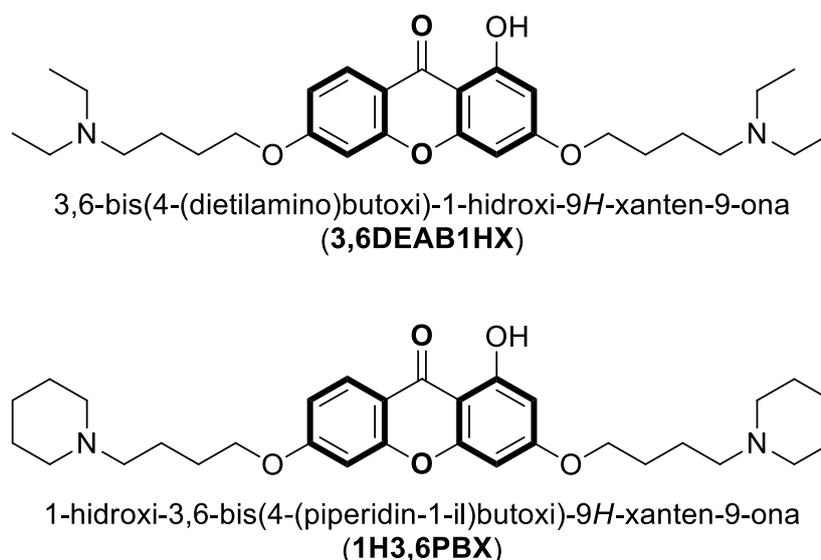


Figura 5.19. Derivados anfifílicos de la 1,3,6-THX.

La eliminación microbiana por antimicrobianos activos en la membrana es un proceso complejo. Para patógenos Gram positivos, como MRSA, la ruptura de la membrana interna suele ser el paso limitante de la velocidad.²⁶¹

Desde un punto de vista estructural, la membrana interna bacteriana se puede descomponer en tres fragmentos: dos regiones de grupos aniónicos de cabeza y una región hidrofóbica, y esta descomposición proporciona la base para el desarrollo de una estrategia basada en fragmentos²⁷⁴ (Figura 5.20).

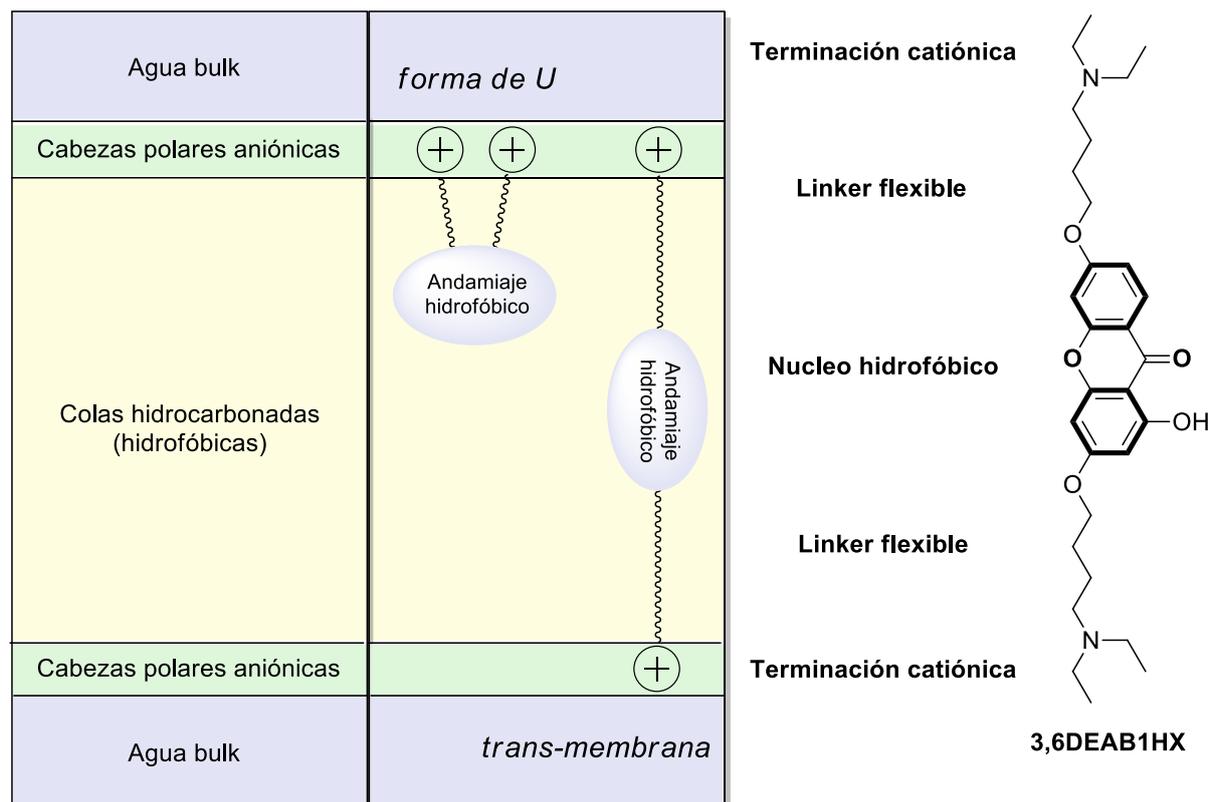


Figura 5.20. Posibles conformaciones de la molécula anfifílica de xantona en la membrana modelo bacteriana y esquema de sus secciones con sus respectivas zonas de interacción.

En base a información y experiencias del grupo de Jianguo Li y colaboradores,²¹⁹ se establece la hipótesis de que una molécula que perturba los tres fragmentos de la membrana interna bacteriana tendrá una alta actividad de membrana. Como tal, se propuso un modelo de farmacóforo tipo bola que consiste en dos brazos catiónicos y un andamio hidrofóbico, que interactúan complementariamente con los dos fragmentos de grupos aniónicos de cabeza y el fragmento de cola lipídica, respectivamente.

El andamio hidrofóbico proporciona afinidad por las colas lipídicas de la membrana bacteriana, mientras que los dos grupos catiónicos interactúan preferentemente con las dos regiones de grupos aniónicos de cabeza de la membrana bacteriana. Se puede deducir del modelo que, tras la adsorción inicial en la superficie de la hoja externa bacteriana, la molécula adoptaría una conformación en forma de U, con ambos grupos catiónicos interactuando con los grupos de cabeza de la hoja externa y el andamio hidrofóbico incrustado en la región de cola lipídica.

5.2.2 Materiales

1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-fosfatidilglicerol aniónico (POPG) y 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). Las xantonas sintetizadas, caracterizadas y purificadas fueron derivados de la 1,3,6-THX, la cual se obtuvo mediante la metodología de Eaton, explicada en mayor detalle en el apartado 5.1.2.

Una vez obtenida la xantona 136-THX se procedió con una eterificación dirigida a los hidroxilos en posición 3 y 6, y se continuó con una purificación por columna cromatográfica. Finalmente, se llevó a cabo la aminación sobre el *linker* como se expresa en el esquema (Figura 5.21), y se obtuvo el compuesto final aislado mediante purificación cromatográfica en columna dopada con trietilamina.

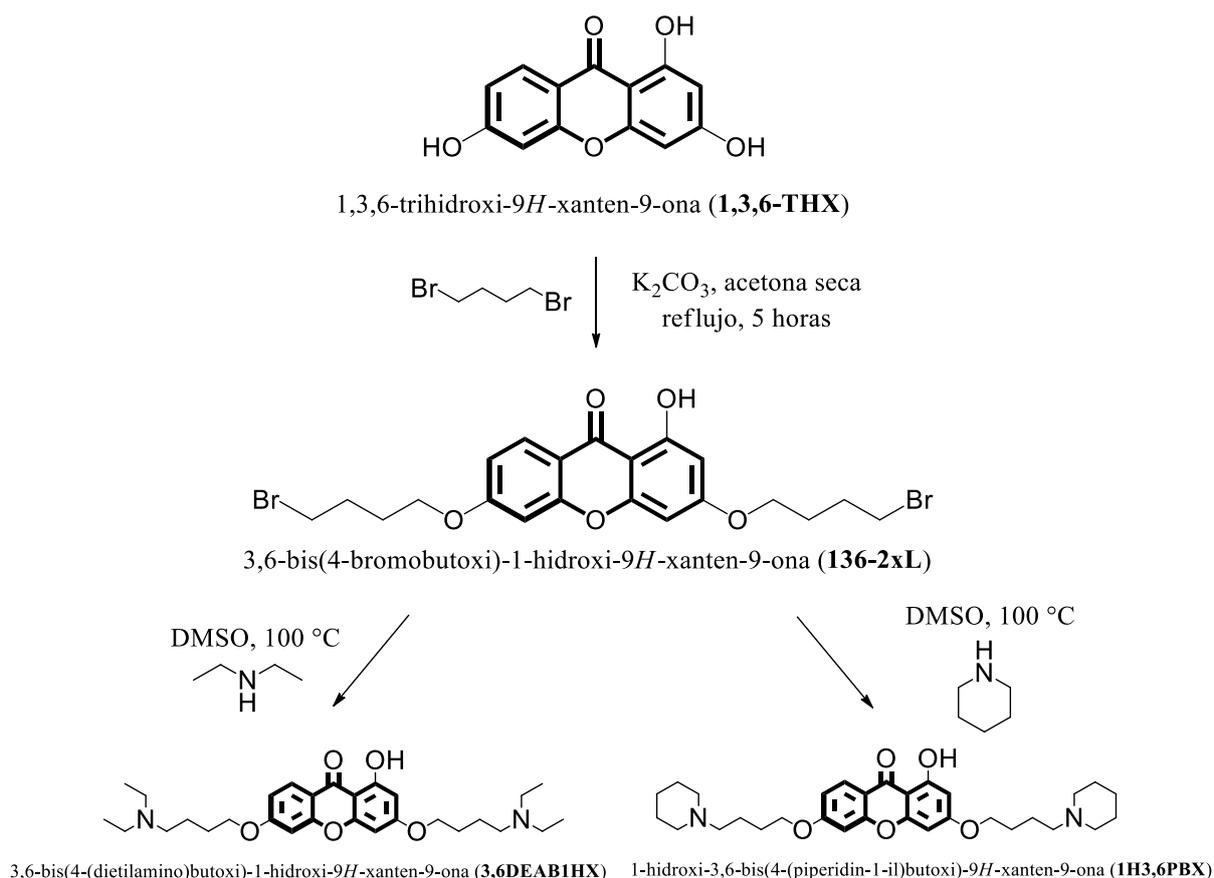


Figura 5.21. Obtención de derivados anfifílicos de xantona.

Los liposomas de POPE-POPG fueron preparados en relación 3:1. La cantidad de efector que se calcula para incluir en las vesículas preformadas corresponde a una fracción molar de 0.1. La masa de POPE y POPG pesada se disolvió en cloroformo, que luego fue removido por evaporación en flujo de nitrógeno de forma tal de obtener un film lipídico seco. El solvente remanente se eliminó mediante alto vacío, 2 horas adicionales en un Thermo Scientific Speed Vac SPD11V. El film lipídico seco se hidrató con 4 mL de agua milliQ a 40 °C y fue homogeneizado mediante ciclos de vórtex. Una vez las vesículas se encontraron propiamente hidratadas, se incorporó solución del derivado de xantona 3,6DEAB1HX en DMSO de forma tal de obtener una fracción molar de xantona de 0.1, suponiendo incorporación total. La población polidispersa de MLVs con xantona tendría una concentración final aproximada de 3.5 mM para cada experimento de potencial zeta.

5.2.3 Métodos

Las características de carga superficial para los sistemas POPE-POPG y POPE-POPG-XA se estudiaron mediante potencial zeta como función de la temperatura en un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK). Las determinaciones se llevaron a cabo por calentamiento progresivo de las muestras, permitiendo que alcancen el equilibrio en cada una de las temperaturas medidas, cada 2°C con períodos de estabilización de 5 minutos (a $\pm 10^{-1}$ K de temperatura constante de acuerdo al método de Peltier). Cada serie fue analizada por triplicado. La metodología utilizada para las medidas es la misma que la que se puede ver en el apartado 5.1.3.

5.2.4 Discusión

Los resultados obtenidos al momento están orientados al análisis del potencial zeta de la membrana microbiana al interactuar con el derivado de xantona anfifílica denominado 3,6DEAB1HX. Es un sistema que aún está en estudio, en relación a las diferentes proporciones de xantona agregada y a la influencia del medio fisiológico en la interacción XA-membrana.

La principal diferencia entre las características fisicoquímicas de la membrana bacteriana y la membrana de mamíferos radica en sus grupos de cabeza, siendo los primeros aniónicos y los últimos zwitteriónicos. Los fragmentos catiónicos del modelo de farmacóforo pueden

interactuar selectivamente con los grupos de cabeza aniónicos a través de interacciones electrostáticas y, por lo tanto, pueden ser cruciales tanto para la actividad antimicrobiana como para la selectividad.

Se comenzó entonces analizando la superficie de la membrana en relación a la carga superficial mediante potencial zeta.

Dado que el DMSO es el solvente vehículo utilizado en el agregado de xantona a la membrana POPE-POPG, se obtuvieron, en principio, medidas de potencial zeta para la mezcla lipídica con y sin DMSO agregado. Los resultados se muestran en la Figura 5.22.

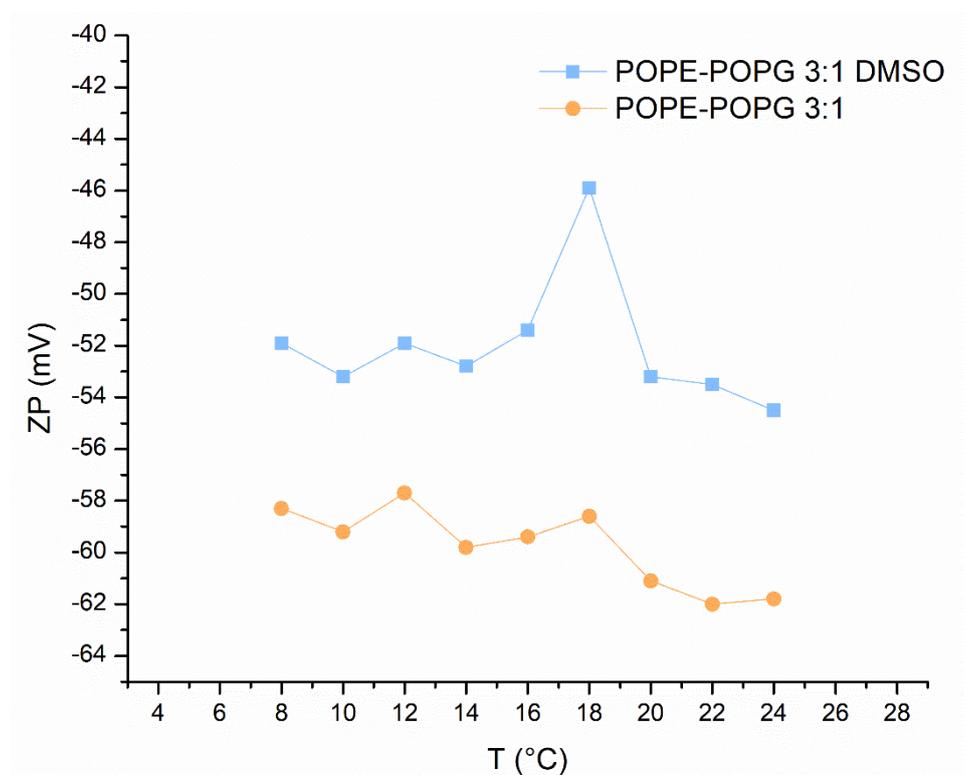


Figura 5.22. Potencial zeta de los sistemas POPE-POPG 3:1 con y sin agregado del vehículo DMSO.

Se observa el DMSO afecta el potencial de membrana, no sólo haciéndolo menos negativo, sino que también desplaza levemente la temperatura de transición de la vesícula lipídica, disminuyéndola aproximadamente de 20°C a 19°C. Además, la transición se vuelve más evidente en presencia de DMSO. Esto demuestra que la presencia de DMSO no es inerte a la membrana y que su influencia debería tenerse en cuenta al momento del análisis de resultado en presencia de xantonas.

En cuanto a las interacciones DMSO-membrana, muchos artículos de investigación recientes^{275,276} han indicado que la unión y permeación de moléculas anfifílicas pequeñas, como DMSO, a través de la membrana lipídica conducen a la alteración de la estructura de la membrana y sus propiedades físicas.

El DMSO es un solvente aprótico que tiene la capacidad de inducir la fusión y diferenciación celular, además de mejorar la permeabilidad de las membranas lipídicas. Mediante simulaciones moleculares, se ha demostrado²⁷⁶ que el DMSO puede inducir poros de agua en bicapas de dipalmitoil fosfatidilcolina y se propone que esto podría ser una posible vía para mejorar la penetración de activos a través de las membranas lipídicas. Además, el DMSO provoca que la membrana se vuelva más flexible, lo que aumentaría la permeabilidad, facilitaría la fusión de membranas y permitiría que la membrana celular se adapte a tensiones osmóticas y mecánicas durante la criopreservación.

Dada la importancia de esta interacción, nos detuvimos actualmente en la investigación para intentar dilucidar su efecto sobre la membrana.

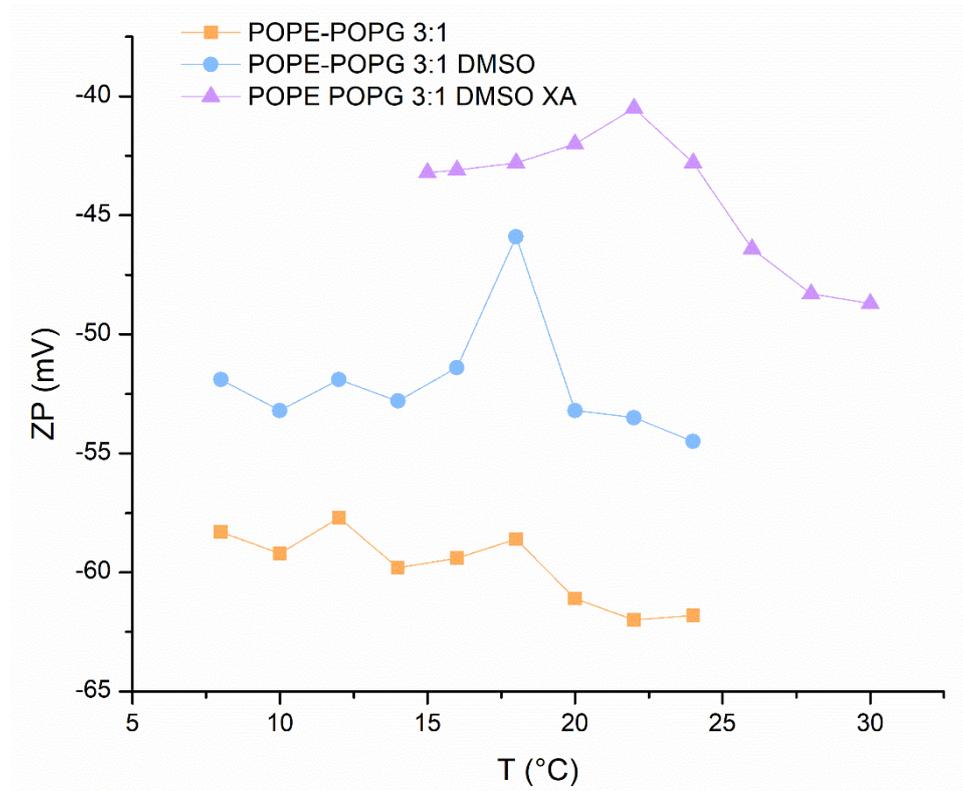


Figura 5.23. Comportamiento de la membrana de POPE-POPG en presencia del efector.

La Figura 5.23 muestra que, en presencia del derivado anfifílico de xantona al 10%, la membrana modifica su potencial hacia potenciales menores, que sería el comienzo de lo esperable en cuanto a la afectación superficial. Evidencia también que la proporción de efector agregado aun no es suficiente como para que la membrana se vea realmente afectada. Se observa también que hay un cambio significativo en la temperatura de transición de la mezcla lipídica, que se desplaza aproximadamente a 24°C.

5.2.5 Conclusiones

En este punto de la investigación es prematuro obtener una conclusión, pero los estudios están encaminados a obtener resultados relevantes.

Están siendo estudiadas las propiedades mecánicas de la membrana en interacción con 3,6DEAB1HX, específicamente en lo que se refiere a volumen aparente, compresibilidad adiabática y elasticidad, a través del módulo volumétrico. De igual forma, otro de los derivados de xantona mencionados en el apartado 5.2.2 será probado a fines comparativos en el mismo contexto. En presencia de la xantona, la interfaz hidrofóbico-agua se desestabilizaría e iría acompañada de un cambio drástico en las propiedades elásticas de la membrana bacteriana.²⁷⁷

Está previsto análisis por TEM y finalmente ensayos in vivo. Dado que es difícil investigar las conformaciones transmembrana mediante experimentos biofísicos, las simulaciones de dinámica molecular proporcionan una herramienta ideal para explorar tales características, opción a implementar próximamente.

Capítulo 6: Derivados O-prenilados de xantona en liposomas de DPPC y COL

6.1 Introducción

En los capítulos previos, se han explorado las complejidades de las membranas y sus interacciones con sustancias bioactivas, destacando la versatilidad de las xantonas y su papel potencial en aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, el estudio de las membranas, especialmente en el contexto de sistemas liposomales, nos desafía a adoptar perspectivas novedosas.

Los liposomas, nanopartículas ricas en lípidos, desempeñan un papel fundamental en la ingeniería de sistemas de liberación de fármacos.²⁷⁸ Su versatilidad para encapsular medicamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como su biodegradabilidad y capacidad de adaptarse a diferentes tamaños, los convierten en candidatos ideales para aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, la inestabilidad fisicoquímica, especialmente en términos de integridad estructural y rigidez de la membrana, puede comprometer su utilidad.^{279,280}

Muchos liposomas de fosfolípidos son permeables y no suficientemente rígidos, por lo que a menudo liberan medicamentos encapsulados durante el almacenamiento. El resultado más frecuente encontrado en la literatura es que la incorporación de colesterol en las bicapas lipídicas aumenta la cohesión de la membrana al conferir rigidez.^{281–283} En la investigación de la estabilidad liposomal, la evaluación de la integridad está estrechamente relacionada con su elasticidad y, por lo tanto, con las propiedades mecánicas de los liposomas.

La elasticidad de un liposoma, es decir, su capacidad para recuperar su forma original después de deformarse, es crucial para el éxito en la entrega de medicamentos.²⁸⁴ La rigidez de la membrana, influenciada por factores como la presencia de colesterol, se asocia estrechamente con la estabilidad.

En el contexto de las nanopartículas, la elasticidad es una notable propiedad física que ha suscitado interés reciente por sus funciones en la interfaz nano-bio. Este interés se impulsa por las notables habilidades demostradas por ciertas entidades biológicas, como los glóbulos rojos, el virus de la leucemia murina y el virus de la inmunodeficiencia humana, que pueden ajustar su rigidez mientras realizan funciones biológicas intrincadas. Por lo tanto, comprender

las propiedades mecánicas de las nanopartículas y sus impactos en la orientación pasiva y/o activa se vuelve esencial para el diseño racional de nanotransportadores de medicamentos óptimos.²⁸⁵

Las bicapas lipídicas dentro de la membrana revelan heterogeneidades laterales, caracterizadas por variaciones en las composiciones de lípidos, longitudes de cadena y densidades de empaquetamiento en diferentes regiones. Estas heterogeneidades provienen de la naturaleza dinámica de las moléculas lipídicas y de la coexistencia de varias especies lipídicas dentro de la bicapa.

Además, las bicapas pueden contener áreas de variabilidad en la fluidez, reflejando diferencias en la movilidad y organización de los lípidos dentro de la membrana. En sistemas complejos como las bicapas lipídicas, donde ninguna región única es representativa del todo, es importante asegurar que las propiedades mecánicas se evalúen de manera que considere la totalidad de la nanopartícula. En consecuencia, dado la anisotropía de las propiedades mecánicas de los liposomas, una comprensión integral de estas propiedades requiere la investigación de la deformación de la membrana en diversas direcciones.²⁸⁶

Dada esta complejidad, evaluar propiedades mecánicas anisotrópicas en diversas direcciones se vuelve esencial. El uso del módulo de compresibilidad volumétrica, más representativo que el módulo unidireccional comúnmente utilizado, emerge como una opción idónea para determinar la rigidez liposomal. Determinar este módulo como función de la temperatura para un sistema liposomal permite evaluar el cambio en la magnitud del módulo a una temperatura dada o bajo un estado específico de fluidez. Esta observación es altamente significativa durante el proceso de tecnología farmacéutica al que se somete el sistema liposomal.

Tradicionalmente, la evaluación de la integridad de un transportador como factor fundamental para su estabilidad se realiza mediante técnicas como potencial zeta, dispersión dinámica de luz y calorimetría diferencial de barrido. En el desarrollo de este trabajo, se utilizaron métodos de velocimetría por ultrasonido y densitometría para analizar la estabilidad liposomal desde el punto de vista de la rigidez liposomal mediante la evaluación de la compresibilidad de la membrana. Las técnicas mencionadas permiten la evaluación de los cambios en las propiedades físicas de toda la bicapa.^{210,227} El equipo utilizado proporciona

datos sobre la velocidad del sonido y la densidad del sistema liposomal en estudio, y a partir de estos, es posible obtener, a través de algunas ecuaciones relativamente simples, el módulo de compresibilidad volumétrica.

El sistema de estudio elegido para aplicar y examinar los conceptos anteriores es el liposoma compuesto por DPPC-Colesterol. El bioefector es el 3-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)-9H-xanteno-9-ona (3PX), un derivado de xantona O-prenilado (Figura 6.1).

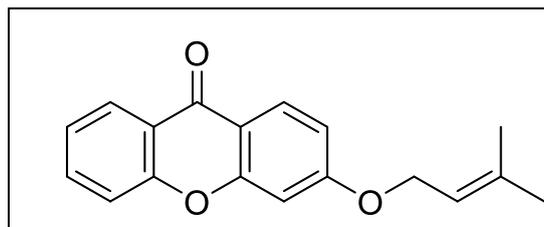


Figura 6.1. Derivado O-prenilado, 3PX.

La razón de esta elección radica en la experiencia de nuestro grupo con este tipo de bioefector. En un trabajo experimental y computacional anterior de este grupo, ^{56,226} se describió la interacción de las xantonas con regiones específicas de bicapas de fosfatidilcolina. Esos estudios revelaron una influencia sustancial de estas xantonas en las propiedades mecánicas y termodinámicas de dichas membranas, sugiriendo que estos efectos podrían atribuirse a la estructura plana de la xantona. ⁵⁶

Las xantonas constituyen un farmacóforo bien conocido compuesto por un armazón de dibenzo- γ -pirona, que está presente en productos naturales y puede sintetizarse orgánicamente. A esta familia de compuestos se le atribuye un amplio rango de potenciales terapéuticos, ²¹⁶⁻²²² principalmente atribuidos a las numerosas posibilidades de sustitución en los anillos bencénicos que flanquean el núcleo de γ -pirona.

Como ya se ha comentado, para los derivados de xantona prenilados se ha informado un efecto antitumoral como resultado de su impacto en la reducción de la fibronectina pericelular. ²⁸⁷ Se han observado efectos inhibitorios de enzimas, como los de la esfingomielinasa ácida ^{288,289} y las topoisomerasas ²⁹⁰ con señalización relacionada con la apoptosis. Al igual que muchos compuestos fenólicos, las xantonas son conocidas por sus propiedades antioxidantes, que han conferido propiedades hepatoprotectoras ²⁹¹ y antiinflamatorias ²⁹² a esta familia de compuestos. También se les atribuyen propiedades

antidiabéticas,²⁹³ debido a su capacidad para inhibir la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa. Su efecto antimicrobiano de amplio espectro se puede atribuir a sustituciones en los anillos del núcleo de xantona, lo que les permite actuar como agentes antibacterianos,²⁹⁴ antifúngicos²⁹⁵ y antimaláricos.²⁹⁶

Debido a su baja solubilidad en medios acuosos, las xantonas enfrentan limitaciones en aplicaciones farmacéuticas. Para abordar este desafío planteado por moléculas pequeñas altamente hidrofóbicas como las xantonas, exploramos el potencial de los liposomas como transportadores. El análisis que se llevó a cabo se centra en comprender cómo un grupo seleccionado de xantonas, xantonas O-preniladas, interactúa con un tipo de fosfatidilcolina en presencia de colesterol, dado su efecto estabilizador conocido en un liposoma.^{278,297-300} Esta investigación examina las alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la bicapa liposomal inducidas por los efectores de xantona. Los hallazgos de esta investigación ofrecen perspectivas valiosas desde perspectivas fundamentales y biotecnológicas, abriendo potencialmente el camino para la ingeniería de membranas con propiedades adaptadas para funciones específicas.

Así, desde la síntesis de compuestos hasta la evaluación de su impacto en membranas modelo, llegamos ahora a la vanguardia de la investigación con una herramienta única: el módulo de elasticidad volumétrica. Este capítulo busca redescubrir una técnica desde una perspectiva diferente, así como explorar nuevas dimensiones en la investigación de la estabilidad liposomal.

6.2 Materiales

La 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (1,3-DHX) y el 1,3,6-trihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (1,3,6-THX) se sintetizaron mediante el protocolo de Grover, Shah y Shah.²⁹ Se añadió cloruro de fosforilo (0,8 ml) a la mezcla de ácido salicílico (138,1 mg, 1 mmol), floroglucinol (157,5 mg, 1,25 mmol) y cloruro de zinc anhidro (300 mg, 2,20 mmol). A continuación, la nueva mezcla se agitó a 65°C durante 4 a 8 horas. El progreso de la reacción se monitorizó mediante TLC. La mezcla de reacción se vertió luego sobre hielo triturado y se agitó durante 2 horas. Posteriormente, se recogió el sólido y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y agua antes de secarlo con Na₂SO₄ anhidro. Las xantonas hidroxiladas se utilizaron en reacciones posteriores sin purificación adicional.

La 3-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona (3-HX) se sintetizó mediante una técnica en dos pasos informada por Chen y colaboradores.¹⁷⁴

Se preparó ((2-clorofenil)(2,4-dihidroxifenil)metanona mediante la adición de cloruro de zinc anhidro (545,2 mg, 4 mmol) a una mezcla de ácido 2-clorobenzoico (156,6 mg, 1 mmol) y resorcinol (165,7 mg, 1,5 mmol) y luego se agitó a 150°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se vertió sobre una solución acuosa saturada de NaHCO₃ fría y se agitó vigorosamente. Después de 2 horas, se lavó el sólido con agua destilada y se dejó secar durante la noche. La ciclización de la ((2-clorofenil)(2,4-dihidroxifenil)metanona para obtener 3-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona se llevó a cabo en DMSO con NaOH (2 equivalentes) como base, agitando y añadiendo porciones durante las primeras 3 horas a 80°C. Después de un total de 4 horas de agitación, con la última hora a 120°C, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo triturado acidificado con H₂SO₄ y se filtró el sólido, se lavó con agua hasta alcanzar un pH neutro y luego se recristalizó a partir de AcOEt.

Las hidroxixantonas (1 mmol), preparadas según el esquema mostrado en la Figura 6.2, se hicieron reaccionar con bromuro de prenilo (133 µL, 1,25 mmol) según el procedimiento reportado por Qin y colaboradores para una eterificación de Williamson dirigida.³⁰¹

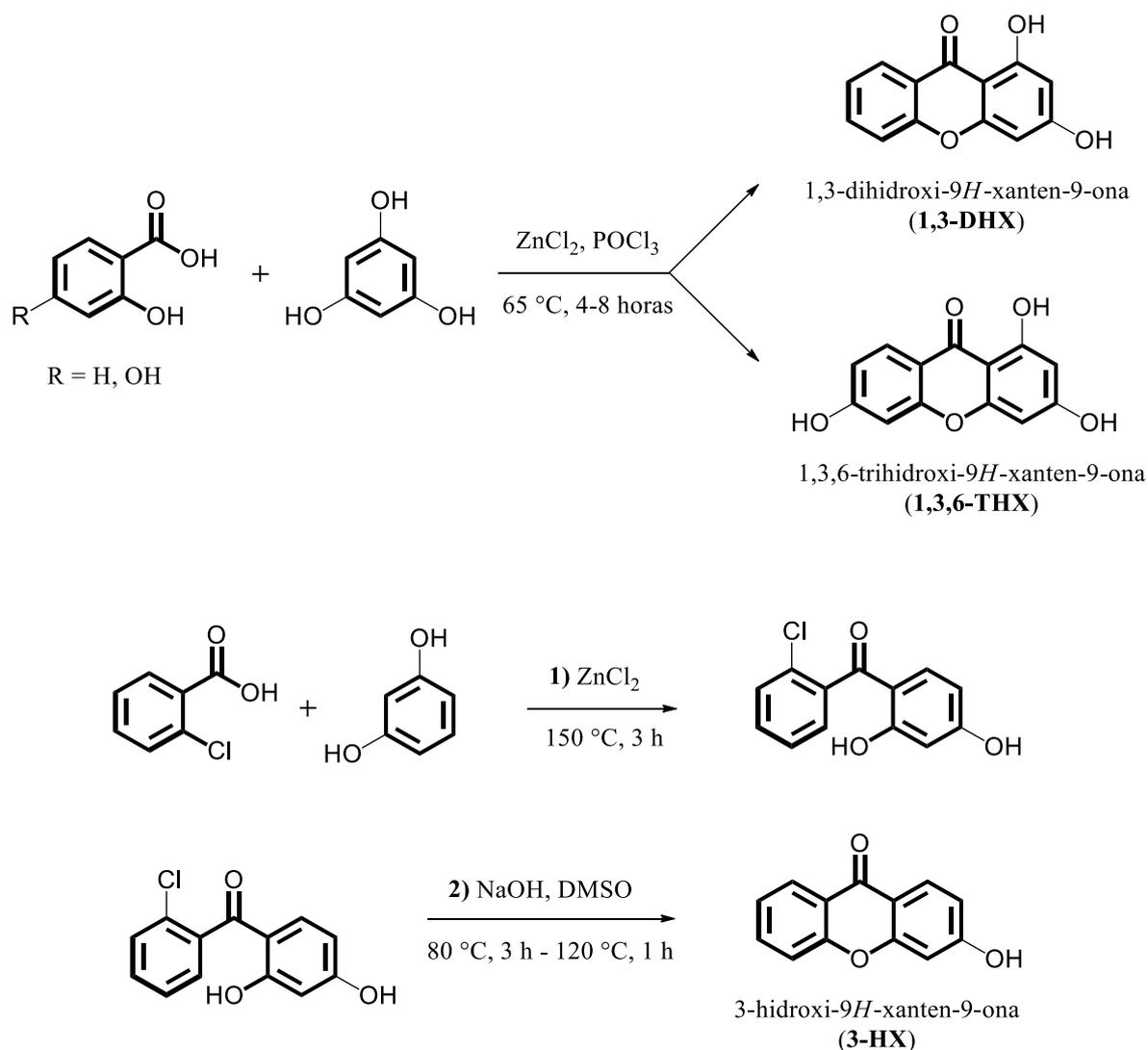


Figura 6.2. Síntesis de hidroxixantonas

Las xantonas O-preniladas se obtuvieron de acuerdo se esquematiza en la figura, a temperatura ambiente en acetona seca, en presencia de K_2CO_3 (172,7 mg, 1,25 mmol) y KI (10 mg) durante 8 a 24 horas. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo con EP:AcOEt (15:1). Se obtuvieron 3-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)-9H-xanten-9-ona (3PX), 1-hidroxi-3-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)-9H-xanten-9-ona (1H3PX) y 1-hidroxi-3,6-bis((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)-9H-xanten-9-ona (1H3,6DPX) con rendimientos del 73 al 87%, como se muestra en la Figura 6.3.

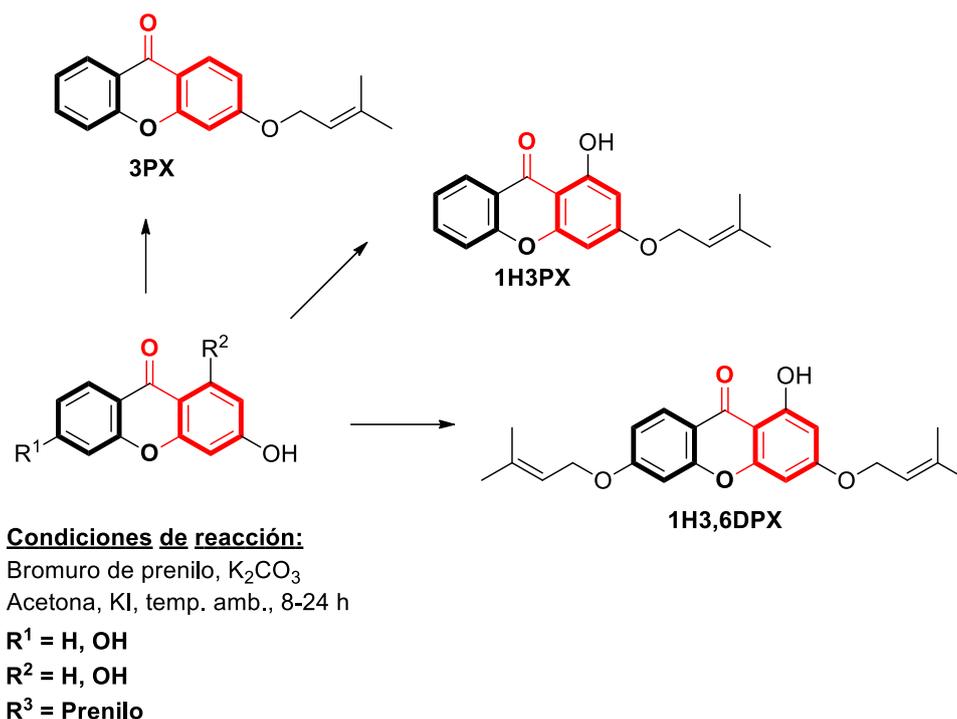


Figura 6.3. O-prenilación de hidroxixantonas

Se prepararon liposomas de DPPC-XAs con un X_{XAs} de 0.3, donde X_{XAs} es la fracción molar de xantonas en las mezclas de liposomas, utilizando la técnica descrita en un trabajo anterior.⁵⁶ La concentración final fue de aproximadamente 3.5 mM para todas las dispersiones acuosas de MLV. Todos los derivados de xantona se estudiaron en MLVs de DPPC, hidratando con agua milli-Q. Se prepararon liposomas de DPPC-COL con una fracción molar de colesterol de 0.3, utilizando la misma técnica y se continuó estudiando el comportamiento específico de 3PX. Las bicapas reconstruidas típicamente pueden acomodar un máximo de colesterol de aproximadamente 50 mol%. La relación 70:30, que se utiliza con mayor frecuencia en la literatura, asegura la estabilidad liposomal y promueve condiciones óptimas para la liberación del fármaco.³⁰²⁻³⁰⁴

Se prepararon liposomas de DPPC-COL-3PX con un X_{COL} de 0.3 en relación al DPPC y un X_{3PX} de 0.3 en relación a la mezcla de lípidos. Las películas de DPPC-3PX y DPPC-COL-3PX se disolvieron tanto en agua milli-Q (pH 5.5) como en buffer HEPES (10 mM, pH 7.4).

6.3 Métodos

Las densidades (ρ) y las velocidades del sonido (u) se determinaron simultáneamente utilizando un instrumento comercial de densidad y velocidad del sonido (densímetro y analizador de velocidad del sonido Anton-Paar DSA 5000), tal como se describe en un trabajo anterior de este grupo.⁵⁶ Las mediciones se realizaron en el rango de 50°C a 25°C, disminuyendo sucesivamente la temperatura. Los incrementos de concentración de la velocidad del sonido [u], los volúmenes parciales específicos aparentes φ_v y la compresibilidad adiabática específica φ_k/β_0 se calcularon de acuerdo con el trabajo de Rybar y colaboradores.²¹⁰

La compresibilidad adiabática específica del lípido se calcula mediante los incrementos de concentración de velocidad del sonido, volumen parcial específico aparente y compresibilidad adiabática del solvente (β_0) mediante³⁰⁵:

$$\beta_{lipido} = \beta_0 \left(2 - \frac{[u]}{\varphi_v} \right)$$

Finalmente, el módulo de compresibilidad volumétrico se obtiene al calcular la inversa de la compresibilidad adiabática aparente del lípido:

$$K = 1/\beta_{lipid}$$

El método de potencial zeta permite la determinación de las características de carga superficial y fluidez, tal como se describe en trabajos previos del grupo.²³⁷ El potencial Zeta (ζ) y la conductividad de los liposomas de DPPC, DPPC-XAs, DPPC-COL y DPPC-COL-XAs se obtuvieron mediante un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Se realizaron mediciones en el rango de 50°C a 25°C, disminuyendo sucesivamente la temperatura y permitiendo que la muestra alcanzara el equilibrio entre las mediciones. Se registró un punto cada 2°C con un período de estabilización de 5 minutos a una temperatura constante antes de realizar la medición. El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron mediante el mismo equipo tras hidratar e incubar a 37°C durante un período de siete días.

Para determinar la eficacia de encapsulamiento (EE), se llevó a cabo la preparación e hidratación de los liposomas, seguido de una centrifugación y liofilización del sobrenadante sobre el que se determinó la concentración de xantona no incorporada de acuerdo a la metodología descrita por Dzoyem y colaboradores³⁰⁶. Se utilizó una centrífuga Sigma 2K15 a 8000 rpm por 60 minutos a 5°C, un liofilizador Rificor L-A-B4 y un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 a 300 nm, con un λ óptimo determinado a través de un *scan* de barrido previo (200-600 nm).

Los valores de concentración fueron extraídos de la curva de calibrado obtenida a partir de soluciones de concentración creciente del compuesto de interés, al determinarse la absorbancia de la muestra retomada en el mismo solvente, considerando que la cantidad encapsulada y la fracción libre suman el total utilizado de dopante, de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Eficacia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{dopante encapsulado} \times 100}{\text{dopante encapsulado} + \text{dopante libre}}$$

La integridad y potencial pérdida del compuesto en el tiempo se estudió preparando siete muestras de acuerdo al mismo protocolo, los tiempos de incubación fueron consecutivamente de 1 a 7 días, y cada muestra fue centrifugada y su sobrenadante, liofilizado. El sólido remanente fue retomado en cloroformo y se llevaron a cabo las mediciones de acuerdo al protocolo que se detalló anteriormente.

Las medidas de calorimetría se realizaron utilizando un calorímetro de barrido diferencial modelo Q20 de TA Instruments. Las muestras de liposomas se colocaron en cápsulas herméticas para DSC. Las medidas de calorimetría se realizaron para cada mezcla entre 25 y 50 °C, a una velocidad de calentamiento de 0.5°C por minuto. La disrupción de la integridad de los liposomas se evaluó tras incubar a 37 °C las dispersiones de MLV, y se analizaron a lo largo de un período de 7 días. Los datos reportados son el promedio de tres lotes diferentes de cada muestra.

6.4 Discusión

El sistema de estudio elegido para aplicar y examinar el módulo de compresibilidad volumétrica es el liposoma compuesto por DPPC, Colesterol y 3PX. Además, se realizaron estudios de los sistemas DPPC-COL y DPPC-COL-3PX en agua y en solución de buffer HEPES. El uso de un buffer no solo nos permitió replicar condiciones de pH fisiológico, sino que también facilitó el examen de los efectos de los iones del medio en la superficie liposomal, junto con las posibles consecuencias que estas interacciones puedan tener en las propiedades mecánicas del liposoma. Es importante señalar que, incluso en agua, la presencia de carga superficial se origina a partir de la estructuración lipídica.²⁵⁴ Por otro lado, aunque los estudios son dependientes de la temperatura, el análisis se centra particularmente en la temperatura fisiológica (37°C).

Si bien no formaron parte protagónica de este estudio, ensayos adicionales fueron llevados a cabo a modo exploratorio utilizando como efectores 1H3PX y 1H3,6DPX. Los resultados obtenidos se comentan a modo ilustrativo, pero no constituyen el foco del desarrollo de este trabajo. Análisis mediante potencial zeta, dilatometría, y densitometría y velocidad de ultrasonido se combinaron para estudiar las características de superficie de liposomas de DPPC-XAs en función de la temperatura, con agua milli-Q como medio de dispersión. Los resultados se muestran en la Figura 6.4.

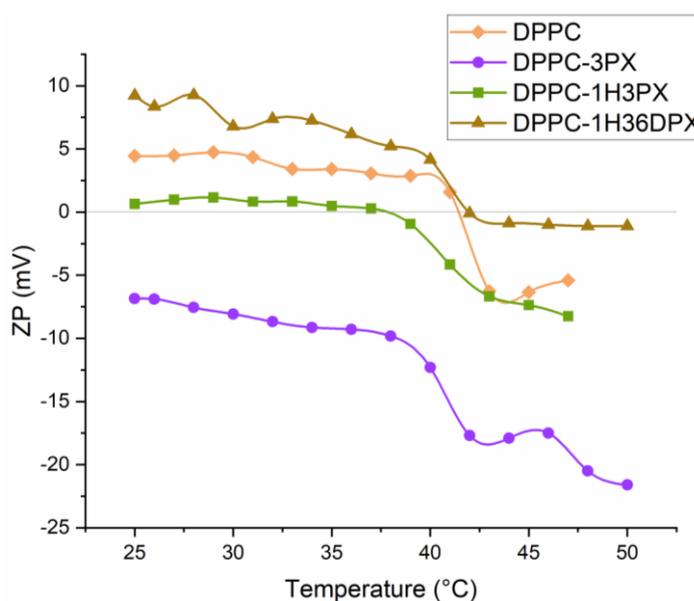


Figura 6.4. Potencial zeta vs. temperatura para liposomas de tipo MLV, compuestos de DPPC con y sin xantonas.

Se puede observar que los potenciales exhibidos por los sistemas que contienen derivados de xantona O-prenilados son relativamente similares al que corresponde al sistema de DPPC puro. Esto sucede a lo largo de todo el rango de temperatura estudiado, es decir, tanto en estado sólido, como líquido cristalino, excepto para aquellos que contienen como efector al compuesto 3PX.

El sistema DPPC-3PX muestra un potencial zeta negativo de mayor magnitud que todos los otros sistemas compuestos y que el lípido puro. Si se analiza la temperatura de transición, que tiene lugar en el punto en que el descenso de los valores de potencial zeta es más abrupto y puede ser calculado mediante la derivada de la curva ajustada, el menor valor se obtiene para el sistema DPPC-3PX. Los valores de las diferentes temperaturas de transición para los diversos sistemas se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Temperaturas de transición obtenidas mediante tratamiento matemático de las curvas de potencial zeta y densitometrías para DPPC y DPPC-XAs en agua milli-Q.

<i>Sistema</i>	<i>T_m (°C)</i> <i>Potencial Zeta</i>	<i>T_m (°C)</i> <i>Densitometría</i>
<i>DPPC</i>	41.6	41.3
<i>DPPC-3PX</i>	39.5	39.3
<i>DPPC-1H3PX</i>	40.5	39.9
<i>DPPC-1H3,6DPX</i>	40.4	39.9

A continuación, se calcularon los incrementos de concentración de velocidad de ultrasonido, el volumen específico y la compresibilidad adiabática específica para vesículas de DPPC puro y de DPPC-XAs a temperaturas decrecientes.

La Figura 6.5, A), muestra el comportamiento de los liposomas con el declive típico para el DPPC alrededor del punto en que tiene lugar la temperatura de transición de fase principal, con un ligero desplazamiento a temperaturas menores y con una amplitud menor para los liposomas que contienen xantonas. La presencia de xantonas O-preniladas afecta [u] en mayor proporción en la fase líquido cristalina.

Considerando el efecto de la capa de hidratación en el sistema lípido-efector en lo que refiere a la compresibilidad y, por ende, a las propiedades mecánicas de los mismos, se determinó el volumen específico tal como se muestra en la Figura 6.5, B).²⁸⁶ Como es de esperarse, ϕ_v aumenta al incrementarse la temperatura, partiendo desde un sistema que se encuentra en fase sólido-cristalino, hacia uno que se encontrará en fase líquido-cristalino. Se puede apreciar que el volumen específico de los liposomas de DPPC puro tiende a ser mayor que el de aquellos que contienen efector, reflejando una bicapa lipídica menos compacta.

Los resultados de ϕ_k/β_0 se muestran en Figura 6.5 C). Tanto un aumento en el desorden de la zona hidrofóbica de las bicapas, como de su esfera de hidratación, serían responsables por el aumento de la compresibilidad adiabática al incrementarse la temperatura.²⁸⁶ En el estado líquido-cristalino, la membrana compuesta de DPPC-3PX muestra la menor compresibilidad de entre todos los sistemas. En estado sólido-cristalino, las curvas no muestran diferencias significativas en la mayoría de los casos estudiados, a excepción de la bicapa que contiene 3PX, que también exhibe la menor compresibilidad.

Las fluctuaciones en el volumen de la bicapa lipídica podrían atribuirse a la inducción de un estado de mayor orden, principalmente en el área hidrofóbica de la bicapa,²²⁶ coincidente con la disminución de compresibilidad adiabática específica observada. Este efecto se observa más acentuado en el estado líquido-cristalino, que en el estado sólido-cristalino. Como se ha mencionado previamente, la forma planar propia de este tipo de compuestos daría lugar un empaquetamiento eficiente del efector entre las colas hidrocarbonadas de los lípidos, disminuyendo la compresibilidad.

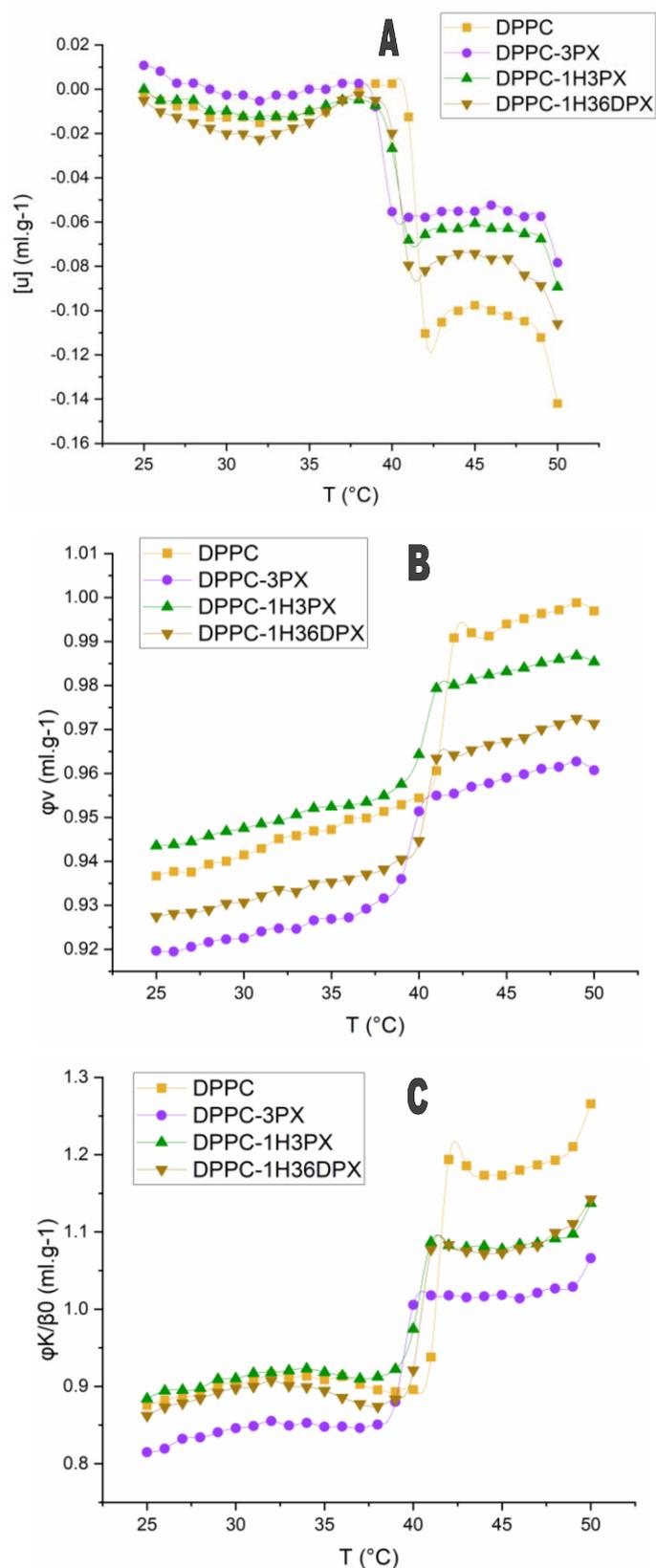


Figura 6.5. Gráfico de (A) incremento de la concentración de velocidad de ultrasonido, $[u]$; (B) volumen específico, φ_v ; (C) compresibilidad adiabática específica, φ_{κ/β_0} , vs. Temperatura para una suspensión acuosa de MLVs compuestos de DPPC con y sin xantonas O-preniladas.

En resumen, todos los sistemas estudiados muestran un incremento en la concentración de velocidad de ultrasonido y una reducción en el volumen específico y la compresibilidad adiabática al incorporarse los efectores, con las mayores diferencias observándose para el sistema que contiene 3PX.

Además, para todos los sistemas estudiados se observa que al disminuirse la cantidad de grupos sustituyentes sobre el andamiaje xantona, la T_m tiende a desplazarse a menores temperaturas Tabla 6.1. Esta tendencia implica que el compuesto con un efecto más pronunciado sobre las características fisicoquímicas de la bicapa sería 3PX, con lo cual se planteó como el óptimo para continuar con ensayos más complejos que involucran nuevas variables. Se incluyó dentro de las variables de interés el uso de colesterol en el ensamblaje del liposoma a estudiar, que como se ha mencionado previamente en este capítulo, cumple un rol clave en la estabilidad de este tipo de sistemas.

La velocidad ultrasónica y la densidad de los liposomas de DPPC-COL-3PX se midieron en agua y en el buffer HEPES, lo cual permitió el cálculo del volumen específico y el módulo de compresibilidad volumétrica de las vesículas, como se detalla en la sección de métodos de este capítulo. Todas las figuras muestran la ausencia característica del salto correspondiente a la temperatura de transición debido a la presencia del colesterol.

Las figuras 6.4, 6.5 y 6.6 muestran el comportamiento del liposoma en un medio acuoso ácido, con y sin la adición de xantona. La presencia del efector resulta en un volumen ligeramente menor de lípidos (Figura 6.6). En consecuencia, la estructura lipídica se compacta lateralmente, como indica el factor de compresibilidad (Figura 6.7). El efecto limitado de la xantona en la estructuración lipídica se refleja en el módulo de elasticidad, que prácticamente no muestra diferencias para el liposoma en presencia o ausencia de xantona. Específicamente, a la temperatura fisiológica de 37°C, la variación de K_{lip} entre los dos sistemas, con y sin 3PX como efector, es insignificante (Figura 6.8).

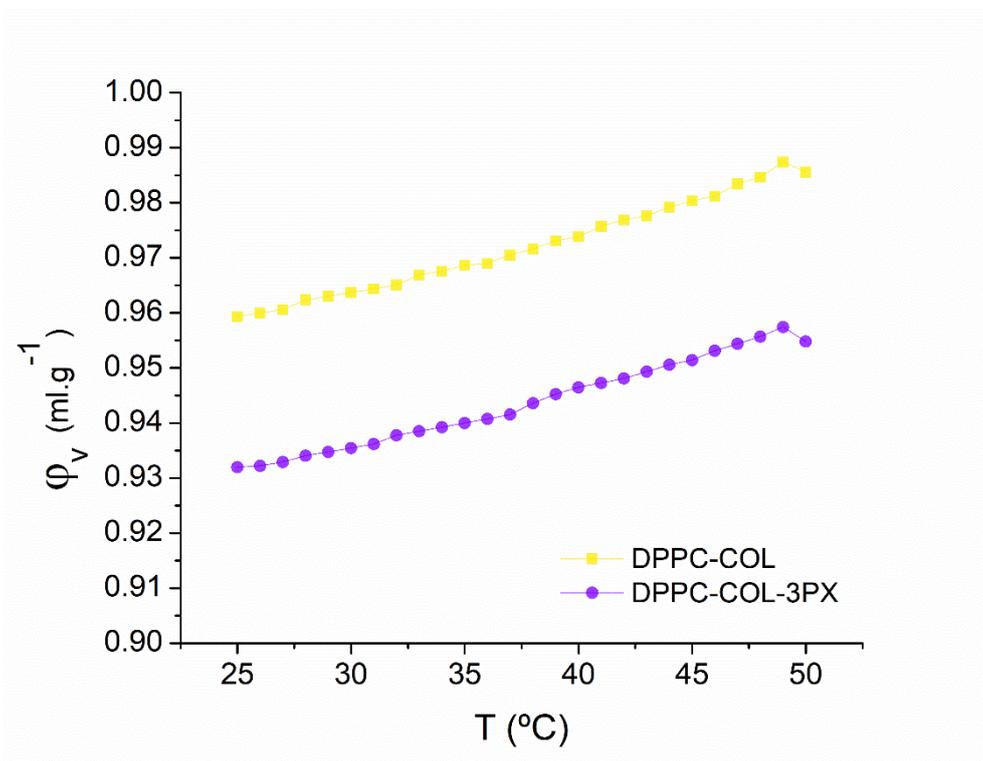


Figura 6.6. Volumen específico ϕ_v para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión acuosa de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

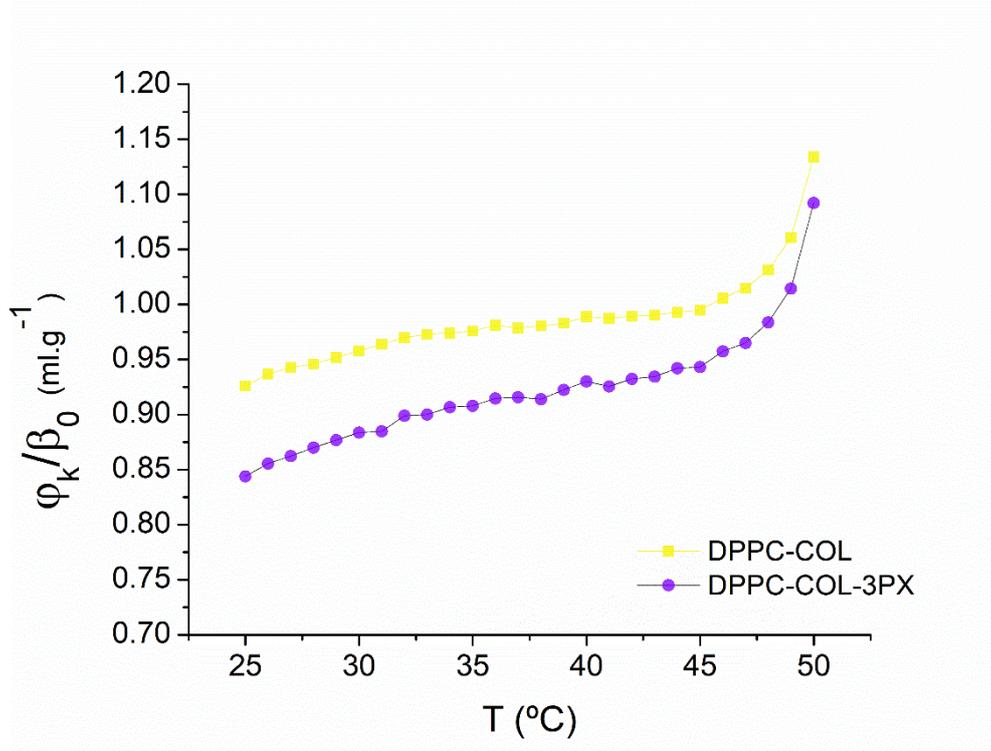


Figura 6.7. Compresibilidad adiabática ϕ_k/β_0 para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión acuosa de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

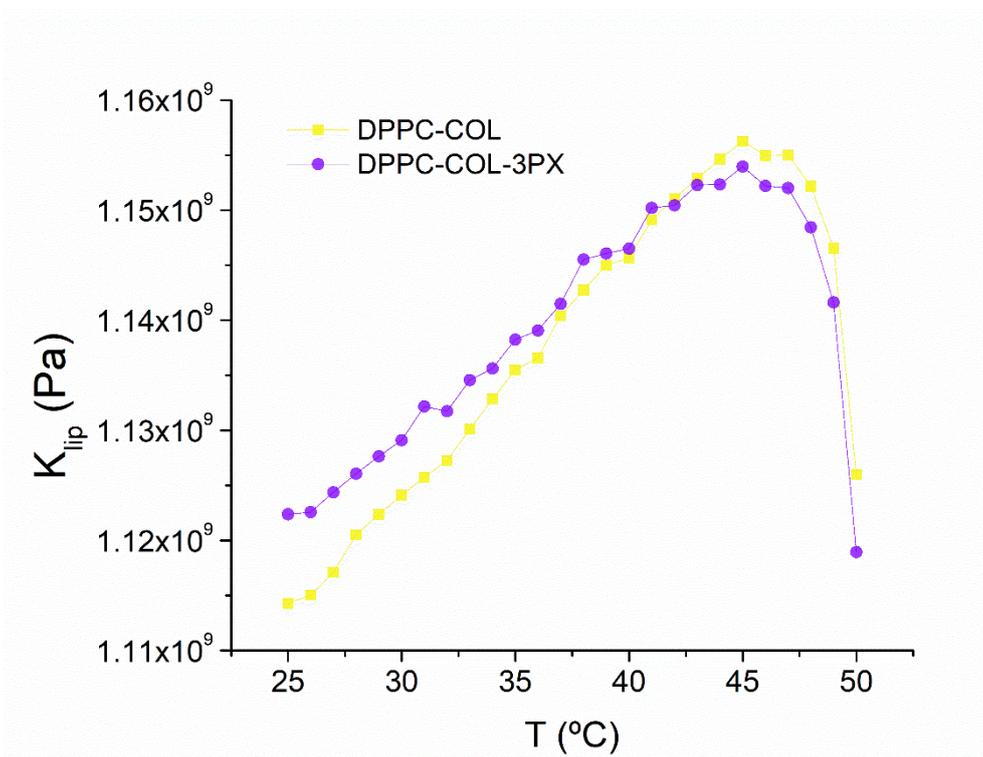


Figura 6.8. Módulo de compresibilidad volumétrica K_{ip} para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión acuosa de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

El comportamiento del liposoma cambia sustancialmente en sus propiedades mecánicas con la introducción del efector cuando el medio es neutro, en presencia del buffer HEPES. No solo se observan cambios más pronunciados en los parámetros mecánicos, sino que también el comportamiento se invierte en comparación con el comportamiento del liposoma en agua.

Inicialmente, el volumen aumenta en presencia del efector (Figura 6.9). Los iones del buffer presentes en el medio establecen una interacción con el oxígeno del colesterol. Esta interacción se vería afectada por la presencia del efector, que, dadas sus características moleculares planas, se alinearían paralelas al lípido como se determinó previamente en nuestra investigación,⁵⁶ permitiendo que el volumen aumente. Claramente, este efecto se refleja en el aumento de la compresibilidad del liposoma (Figura 6.10) y de la magnitud del módulo de elasticidad volumétrica (Figura 6.11).

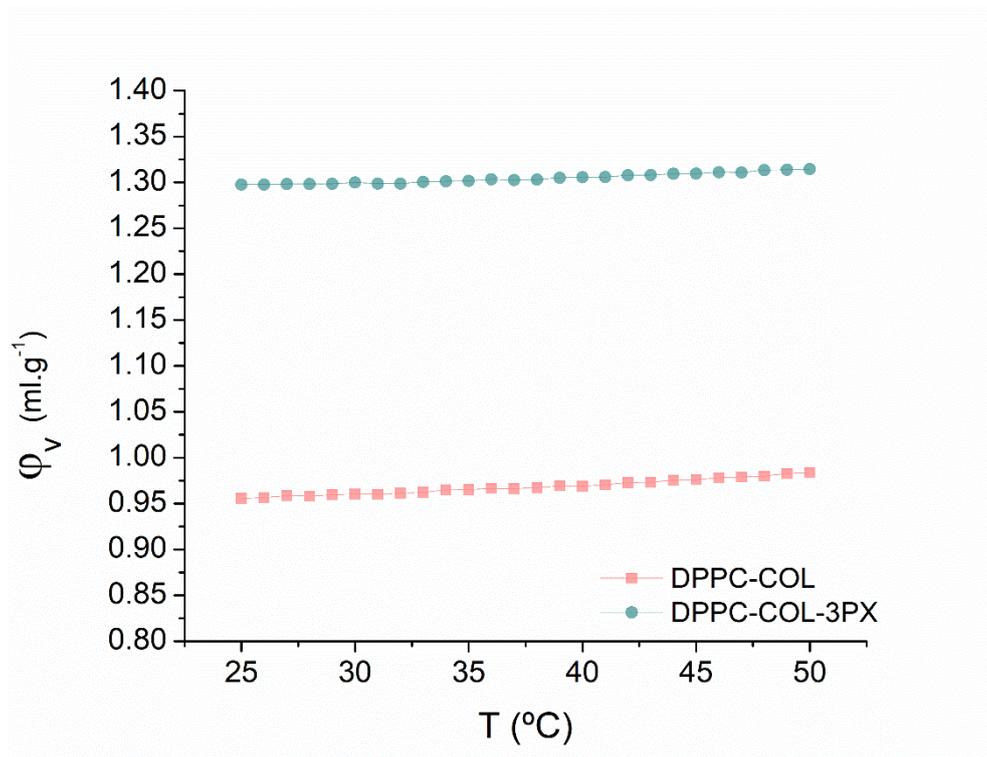


Figura 6.9. Volumen específico ϕ_v para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión en HEPES de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

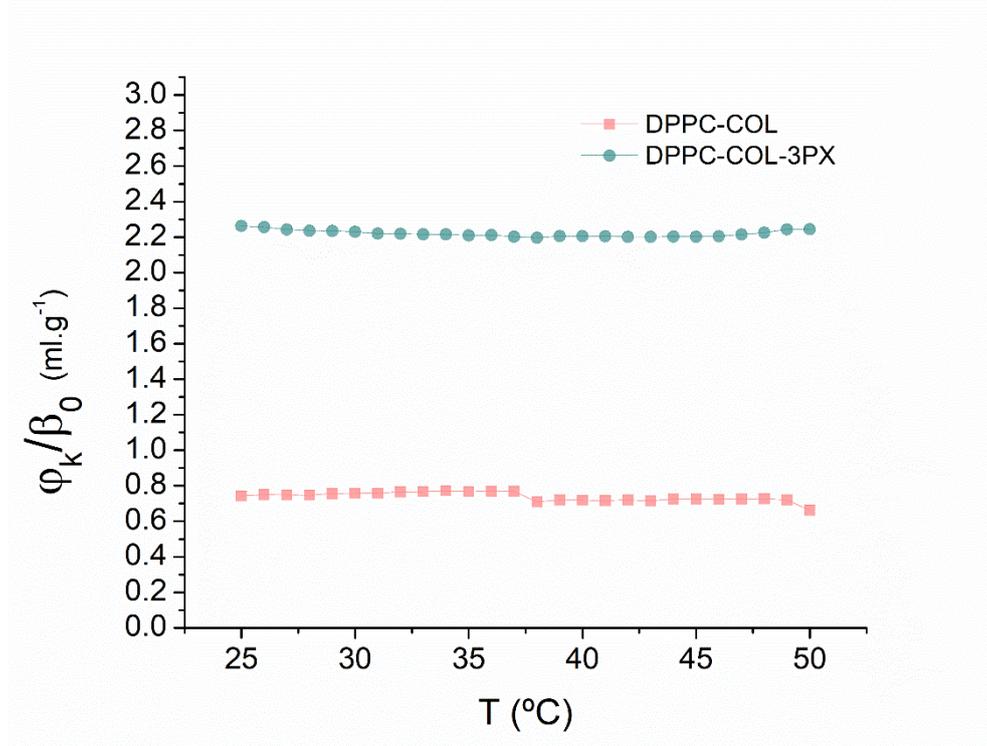


Figura 6.10. Compresibilidad adiabática ϕ_k/β_0 para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión en HEPES de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

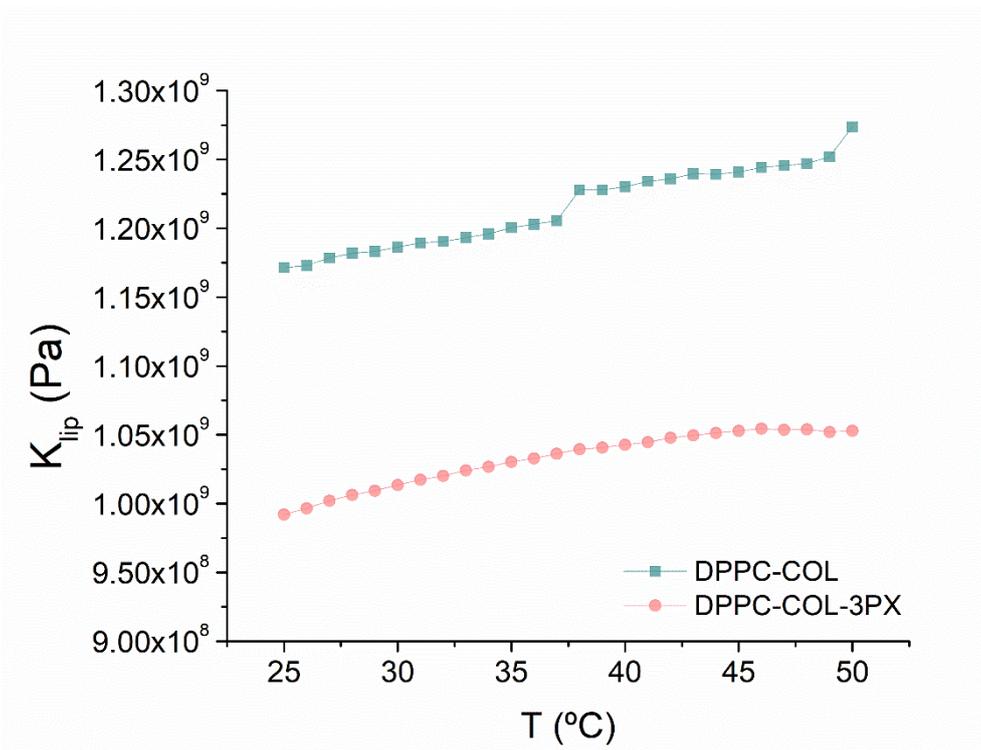


Figura 6.11. Módulo de compresibilidad volumétrica K_{ip} para DPPC-COL y DPPC-COL-3PX vs. temperatura para una suspensión acuosa de MLVs. En todos los casos, los resultados presentaron una desviación estándar menor al 10% y son resultado del promedio de tres réplicas.

En cuanto a las propiedades mecánicas, los sistemas propuestos demostraron ser susceptibles al entorno. La Tabla 6.2 muestra la comparación de las propiedades mecánicas en diferentes medios para el liposoma DPPC-Colesterol-3PX a 37°C. Se puede observar que a pH fisiológico presentan una magnitud de módulo de elasticidad volumétrica inferior a la de aquellos en agua.

Tabla 6.2. Comparación de las propiedades mecánicas en diferentes medios para liposomas de tipo MLV de DPPC-COL-3PX a 37 °C.

<i>Medio</i>	$\varphi_v(mL.g^{-1})$	$\varphi_k/\beta_0(mL.g^{-1})$	$K_{ip}/10^9(Pa)$
<i>Agua</i>	0.94±0.02	0.92±0.01	1.14±0.03
<i>HEPES</i>	1.30±0.03	2.20±0.05	1.04±0.02

Se han informado muy pocos estudios sistemáticos con relación a las características fisicoquímicas de los liposomas a diferentes valores de pH y temperaturas. Zhang y colaboradores,³⁰⁷ documentaron que el pH y la temperatura tienen un efecto en el grado de

hidrólisis de fosfolípidos, influyendo en la longevidad de los liposomas. Del mismo modo, Sulkowski y colaboradores, ³⁰⁸ observaron que la flexibilidad de la membrana aumenta a medida que suben el pH y la temperatura. La protonación de fosfolípidos ocurre a niveles de pH más bajos, dando lugar a un enlace de hidrógeno que rigidiza. Roy y colaboradores, ³⁰⁹ corroboraron que todos los sistemas estudiados se volvían más rígidos con el aumento de acidez del medio según los resultados de DSC debido al incremento de enlaces de hidrógeno entre moléculas de fosfolípidos.

Aplicando el módulo de elasticidad volumétrica y de acuerdo con los resultados encontrados en la literatura mediante otras técnicas, nuestros hallazgos, reflejados en la magnitud de K_{lip} , demuestran la importancia del medio en relación con la obtención de un liposoma más o menos rígido.

Los resultados de las propiedades mecánicas del liposoma propuesto en relación con su estabilidad se correlacionan con los resultados del estudio de su potencial zeta. La carga superficial juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los liposomas. Los procesos de agregación y fusión de liposomas están en gran medida controlados por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas. ³¹⁰ Si todas las partículas en suspensión presentan un potencial zeta alto negativo o positivo, tienden a repelerse entre sí, y no habrá tendencia a la agregación de las mismas. ²⁸⁴

Los sistemas que incluyen DPPC en agua como medio dispersante exhibieron carga superficial a pesar de que DPPC es un lípido zwitteriónico. Este fenómeno ha sido observado y explicado por un trabajo previo de este grupo. ²⁵⁴ La Figura 6.12 muestra el potencial zeta de los sistemas estudiados. Los liposomas que contienen 3PX en solución de buffer muestran un potencial negativo de mayor magnitud, lo cual indicaría una mayor estabilidad de la suspensión liposomal y una reducida tendencia a la agregación.

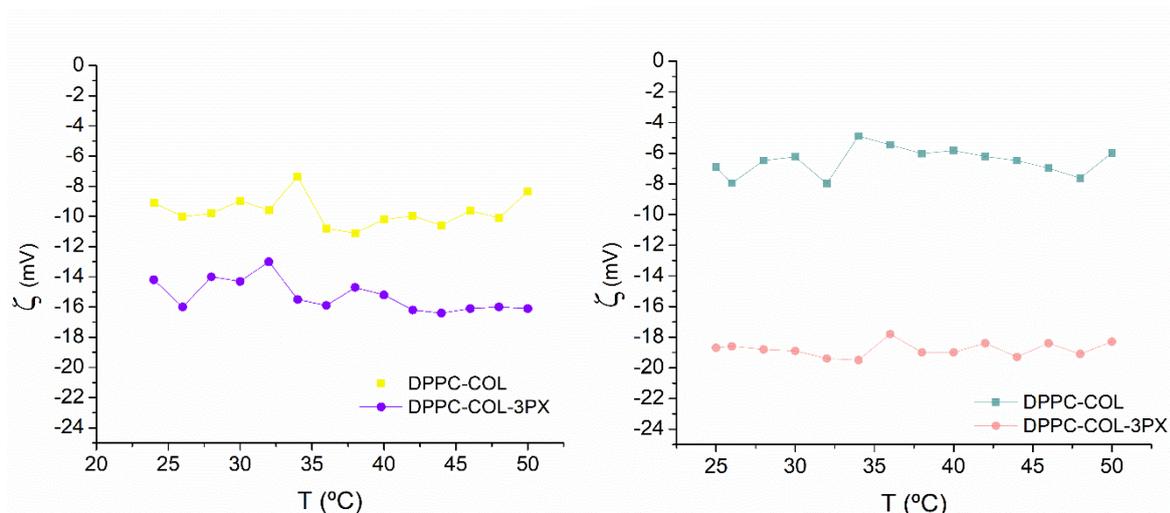


Figura 6.12. Potencial Zeta vs. temperatura de DPPC-COL y DPPC-COL-3PX en agua (izquierda) y buffer HEPES (derecha). En todos los casos, la desviación estándar fue menor al 10% y no se muestra para permitir una clara visualización. Los datos reportados corresponden a un promedio entre tres réplicas de las muestras.

También se puede observar la influencia de los iones del medio en el liposoma, especialmente los cationes de sodio, ya que la unión del grupo colesterol-fosfatidilcolina prevalece sobre la del ion Na^+ al grupo fosfatidilcolina. Como resultado, los iones son liberados desde la interfaz agua-membrana hacia la fase acuosa.³¹¹ Este efecto se refleja en el potencial menos negativo exhibido por los liposomas DPPC-COL en el buffer, en comparación con los de agua.

Si bien el estudio de las propiedades mecánicas, en particular del módulo elástico volumétrico, constituye el enfoque central en esta evaluación de la estabilidad termodinámica de los liposomas, se realizó una investigación complementaria sobre su estabilidad cinética. Para evaluar esto, se llevaron a cabo experimentos durante un período de 7 días para evaluar la integridad del liposoma y la posible fuga del efector. Los cambios en la suspensión liposomal en función del tiempo se observaron mediante espectroscopía UV-Vis, DLS y DSC. Esta investigación complementaria proporciona información sobre la estabilidad cinética de las formulaciones. Los datos obtenidos se muestran en las Figuras 6.13 a 6.15.

La eficiencia de encapsulación de la formulación liposomal para 3PX, en agua y buffer, se obtuvo como se describe en la sección de métodos. En todos los casos, los valores de EE indicaron que más del 90% de la cantidad inicial de 3PX estaba encapsulada. Este resultado es de interés, pero no necesariamente sorprendente, ya que estos liposomas son MLVs. Dado

que varían en el número de bicapas lipídicas y tienen un volumen de encapsulación acuoso bajo, serían adecuados para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos que interactúan con la bicapa.²⁷⁸

Como ejemplo, la Figura 6.13 ilustra la EE para el sistema DPPC-COL-3PX a lo largo del tiempo. Los resultados demuestran que el sistema mantiene la integridad liposomal durante el período estudiado, ya que la fuga de 3PX es mínima.

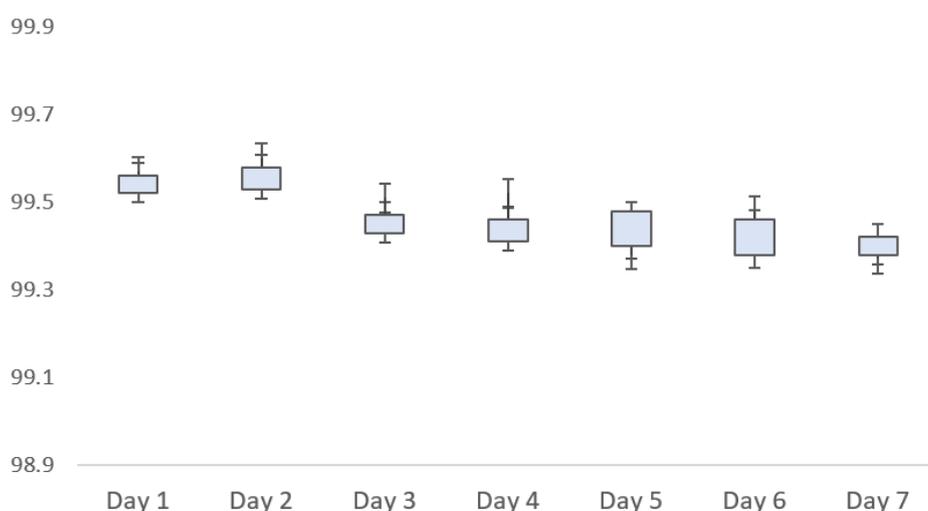


Figura 6.13. Porcentaje de 3PX encapsulada en MLVs compuestos de DPPC-COL retenida a lo largo de un período de 7 días en buffer HEPES a 37 °C.

Asegurar una alta encapsulación y retención del fármaco dentro de los liposomas es crucial para el desarrollo de transportadores de fármacos eficaces.²⁷⁸ En el caso de los liposomas, la eficiencia de encapsulación de los posibles fármacos siempre depende de su miscibilidad en la mezcla lipídica del sistema portador. Tanto la estabilidad de la formulación final como la biodisponibilidad del fármaco se determinan por la miscibilidad. El objetivo final de la formulación es aumentar la biodisponibilidad.³¹²

La técnica de dispersión de luz dinámica destaca como una de las metodologías empleadas con frecuencia en el análisis de nanopartículas ya que ofrece resultados relativamente precisos y consistentes. Además, la ventaja de la DLS radica en su eficiencia, ya que puede completarse en un período de tiempo relativamente corto, generalmente alrededor de 10

minutos. Como resultado, la DLS ha surgido como la técnica preferida para evaluar rutinariamente el tamaño de las nanopartículas.

La Figura 6.14 muestra los resultados obtenidos para DPPC-COL-3PX a 37 °C en medio HEPES durante un período de 7 días. El análisis del gráfico revela que el tamaño de las partículas suspendidas permanece aproximadamente constante a lo largo del tiempo durante el período de estudio. Esta observación es consistente con los resultados obtenidos del análisis de potencial zeta, que indican un valor apreciable en el potencial de superficie en el sistema estudiado.

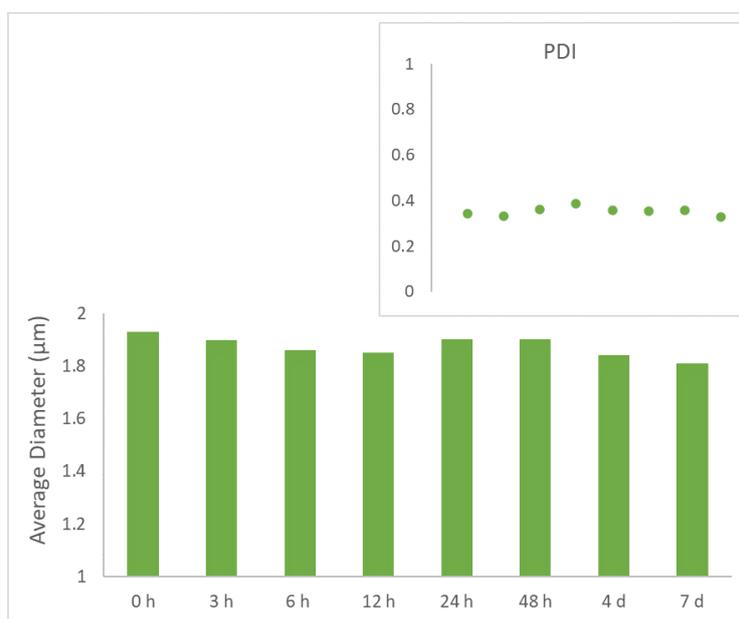


Figura 6.14. Tamaño de partícula observado mediante determinación de distribución de tamaño en preparaciones de liposomas de DPPC-COL-3PX a lo largo de un período de 7 días. El gráfico inserto muestra una determinación de PDI para cada punto medido. Los datos reportados son promedio de tres réplicas.

En cuanto a la composición química y las características físicas, especialmente el tamaño, de los liposomas, la utilización de la calorimetría diferencial de barrido tiene un potencial significativo como técnica robusta para garantizar el control de calidad. Al establecer parámetros calorimétricos adecuados utilizando una muestra de lípido de referencia apropiada, el método de DSC permite la evaluación de la calidad y estabilidad de una formulación mediante el análisis de perfiles térmicos distintivos. Además, la ausencia de variaciones temporales en los resultados de DSC para una preparación liposomal específica, ya sea que contenga un medicamento o no, indica la estabilidad química y física de los

liposomas. La Figura 6.15 muestra los termogramas dependientes del tiempo para el nanosistema DPPC-COL-3PX.

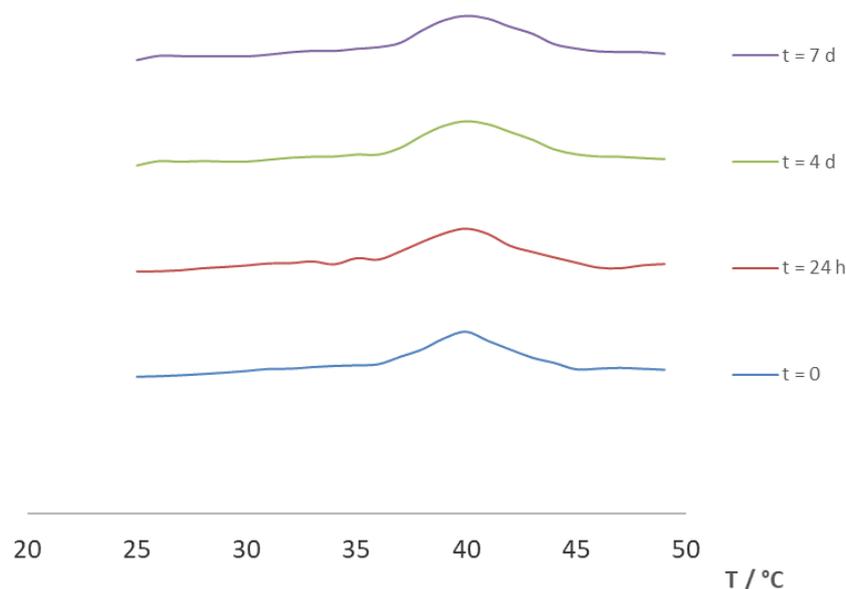


Figura 6.15. Cascada de termogramas de MLVs constituidos por DPPC-COL-3PX en buffer HEPES, obtenidos mediante DSC en función del tiempo.

Los termogramas del sistema DPPC-COL-3PX muestran el comportamiento esperado para liposomas con la proporción específica de colesterol bajo investigación. También muestran consistencia temporal indicada por la forma sostenida de los termogramas. Estos hallazgos, sumados a los resultados obtenidos mediante las otras técnicas mencionadas, sugieren que los liposomas mantienen su integridad estructural a lo largo de la duración del estudio.

6.5 Conclusiones

En este estudio, se ha explorado la posibilidad de determinar la rigidez a través del Módulo de Compresibilidad Volumétrica con técnicas relativamente simples y no invasivas, como la Velocimetría por Ultrasonido y la densitometría. El análisis de la rigidez de los sistemas de liposomas a través de estos medios no ha sido llevado a cabo, hasta donde llega nuestro conocimiento.

El módulo de compresibilidad volumétrica, a diferencia del ampliamente utilizado módulo de Young, actúa como una medición de rigidez más representativa para sistemas como los liposomas, dadas las heterogeneidades de estas vesículas. Con el propósito de estudiarlo, se diseñó un sistema de liposomas compuesto por DPPC y Colesterol como portador de una xantona *O*-prenilada potencialmente bioactiva (3PX). Los resultados indicaron que, bajo condiciones de pH y temperatura fisiológicas, el sistema mencionado cumple con características prometedoras de integridad y estabilidad. La estabilidad exhibida por este portador, tanto termodinámicamente como cinéticamente, es notable.

Esta caracterización fisicoquímica integral del liposoma propuesto no solo enfatiza un aspecto escasamente investigado como la rigidez liposomal, sino también la importancia de considerar la influencia que el entorno tiene en relación con la elasticidad de la nanopartícula con respecto al uso específico previsto.

Capítulo 7: Conclusiones generales

Respecto de la primera parte del presente trabajo de tesis, se destaca el aporte significativo de este estudio al campo de la química orgánica verde, mediante el desarrollo de tres metodologías innovadoras y eco-amigables para la síntesis eficiente de heterociclos tricíclicos fusionados de nitrógeno (carbazoles y acridonas) y oxígeno (xantonas). La combinación estratégica de la catálisis heterogénea y la síntesis asistida por microondas ha demostrado ser excepcionalmente poderosa, superando limitaciones comunes asociadas con nuevos protocolos de síntesis.

A lo largo de la investigación, se ha observado que muchos de los nuevos protocolos de síntesis suelen requerir precursores complejos, catalizadores de elevado valor no recuperables, o el uso de ligandos fosfina y/o aditivos. En contraste, las estrategias sintéticas propuestas en este trabajo destacan por su eficiencia y sostenibilidad. La utilización de catalizadores heterogéneos meticulosamente preparados ha proporcionado ventajas clave en términos de reactividad, selectividad y reutilización, superando la necesidad de catalizadores costosos y no recuperables.

Simultáneamente, la síntesis asistida por microondas ha contribuido a la reducción significativa de los tiempos de reacción, sin depender del uso de precursores complejos o de la inclusión de ligandos tóxicos y/o costosos. Este enfoque sinérgico no solo acelera las transformaciones químicas, sino que también promueve condiciones de reacción más suaves y sostenibles desde una perspectiva ecológica, destacando así la importancia de abordar las limitaciones inherentes a muchos de los protocolos sintéticos actuales.

Estas metodologías ofrecen rutas sintéticas novedosas para la obtención de heterociclos tricíclicos fusionados de nitrógeno y oxígeno, al mismo tiempo que abordan y superan las restricciones asociadas comúnmente con los nuevos enfoques sintéticos. Este enfoque estratégico no solo representa un avance significativo en el campo de la química orgánica, sino que también destaca la importancia de desarrollar metodologías eficientes y sostenibles en la síntesis de compuestos heterocíclicos.

En relación a la segunda parte, hemos estudiado la aplicación de uno de los andamiajes privilegiados, el enfoque se trasladó a la exploración de la interacción de las xantonas sobre membranas biomiméticas y liposomas. En el caso de las membranas biomiméticas de DPPC y DMPC, se observa que las xantonas inducen un estado de empaquetamiento más compacto, generando perturbaciones en las interacciones laterales de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Este efecto no presenta una relación trivial con las características de compresibilidad y fluidez de la membrana, resaltando la complejidad de las interacciones introducidas por las xantonas. Para las membranas de células bacterianas de POPE y POPG, aún en una fase preliminar, los estudios se enfocan en las variaciones de potencial zeta en presencia y ausencia del efector, y se encuentra en desarrollo el estudio de las propiedades mecánicas como volumen aparente, compresibilidad adiabática y elasticidad. Se anticipa que la presencia de xantonas desestabilizará la interfaz hidrofóbico-agua, generando cambios en las propiedades elásticas de la membrana, con futuros análisis por TEM y ensayos *in vivo*.

Por otro lado, se aborda el uso de xantonas en liposomas propuestos como potencial herramienta para el transporte de fármacos. El estudio destaca la determinación de la rigidez a través del Módulo de Compresibilidad Volumétrica, utilizando técnicas no invasivas como la Velocimetría por Ultrasonido y la densitometría. Esta aproximación innovadora revela características prometedoras de integridad y estabilidad en el sistema de liposomas propuesto, subrayando la importancia de considerar el entorno en relación con la elasticidad de la nanopartícula para su uso específico.

En resumen, este trabajo no solo contribuye significativamente al avance de la química orgánica con metodologías eficientes y sostenibles, sino que también aporta a la comprensión de las interacciones de efectores de características particulares y numerosas potenciales aplicaciones en diversos campos de la farmacología, tales como son las xantonas, con membranas biomiméticas y liposomas, abriendo nuevas perspectivas en la síntesis y aplicaciones de compuestos heterocíclicos.

Referencias

- (1) Yin, P.; Zhang, J.; Imler, G. H.; Parrish, D. A.; Shreeve, J. M. *Angew. Chemie* **2017**, *129*, 8960.
- (2) Zhang, Y. C.; Jiang, F.; Shi, F. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 425.
- (3) Ledwon, P. *Org. Electron.* **2019**, *75*, 105422.
- (4) Gao, H.; Zhang, G. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 5455.
- (5) Akao, Y.; Nakagawa, Y.; Iinuma, M.; Nozawa, Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 355.
- (6) Valdés, A. F.-C. *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 11.
- (7) Waszkielewicz, A. M.; Słoczyńska, K.; Pękala, E.; Żmudzki, P.; Siwek, A.; Gryboś, A.; Marona, H. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 339.
- (8) O'Brien, W. M.; Bagby, G. F. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **1987**, *7*, 16.
- (9) Pinto, M. M. M.; Sousa, M. E.; Nascimento, M. S. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2517.
- (10) Busacca, C. A.; Fandrick, D. R.; Song, J. J.; Senanayake, C. H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1825.
- (11) Pedro, M.; Cerqueira, F.; Sousa, M. E.; Nascimento, M. S. J.; Pinto, M. *Bioorganic Med. Chem.* **2002**, *10*, 3725.
- (12) Klein-Júnior, L. C.; Campos, A.; Niero, R.; Corrêa, R.; Vander Heyden, Y.; Filho, V. C. *Chem. Biodivers.* **2020**, *17*.
- (13) Rech, J.; Sypniewski, D.; Żelazczyk, D.; Szkaradek, N.; Rogóż, W.; Waszkielewicz, A.; Marona, H.; Bednarek, I. *Biomolecules* **2021**, *11*.
- (14) Pinto, E.; Afonso, C.; Duarte, S.; Vale-Silva, L.; Costa, E.; Sousa, E.; Pinto, M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 212.
- (15) Shagufta; Ahmad, I. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *116*, 267.
- (16) Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.;

- Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Cerino, D. J.; Chen, T. B.; Kling, P. J.; Kunkel, K. A.; Springer, J. P.; Hirshfield, J. J. *Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235.
- (17) Yet, L. *Privileged Structures in Drug Discovery: Medicinal Chemistry and Synthesis*, **2018**.
- (18) Wezeman, T.; Masters, K.-S. *Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation*; Bräse, S., Ed.; The Royal Society of Chemistry, **2015**; 0.
- (19) Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Sousa, E.; Pinto, M.; Gonçalves, J. *Bioorganic Med. Chem.* **2002**, *10*, 3219.
- (20) Liu, Y.; Liang, C.; Xin, L.; Ren, X.; Tian, L.; Ju, X.; Li, H.; Wang, Y.; Zhao, Q.; Liu, H.; Cao, W.; Xie, X.; Zhang, D.; Wang, Y.; Jian, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *206*, 112711.
- (21) Pathak, K.; Saikia, R.; Das, A. *Sci. Phytochem.* **2023**, *2*, 38.
- (22) Gholam, G. M.; Luthfia, M.; Firdausy, I. A. *J. Farm. dan Ilmu Kefarmasian Indones.* **2023**, *10*, 1.
- (23) Ovalle-Magallanes, B.; Eugenio-Pérez, D.; Pedraza-Chaverri, J. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 102.
- (24) Burke, A. J.; Marques, C. S. *Catalytic Arylation Methods*, **2014**.
- (25) Wang, P.; Rao, H.; Hua, R.; Li, C. *J. Org. Lett.* **2012**, *14*, 902.
- (26) Zhang, H.; Shi, R.; Gan, P.; Liu, C.; Ding, A.; Wang, Q.; Lei, A. *Angew. Chemie* **2012**, *124*, 5294.
- (27) Resende, D. I. S. P.; Durães, F.; Maia, M.; Sousa, E.; Pinto, M. M. M. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 3027.
- (28) Montinari, M. R.; Minelli, S.; De Caterina, R. *Vascul. Pharmacol.* **2019**, *113*, 1.
- (29) Grover, P. K.; Shah, G. D.; Shah, R. C. *J. Sci. Ind. Res* **1953**, *13*, 3982.
- (30) Zhao, J.; Larock, R. C. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4273.
- (31) Shen, C.; Wu, X. F. *Synlett* **2016**, *27*, 1269.
- (32) Wang, S.; Xie, K.; Tan, Z.; An, X.; Zhou, X.; Guo, C. C.; Peng, Z. *Chem. Commun.* **2009**,

- 6469.
- (33) Menéndez, C. A.; Nador, F.; Radivoy, G.; Gerbino, D. C. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2846.
- (34) Hu, J.; Adogla, E. A.; Ju, Y.; Fan, D.; Wang, Q. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11256.
- (35) Ramani, T.; Umadevi, P.; Prasanth, K. L.; Sreedhar, B. *European J. Org. Chem.* **2013**, 6021.
- (36) Márquez-Valadez, B.; Lugo-Huitrón, R.; Valdivia-Cerda, V.; Miranda-Ramírez, L. R.; Pérez-De La Cruz, V.; González-Cuahutencos, O.; Rivero-Cruz, I.; Mata, R.; Santamaría, A.; Pedraza-Chaverrí, J. *Nutr. Neurosci.* **2009**, *12*, 35.
- (37) Yin, Q.; Wu, Y. J.; Pan, S.; Wang, D. D.; Tao, M. Q.; Pei, W. Y.; Zuo, J. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 1983.
- (38) Packer, N.; Hoffman-Goetz, L. J. *Sports Med. Phys. Fitness* **2015**, *55*, 368-376.
- (39) Madan, B.; Singh, I.; Kumar, A.; Prasad, A. K.; Raj, H. G.; Parmar, V. S.; Ghosh, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3431.
- (40) Zou, W.; Yin, P.; Shi, Y.; Jin, N.; Gao, Q.; Li, J.; Liu, F. *Inflammation* **2019**, *42*, 103.
- (41) Rechenchoski, D. Z.; Agostinho, K. F.; Faccin-Galhardi, L. C.; Lonni, A. A. S. G.; da Silva, J. V. H.; de Andrade, F. G.; Cunha, A. P.; Ricardo, N. M. P. S.; Nozawa, C.; Linhares, R. E. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115304.
- (42) Zheng, M.; Lu, Z. *Chin. Med. J. (Engl.)* **1990**, *103*, 160.
- (43) Dean, B.; Cooper, G.; Shivkumar, M.; Snape, T. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2023**, *84*, 129211.
- (44) Mukherjee, D.; Zou, H.; Liu, S.; Beuerman, R.; Dick, T. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 643.
- (45) Douglas Chaves de Alcântara Pinto, Gabriela Alves de Souza, Paulo Pitasse-Santos, Debora Decote-Ricardo, Afonso Santine M. M. Velez, Leonardo Freire-de-Lima, Célio G. Freire-de-Lima, M. E. F. de L. *Quim. Nov.* **2023**, *46*, 77.
- (46) Lu, Y.; Guan, T.; Wang, S.; Zhou, C.; Wang, M.; Wang, X.; Zhang, K.; Han, X.; Lin, J.; Tang, Q.; Wang, C.; Zhou, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *83*, 117232.

- (47) Roy, S.; Maiti, B.; Banerjee, N.; Kaulage, M. H.; Muniyappa, K.; Chatterjee, S.; Bhattacharya, S. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2023**, *6*, 546.
- (48) Nauman, M. C.; Won, J. H.; Petiwala, S. M.; Vemu, B.; Lee, H.; Sverdlov, M.; Johnson, J. *J. Cancers (Basel)*. **2023**, *15*.
- (49) Lawal, B.; Wu, A. T. H.; Chen, C.-H.; T.A, G.; Wu, S.-Y. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *163*, 114800.
- (50) Attari, M.; Khosravi, M.; Hajikhani, R.; Bananaj, M.; Solati, J. J. *Anim. Biol.* **2023**, *15*, 1.
- (51) Chen, Y.-L.; Chen, Y.-C.; Xiong, L.-A.; Huang, Q.-Y.; Gong, T.-T.; Chen, Y.; Ma, L.-F.; Fang, L.; Zhan, Z.-J. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115251.
- (52) Wang, Y.; Xia, Z.; Xu, J.-R.; Wang, Y.-X.; Hou, L.-N.; Qiu, Y.; Chen, H.-Z. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 871.
- (53) Kavitha, M.; Nataraj, J.; Essa, M. M.; Memon, M. A.; Manivasagam, T. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *206*, 239.
- (54) Ji, H.-F.; Zhang, H.-Y. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2006**, *767*, 3.
- (55) Santonocito, D.; Barbagallo, I.; Distefano, A.; Sferrazzo, G.; Vivero-Lopez, M.; Sarpietro, M. G.; Puglia, C. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 951.
- (56) Morini, M.; Pedroni, V.; Alarcon, L.; Verde, A.; Mendioroz, P.; Appignanesi, G.; Sierra, M. B. *Chem. Phys. Lipids* **2020**, *231*.
- (57) Akinyemi, K. O.; Oladapo, O.; Okwara, C. E.; Ibe, C. C.; Fasure, K. A. *BMC Complement. Altern. Med.* **2005**, *5*, 1.
- (58) Hamza, O. J. M.; van den Bout-van, C. J. P.; Matee, M. I. N.; Moshi, M. J.; Mikx, F. H. M.; Selemani, H. O.; Mbwambo, Z. H.; Van der Ven, A. J. A. M.; Verweij, P. E. J. *Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 124.
- (59) Uwaifo, A. O. J. *Toxicol. Environ. Heal. Part A Curr. Issues* **1984**, *13*, 521.
- (60) Tamene, D.; Endale, M. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2019**, *2019*.
- (61) Yun-Cheung, K.; Kam-Hung, N.; Pui-Hay, B. P.; Qian, L.; Si-Xao, Y.; Hong-Ta, Z.; Kin-Fai,

- C.; Doel, S. D.; Woei-Song, K.; Waterman, P. G. J. *Ethnopharmacol.* **1986**, *15*, 195.
- (62) Kesari, A. N.; Kesari, S.; Singh, S. K.; Gupta, R. K.; Watal, G. J. *Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 305.
- (63) Nagappan, T.; Segaran, T. C.; Wahid, M. E. A.; Ramasamy, P.; Vairappan, C. S. *Molecules* **2012**, *17*, 14449.
- (64) Nandy, B. C.; Gupta, A. K.; Mittal, A.; Vyas, V. J. *Biomed. Pharm. Res* **2014**, *3*, 42.
- (65) Gurung, S.; Škalko-Basnet, N. J. *Ethnopharmacol.* **2009**, *121*, 338.
- (66) Süntar, I.; Akkol, E. K.; Keleş, H.; Oktem, A.; Başer, K. H. C.; Yeşilada, E. J. *Ethnopharmacol.* **2011**, *134*, 89.
- (67) Kumar, B.; Vijayakumar, M.; Govindarajan, R.; Pushpangadan, P. J. *Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 103.
- (68) Shailajan, S.; Menon, S.; Pednekar, S.; Singh, A. J. *Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 99.
- (69) Strahan, J.; Popere, B. C.; Khomein, P.; Pointer, C. A.; Martin, S. M.; Oldacre, A. N.; Thayumanavan, S.; Young, E. R. *Dalt. Trans.* **2019**, *48*, 8488.
- (70) Sadeghian, B.; Sakhteman, A.; Faghih, Z.; Nadri, H.; Edraki, N.; Iraj, A.; Sadeghian, I.; Rezaei, Z. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1221*, 128793.
- (71) Fischer, J.; Ganellin, C. R. *Chem. Int. IUPAC* **2010**, *32*, 12.
- (72) Issa, S.; Prandina, A.; Bedel, N.; Rongved, P.; Yous, S.; Le Borgne, M.; Bouaziz, Z. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1321.
- (73) Yang, J.-H.; Wang, X.-Y.; Zhou, Y.-P.; Lu, R.; Chen, C.-H.; Zhang, M.-H.; Cheng, Y.-Y.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H.; Wang, Y.-S. *Molecules* **2019**, *25*, 99.
- (74) Liu, Y.-P.; Hu, S.; Liu, Y.-Y.; Zhang, M.-M.; Zhang, W.-H.; Qiang, L.; Fu, Y.-H. *Bioorg. Chem.* **2019**, *91*, 103107.
- (75) Shen, M.; Li, P.-T.; Wu, Y.-J.; Lin, C.-H.; Chai, E.; Chang, T.-C.; Chen, C.-T. *Med. Mycol.* **2020**, *58*, 521.
- (76) Pattanashetty, S. H.; Hosamani, K. M.; Shettar, A. K.; Mohammed Shafeeulla, R. J.

- Heterocycl. Chem. **2018**, *55*, 1765.
- (77) Neogi, I.; Jhulki, S.; Ghosh, A.; Chow, T. J.; Moorthy, J. N. ACS Appl. Mater. Interfaces **2015**, *7*, 3298.
- (78) Hwang, J.; Lee, C.; Jeong, J.-E.; Kim, C. Y.; Woo, H. Y.; Park, S.; Cho, M. J.; Choi, D. H. ACS Appl. Mater. Interfaces **2020**, *12*, 8485.
- (79) Gao, L.; Schloemer, T. H.; Zhang, F.; Chen, X.; Xiao, C.; Zhu, K.; Sellinger, A. ACS Appl. Energy Mater. **2020**, *3*, 4492.
- (80) Georgiades, S. N.; Nicolaou, P. G. Adv. Heterocycl. Chem. **2019**, *129*, 1.
- (81) Watanabe, T.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. J. Org. Chem. **2009**, *74*, 4720.
- (82) Goo, D.-Y.; Woo, S. K. Org. Biomol. Chem. **2016**, *14*, 122.
- (83) Ackermann, L.; Althammer, A.; Mayer, P. Synthesis (Stuttg). **2009**, *2009*, 3493.
- (84) Jiang, S.-F.; Ling, L.-L.; Xu, Z.; Liu, W.-J.; Jiang, H. Ind. Eng. Chem. Res. **2018**, *57*, 13055.
- (85) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. New York **1988**.
- (86) Scholten, J. J. F.; Pijpers, A. P.; Hustings, A. M. L. Catal. Rev. **1985**, *27*, 151.
- (87) Takamatsu, K.; Hirano, K.; Satoh, T.; Miura, M. Org. Lett. **2014**, *16*, 2892.
- (88) Buden, M. E.; Vaillard, V. A.; Martin, S. E.; Rossi, R. A. J. Org. Chem. **2009**, *74*, 4490.
- (89) Bedford, R. B.; Betham, M. J. Org. Chem. **2006**, *71*, 9403.
- (90) Alcaide, B.; Almendros, P.; Alonso, J. M.; Quiros, M. T.; Gadzinski, P. *Gold-or palladium-catalyzed allene carbocyclization/functionalization: Simple and efficient synthesis of carbazoles*, **2011**.
- (91) Shou, W. G.; Li, J.; Guo, T.; Lin, Z.; Jia, G. Organometallics **2009**, *28*, 6847.
- (92) Jiang, Q.; Duan-Mu, D.; Zhong, W.; Chen, H.; Yan, H. Chem. Eur. J. **2013**, *19*, 1903.
- (93) Guerra, W. D.; Rossi, R. A.; Pierini, A. B.; Barolo, S. M. J. Org. Chem. **2015**, *80*, 928.
- (94) Chakraborty, S.; Chattopadhyay, G.; Saha, C. J. Heterocycl. Chem. **2013**, *50*, 91.

- (95) Liégault, B.; Lee, D.; Huestis, M. P.; Stuart, D. R.; Fagnou, K. J. *Org. Chem.* **2008**, *73*, 5022.
- (96) Laha, J. K.; Barolo, S. M.; Rossi, R. A.; Cuny, G. D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6421.
- (97) Khan, A.; Karim, R.; Dhimane, H.; Alam, S. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 6598.
- (98) Brabin, B. . *Historias de la malaria: La guerra y la historia — Cuaderno de Cultura Científica* <https://culturacientifica.com/2020/05/17/historias-de-la-malaria-la-guerra-y-la-historia/>.
- (99) Wallace, D. J. In *Seminars in arthritis and rheumatism*; Elsevier, **1989**; Vol. 18, 282.
- (100) García-Montero, P.; Del Boz, J.; Millán-Cayetano, J. F.; de Troya-Martín, M. *Actas dermo-sifiliogr.*(Ed. impr.) **2016**, 867.
- (101) Silakari, O. *Key heterocycle cores for designing multitargeting molecules*; Elsevier, **2018**.
- (102) Miglbauer, E.; Demitri, N.; Himmelsbach, M.; Monkowius, U.; Sariciftci, N. S.; Głowacki, E. D.; Oppelt, K. T. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 6349.
- (103) Hamzehpoor, E.; Ruchlin, C.; Tao, Y.; Ramos-Sanchez, J. E.; Titi, H. M.; Cosa, G.; Perepichka, D. F. *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 6431.
- (104) Pereira, R. C.; Pontinha, A. D. R.; Pineiro, M.; de Melo, J. S. S. *Dye. Pigment.* **2019**, *166*, 203.
- (105) Chan, Y.-C.; Li, C.-Y.; Lai, C.-W.; Wu, M.-W.; Tseng, H.-J.; Chang, C.-C. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 8708.
- (106) Singh, P.; Kumar, A.; Kaur, S.; Singh, A.; Gupta, M.; Kaur, G. *Medchemcomm* **2016**, *7*, 632.
- (107) Games, D. *Chem. Commun.* **1997**, 1529.
- (108) Zheng, Z.; Dian, L.; Yuan, Y.; Zhang-Negrerie, D.; Du, Y.; Zhao, K. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7451.
- (109) Zhou, W.; Yang, Y.; Liu, Y.; Deng, G.-J. *Green Chem.* **2013**, *15*, 76.
- (110) Yu, J.; Yang, H.; Jiang, Y.; Fu, H. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4271.

- (111) Li, X.-A.; Wang, H.-L.; Yang, S.-D. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1794.
- (112) MacNeil, S. L.; Gray, M.; Gusev, D. G.; Briggs, L. E.; Snieckus, V. J. *Org. Chem.* **2008**, *73*, 9710.
- (113) Huang, P.; Parthasarathy, K.; Cheng, C. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 460.
- (114) Zhou, W.; Liu, Y.; Yang, Y.; Deng, G.-J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10678.
- (115) Wei, W.; Sheng, J.; Miao, H.; Luo, X.; Song, X.; Yan, M.; Zou, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 2101.
- (116) Wen, J.; Tang, S.; Zhang, F.; Shi, R.; Lei, A. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 94.
- (117) Wu, H.; Zhang, Z.; Liu, Q.; Liu, T.; Ma, N.; Zhang, G. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2897.
- (118) Zhao, J.; Larock, R. C. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 583.
- (119) Pang, X.; Lou, Z.; Li, M.; Wen, L.; Chen, C. *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 3361.
- (120) Jiang, C.-Y.; Xie, H.; Huang, Z.-J.; Liang, J.-Y.; Huang, Y.-X.; Liang, Q.-P.; Zeng, J.-Y.; Zhou, B.; Zhang, S.-S.; Shu, B. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 8487.
- (121) Wu, H.; Ma, N.; Song, M.; Zhang, G. *Chinese Chem. Lett.* **2020**, *31*, 1580.
- (122) Janke, J.; Villinger, A.; Ehlers, P.; Langer, P. *Synlett* **2019**, *30*, 817.
- (123) Xiao, L.; Liu, G.; Li, Z.; Ren, P.; Ren, L.; Kong, J. *Chinese J. Org. Chem.* **2020**, *40*, 2988.
- (124) Zhang, L.; Yang, W.; Hu, Z.; Zhang, X.; Xu, X. *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2379.
- (125) Climent, M. J.; Corma, A.; Iborra, S.; Sabater, M. J. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 870.
- (126) Climent, M. J.; Corma, A.; Iborra, S. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1072.
- (127) Climent, M. J.; Corma, A.; Iborra, S. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 16.
- (128) Steingruber, H. S.; Mendioroz, P.; Diez, A. S.; Gerbino, D. C. *Synth.* **2020**, *52*, 619.
- (129) Steingruber, H. S.; Mendioroz, P.; Volpe, M. A. *Synthesis (Stuttg.)* **2021**, *53*, 4048.
- (130) Steingruber, H. S.; Mendioroz, P.; Castro, M. J.; Volpe, M. A. *Synthesis (Stuttg.)* **2022**, *55*, 692.

- (131) Guram, A. S.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901.
- (132) Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969.
- (133) Dorel, R.; Grugel, C. P.; Haydl, A. M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58*, 17118.
- (134) Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L. **2016**, *116*, 12564.
- (135) Wakaki, T.; Togo, T.; Yoshidome, D.; Kuninobu, Y.; Kanai, M. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 3123.
- (136) López-Aguado, C.; Paniagua, M.; Melero, J. A.; Iglesias, J.; Juárez, P.; López Granados, M.; Morales, G. *Catalysts* **2020**, *10*, 678.
- (137) García, E. A.; Rueda, E. H.; Rouco, A. J. *Appl. Catal. A Gen.* **2001**, *210*, 363.
- (138) Liu, J.; He, F.; Gunn, T. M.; Zhao, D.; Roberts, C. B. *Langmuir* **2009**, *25*, 7116.
- (139) Neyertz, C.; Volpe, M.; Gigola, C. *Appl. Catal. A Gen.* **2004**, *277*, 137.
- (140) Casoni, A. I.; Hoch, P. M.; Volpe, M. A.; Gutierrez, V. S. *J. Clean. Prod.* **2018**, *178*, 237.
- (141) Mao, Z.; Gu, H.; Lin, X. *Catalysts* **2021**, *11*, 1078.
- (142) Piccolo, L. *Catal. Today* **2021**, *373*, 80.
- (143) Song, J.; Ding, K.; Sun, W.; Wang, S.; Sun, H.; Xiao, K.; Qian, Y.; Liu, C. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 2889.
- (144) Álvarez-Bercedo, P.; Flores-Gaspar, A.; Correa, A.; Martin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 466.
- (145) Molaie, R.; Farhadi, K.; Forough, M.; Hajizadeh, S. **2018**.
- (146) Pal, C.; Kundu, M. K.; Bandyopadhyay, U.; Adhikari, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3563.
- (147) Xiong, Z.; Zhang, X.; Li, Y.; Peng, X.; Fu, J.; Guo, J.; Xie, F.; Jiang, C.; Lin, B.; Liu, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7361.
- (148) Bongui, J.-B.; Elomri, A.; Seguin, E.; Tillequin, F.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Pierre, A.; Atassi, G. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1077.
- (149) Ghosh, P.; Ganguly, B.; Das, S. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4173.

- (150) Hayashi, K.; Matsumoto, A.; Hirata, S. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 1738.
- (151) Parveen, M.; Aslam, A.; Nami, S. A. A.; Malla, A. M.; Alam, M.; Lee, D.-U.; Rehman, S.; Silva, P. S. P.; Silva, M. R. J. *Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *161*, 304.
- (152) Kancharla, P.; Dodean, R. A.; Li, Y.; Kelly, J. X. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 42284.
- (153) Fang, Y.; Rogness, D. C.; Larock, R. C.; Shi, F. J. *Org. Chem.* **2012**, *77*, 6262.
- (154) Simini, B. *Lancet* **2000**, *355*, 48.
- (155) De Lorgeril, M.; Renaud, S.; Salen, P.; Monjaud, I.; Mamelle, N.; Martin, J. L.; Guidollet, J.; Touboul, P.; Delaye, J. *Lancet* **1994**, *343*, 1454.
- (156) Perdue, L.; Marton, K. I.; Shoemaker, W. *The French paradox and beyond: Living longer with wine and the Mediterranean lifestyle*; Lewis Perdue, **1992**.
- (157) Pant, N.; Jain, D. C.; Bhakuni, R. S. *Phytochemicals from genus Swertia and their biological activities*, **2000**.
- (158) Peres, V.; Nagem, T. J.; Oliveira, F. F.; Oliveira, T. T. *Curr. Top. Phytochem. Vol. 5* **2002**, 23.
- (159) Brahmachari, G.; Mondal, S.; Gangopadhyay, A.; Gorai, D.; Mukhopadhyay, B.; Saha, S.; Brahmachari, A. K. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1627.
- (160) Agatonovic-Kustrin, S.; Kettle, C.; Morton, D. W. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 553.
- (161) Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science.* **2002**, *297*, 353.
- (162) Jung, H.-A.; Su, B.-N.; Keller, W. J.; Mehta, R. G.; Kinghorn, A. D. J. *Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2077.
- (163) Kondo, M.; Zhang, L.; Ji, H.; Kou, Y.; Ou, B. J. *Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8788.
- (164) Franklin, G.; Conceição, L. F. R.; Kombrink, E.; Dias, A. C. P. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 60.
- (165) Yang, A.; Liu, C.; Wu, J.; Kou, X.; Shen, R. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *897*, 173950.

- (166) Serrano, M. P. *Mecanismos bioquímicos de la Enfermedad de Alzheimer: Aproximaciones terapéuticas*, **2010**.
- (167) Menéndez, C. A.; Biscussi, B.; Accordino, S.; Murray, A. P.; Gerbino, D. C.; Appignanesi, G. A. *Bioorg. Chem.* **2017**, *75*, 201.
- (168) Holleman, A. F.; Wibaut, J. P. *Zeitschrift für Elektrochemie und Angew. Phys. Chemie* **1927**, *33*, 351.
- (169) Blatt, A. H. *Org. React.* **1942**, *1*, 342.
- (170) Berliner, E. *Org. React.* **1949**, *5*, 229.
- (171) Grover, P. K.; Shah, G. D.; Shah, R. C. *J. Chem. Soc* **1955**, 3982.
- (172) Quillinan, A. J.; Scheinmann, F. J. *Chem. Soc., Perkin Trans., 1*, **1973**, 1329
- (173) Suksamrarn, S.; Khammee, T.; Athipornchai, A.; Upamaia, W.; Jaisin, Y. *KKU Sci. J.* **2014**, *42*, 212.
- (174) Chen, X.; Leng, J.; Rakesh, K. P.; Darshini, N.; Shubhavathi, T.; Vivek, H. K.; Mallesha, N.; Qin, H.-L. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 1706.
- (175) Vanessa, V. V.; Mah, S. H. *Mini Rev. Med. Chem.* **2021**, *21*, 2507.
- (176) Fei, X.; Jo, M.; Lee, B.; Han, S.-B.; Lee, K.; Jung, J.-K.; Seo, S.-Y.; Kwak, Y.-S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2062.
- (177) Santos, C. M. M.; Freitas, M.; Fernandes, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1460.
- (178) Wong, K. W.; Mah, S. H. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2021**, *68*, 393.
- (179) Eaton, P. E.; Carlson, G. R.; Lee, J. T. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 4071.
- (180) Wertz, S.; Leifert, D.; Studer, A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 928.
- (181) Yang, J.; Dong, C.; Li, H.; Li, H.; Li, Y. *Chinese Sci. Bull.* **2012**, *57*, 2364.
- (182) Manna, S. K.; Manda, S. L. K.; Panda, G. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5759.
- (183) Xu, Y.; Zhou, J.; Zhang, C.; Chen, K.; Zhang, T.; Du, Z. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6432.
- (184) Genovese, S.; Fiorito, S.; Specchiulli, M. C.; Taddeo, V. A.; Epifano, F. *Tetrahedron Lett.*

- 2015**, 56, 847.
- (185) Rao, H.; Ma, X.; Liu, Q.; Li, Z.; Cao, S.; Li, C. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 2191.
- (186) Suzuki, Y.; Fukuta, Y.; Ota, S.; Kamiya, M.; Sato, M. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3960.
- (187) Jiang, N.; Li, S.-Y.; Xie, S.-S.; Yao, H.; Sun, H.; Wang, X.-B.; Kong, L.-Y. *RSC Adv.* **2014**, 4, 63632.
- (188) Barbero, N.; SanMartin, R.; Domínguez, E. *Green Chem.* **2009**, 11, 830.
- (189) Hintermann, L.; Masuo, R.; Suzuki, K. *Org. Lett.* **2008**, 10, 4859.
- (190) Woydziak, Z. R.; Fu, L.; Peterson, B. R. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 473.
- (191) Johnson, M. M.; Naidoo, J. M.; Fernandes, M. A.; Mmutlane, E. M.; van Otterlo, W. A. L.; de Koning, C. B. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8701.
- (192) Tang, J.; Zhao, S.; Wei, Y.; Quan, Z.; Huo, C. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 1589.
- (193) Venkanna, A.; Goud, P. V. K.; Prasad, P. V.; Shanker, M.; Rao, P. V. *ChemistrySelect* **2016**, 1, 2271.
- (194) Rao, M. L. N.; Ramakrishna, B. S. *RSC Adv.* **2016**, 6, 75505.
- (195) Ruan, J.; Saidi, O.; Iggo, J. A.; Xiao, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10510.
- (196) Satoh, T.; Itaya, T.; Miura, M.; Nomura, M. *Chem. Lett.* **1996**, 25, 823.
- (197) Sole, D.; Mariani, F. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 8136.
- (198) Nowrouzi, N.; Motevalli, S.; Tarokh, D. J. *Mol. Catal. A Chem.* **2015**, 396, 224.
- (199) Solé, D.; Mariani, F.; Fernández, I. *European J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 3935.
- (200) Atwood, D. A. *Sustainable inorganic chemistry*; John Wiley & Sons, **2016**.
- (201) Casoni, A. I.; Bidegain, M.; Cubitto, M. A.; Curvetto, N.; Volpe, M. A. *Bioresour. Technol.* **2015**, 177, 406.
- (202) Gardikis, Y.; Tsoungas, P. G.; Potamitis, C.; Zervou, M.; Cordopatis, P. *Heterocycles* **2011**, 83, 1077.

- (203) Zhao, J.; Yue, D.; Campo, M. A.; Larock, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5288.
- (204) Cremins, P. J.; Saengchantara, S. T.; Wallace, T. W. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 3075.
- (205) Epstein, O.; Bryan, M. C.; Cheng, A. C.; Derakhchan, K.; Dineen, T. A.; Hickman, D.; Hua, Z.; Human, J. B.; Kreiman, C.; Marx, I. E. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9796.
- (206) Granoth, I.; Pownall, H. J. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2088.
- (207) Dhar, S. N. *J. Chem. Soc. Trans.* **1920**, *117*, 1053.
- (208) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science*. **1972**, *175*, 720.
- (209) Danielli, J. F.; Davson, H. J. *Cell. Comp. Physiol.* **1935**, *5*, 495.
- (210) Rybar, P.; Krivanek, R.; Samuely, T.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N.; Hianik, T. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2007**, *1768*, 1466.
- (211) Krivanek, R.; Rybar, P.; Prenner, E. J.; McElhaney, R. N.; Hianik, T. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2001**, *1510*, 452.
- (212) Hianik, T.; Rybár, P.; Krivánek, R.; Petříková, M.; Roudna, M.; Apell, H.-J. *Gen. Physiol. Biophys.* **2011**, *30*, 145.
- (213) Okoro, L. N. *Int. J. Chem.* **2011**, *3*, 166.
- (214) Colotto, A.; Kharakoz, D. P.; Lohner, K.; Laggner, P. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 2360.
- (215) Halstenberg, S.; Heimbürg, T.; Hianik, T.; Kaatze, U.; Krivanek, R. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 264.
- (216) SubbaRao, G. R. S.; Raghavan, S. J. *Indian Inst. Sci.* **2001**, *81*, 393.
- (217) Sousa, M. E.; Pinto, M. M. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2447.
- (218) Castanheiro, R. A. P.; Pinto, M. M. M.; Cravo, S. M. M.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S.; Kijjoo, A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3848.
- (219) Li, J.; Liu, S.; Koh, J.-J.; Zou, H.; Lakshminarayanan, R.; Bai, Y.; Pervushin, K.; Zhou, L.; Verma, C.; Beuerman, R. W. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2015**, *1848*, 1023.

- (220) Koh, J.-J.; Qiu, S.; Zou, H.; Lakshminarayanan, R.; Li, J.; Zhou, X.; Tang, C.; Saraswathi, P.; Verma, C.; Tan, D. T. H. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2013**, *1828*, 834.
- (221) Koh, J.-J.; Zou, H.; Lin, S.; Lin, H.; Soh, R. T.; Lim, F. H.; Koh, W. L.; Li, J.; Lakshminarayanan, R.; Verma, C. J. *Med. Chem.* **2016**, *59*, 171.
- (222) Ming-Hui, W.; Zhang, K.-J.; Qin-Lan, G. U.; Xiao-Ling, B. I.; Jin-Xin, W. *Chin. J. Nat. Med.* **2017**, *15*, 81.
- (223) Han, A.-R.; Kim, J.-A.; Lantvit, D. D.; Kardono BS, L.; Riswan, S.; Chai, H.; Carcache de Blanco, E. J.; Farnsworth, N. R.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D. J. *Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2028.
- (224) Yuanita, E.; Pranowo, H. D.; Siswanta, D.; Swasono, R. T.; Mustofa, M.; Zulkarnain, K.; Syahri, J.; Jumina, J. *Chem. Chem. Technol.* **2018**, *12*, 290.
- (225) Lee, B. W.; Lee, J. H.; Lee, S.-T.; Lee, H. S.; Lee, W. S.; Jeong, T.-S.; Park, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5548.
- (226) Sierra, M. B.; Alarcón, L.; Gerbino, D.; Pedroni, V. I.; Buffo, F. E.; Morini, M. A. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *206*, 1.
- (227) Hianik, T.; Passechnik, V. I. *Bilayer lipid membranes. Structure and mechanical properties*; Springer Science & Business Media, **1995**.
- (228) Carré, L.; Zaccai, G.; Delfosse, X.; Girard, E.; Franzetti, B. *Astrobiology* **2022**, *22*, 322.
- (229) Pillai, R. K. M.; Naiksatam, P.; Johnson, F.; Rajagopalan, R.; Watts, P. C.; Cricchio, R.; Borrás, S. J. *Org. Chem.* **1986**, *51*, 717.
- (230) Onuki, Y.; Hagiwara, C.; Sugibayashi, K.; Takayama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1103.
- (231) Hianik, T.; Haburcak, M.; Lohner, K.; Prenner, E.; Paltauf, F.; Hermetter, A. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *139*, 189.
- (232) Hianik, T.; Babincova, M.; Babinec, P.; Prenner, E.; Paltauf, F.; Hermetter, A. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **1999**, *211*, 133.

- (233) Hianik, T.; Rybár, P.; Kostner, G. M.; Hermetter, A. *Biophys. Chem.* **1997**, *67*, 221.
- (234) Hianik, T.; Küpcü, S.; Sleytr, U. B.; Rybar, P.; Krivanek, R.; Kaatze, U. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *147*, 331.
- (235) Sarvazyan, A. P. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 321.
- (236) Sarvazyan, A. P. *Ultrasonics* **1982**, *20*, 151.
- (237) Sierra, M. B.; Pedroni, V. I.; Buffo, F. E.; Disalvo, E. A.; Morini, M. A. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *142*, 199.
- (238) Case, D. A.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N. *San Fr.* **2016**.
- (239) Gould, I. R.; Skjevik, A. A.; Dickson, C. J.; Madej, B. D.; Walker, R. C. *Manuscr. Prep.* **2018**.
- (240) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157.
- (241) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- (242) Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8910.
- (243) Hansen, J.-P.; McDonald, I. R. *Theory of simple liquids: with applications to soft matter*; Academic press, **2013**.
- (244) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. J. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 10089.
- (245) Kharakoz, D. P.; Colotto, A.; Lohner, K.; Laggner, P. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9844.
- (246) Heimburg, T. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1998**, *1415*, 147.
- (247) Pabst, G.; Lonez, C.; Vandenbranden, M.; Jestin, J.; Radulescu, A.; Ruyschaert, J.-M.; Gutberlet, T. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7243.
- (248) Mitaku, S.; Ikegami, A.; Sakanishi, A. *Biophys. Chem.* **1978**, *8*, 295.
- (249) Ehringer, W.; Belcher, D.; Wassall, S. R.; Stillwell, W. *J. Chem. Phys. Lipids* **1990**, *54*, 79.

- (250) Nagle, J. F.; Wilkinson, D. A. *Biophys. J.* **1978**, *23*, 159.
- (251) Skjerveik, Å. A.; Madej, B. D.; Dickson, C. J.; Lin, C.; Teigen, K.; Walker, R. C.; Gould, I. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 10573.
- (252) Cejas, J. del P.; Rosa, A. S.; Pérez, H. A.; Alarcón, L.; Menéndez, C.; Appignanesi, G. A.; Disalvo, A.; Frías, M. A. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2018**, *26*, 24.
- (253) Yoshida, A.; Manosroi, A.; Manosroi, J.; Yamauchi, H.; Abe, M. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **1995**, *4*, 423.
- (254) Morini, M. A.; Sierra, M. B.; Pedroni, V. I.; Alarcon, L. M.; Appignanesi, G. A.; Disalvo, E. A. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *131*, 54.
- (255) Pérez Gracia, M. T. *La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos*, **2021**.
- (256) Andersson, D. I.; Hughes, D. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 260.
- (257) Sievert, D. M.; Ricks, P.; Edwards, J. R.; Schneider, A.; Patel, J.; Srinivasan, A.; Kallen, A.; Limbago, B.; Fridkin, S. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2013**, *34*, 1.
- (258) Montero, C. I.; Stock, F.; Murray, P. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1167.
- (259) Courvalin, P. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, S25.
- (260) Hidron, A. I.; Edwards, J. R.; Patel, J.; Horan, T. C.; Sievert, D. M.; Pollock, D. A.; Fridkin, S. K. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 996.
- (261) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I.; Lee, R. E. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 62.
- (262) Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1551.
- (263) Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 37.
- (264) Thaker, H. D.; Som, A.; Ayaz, F.; Lui, D.; Pan, W.; Scott, R. W.; Anguita, J.; Tew, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11088.
- (265) Lienkamp, K.; Madkour, A. E.; Tew, G. N. *Polym. Compos. fractionation–polymeric Pept.* **2013**, 141.

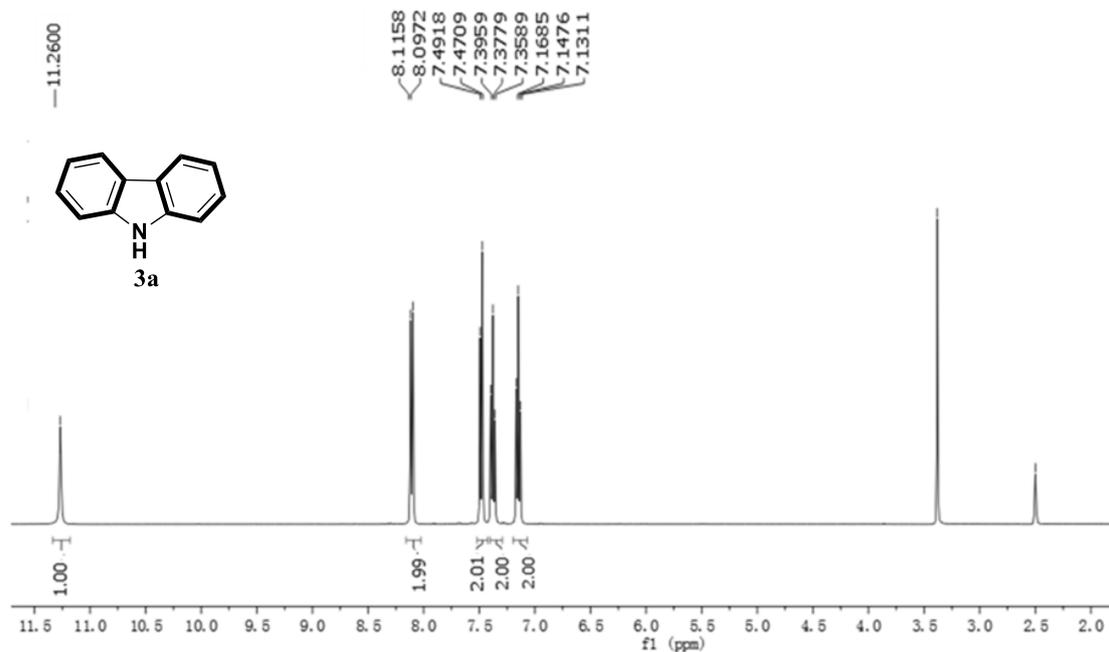
- (266) Matyus, E.; Kandt, C.; Tieleman, D. P. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2789.
- (267) Stark, M.; Liu, L.-P.; Deber, C. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3585.
- (268) Yin, L. M.; Edwards, M. A.; Li, J.; Yip, C. M.; Deber, C. M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7738.
- (269) Tew, G. N.; Scott, R. W.; Klein, M. L.; DeGrado, W. F. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 30.
- (270) Ooi, N.; Miller, K.; Hobbs, J.; Rhys-Williams, W.; Love, W.; Chopra, I. J. *Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 735.
- (271) Isaksson, J.; Brandsdal, B. O.; Engqvist, M.; Flaten, G. E.; Svendsen, J. S. M.; Stensen, W. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5786.
- (272) Epand, R. F.; Pollard, J. E.; Wright, J. O.; Savage, P. B.; Epand, R. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3708.
- (273) Vooturi, S. K.; Dewal, M. B.; Firestine, S. M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6367.
- (274) Erlanson, D. A. *Fragm. drug Discov. X-ray Crystallogr.* **2012**, *1*.
- (275) Kumari, P.; Kaur, S.; Sharma, S.; Kashyap, H. K. *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*.
- (276) Notman, R.; Noro, M.; O'Malley, B.; Anwar, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13982.
- (277) Ben-Shaul, A. R. Lipowsky, E. Sackman **1995**, *1*, 359.
- (278) Kulkarni, S. B.; Betageri, G. V.; Singh, M. J. *Microencapsul.* **1995**, *12*, 229.
- (279) Scrimgeour, C. F. Shahidi, Bailey's Ind. Oil Fats Prod. Edible Oil Fat Prod. Chem. Prop. Heal. Eff. **2005**, *1*.
- (280) Toh, M.-R.; Chiu, G. N. C. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 88.
- (281) Sun, M.; Northup, N.; Marga, F.; Huber, T.; Byfield, F. J.; Levitan, I.; Forgacs, G. J. *Cell Sci.* **2007**, *120*, 2223.
- (282) Ricci, M.; Oliva, R.; Del Vecchio, P.; Paolantoni, M.; Morresi, A.; Sassi, P. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2016**, *1858*, 3024.
- (283) Trucillo, P.; Campardelli, R.; Reverchon, E. J. *Co2 Util.* **2017**, *18*, 181.
- (284) Larsson, M.; Hill, A.; Duffy, J. *Annu. Trans. Nord. Rheol. Soc* **2012**, *20*.

- (285) Hui, Y.; Wibowo, D.; Liu, Y.; Ran, R.; Wang, H.-F.; Seth, A.; Middelberg, A. P. J.; Zhao, C.-X. *ACS Nano* **2018**, *12*, 2846.
- (286) Hianik, T. *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* **2011**, *13*, 33.
- (287) Huang, L. T.; Kuo, C. H.; Tseng, L.; Li, Y. S.; Cheng, L. H.; Cheng, C. Y.; Sheu, S. R.; Chang, W. T.; Chen, C. C.; Cheng, H. C. *Life* **2022**, *12*.
- (288) Okudaira, C.; Ikeda, Y.; Kondo, S.; Furuya, S.; Hirabayashi, Y.; Koyano, T.; Saito, Y.; Umezawa, K. *J. Enzyme Inhib.* **2000**, *15*.
- (289) Iikubo, K.; Ishikawa, Y.; Ando, N.; Umezawa, K.; Nishiyama, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*.
- (290) Tosa, H.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Nozaki, H.; Ikeda, S.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Yamada, M.; Fujimori, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*.
- (291) Fernandes, E. R.; Carvalho, F. D.; Remião, F. G.; Bastos, M. L.; Pinto, M. M.; Gottlieb, O. *R. Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1995**, *12*.
- (292) Lin, C. N.; Chung, M. I.; Liou, S. J.; Lee, T. H.; Wang, J. P. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*.
- (293) Ryu, H. W.; Cho, J. K.; Curtis-Long, M. J.; Yuk, H. J.; Kim, Y. S.; Jung, S.; Kim, Y. S.; Lee, B. W.; Park, K. H. *Phytochemistry* **2011**, *72*.
- (294) Suksamrarn, S.; Suwannapoch, N.; Phakhodee, W.; Thanuhiranlert, J.; Ratananukul, P.; Chimnoi, N.; Suksamrarn, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*.
- (295) Gopalakrishnan, G.; Banumathi, B.; Suresh, G. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*.
- (296) Laphookhieo, S.; Syers, J. K.; Kiattansakul, R.; Chantrapromma, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*.
- (297) Demel, R. A.; De Kruyff, B. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Reviews Biomembr.* **1976**, *457*, 109.
- (298) Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isac, I. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1973**, *311*, 330.
- (299) Virden, J. W.; Berg, J. C. *Langmuir* **1992**, *8*, 1532.

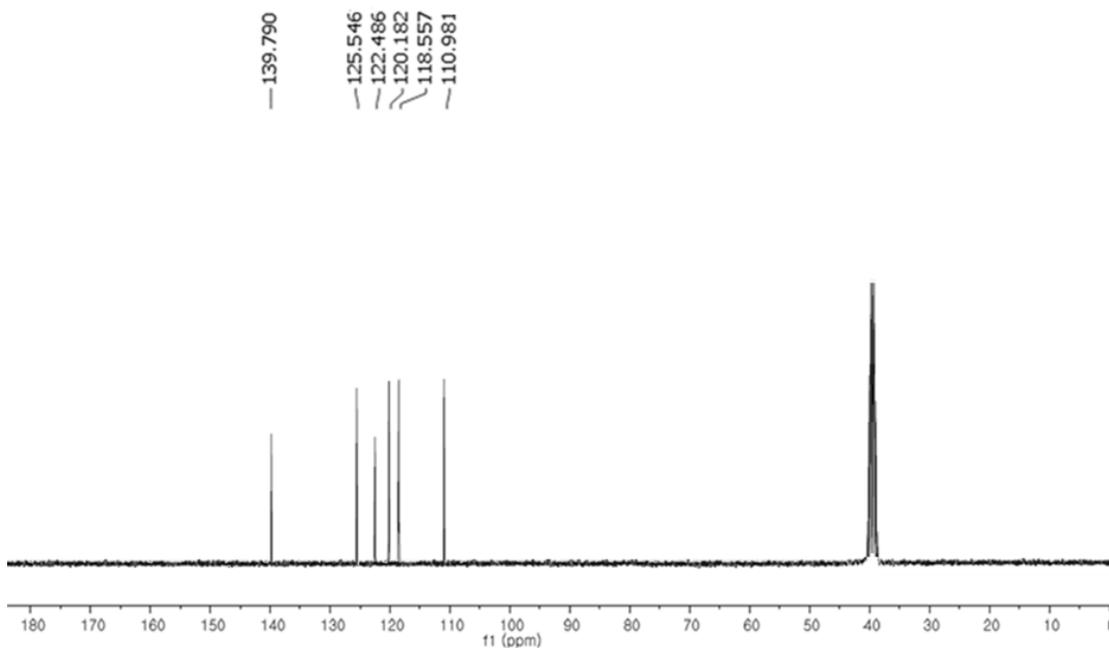
- (300) Liu, D.-Z.; Chen, W.-Y.; Tasi, L.-M.; Yang, S.-P. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *172*, 57.
- (301) Qin, J.; Lan, W.; Liu, Z.; Huang, J.; Tang, H.; Wang, H. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 1.
- (302) Marsh, D. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2154.
- (303) Tseng, L.-P.; Liang, H.-J.; Chung, T.-W.; Huang, Y.-Y.; Liu, D.-Z. *J. Med. Biol. Eng.* **2007**, *27*, 29.
- (304) Briuglia, M.-L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D. A. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5*, 231.
- (305) Schultz, Z. D.; Levin, I. W. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3104.
- (306) Dzoyem, J. P.; Pinnapireddy, S. R.; Fouotsa, H.; Brüßler, J.; Runkel, F.; Bakowsky, U. *Mediators Inflamm.* **2022**, *2022*, 8886087.
- (307) Zhang, J. A.; Pawelchak, J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 357.
- (308) Sułkowski, W. W.; Pentak, D.; Nowak, K.; Sułkowska, A. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744*, 737.
- (309) Roy, B.; Guha, P.; Bhattarai, R.; Nahak, P.; Karmakar, G.; Chettri, P.; Panda, A. K. *J. Oleo Sci.* **2016**, *65*, 399.
- (310) Derjaguin, B.; Landau, L. *Prog. Surf. Sci.* **1993**, *43*, 30.
- (311) Magarkar, A.; Dhawan, V.; Kallinteri, P.; Viitala, T.; Elmowafy, M.; Róg, T.; Bunker, A. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5005.
- (312) Lehmann, J.; Agel, M. R.; Engelhardt, K. H.; Pinnapireddy, S. R.; Agel, S.; Duse, L.; Preis, E.; Wojcik, M.; Bakowsky, U. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1243.

Apéndice: Espectros RMN

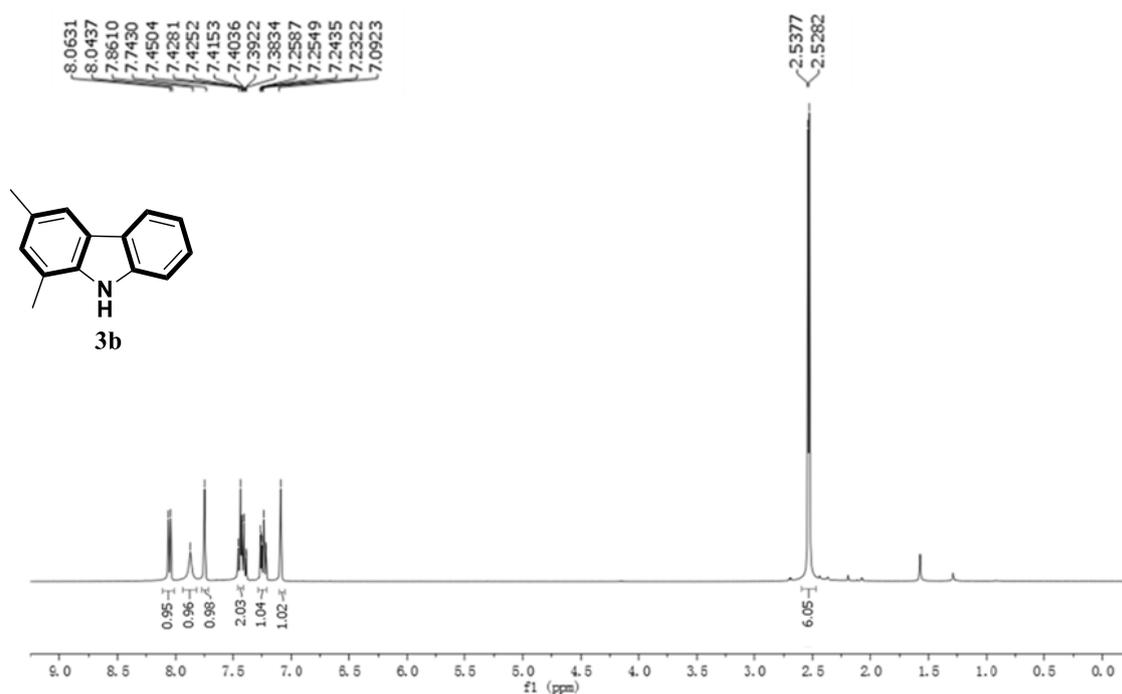
1. Carbazoles



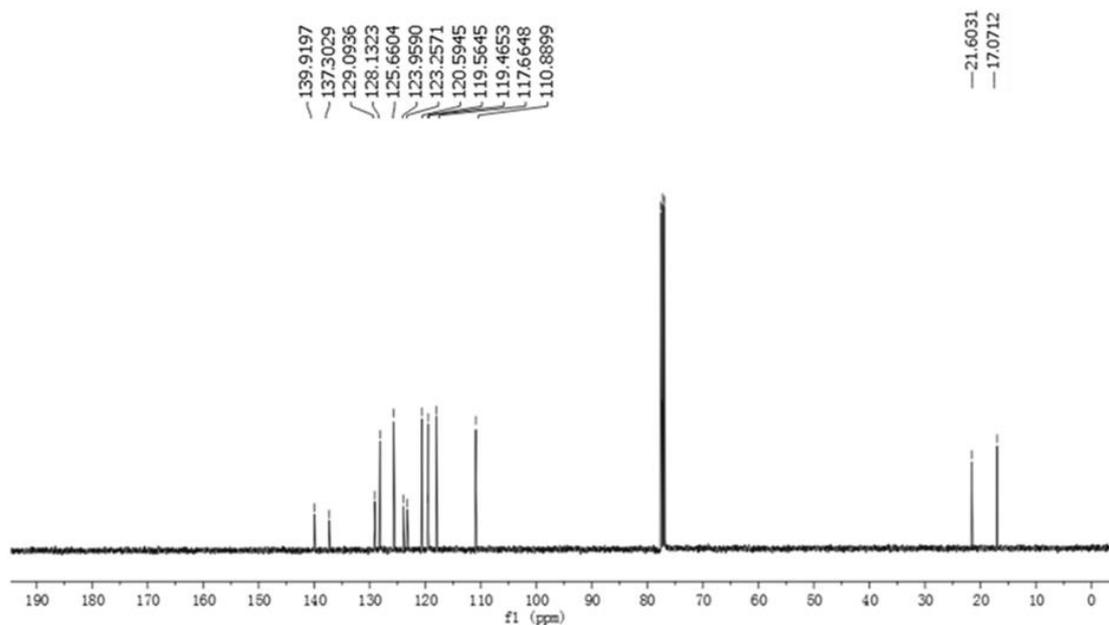
^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9H-carbazol (**3a**)



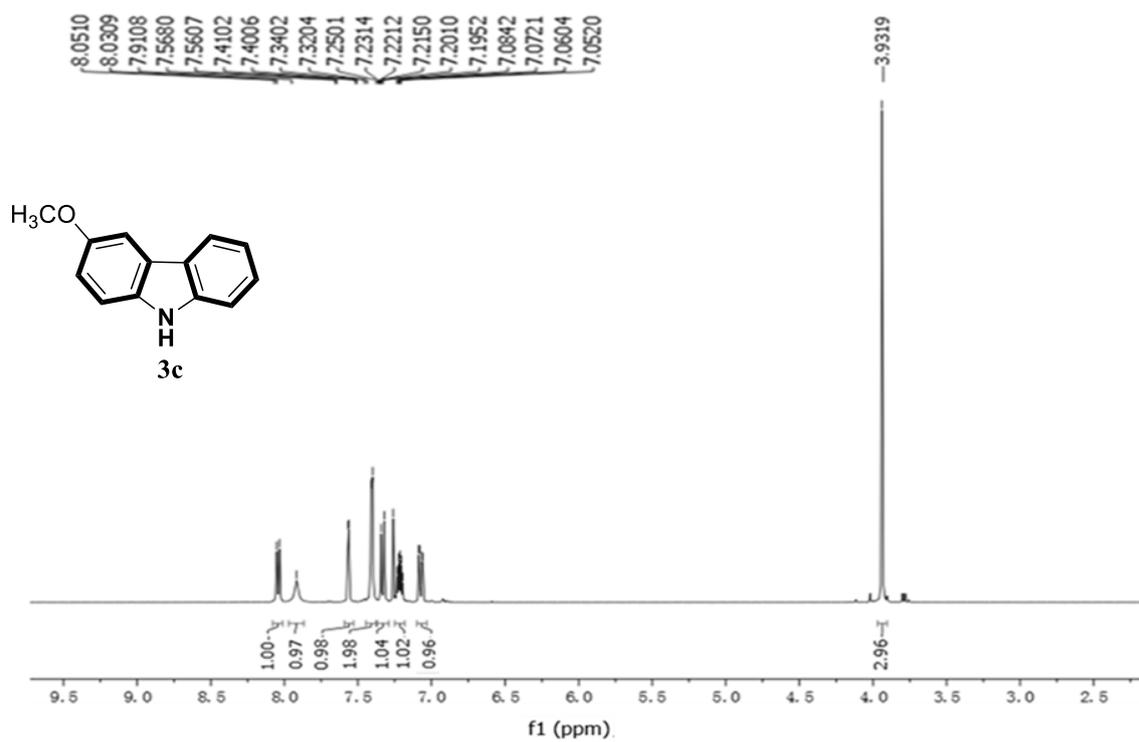
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9H-carbazol (**3a**)



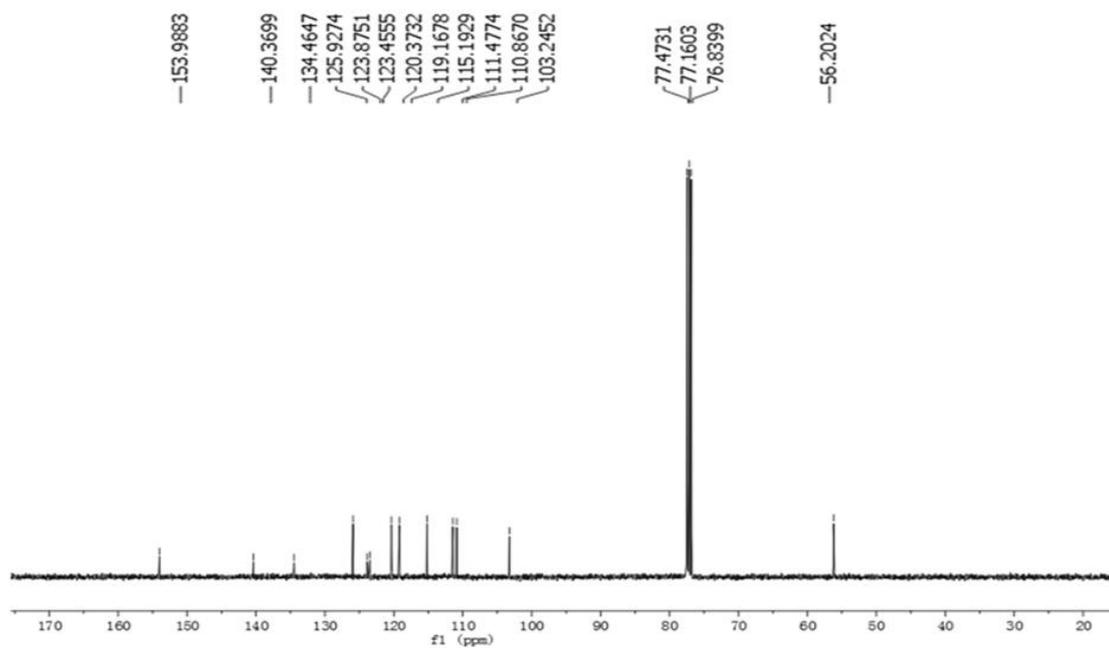
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 1,3-dimetil-9H-carbazol (3b**)**



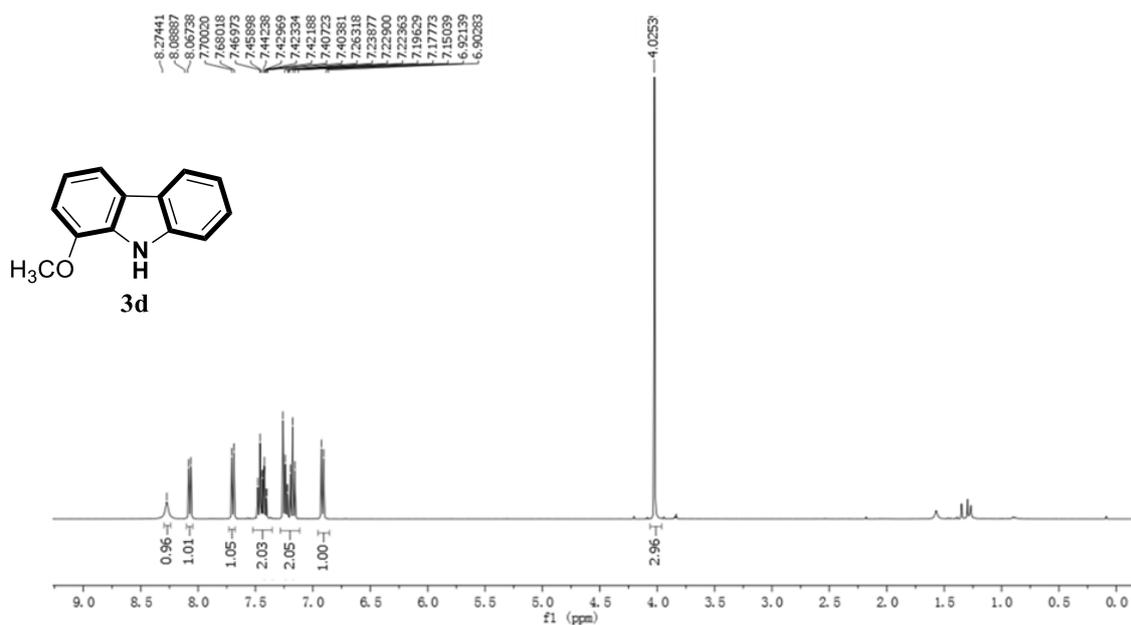
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 1,3-dimetil-9H-carbazol (3b**)**



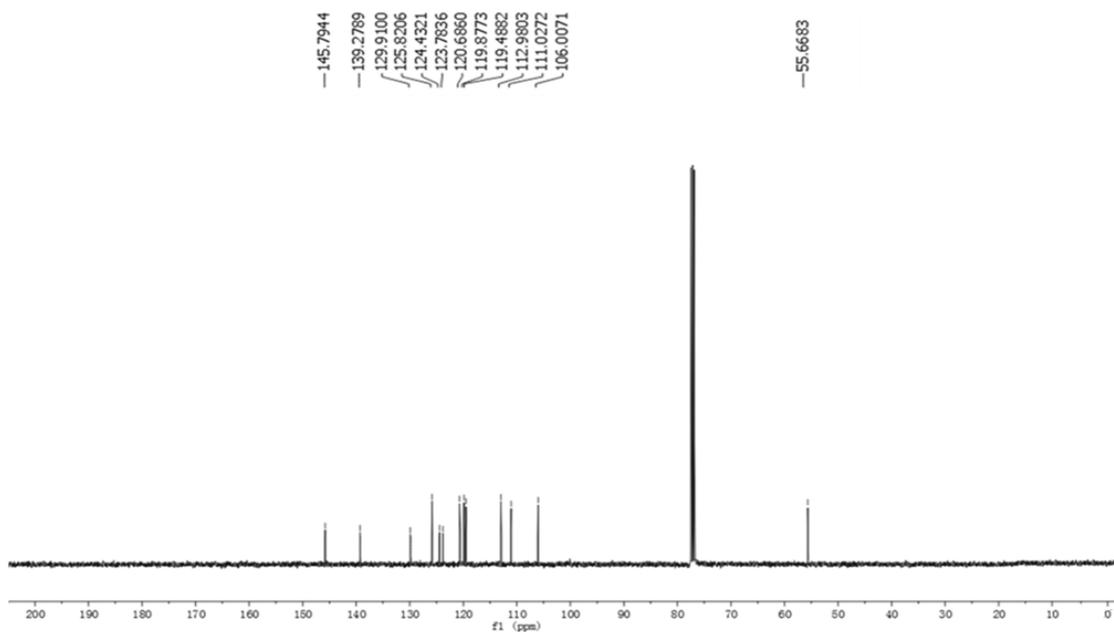
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 3-metoxi-9H-carbazol (**3c**)



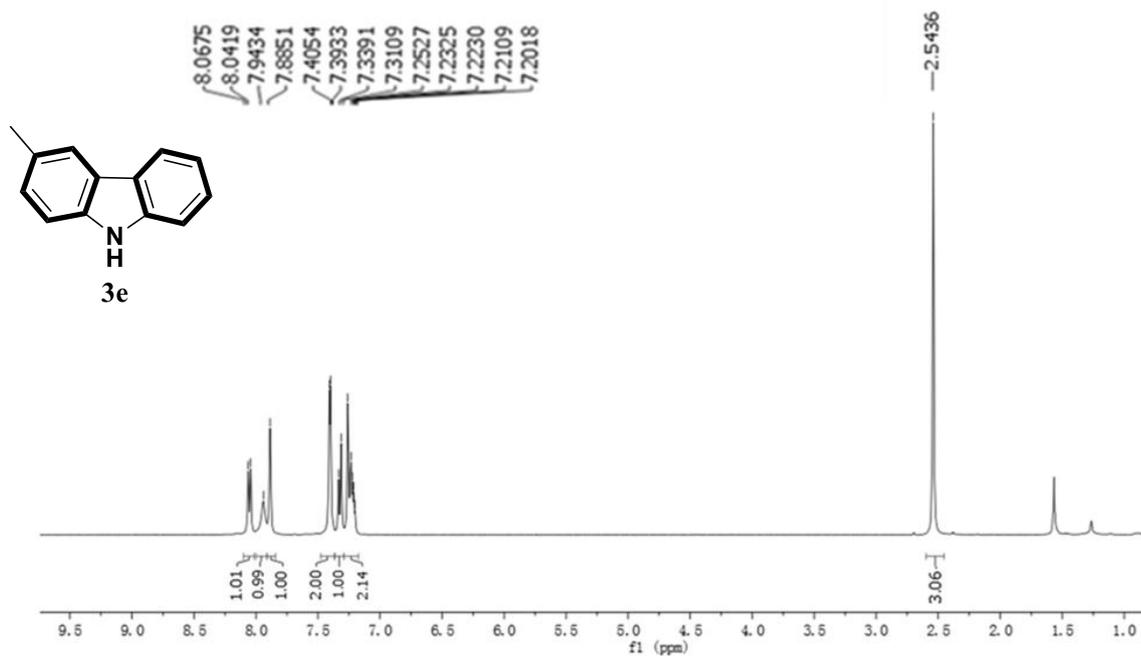
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 3-metoxi-9H-carbazol (**3c**)



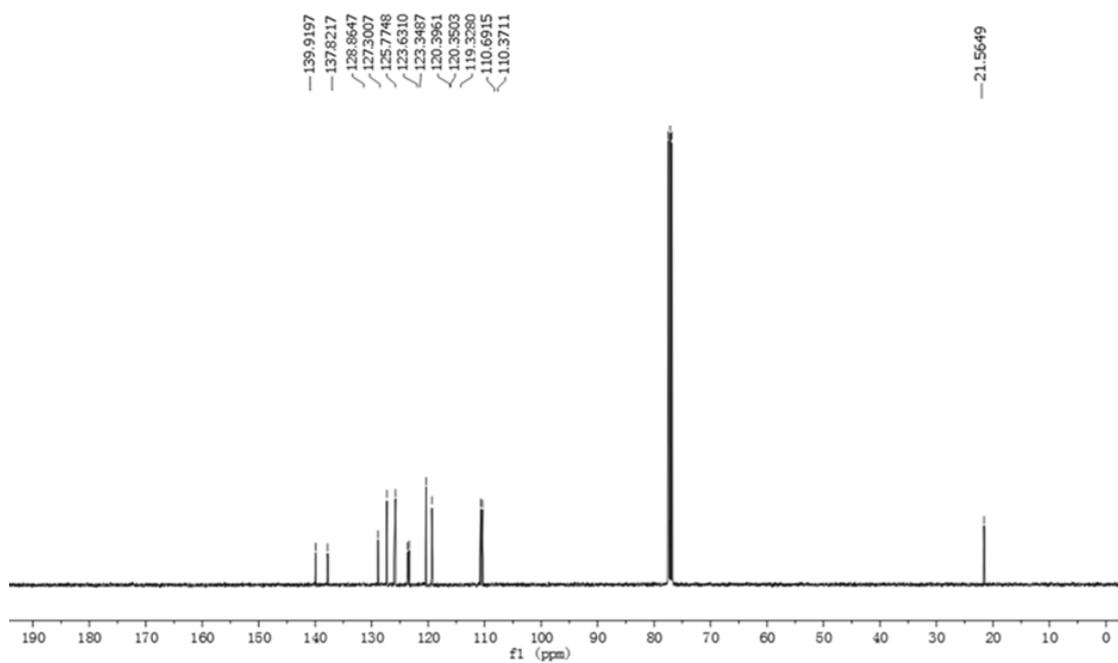
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 1-metoxi-9H-carbazol (**3d**)



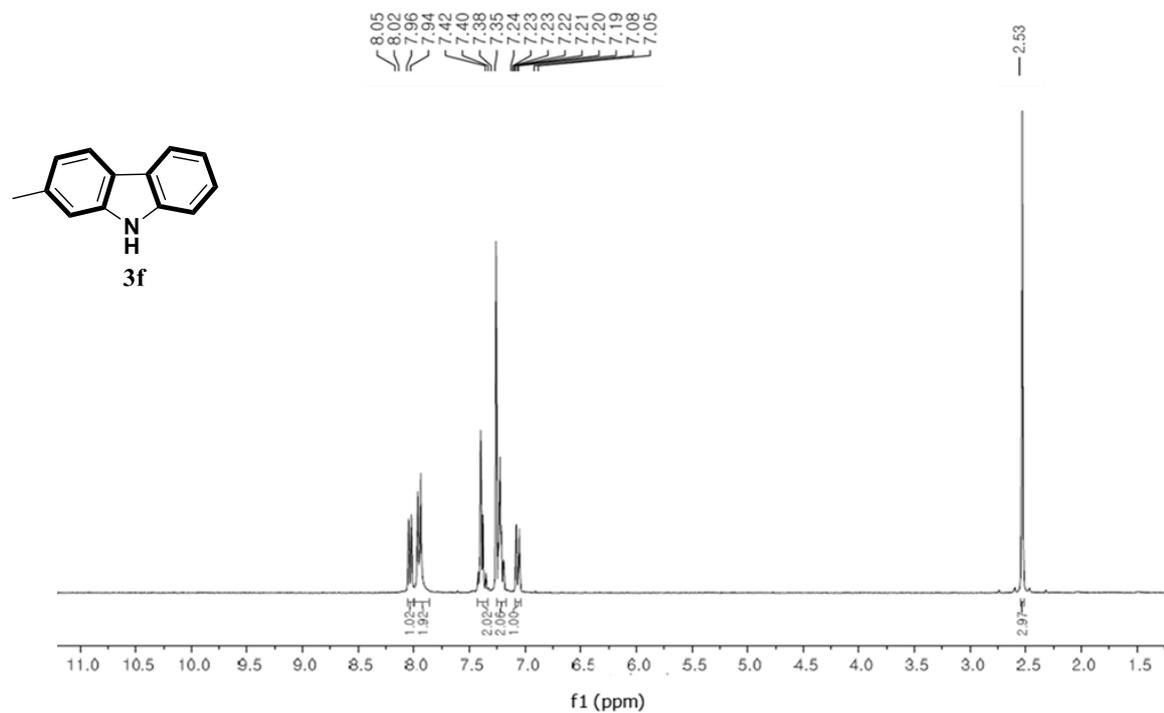
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 1-metoxi-9H-carbazol (**3d**)



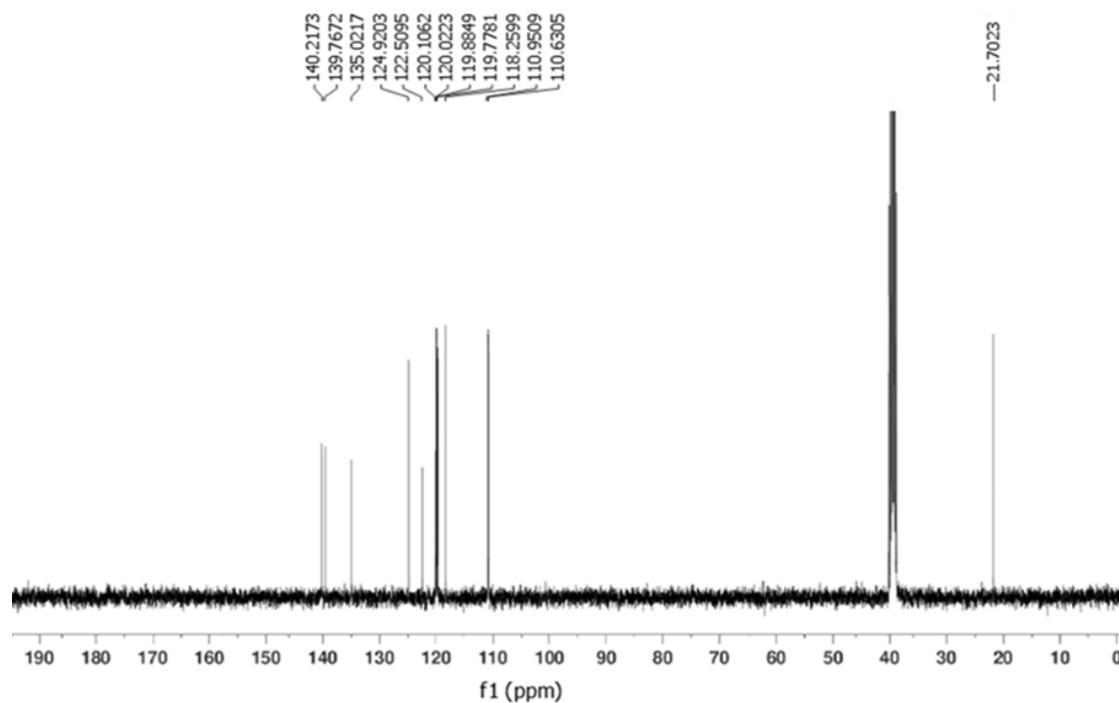
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 3-metil-9H-carbazol (**3e**)



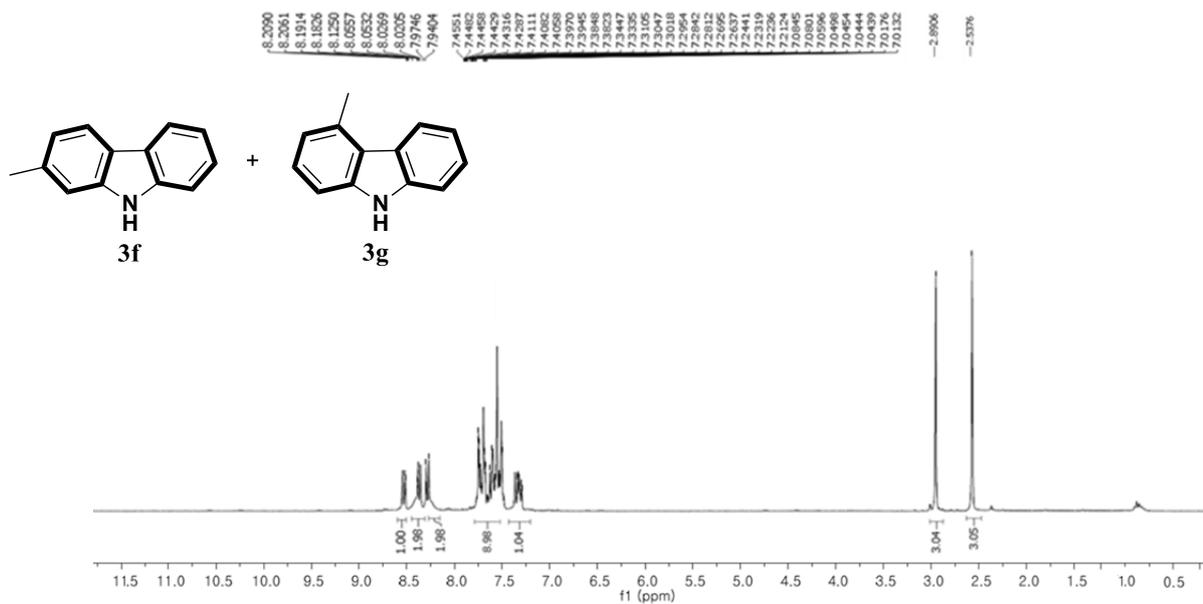
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 3-metil-9H-carbazol (**3e**)



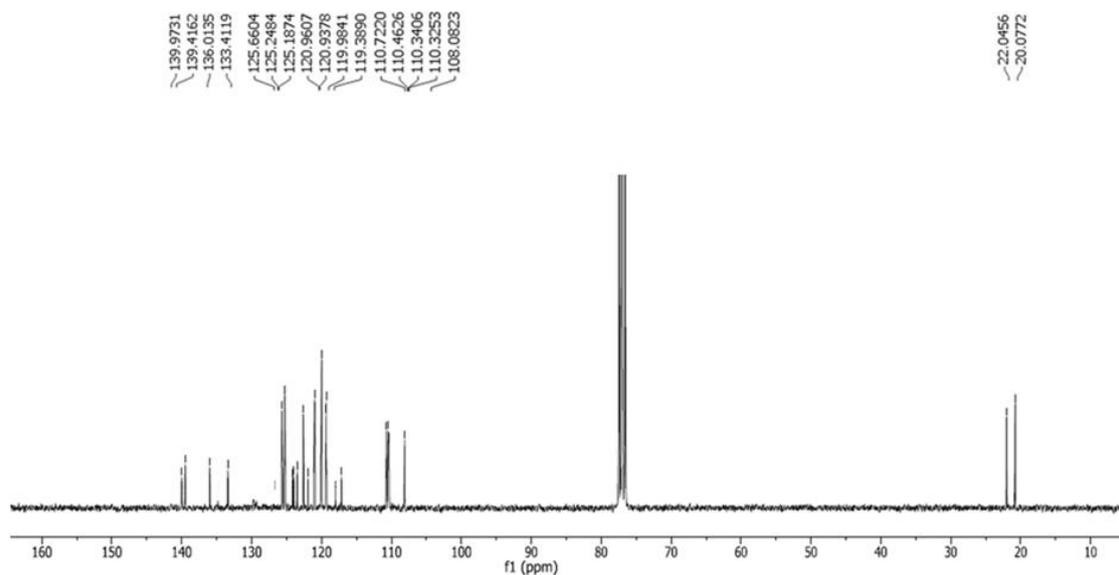
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 2-metil-9H-carbazol (**3f**)



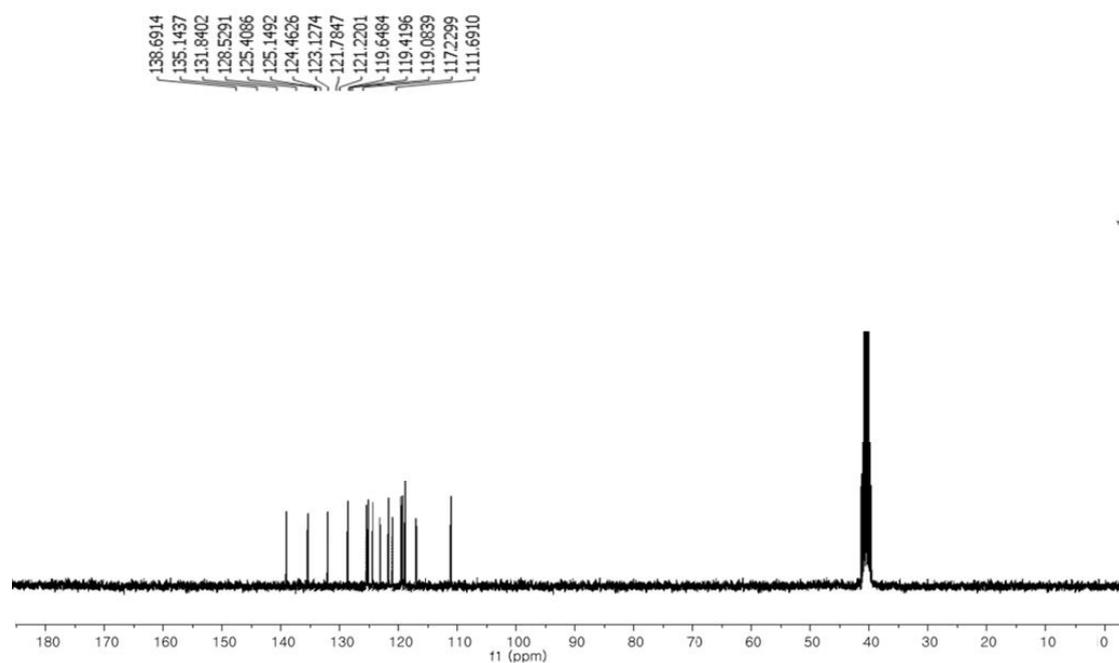
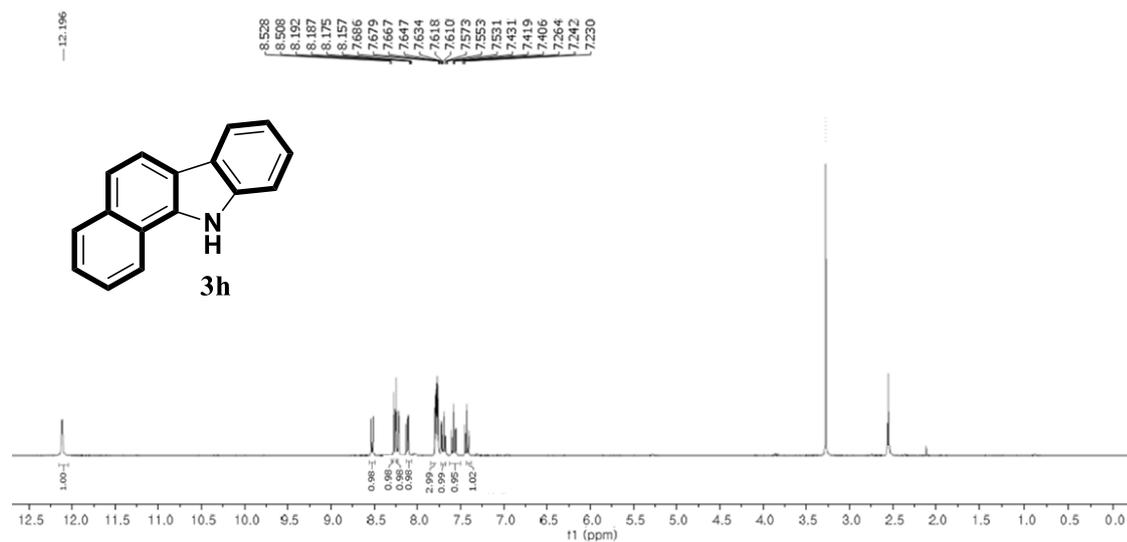
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) de 2-metil-9H-carbazol (**3f**)

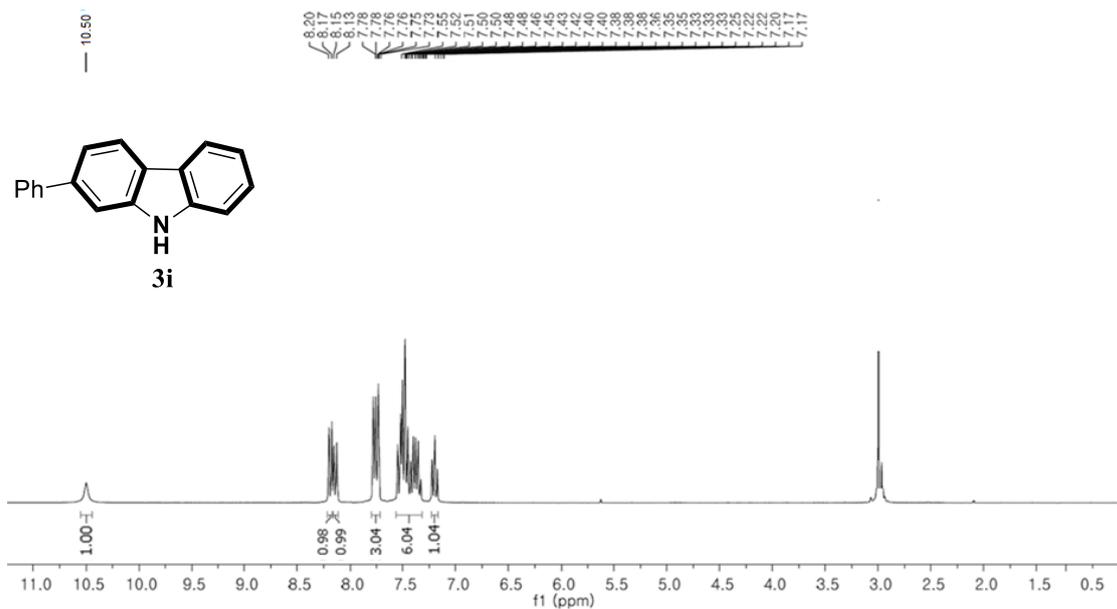


^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 2-metil-9H-carbazol (**3f**) y 4-metil-9H-carbazol (**3g**)

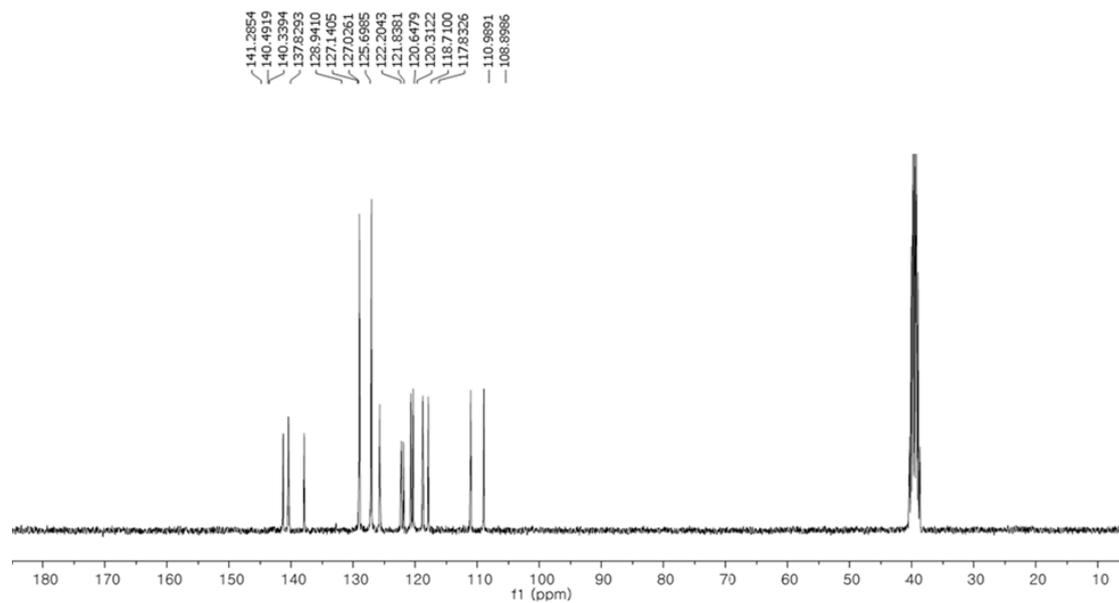


^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 2-metil-9H-carbazol (**3f**) y 4-metil-9H-carbazol (**3g**)

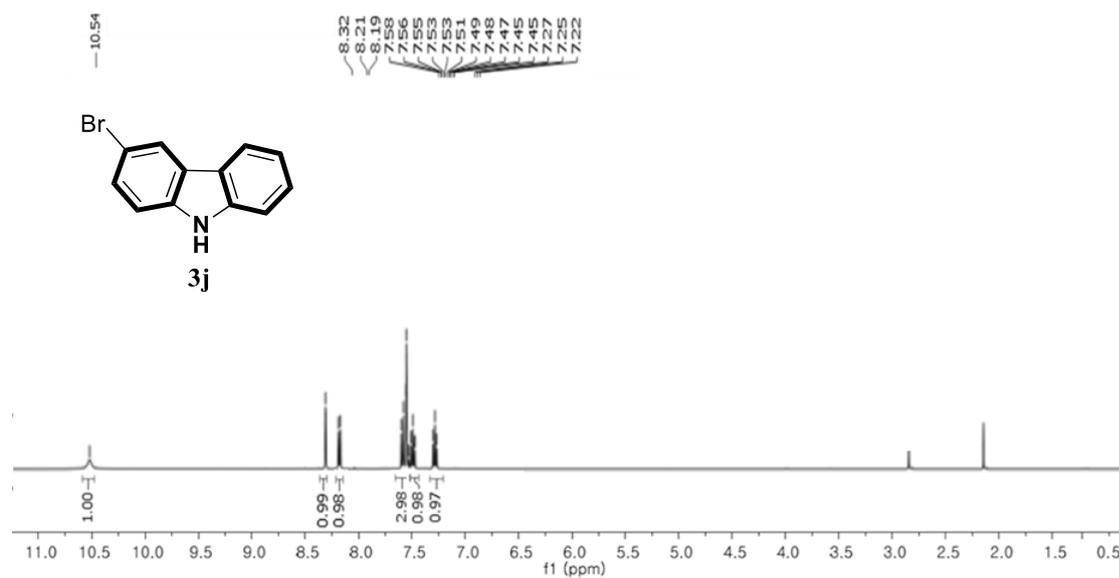




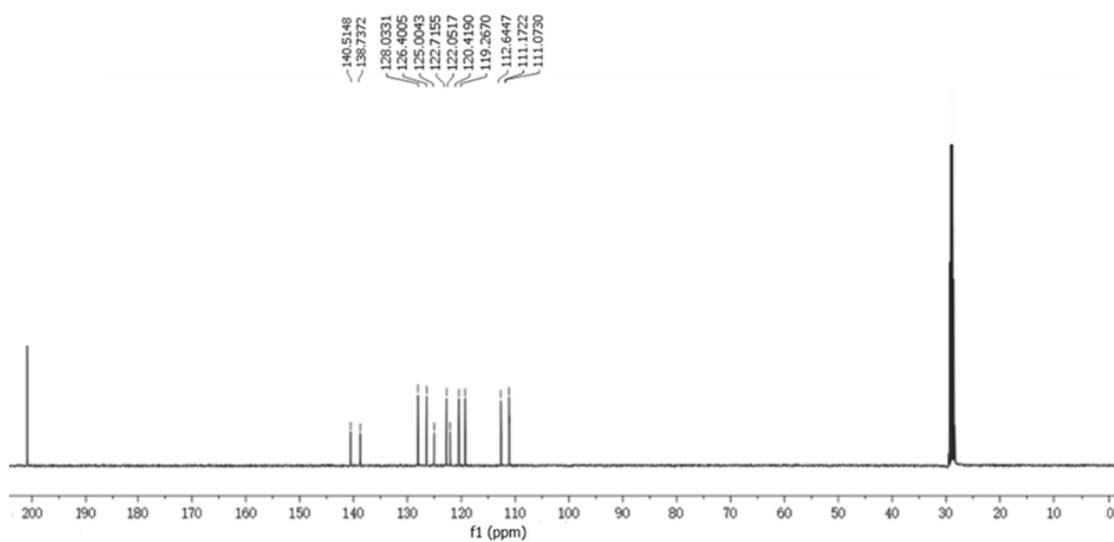
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6) de 2-fenil-9H-carbazol (**3i**)



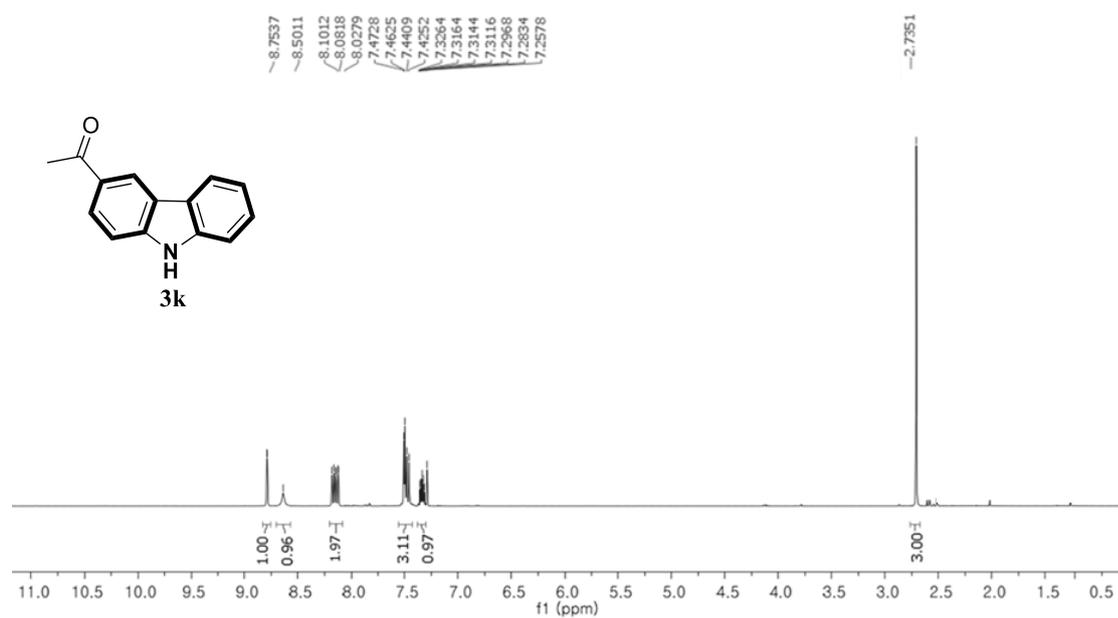
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) de 2-fenil-9H-carbazol (**3i**)



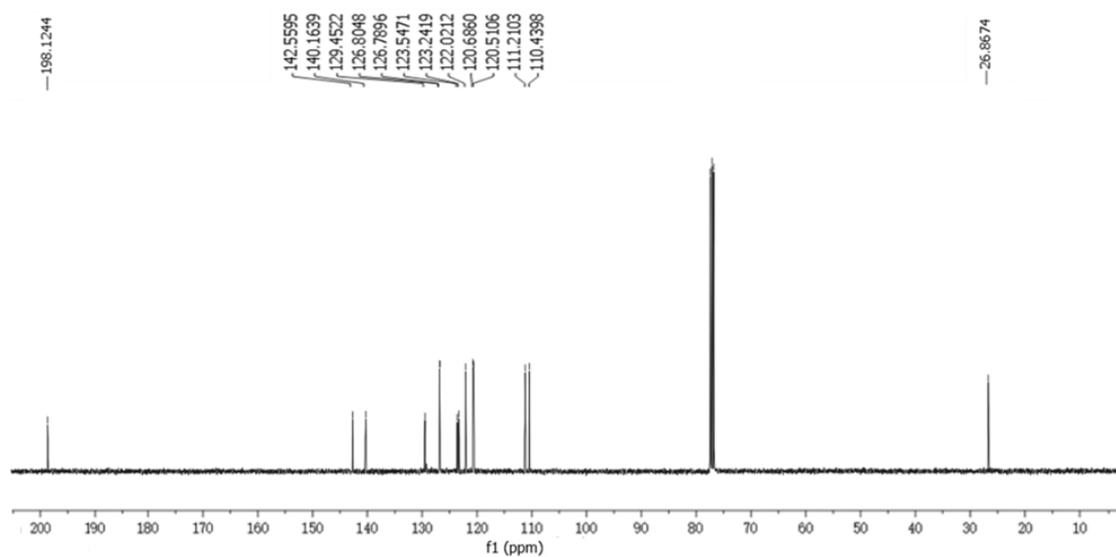
¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) de 3-bromo-9*H*-carbazol (**3j**)



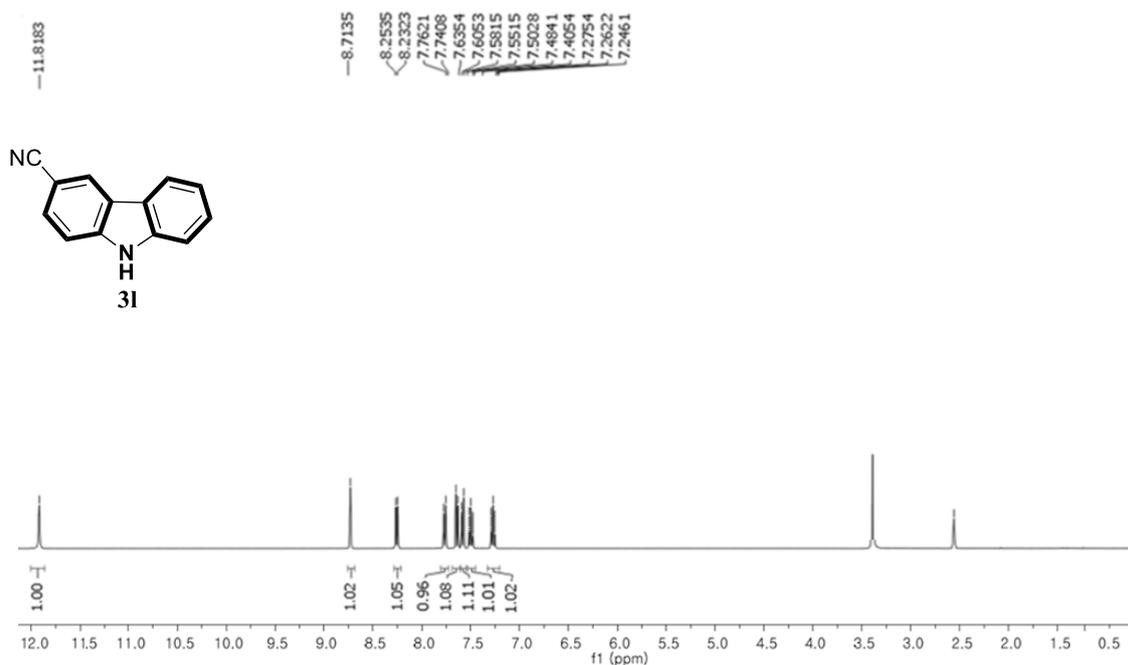
¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) de 3-bromo-9*H*-carbazol (**3j**)



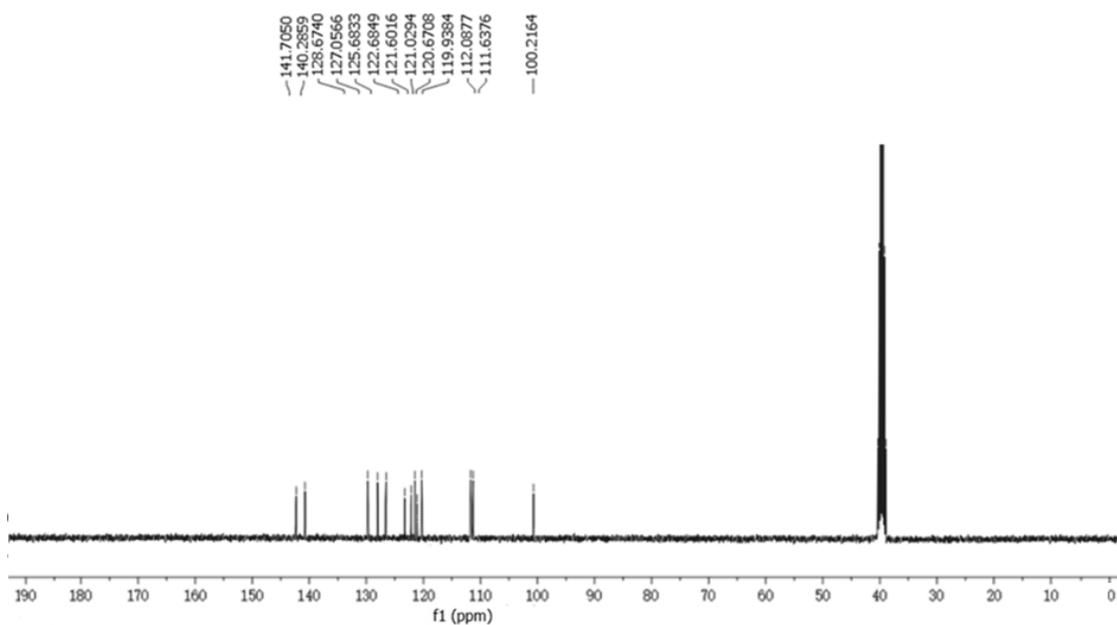
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 1-(9H-carbazol-3-il)etan-1-ona (**3k**)



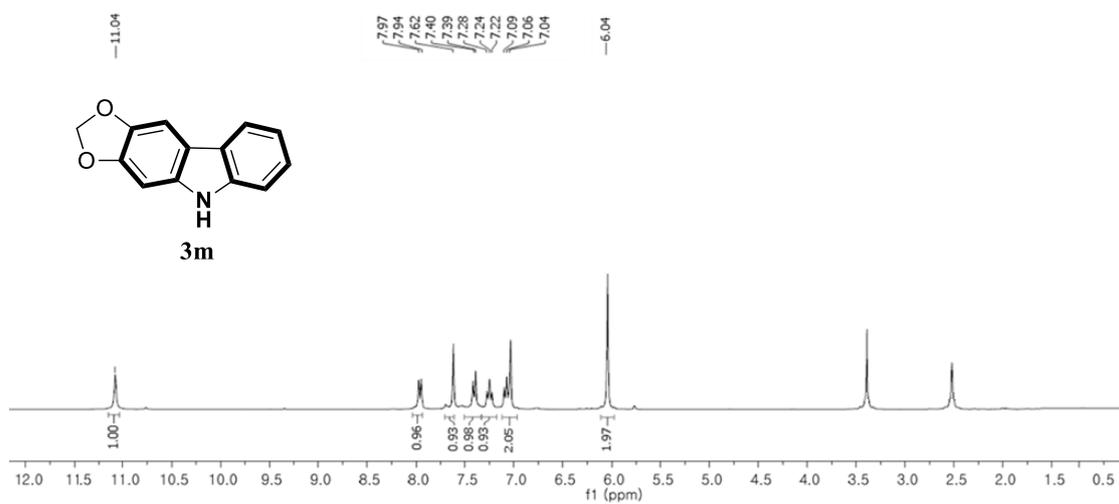
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 1-(9H-carbazol-3-il)etan-1-ona (**3k**)



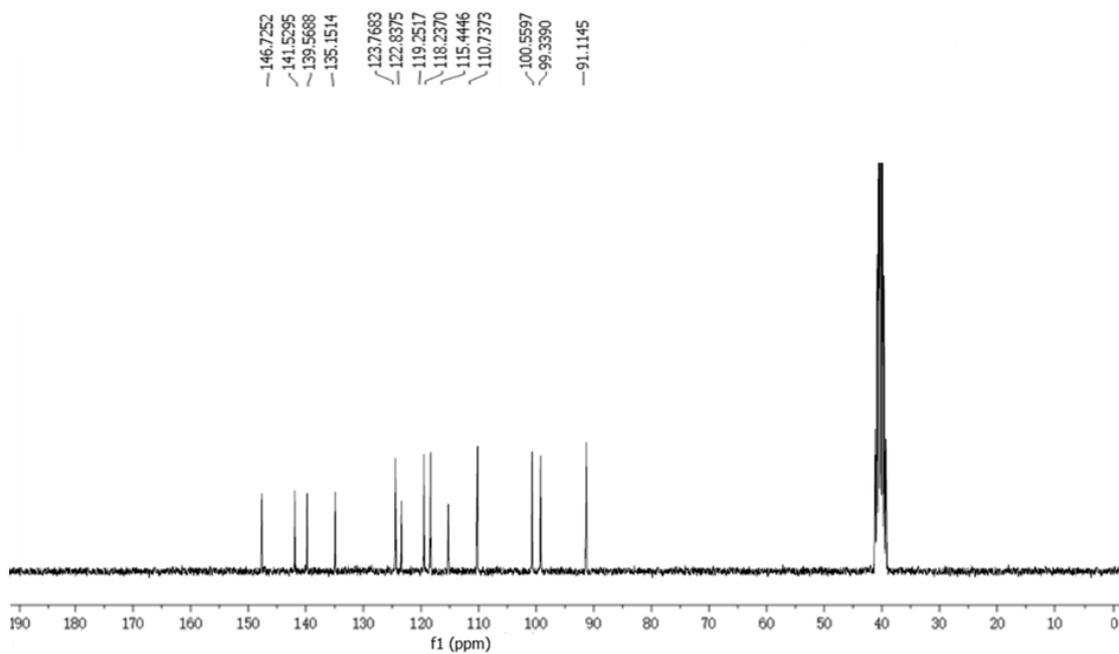
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) de 3-carbonitrilo-9*H*-carbazol (**31**)



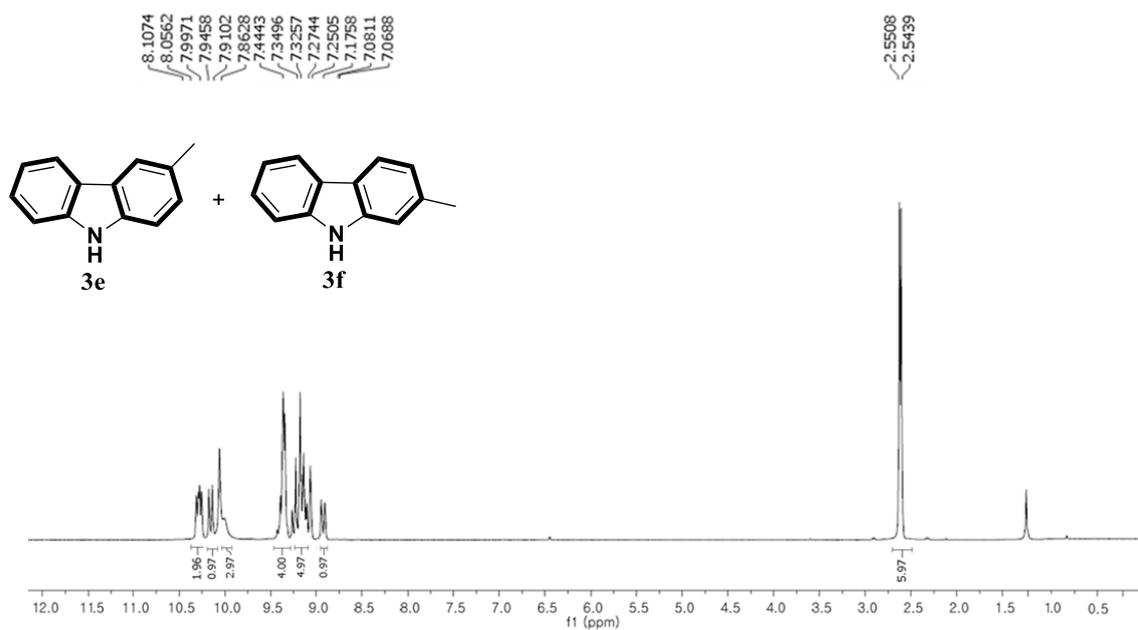
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) de 3-carbonitrilo-9*H*-carbazol (**31**)



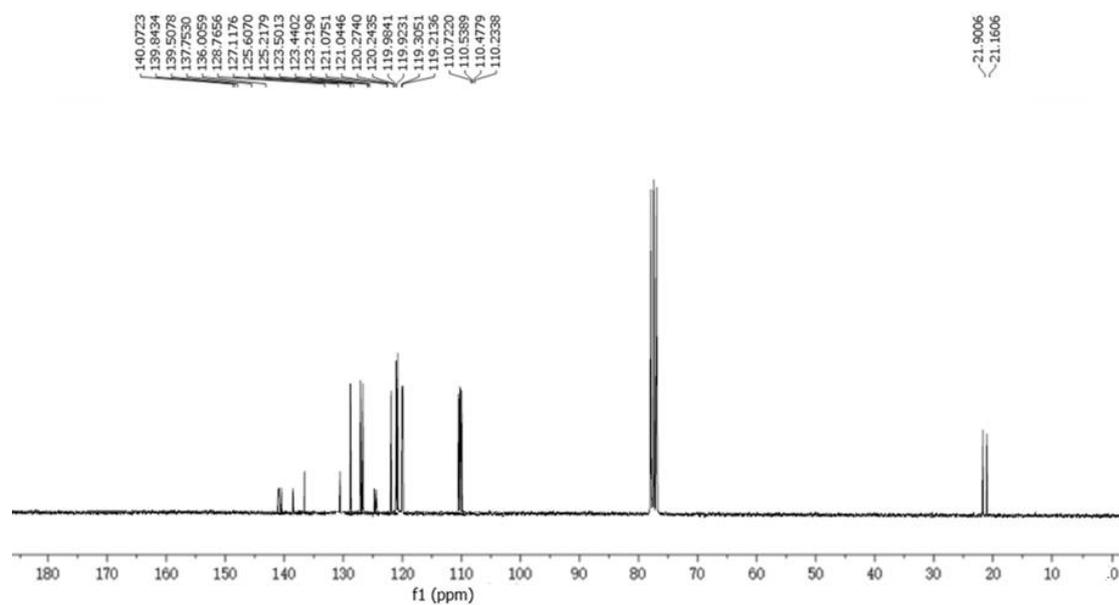
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) de 5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]carbazol (**3m**)



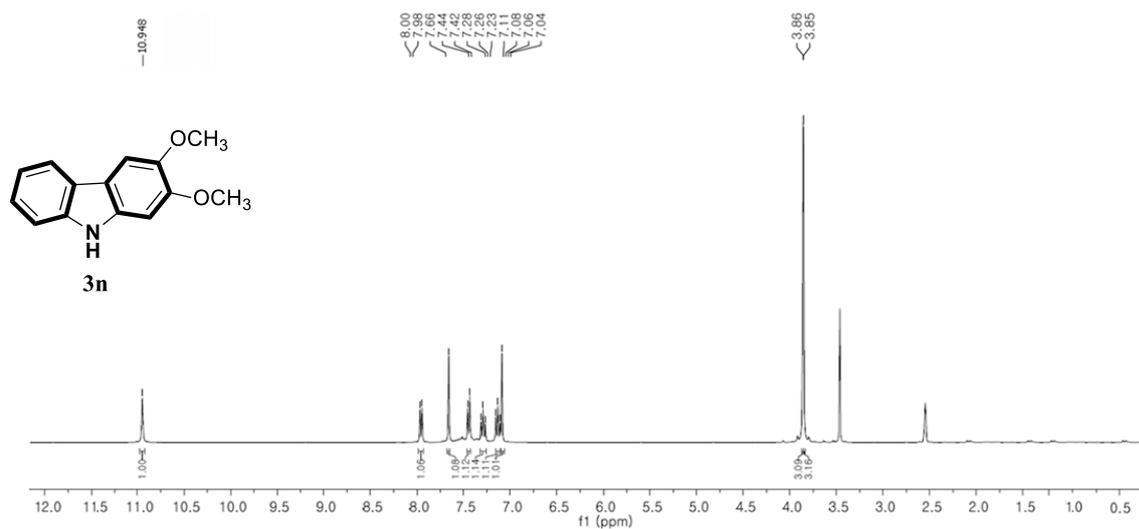
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) de 5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]carbazol (**3m**)



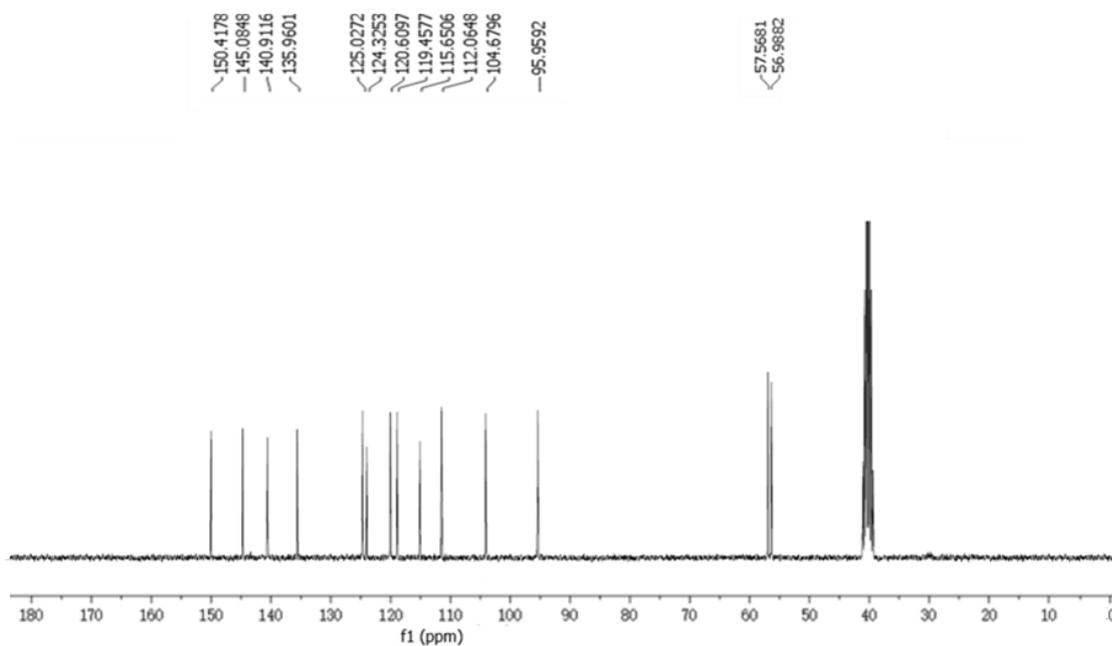
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 3-metil-9*H*-carbazol (**3e**) y 2-metil-9*H*-carbazol (**3f**)



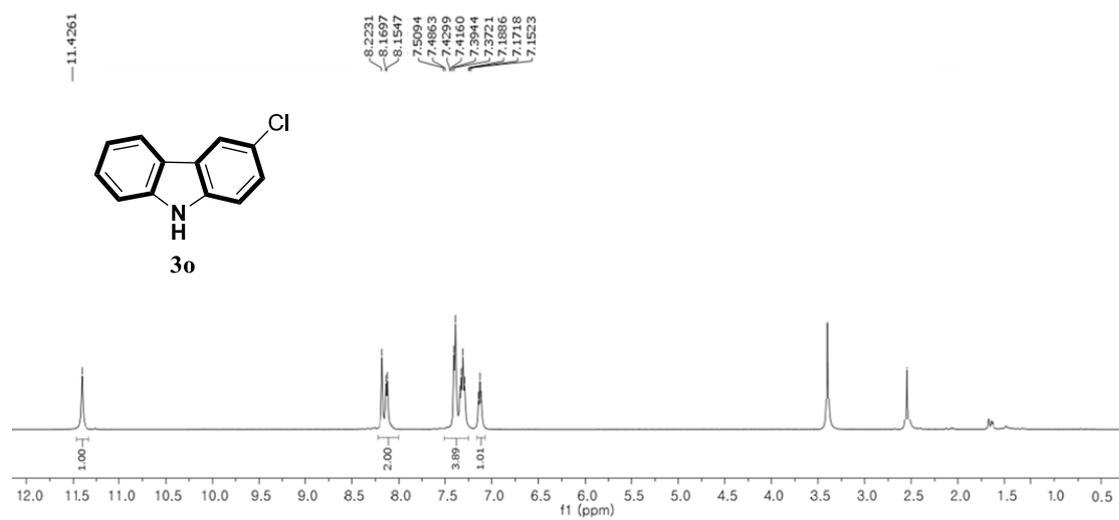
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 3-metil-9*H*-carbazol (**3e**) y 2-metil-9*H*-carbazol (**3f**)



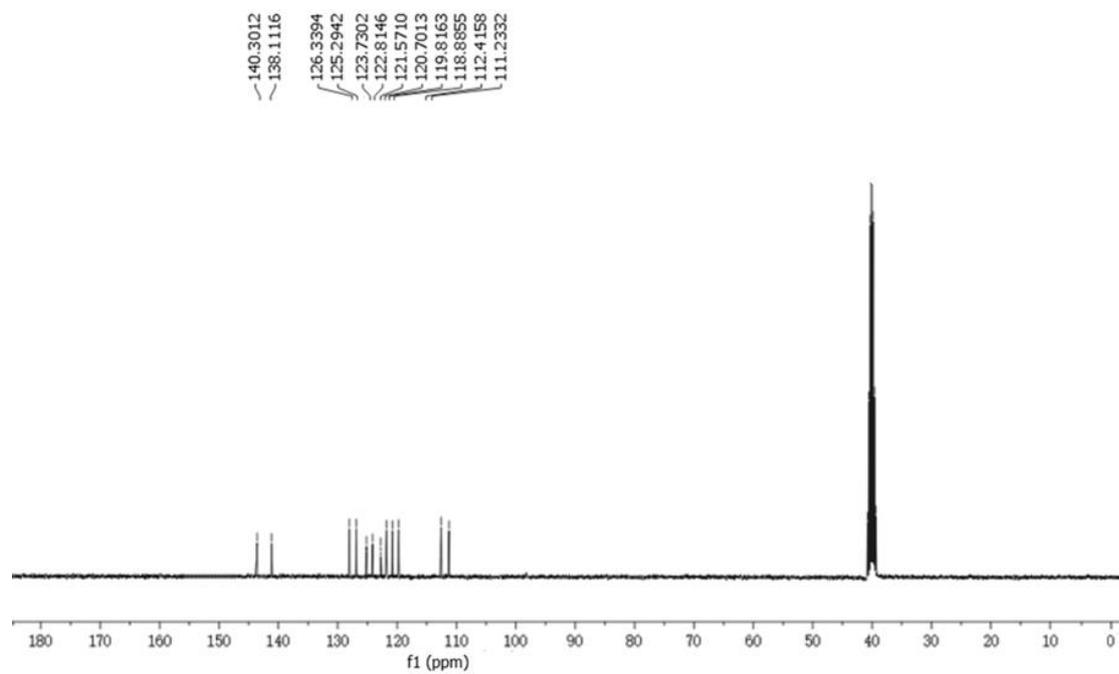
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2,3-dimetoxi-9H-carbazol (**3n**)



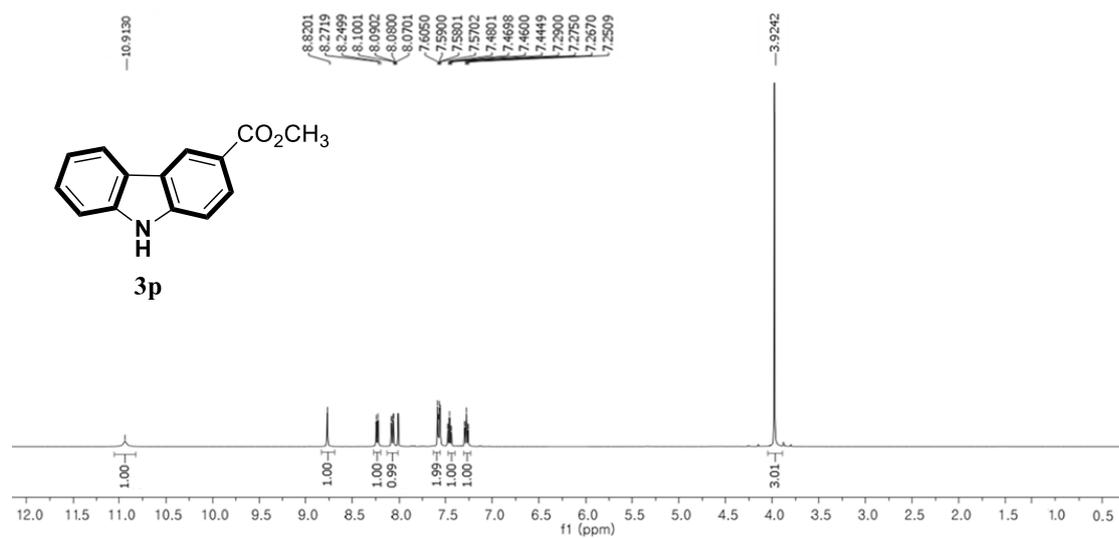
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2,3-dimetoxi-9H-carbazol (**3n**)



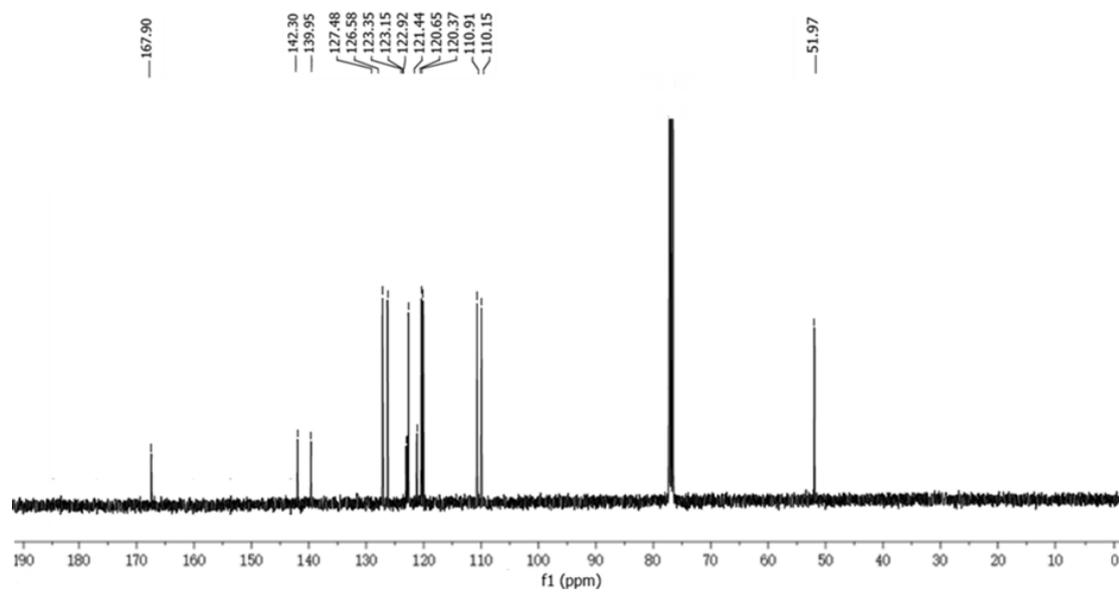
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 3-cloro-9H-carbazol (**3o**)



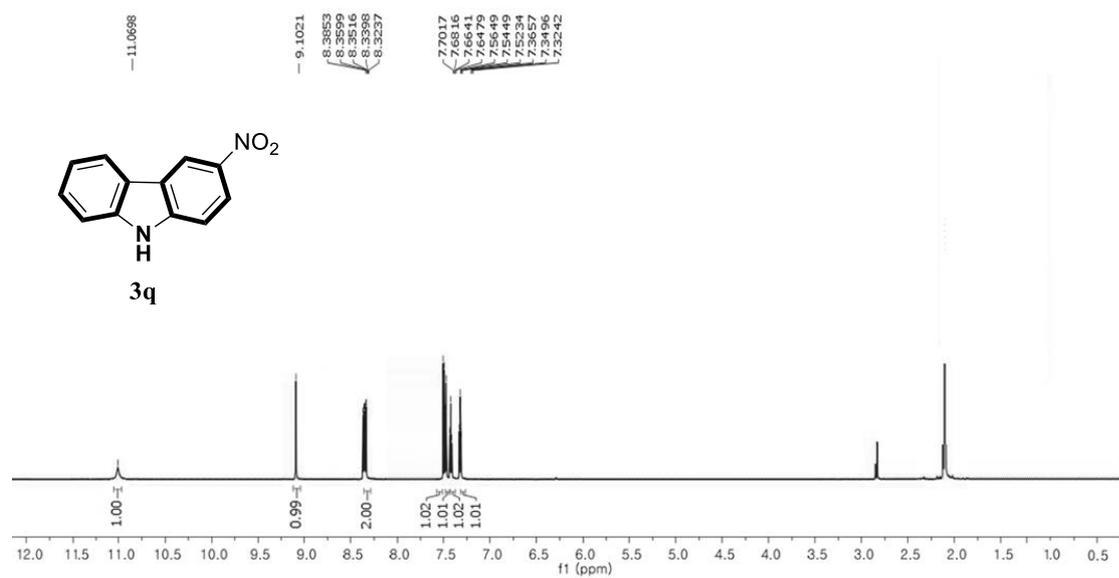
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 3-cloro-9H-carbazol (**3o**)



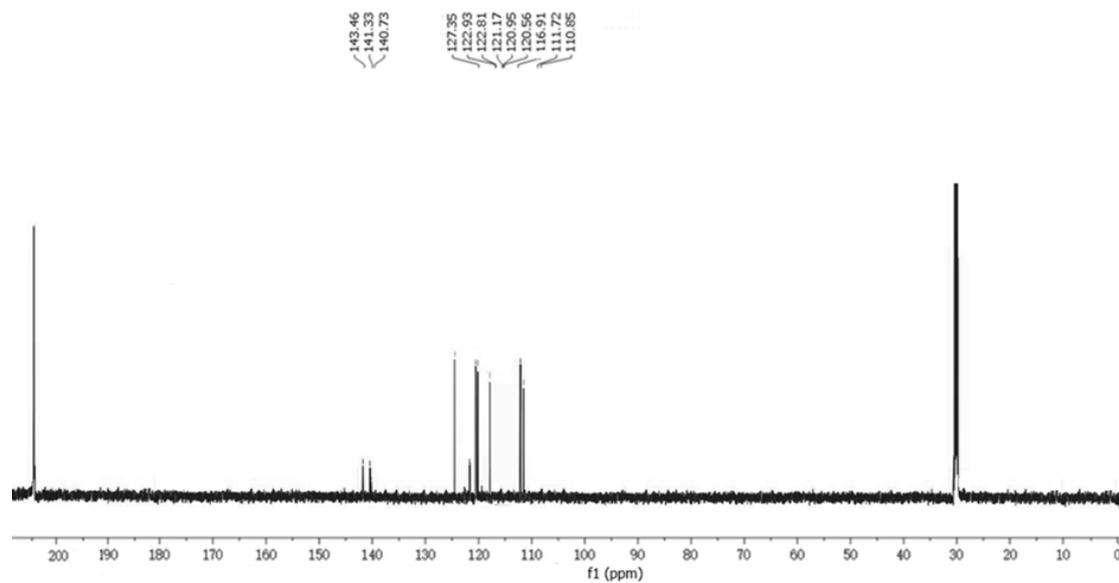
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de metil-9*H*-carbazol-3-carboxilato (**3p**)



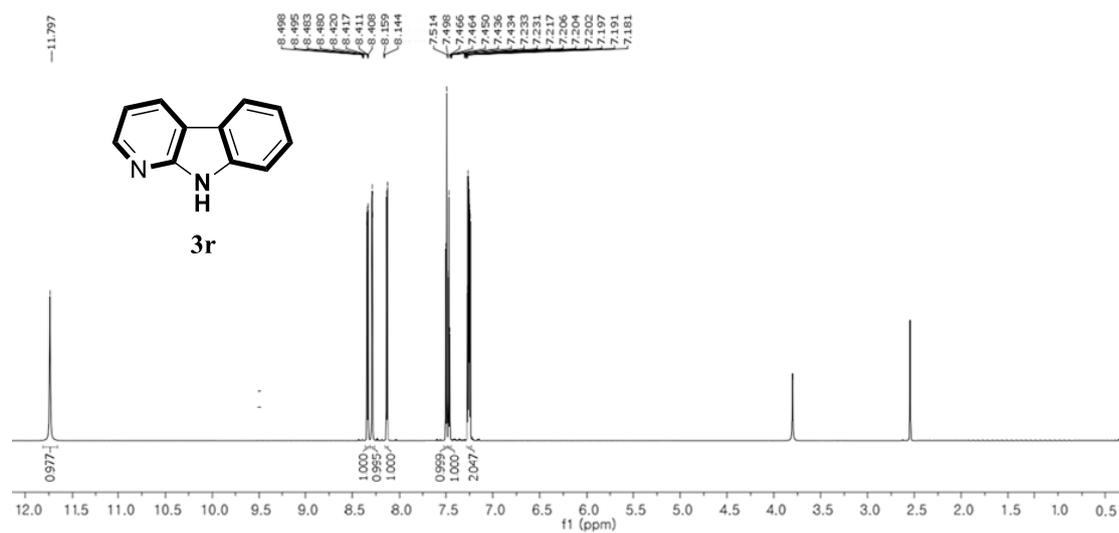
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de metil-9*H*-carbazol-3-carboxilato (**3p**)



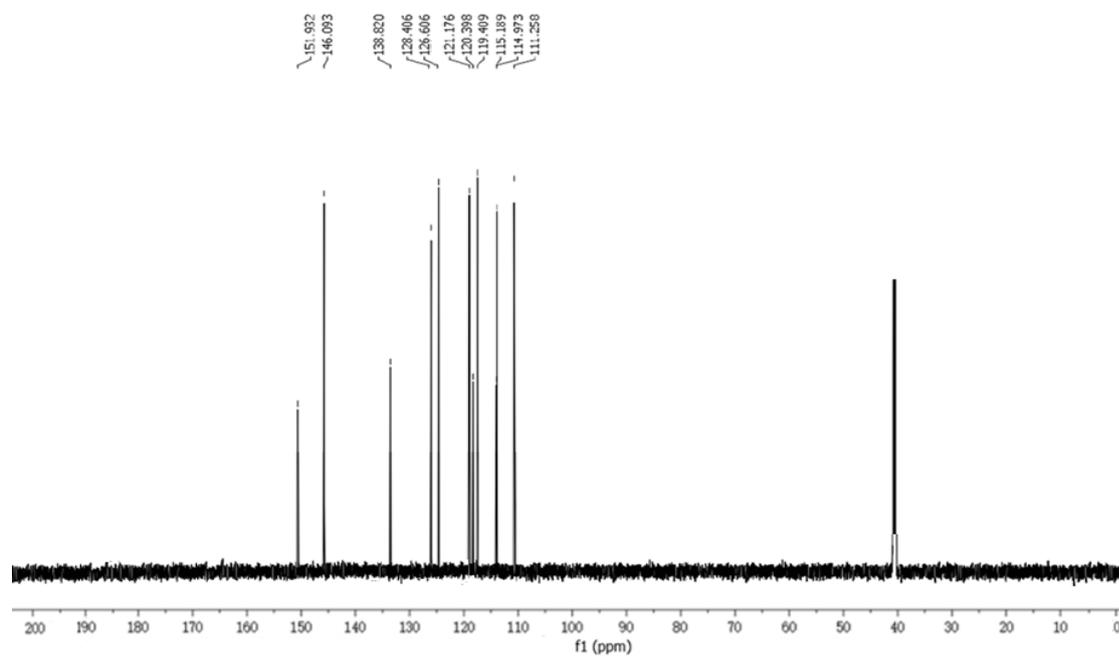
^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6) de 3-nitro-9H-carbazol (**3q**)



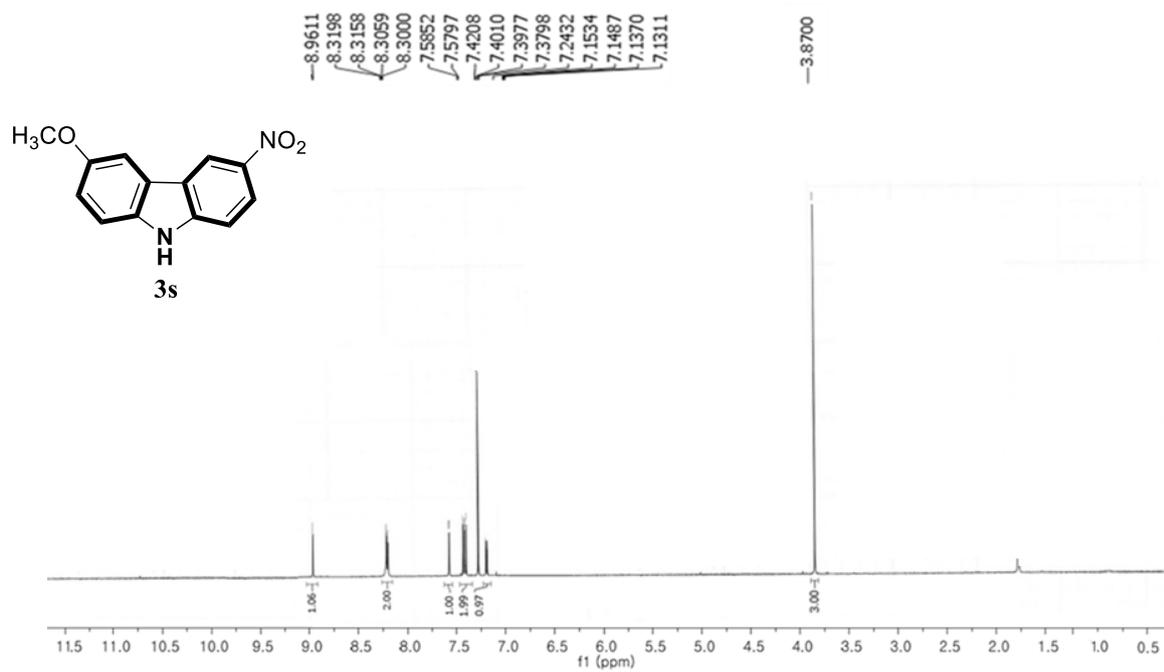
^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6) de 3-nitro-9H-carbazol (**3q**)



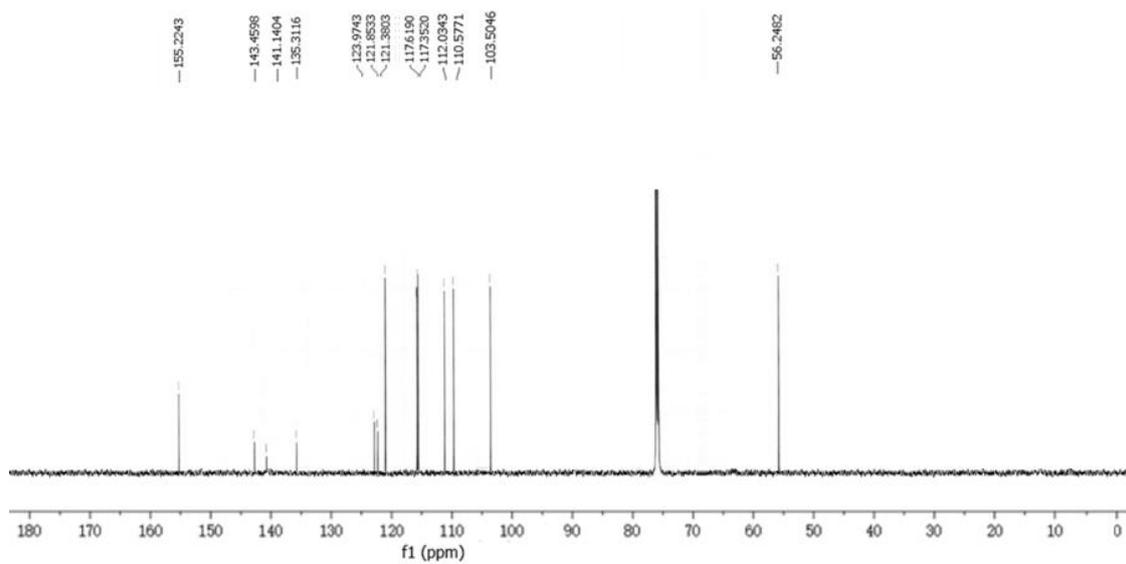
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) de 9*H*-pirido[2,3-*b*]indol (**3r**)



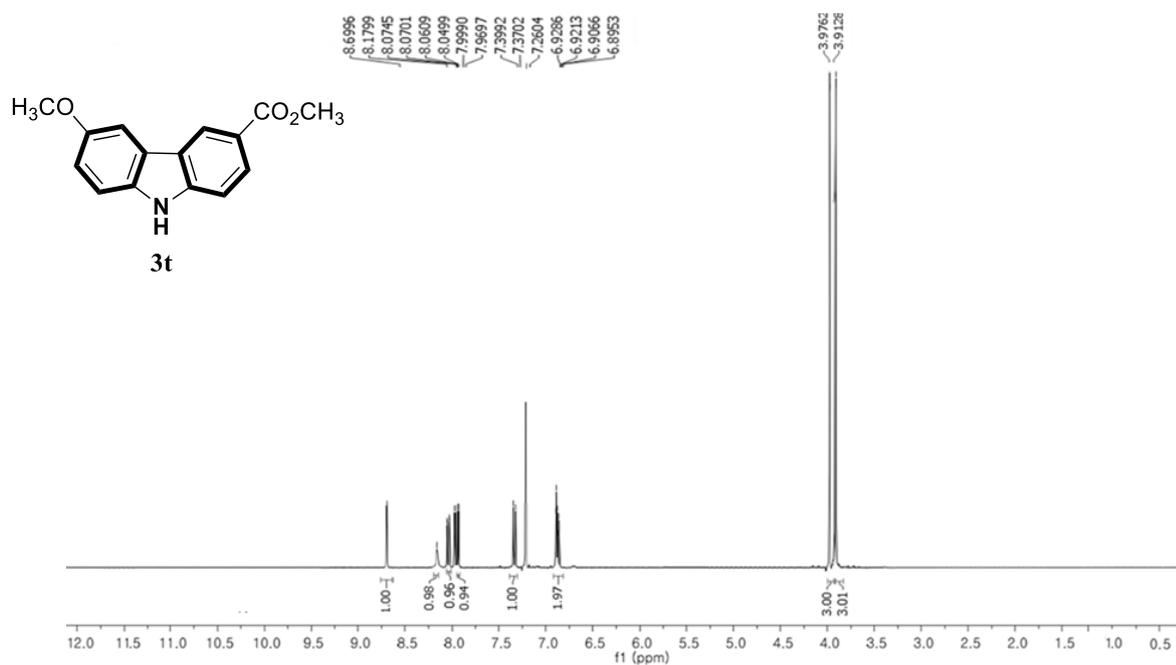
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) de 9*H*-pirido[2,3-*b*]indol (**3r**)



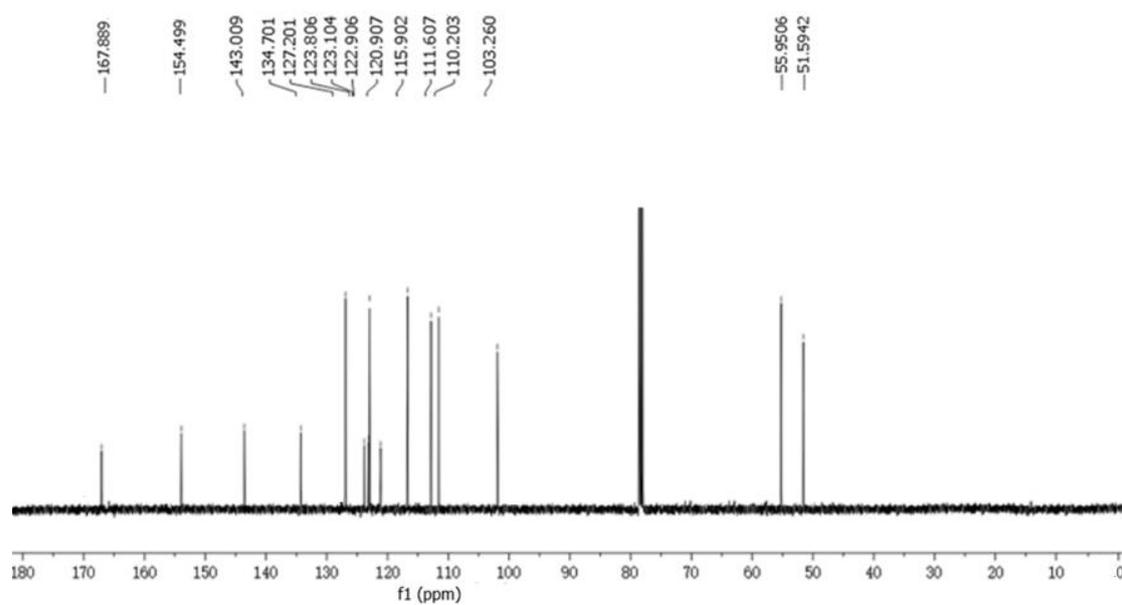
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 3-nitro-6-metoxi-9H-carbazol (**3s**)



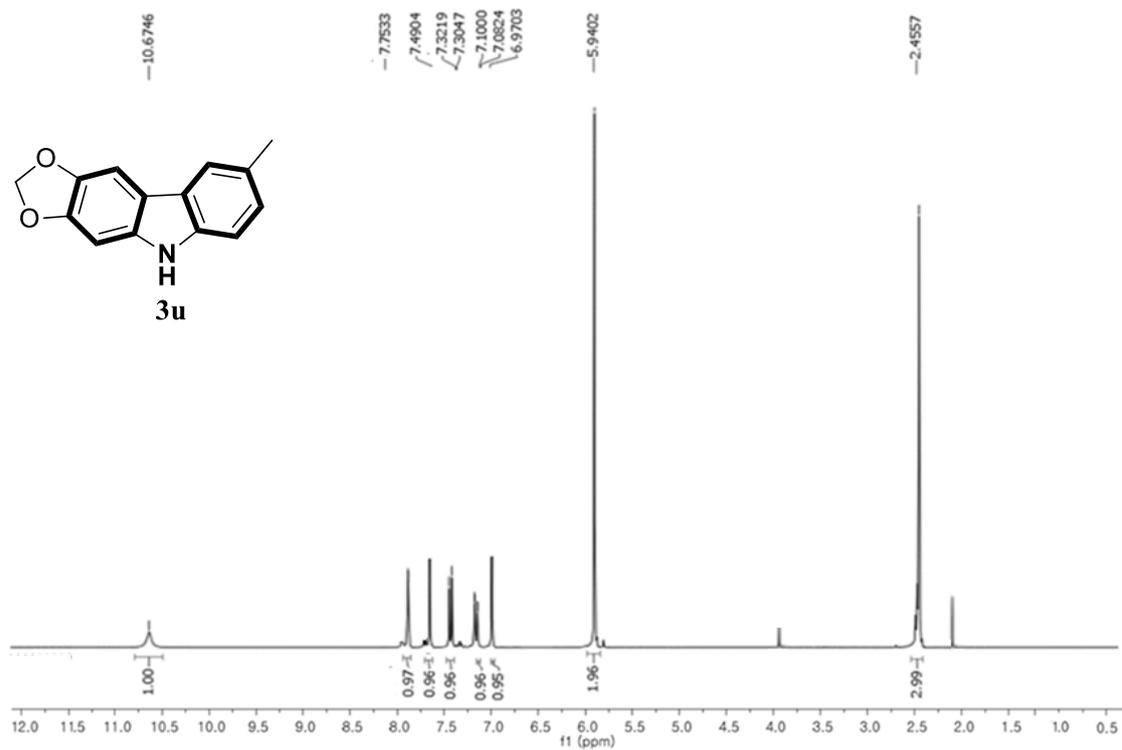
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 3-nitro-6-metoxi-9H-carbazol (**3s**)



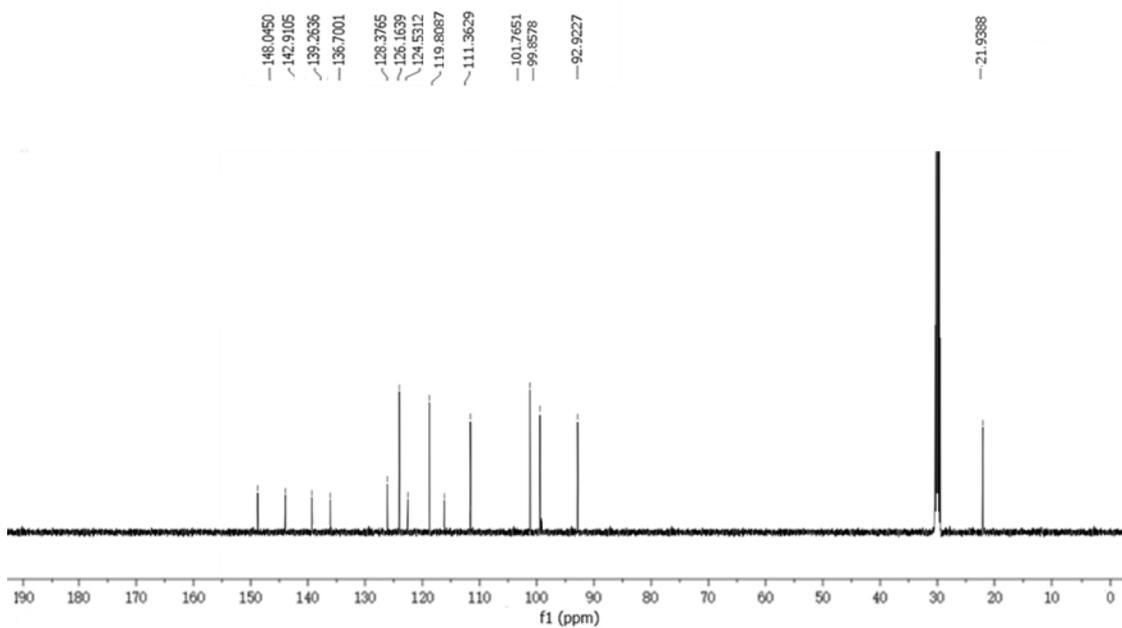
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de metil-6-metoxi-9H-carbazol-3-carboxilato (**3t**)



¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de metil-6-metoxi-9H-carbazol-3-carboxilato (**3t**)

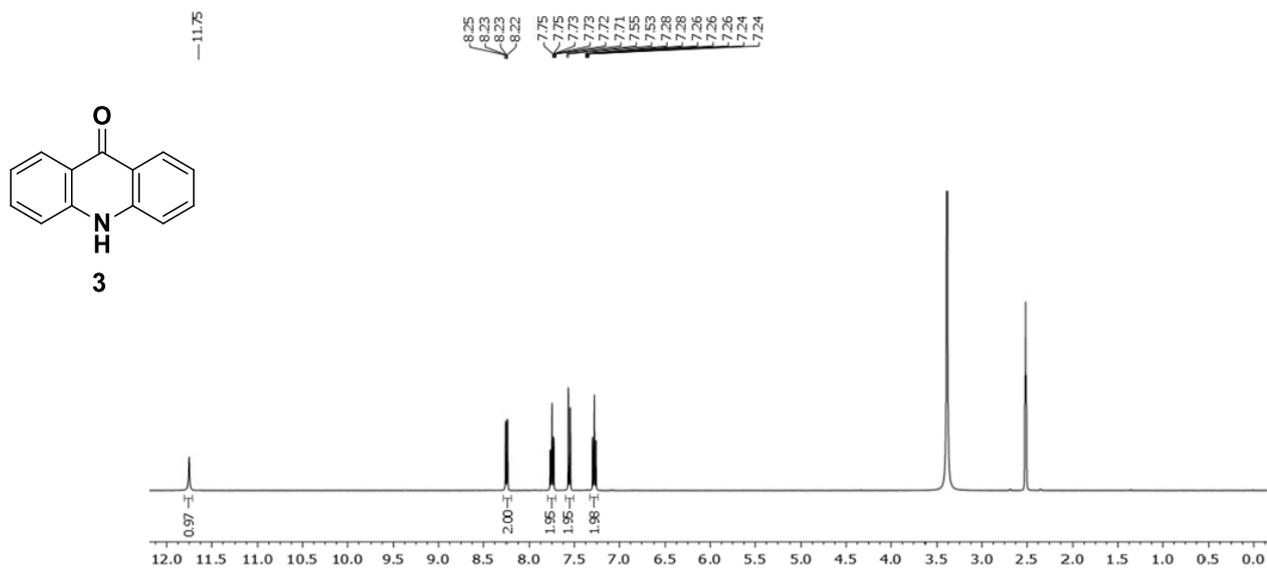


¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) de 8-metil-5*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*b*]carbazol (**3u**)

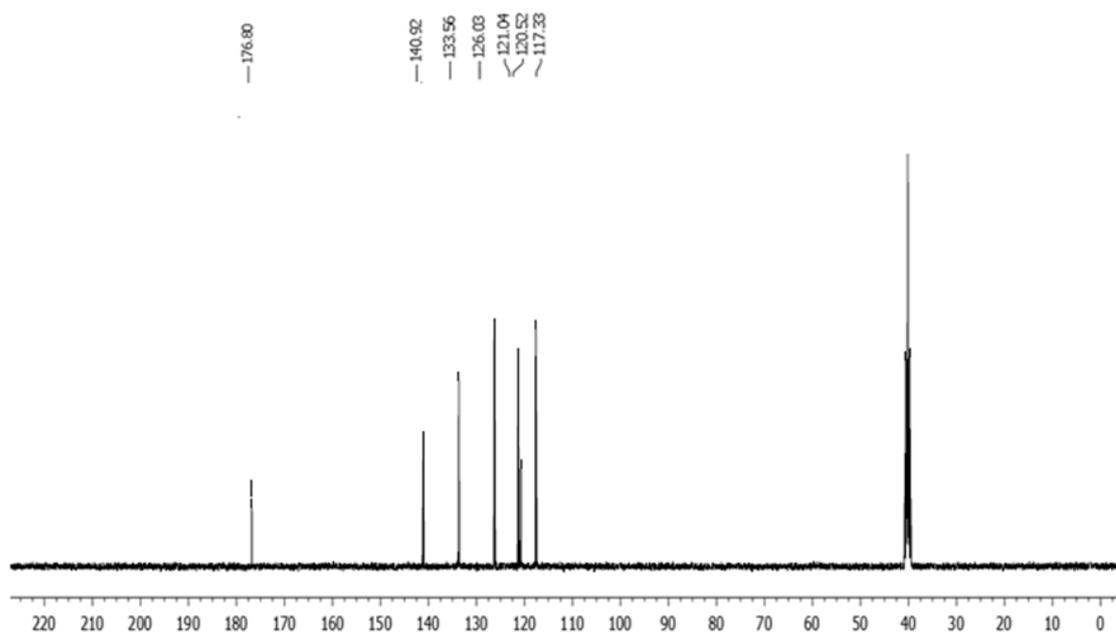


¹³C NMR (75 MHz, Acetone-*d*₆) de 8-metil-5*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*b*]carbazol (**3u**)

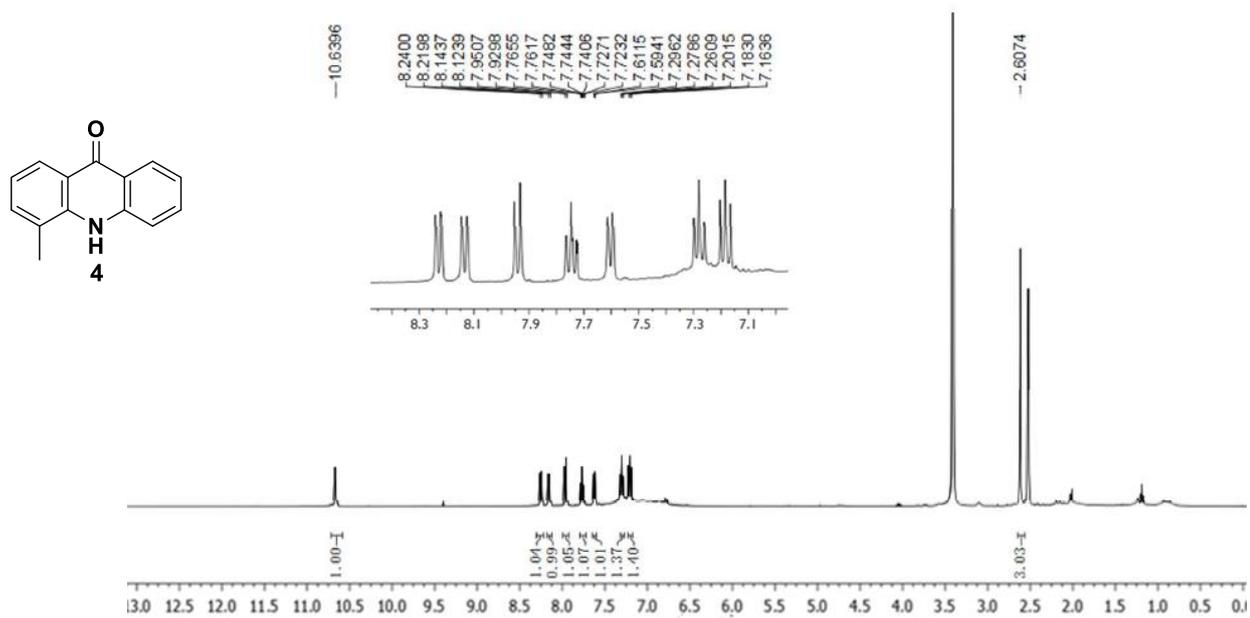
2. Acridonas



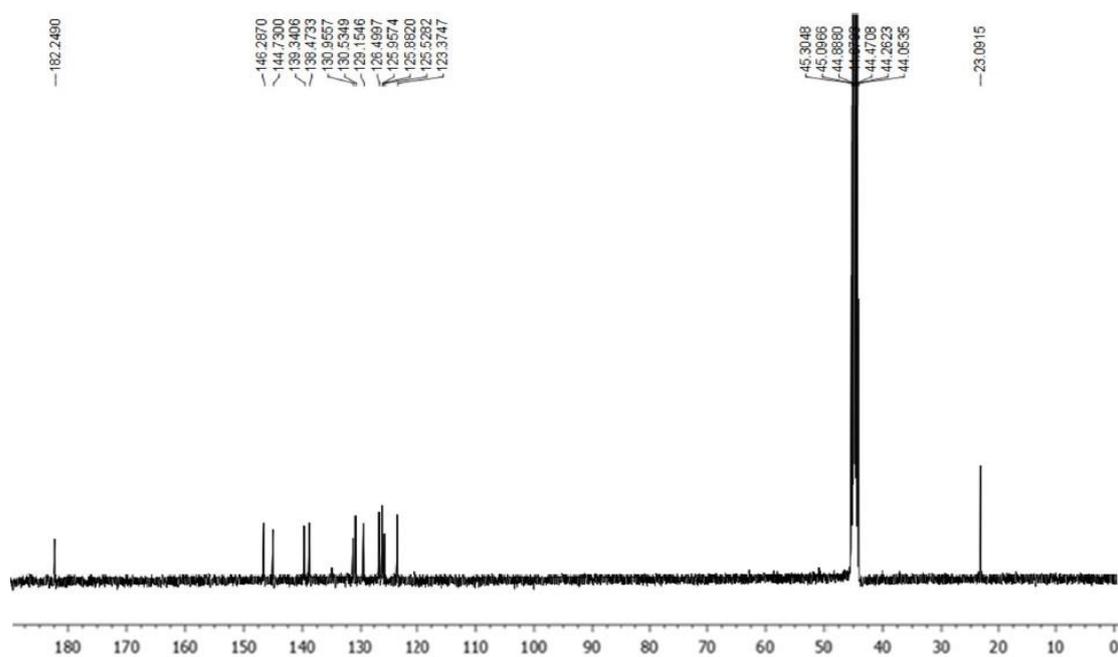
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) de acridin-9(10H)-one (3)



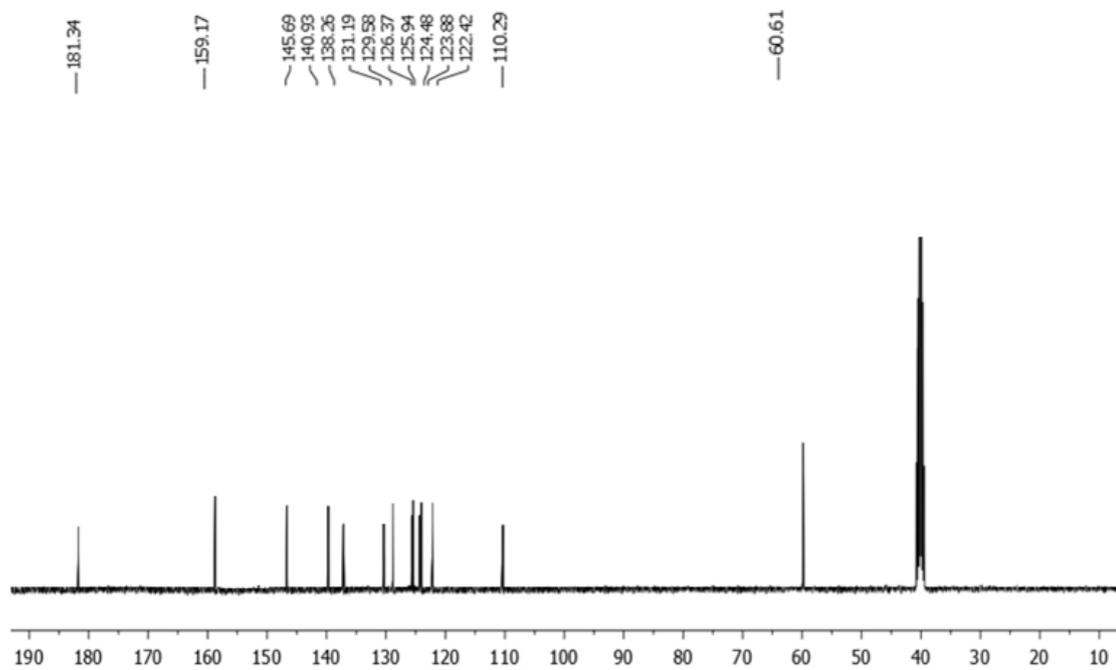
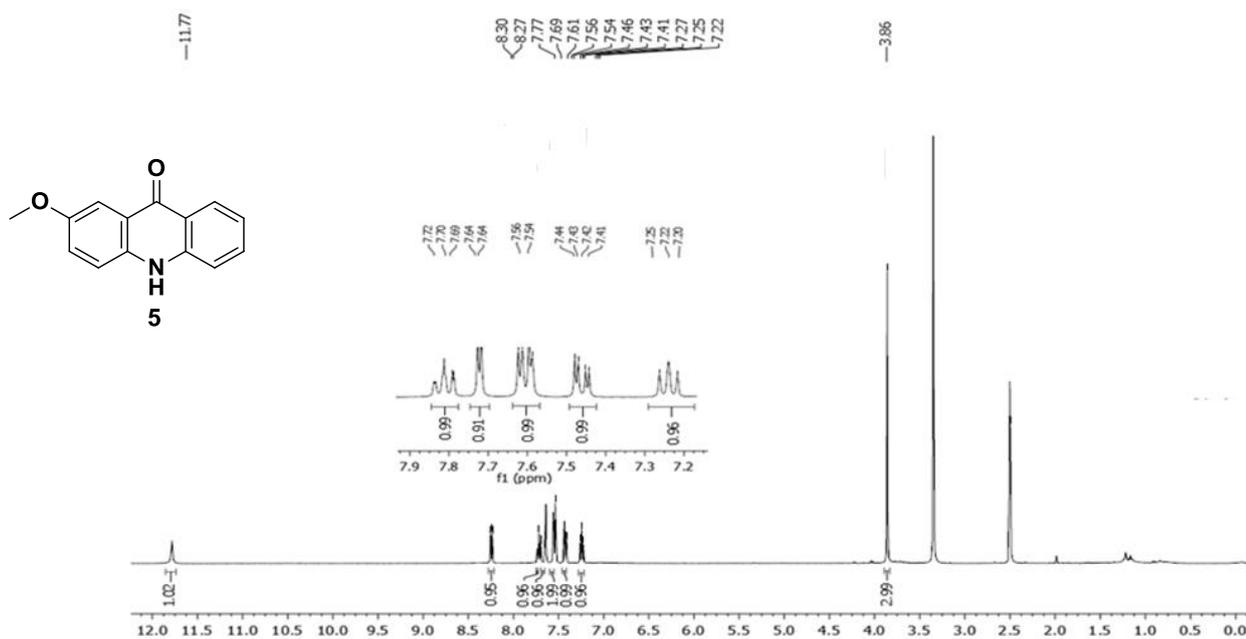
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) de acridin-9(10H)-ona (3)

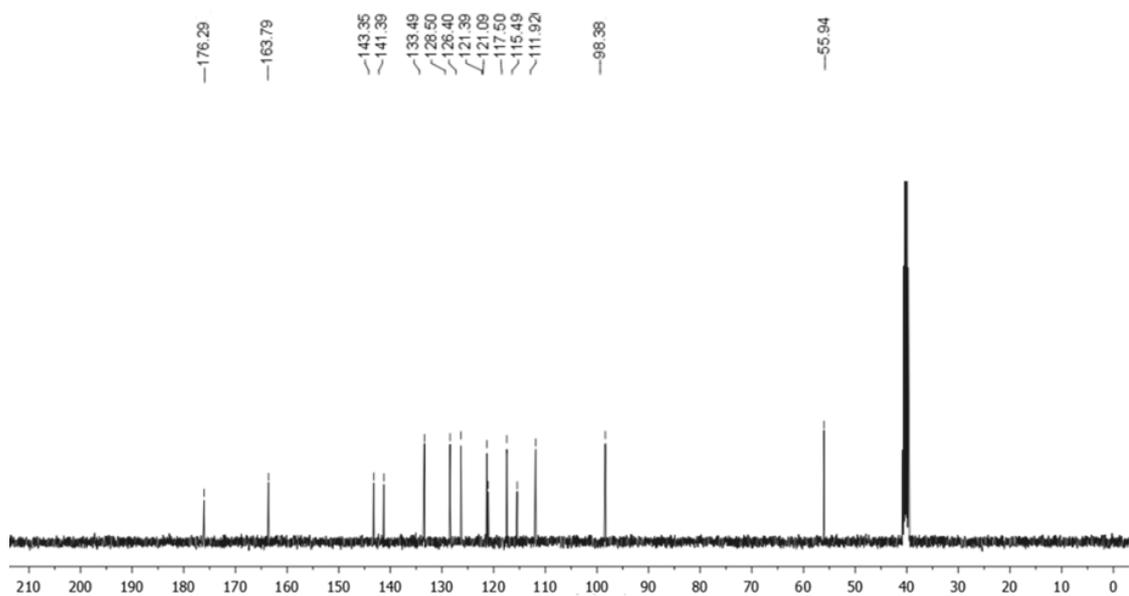
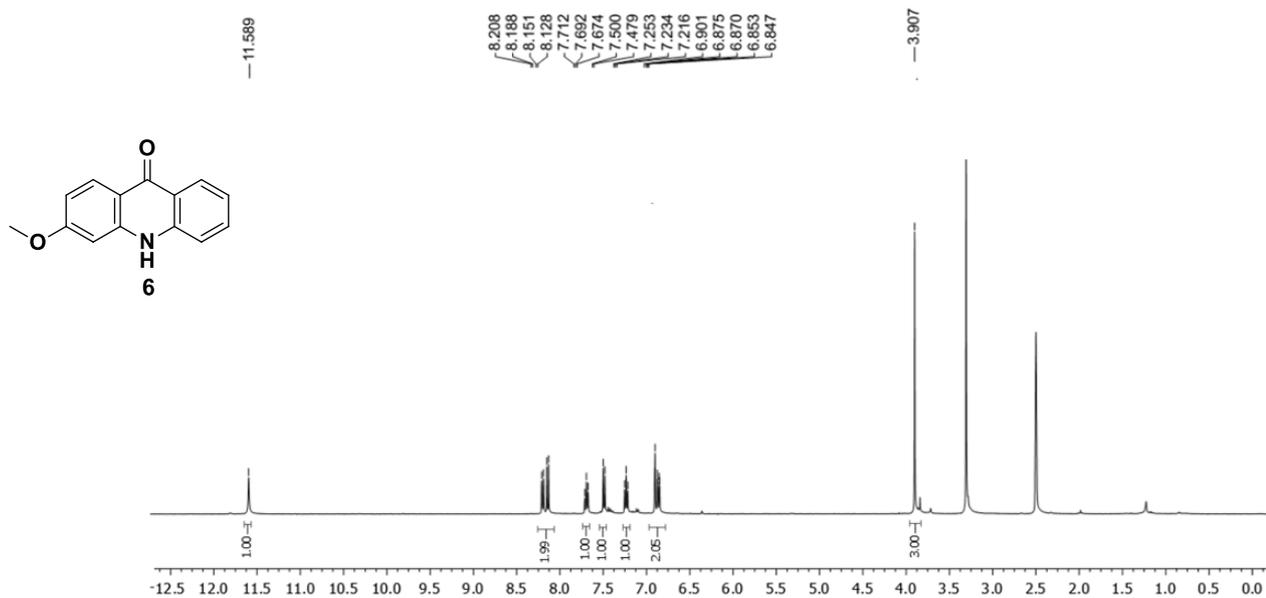


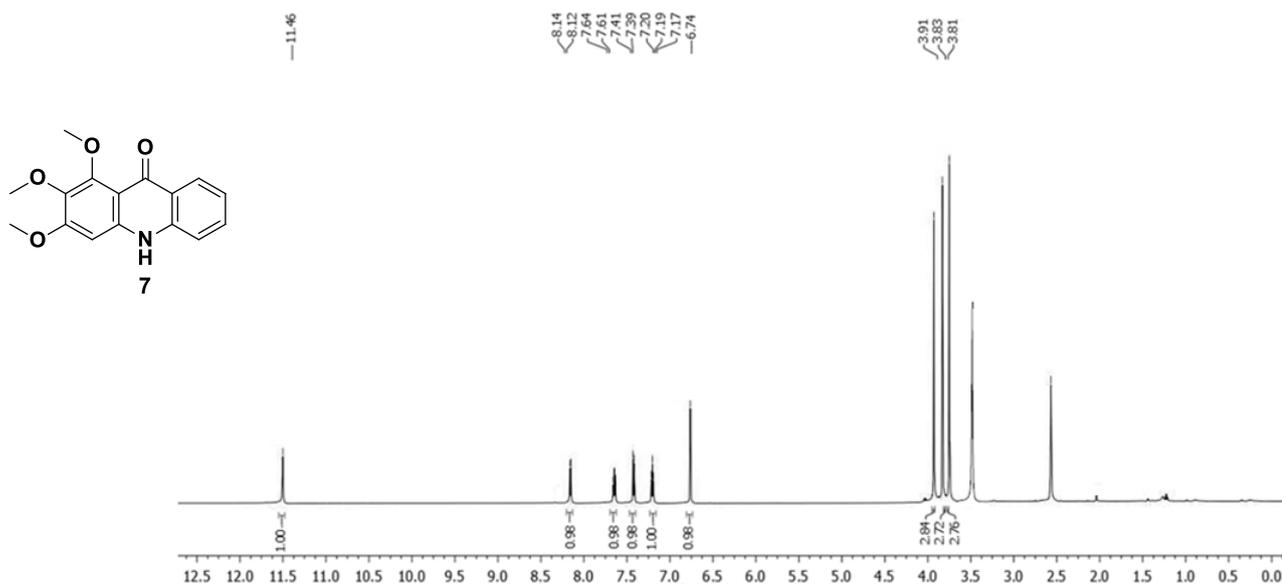
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 4-metilacridin-9(10H)-ona (4)



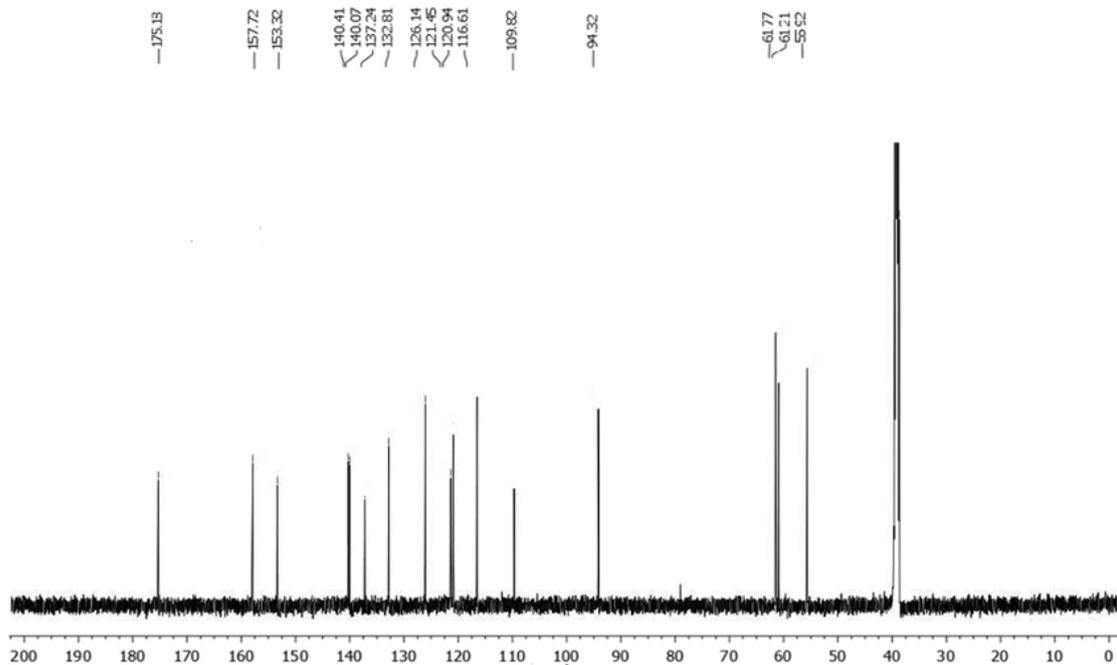
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 4-metilacridin-9(10H)-ona (4)



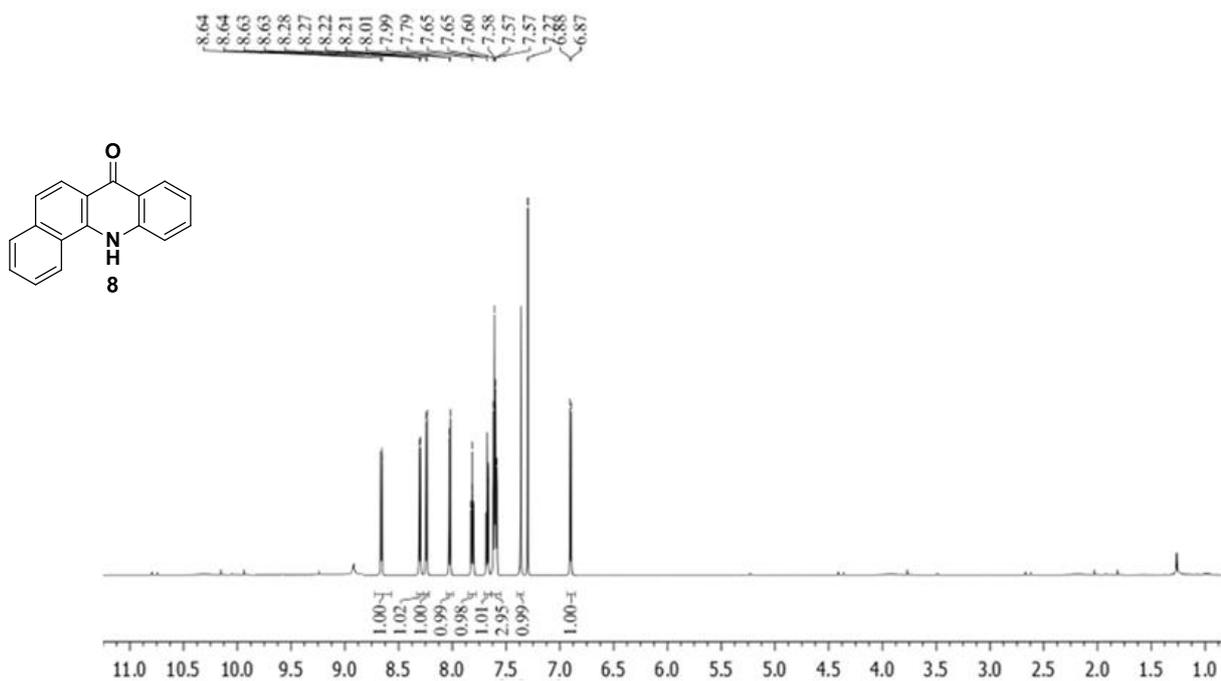




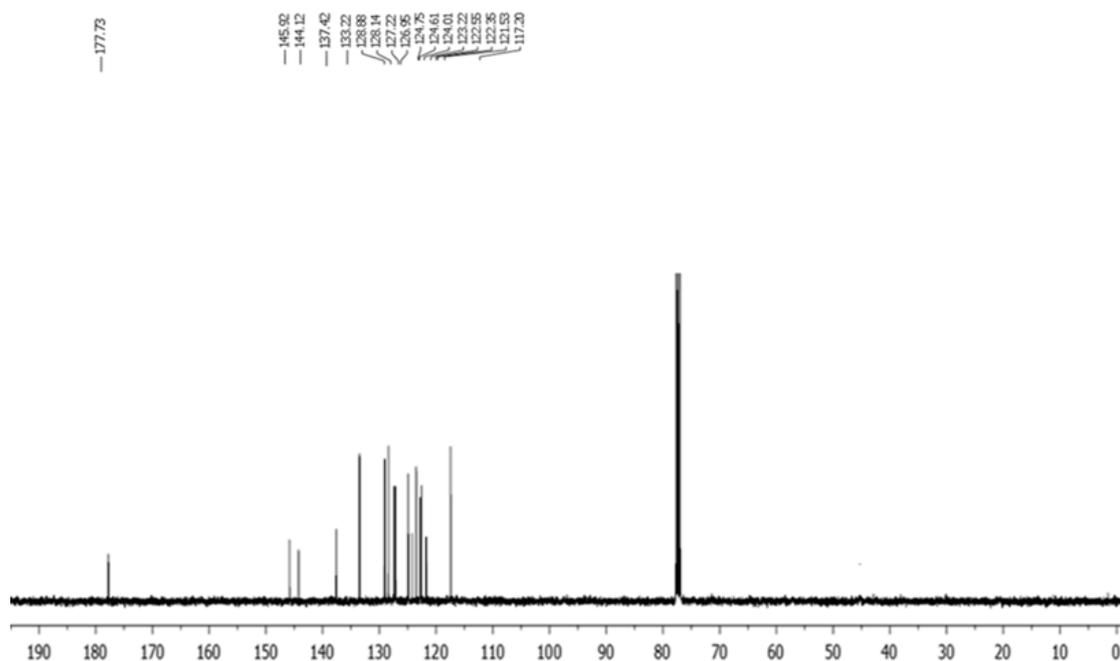
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) de 1,2,3-trimetoxiacridin-9(10*H*)-ona (7)



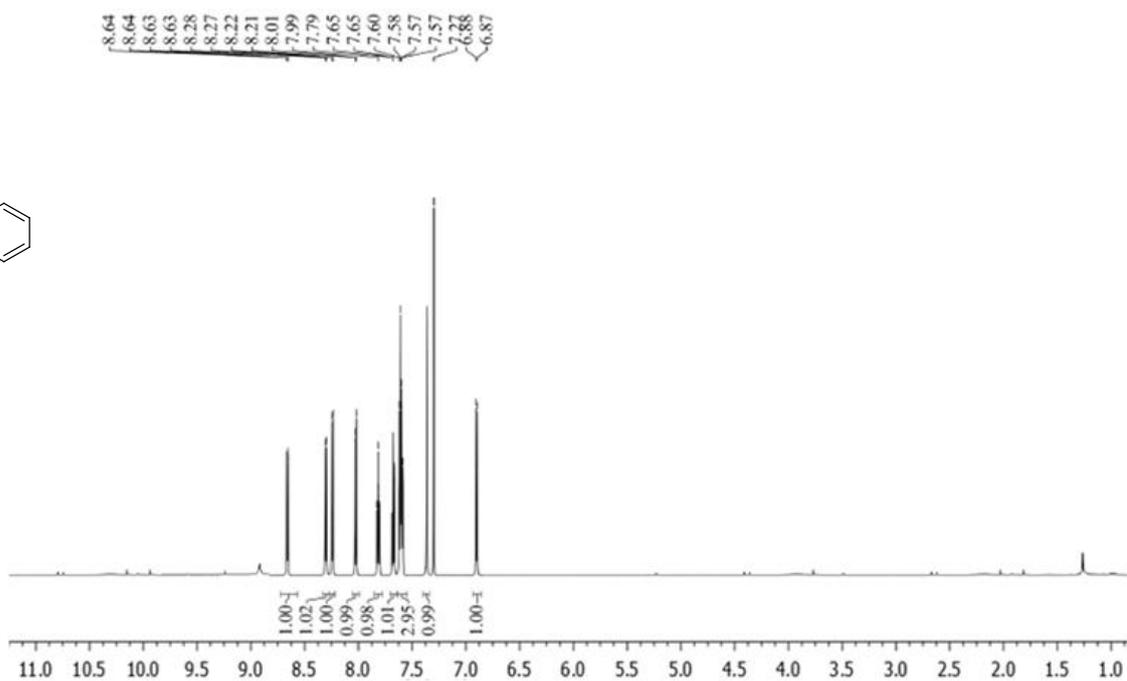
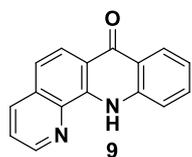
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) de 1,2,3-trimetoxiacridin-9(10*H*)-ona (7)



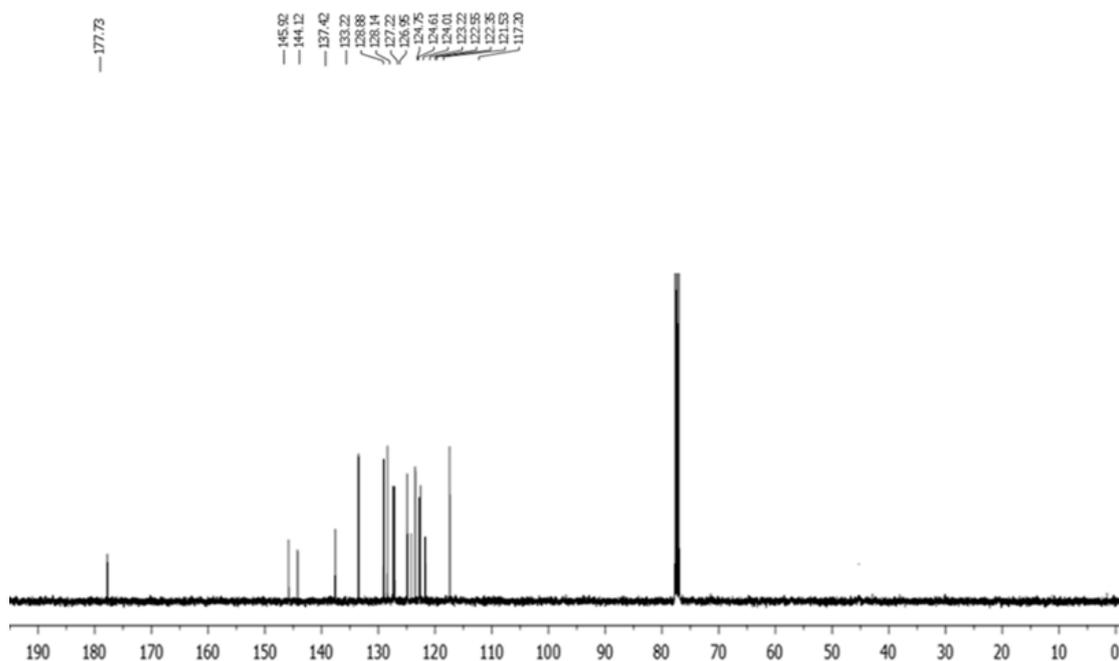
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de benzo[*c*]acridin-7(12*H*)-ona (**8**)



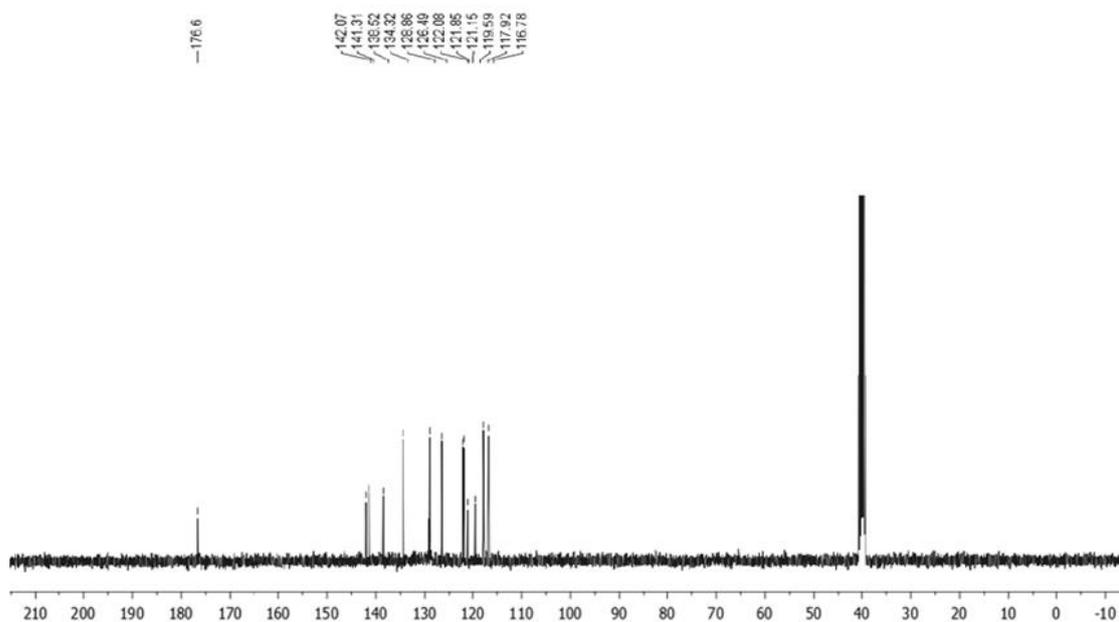
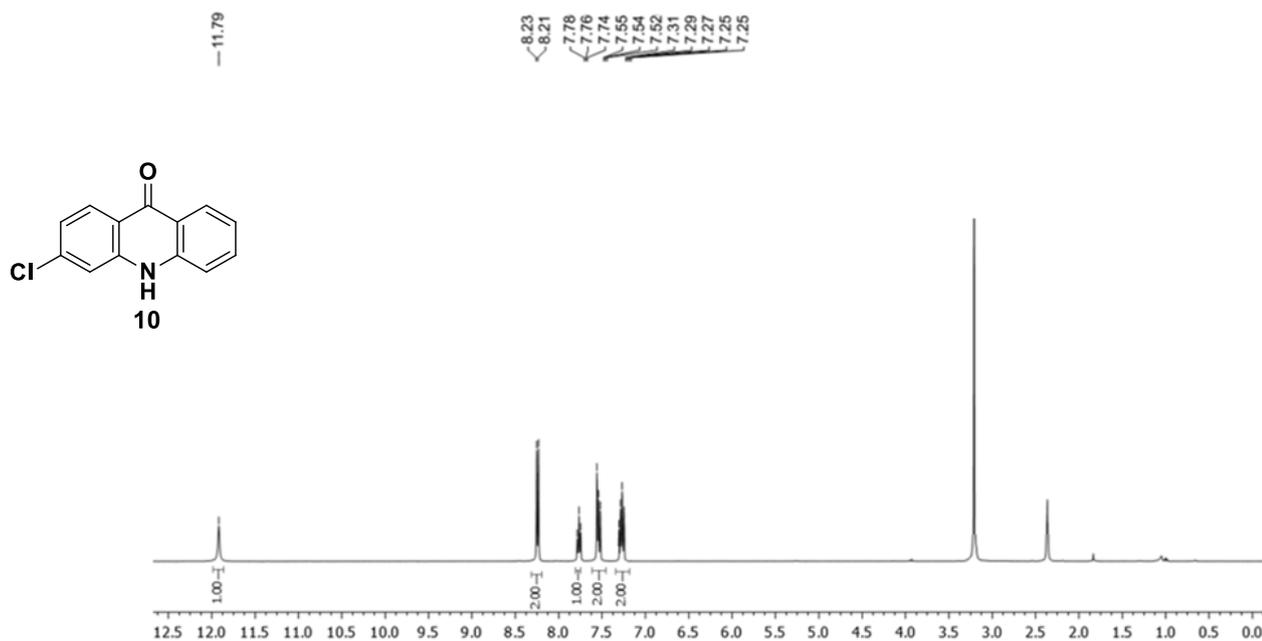
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de benzo[*c*]acridin-7(12*H*)-ona (**8**)

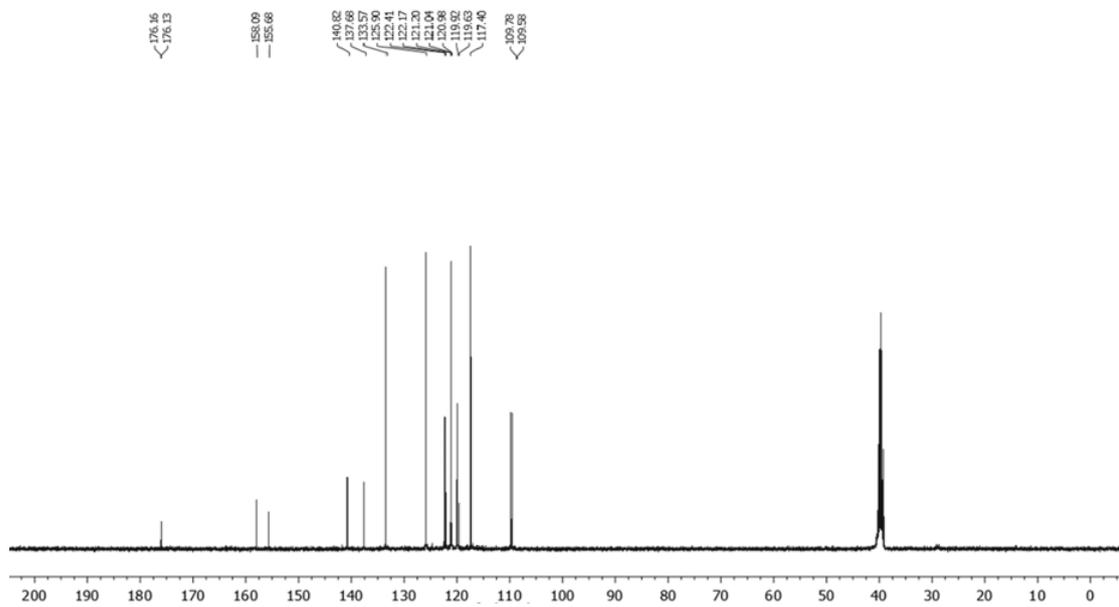
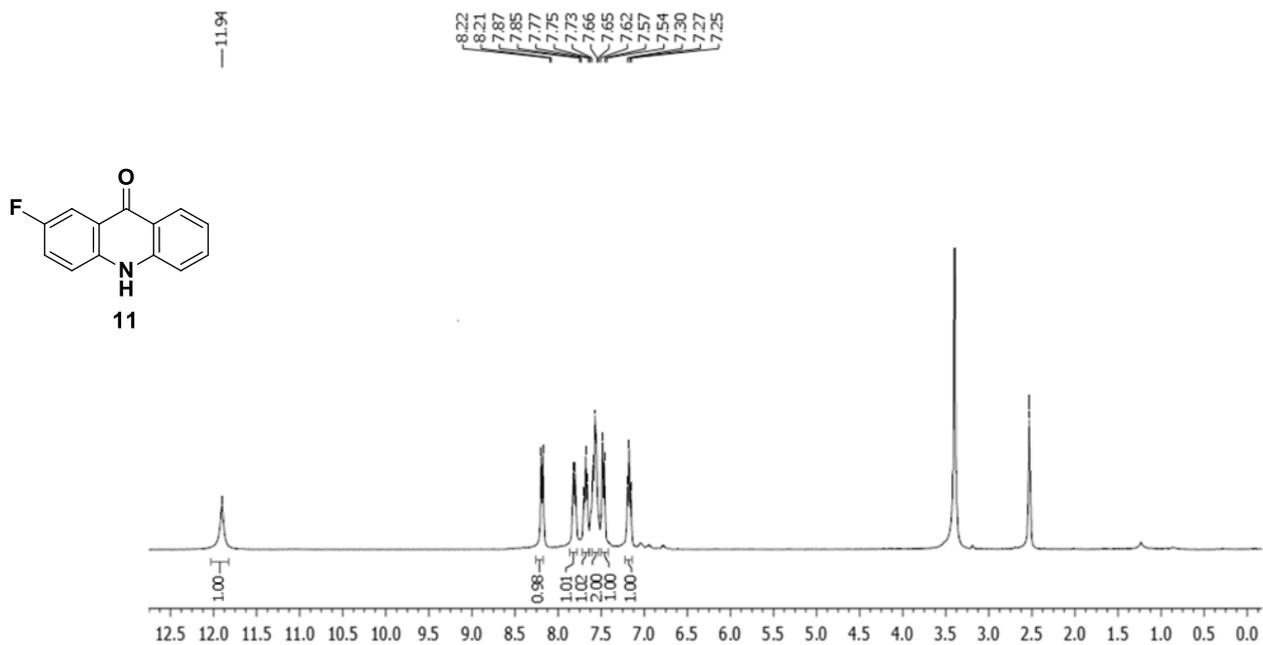


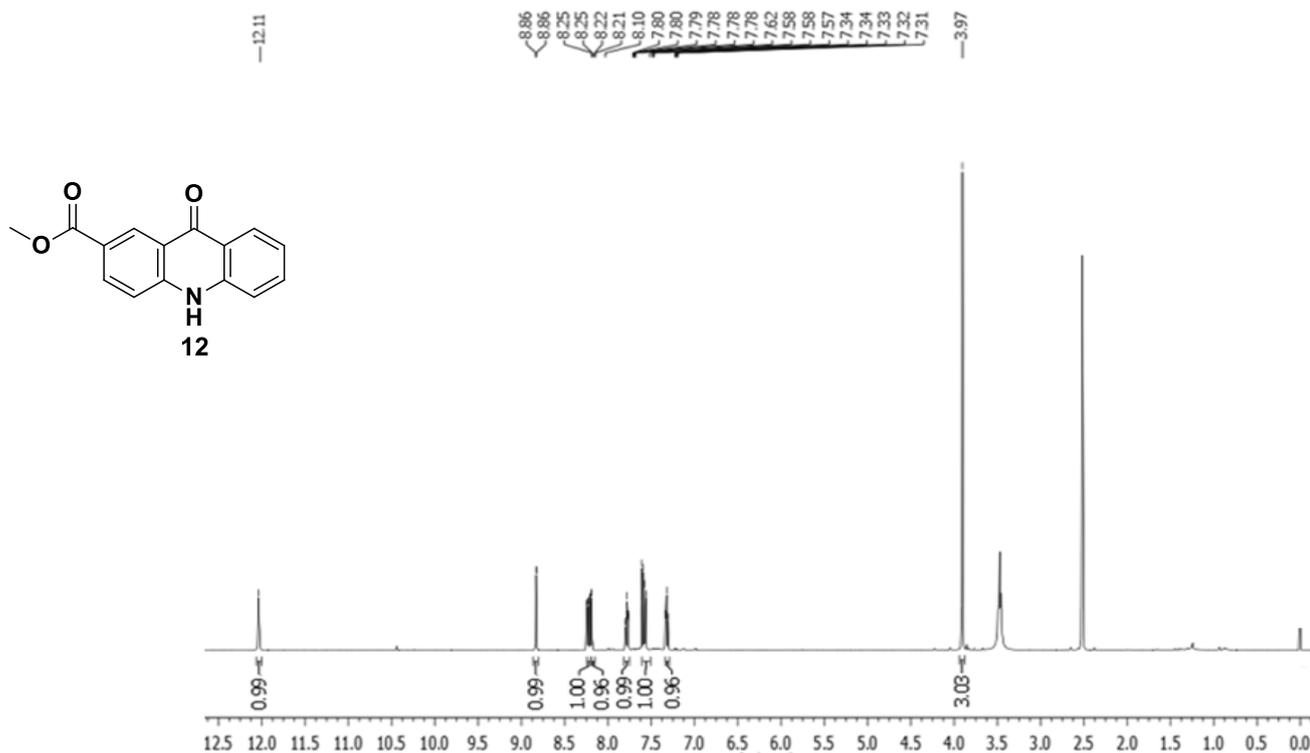
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de benzo[*b*][1,10]fenantrolin-7(12*H*)-ona (**9**)



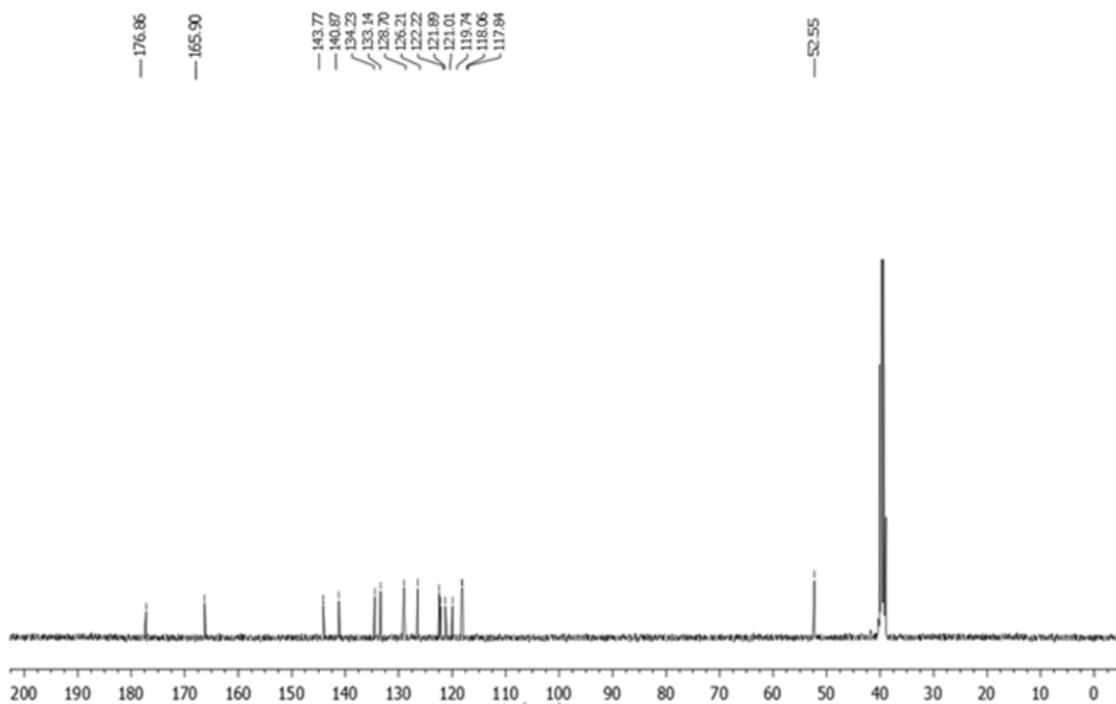
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de benzo[*b*][1,10]fenantrolin-7(12*H*)-ona (**9**)



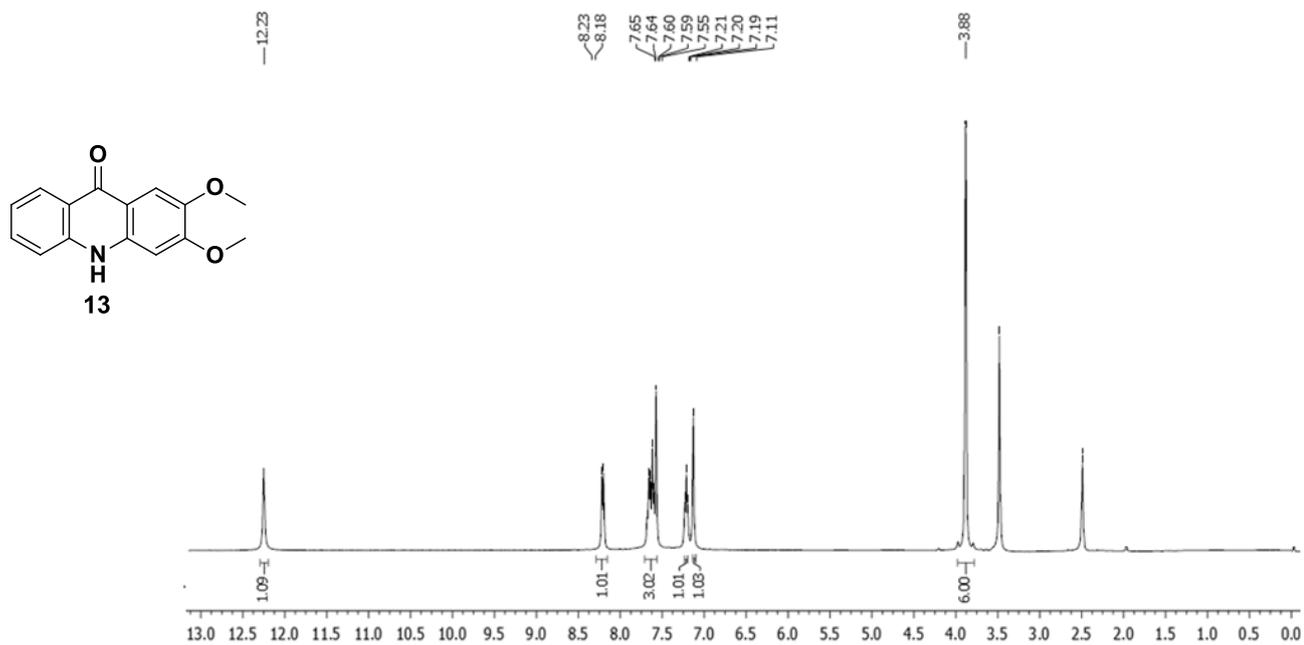




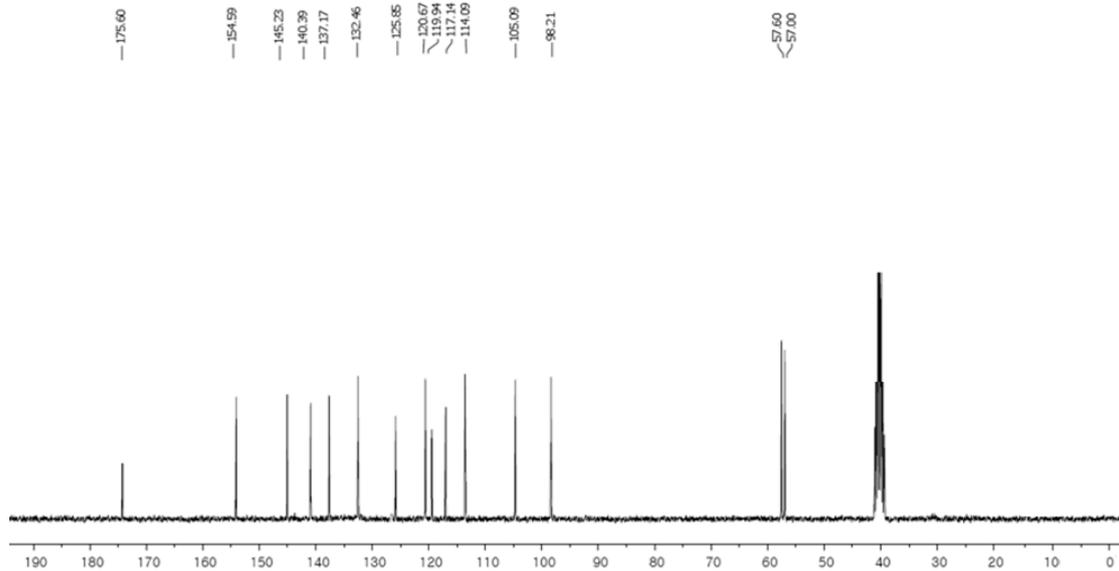
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de metil 9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carboxilato (**12**)



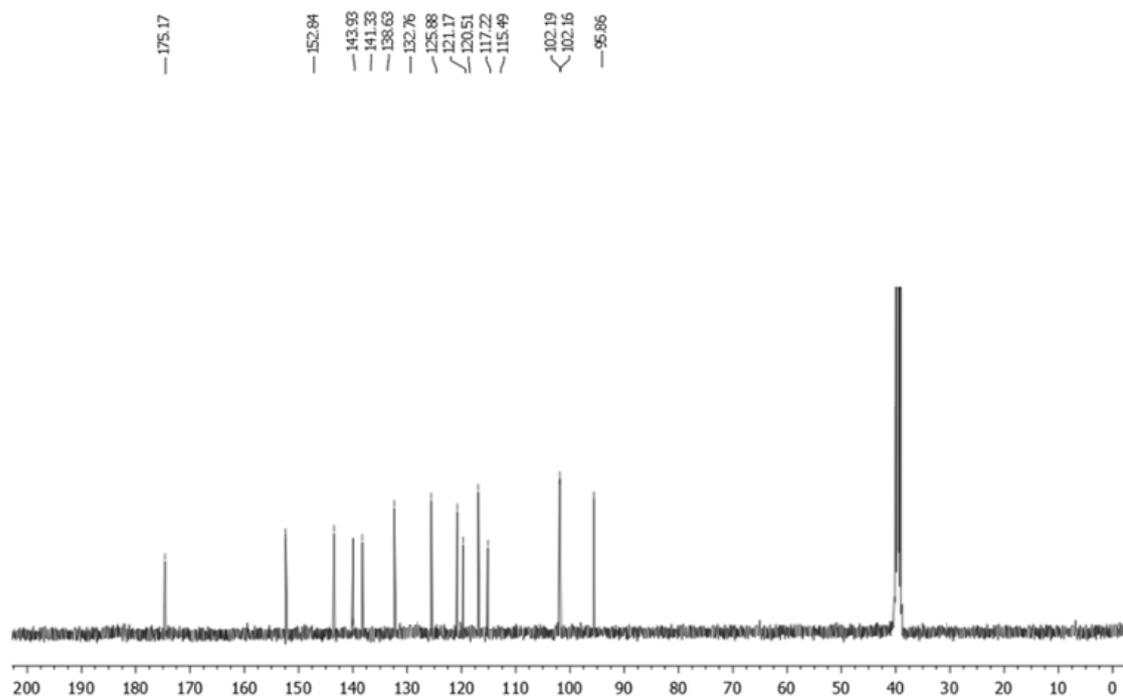
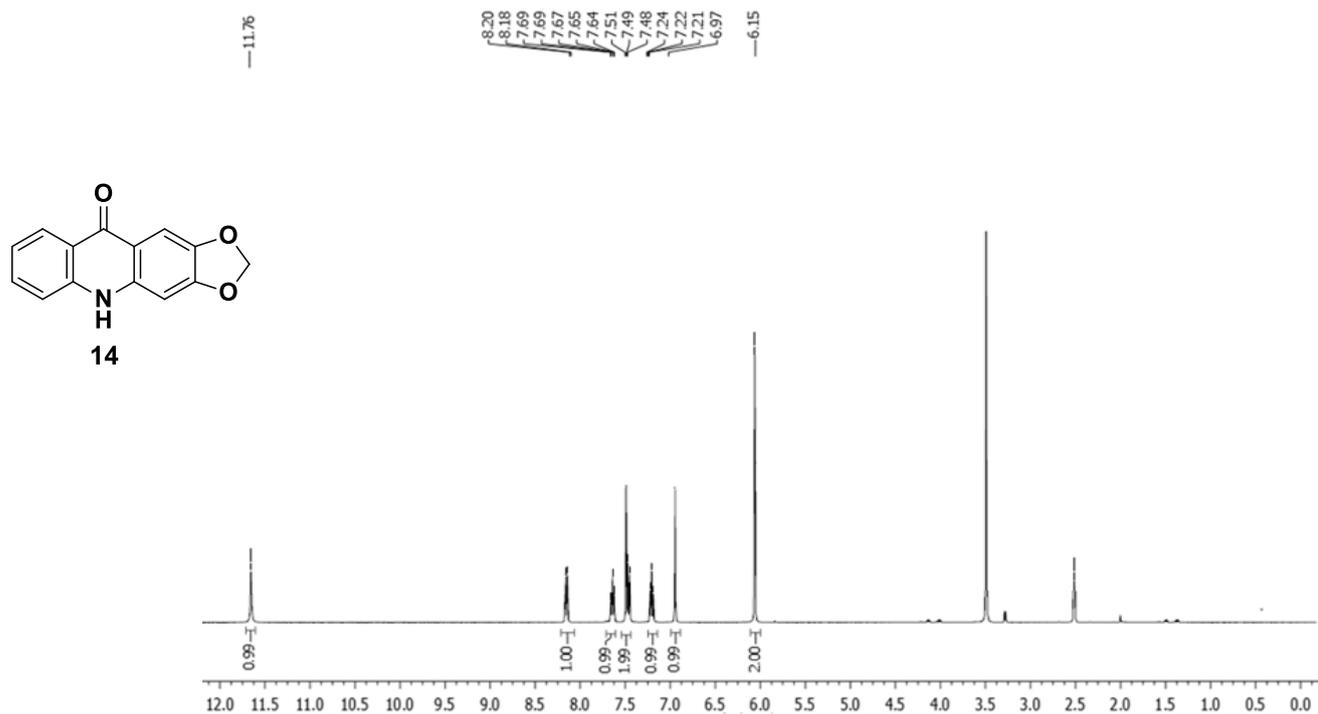
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de metil 9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carboxilato (**12**)

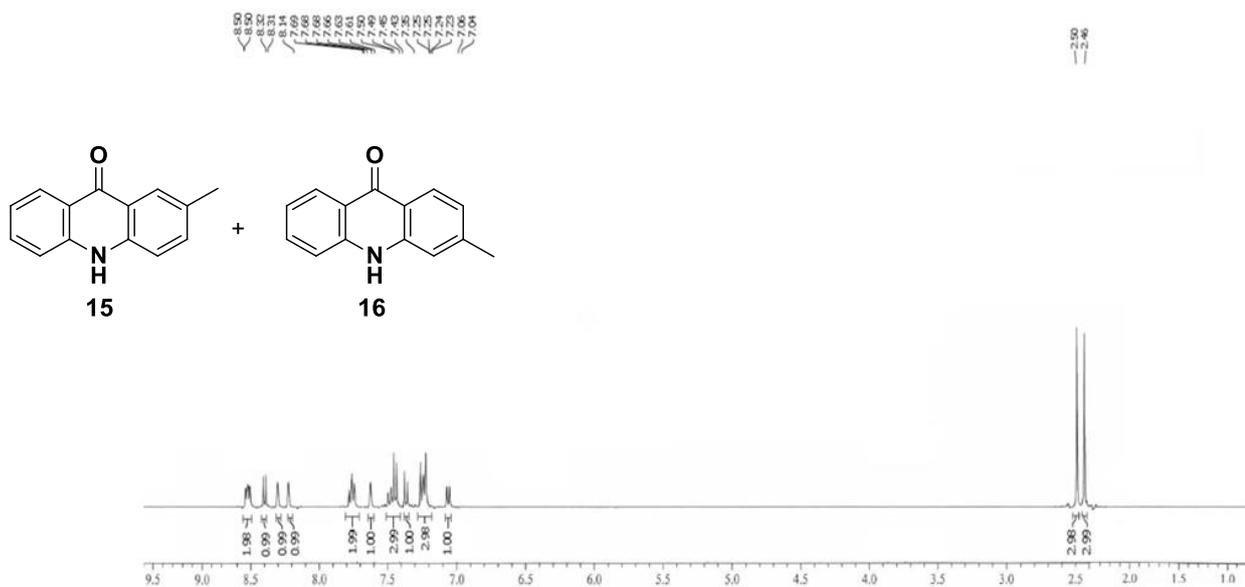


¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) de 2,3-dimetoxiacridin-9(10*H*)-ona (**13**)

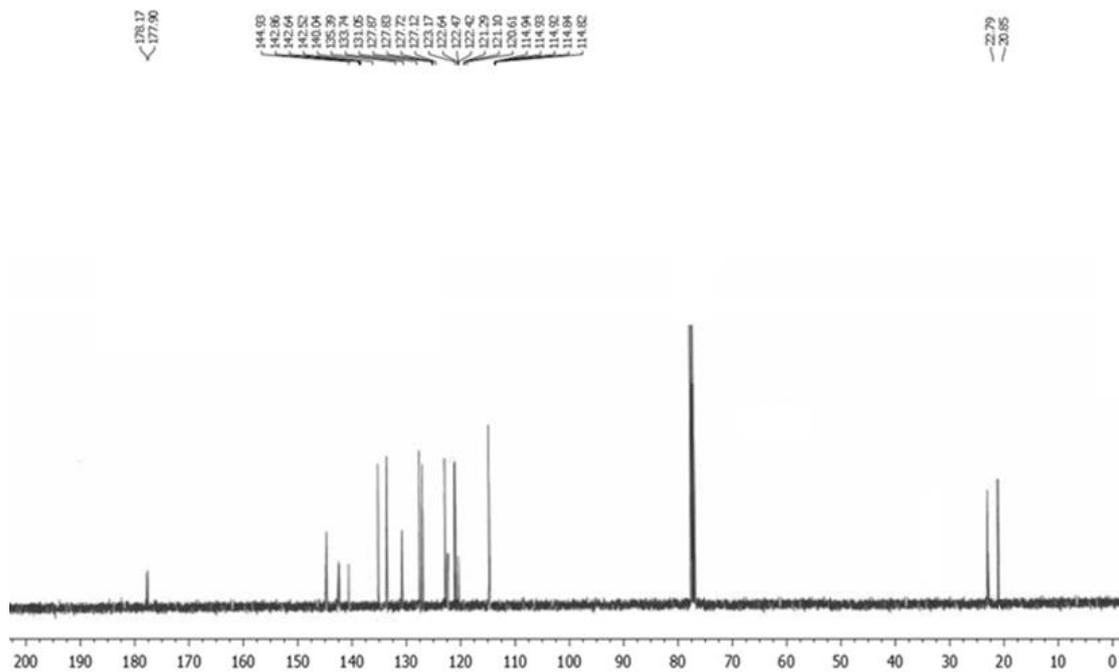


¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) de 2,3-dimetoxiacridin-9(10*H*)-ona (**13**)

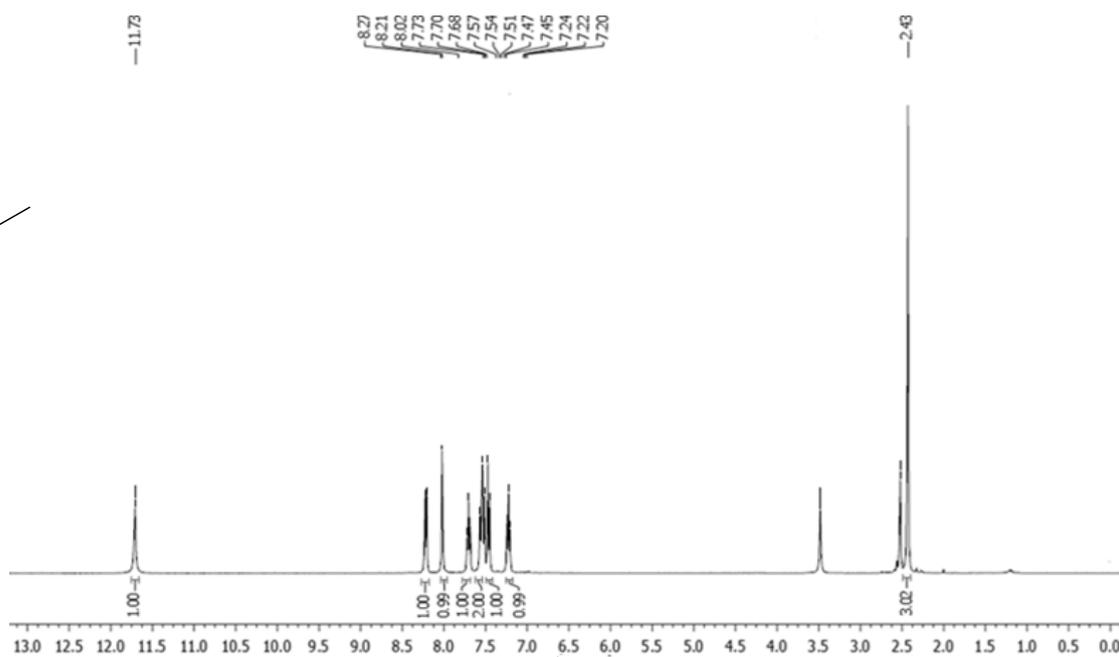
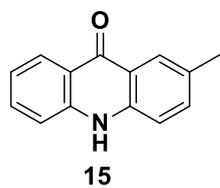




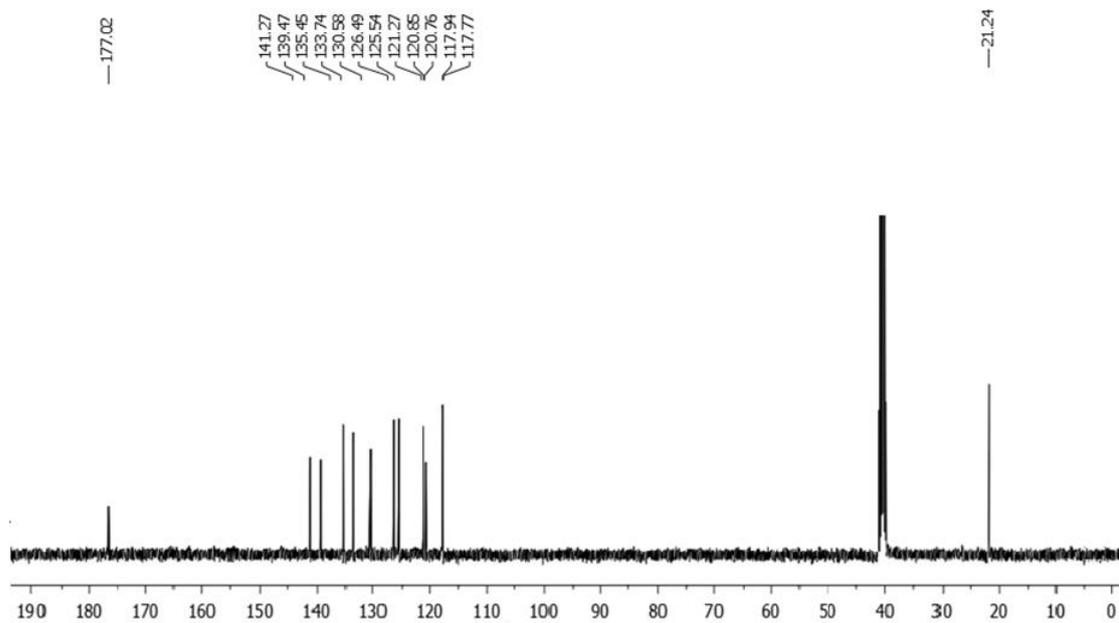
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 2-metilacridin-9(10H)-ona (**15**) and 3-metilacridin-9(10H)-ona (**16**)



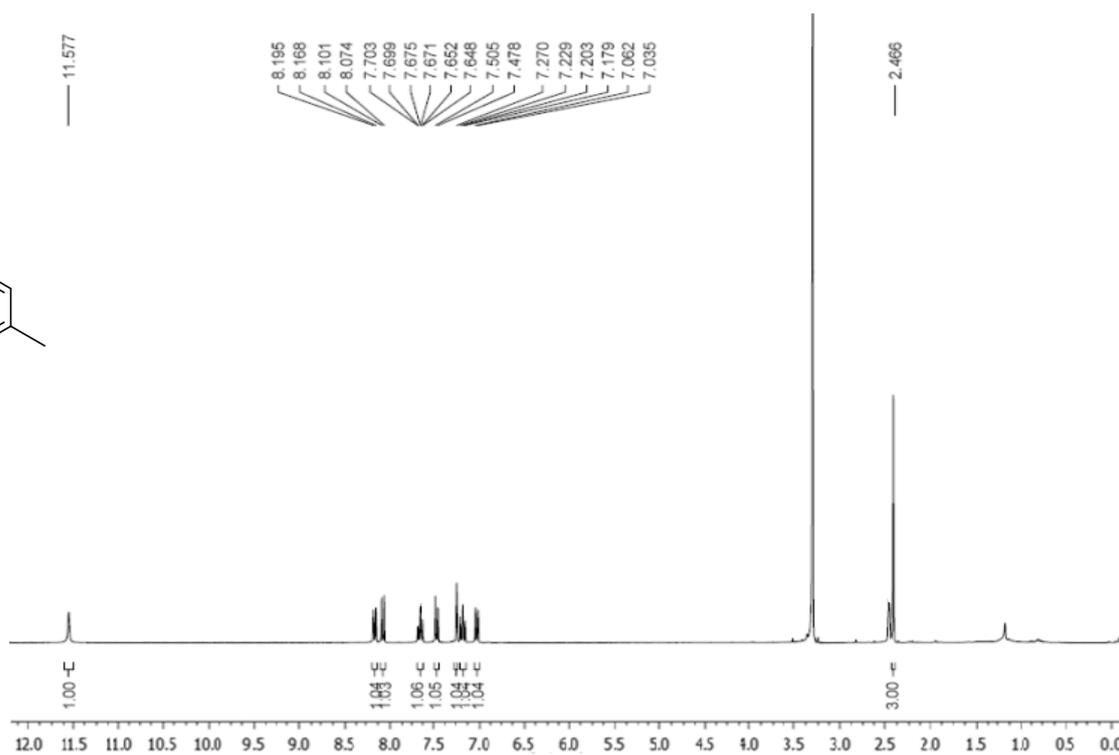
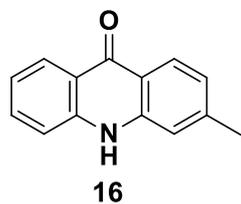
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 2-metilacridin-9(10H)-ona (**15**) and 3-metilacridin-9(10H)-ona (**16**)



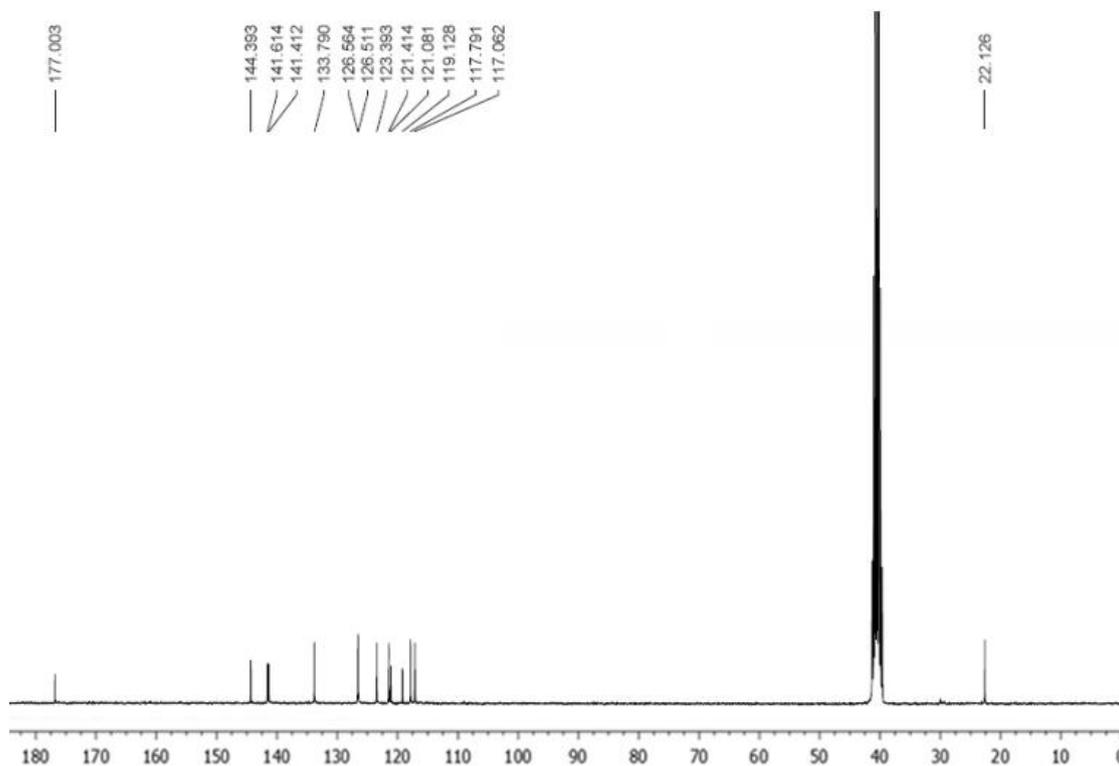
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2-metilacridin-9(10H)-ona (**15**)



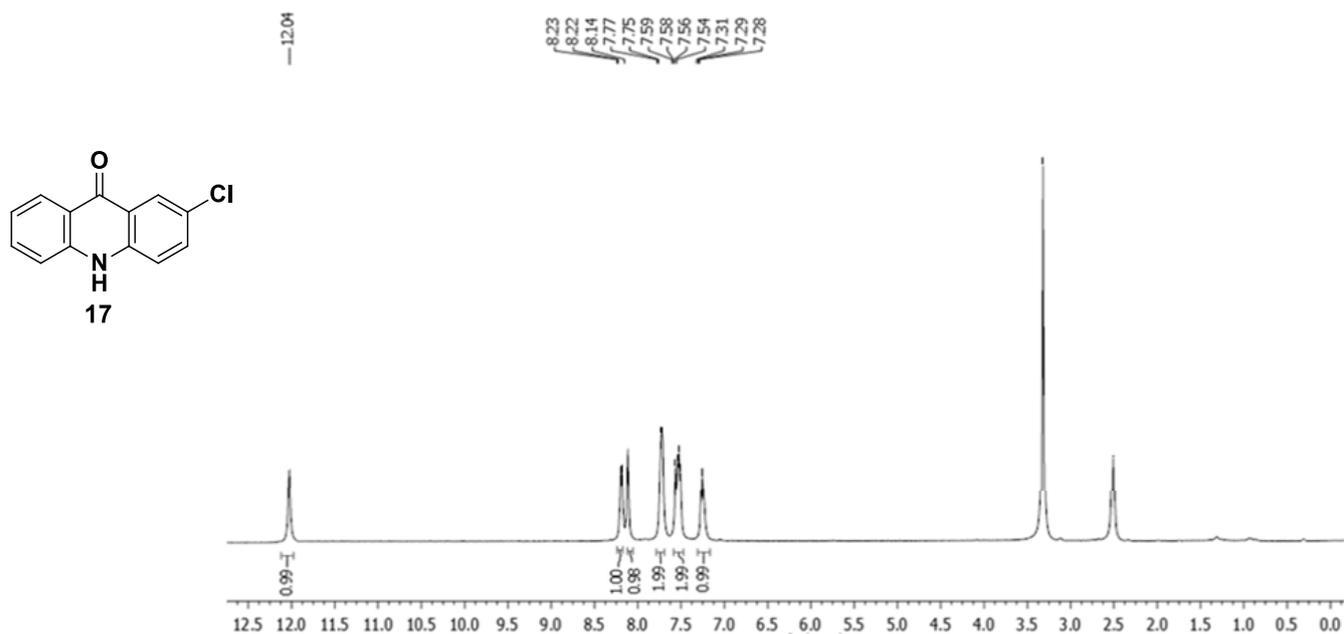
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2-metilacridin-9(10H)-ona (**15**)



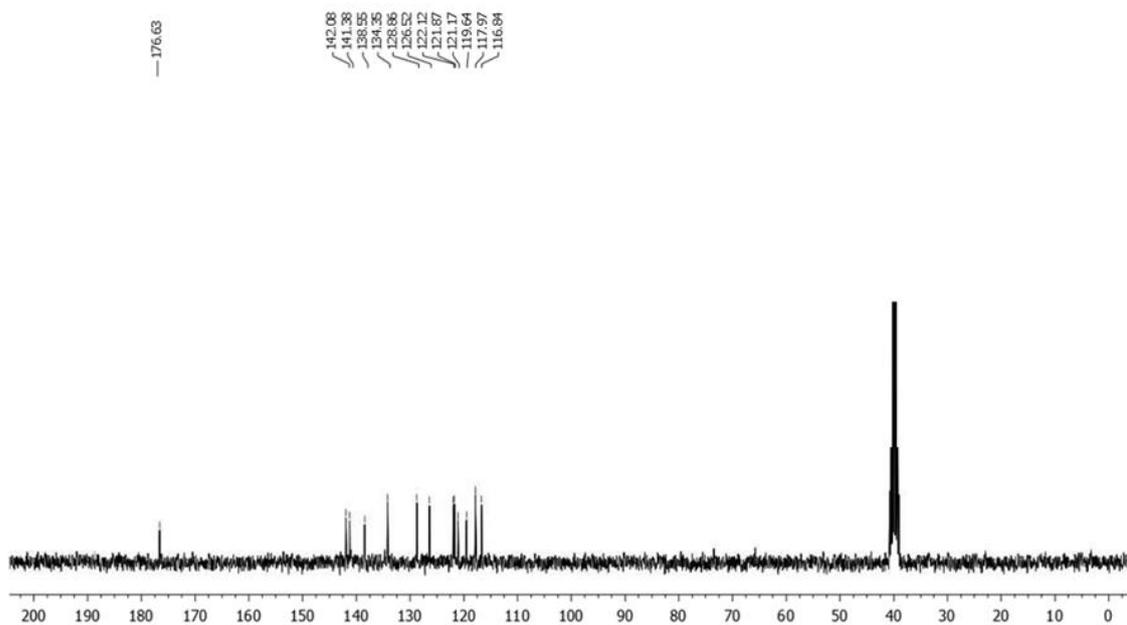
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 3-metilacridin-9(10H)-ona (**16**)



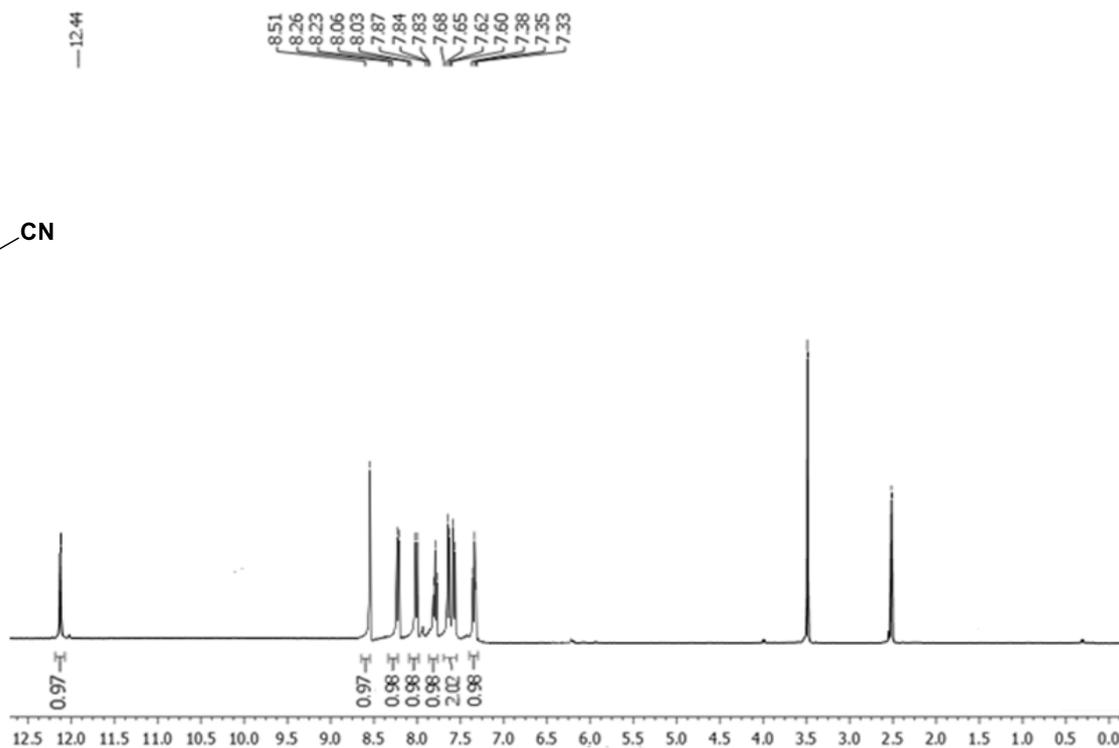
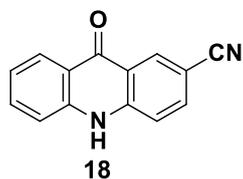
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 3-metilacridin-9(10H)-ona (**16**)



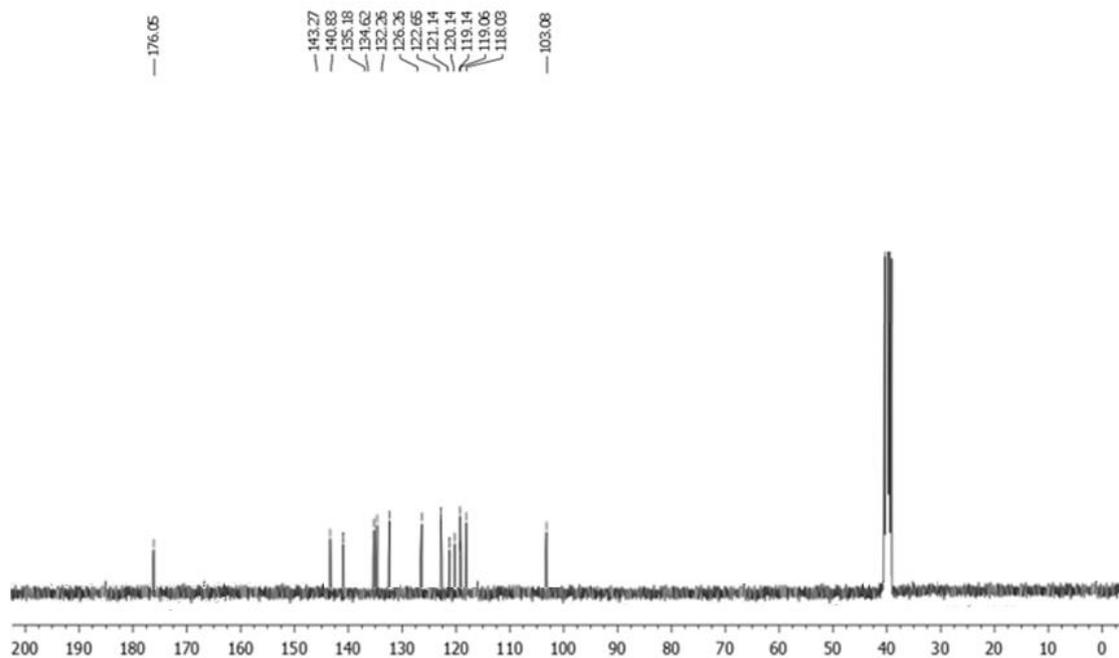
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) de 2-cloroacridin-9(10H)-ona (**17**)



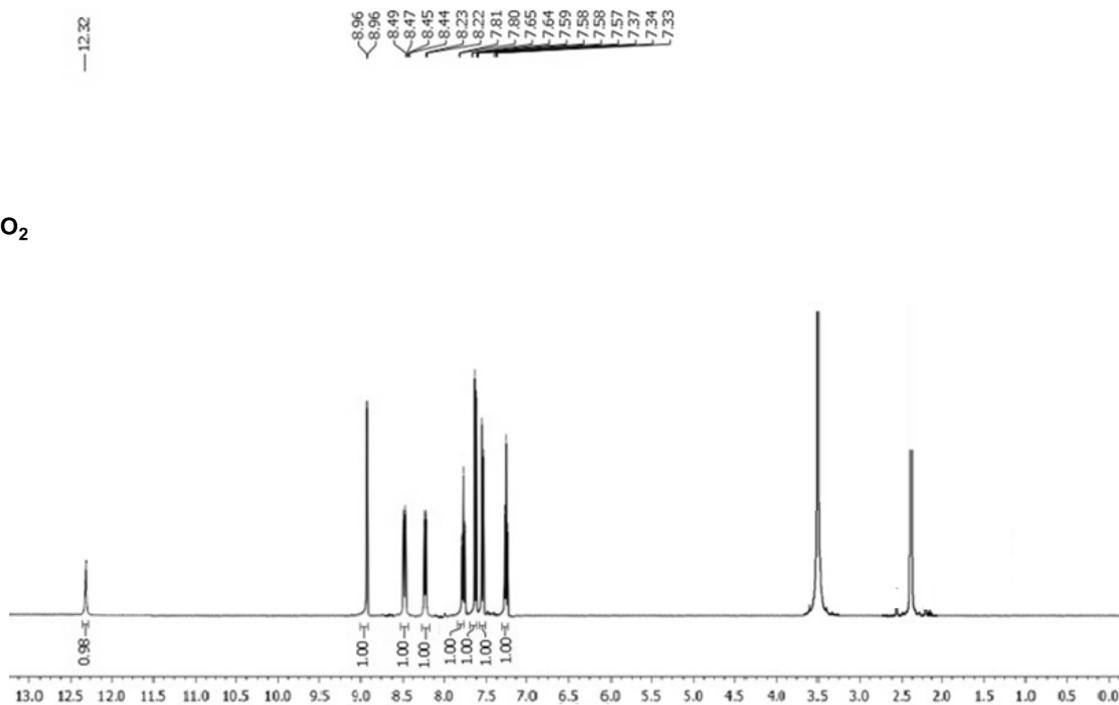
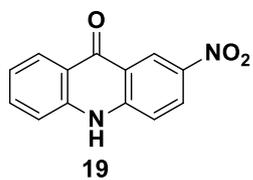
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) de 2-cloroacridin-9(10H)-ona (**17**)



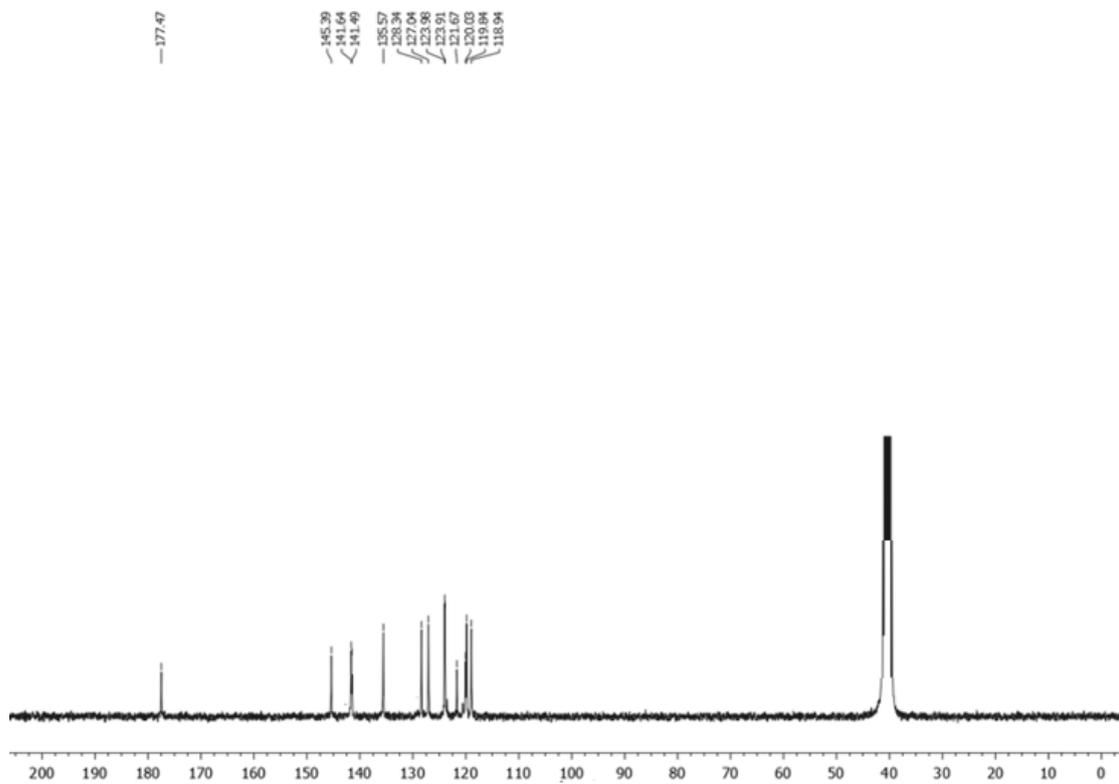
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carbonitrilo (**18**)



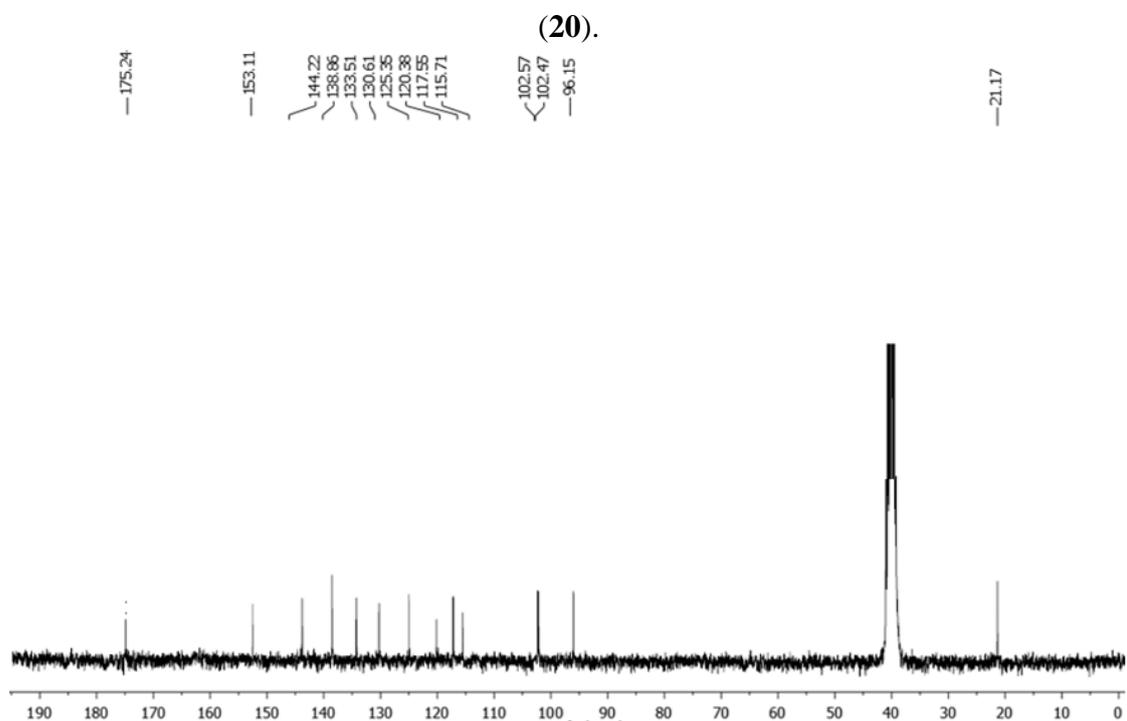
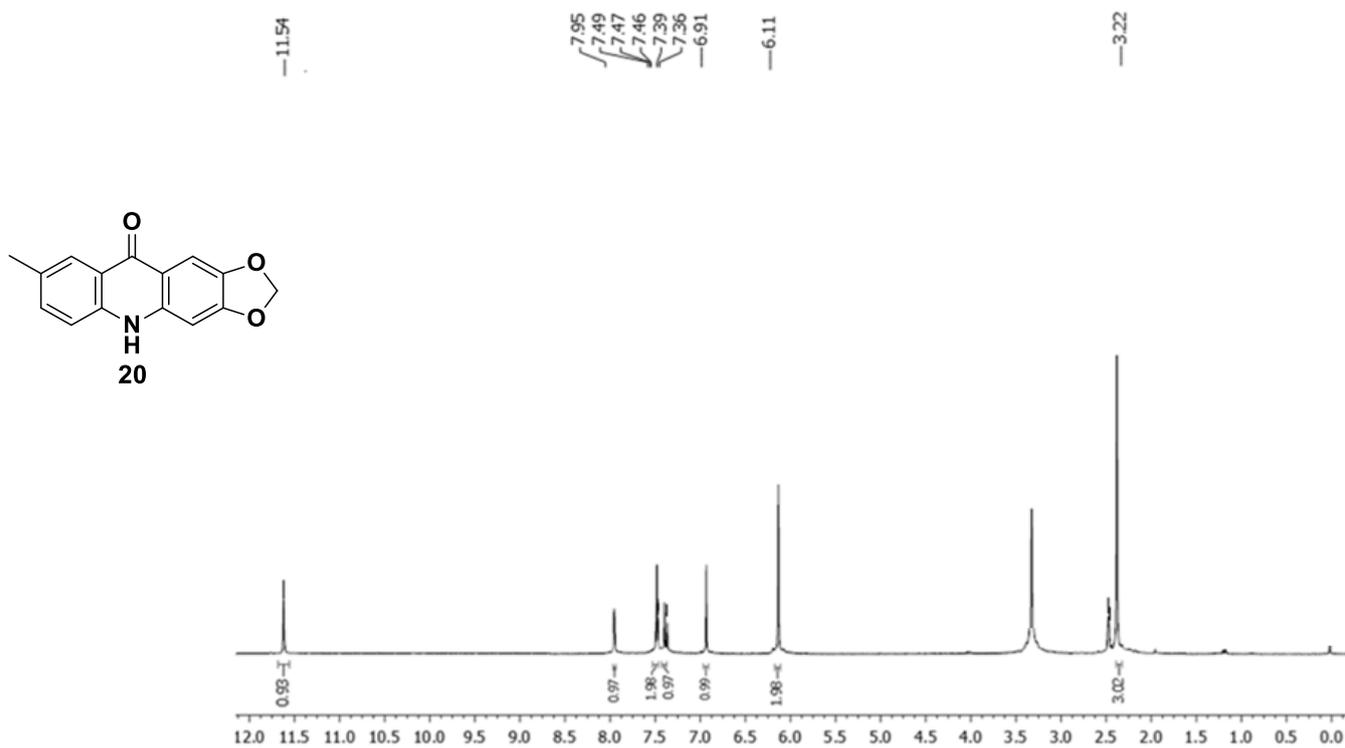
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9-oxo-9,10-dihidroacridin-2-carbonitrilo (**18**)

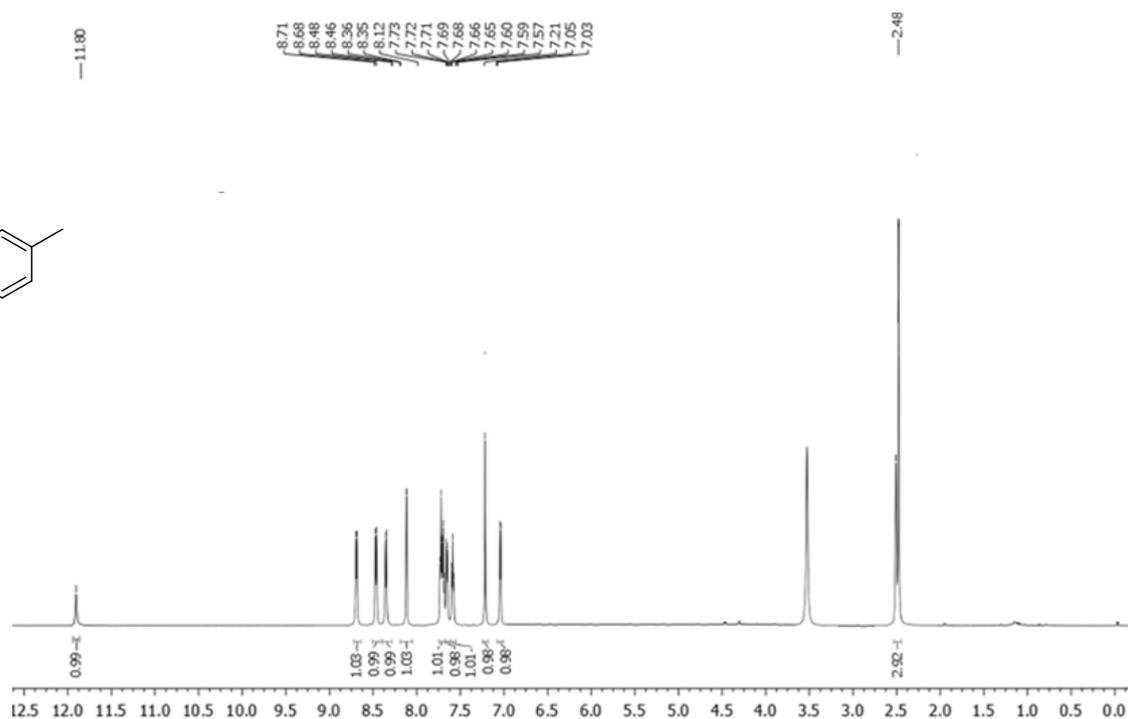
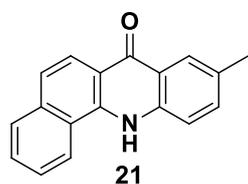


^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2-nitroacridin-9(10H)-ona (**19**)

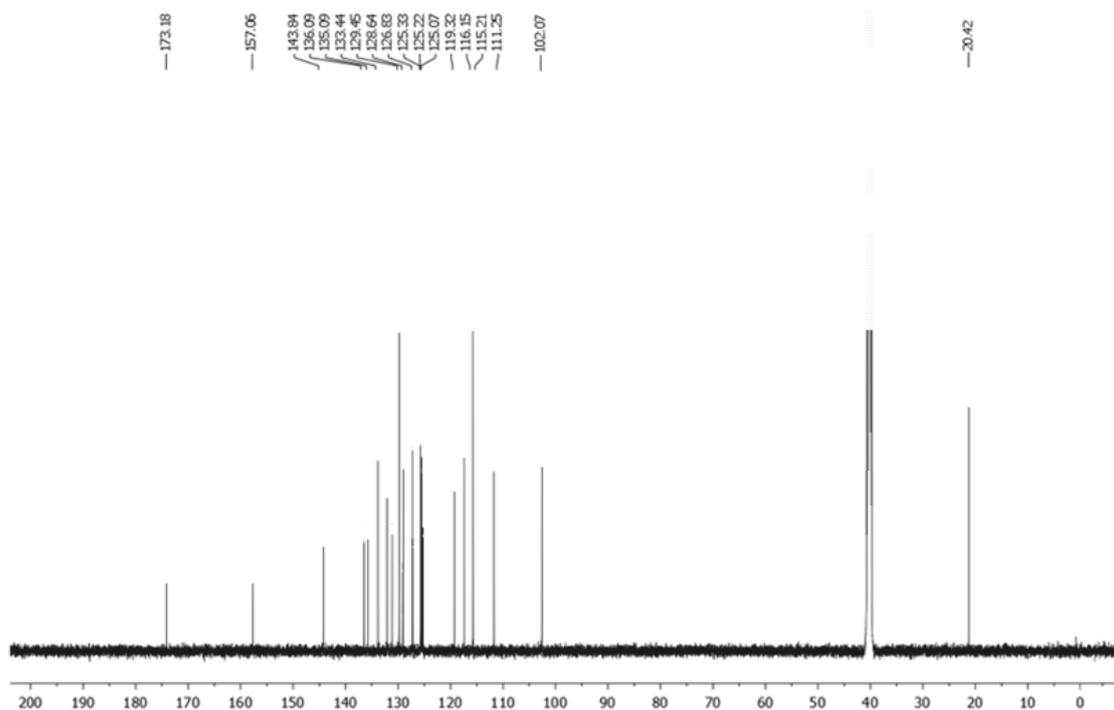


^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 2-nitroacridin-9(10H)-ona (**19**).

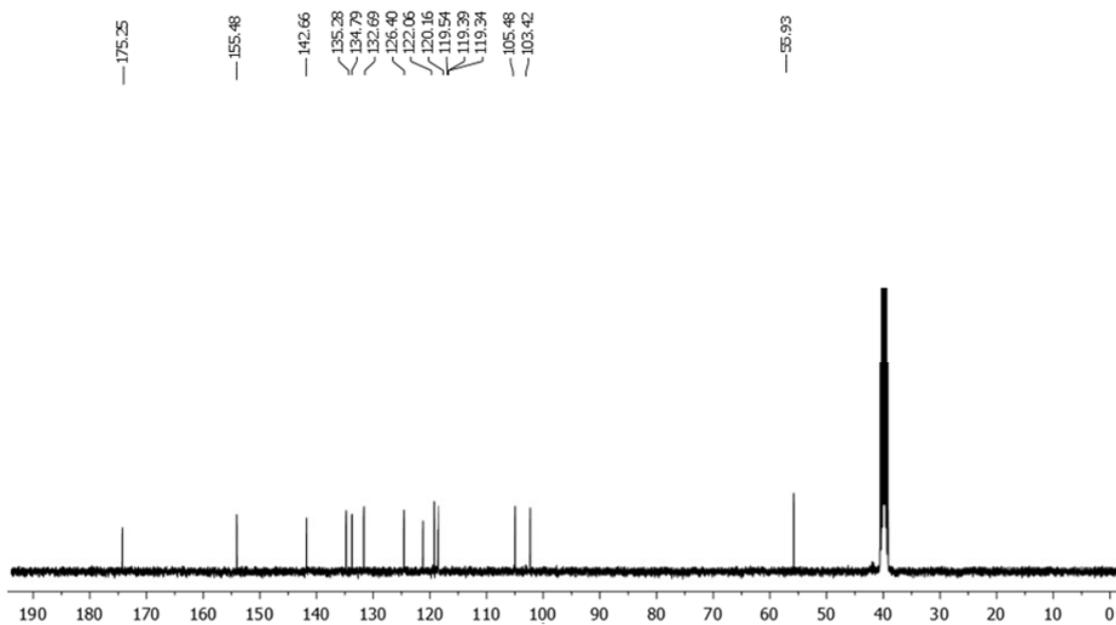
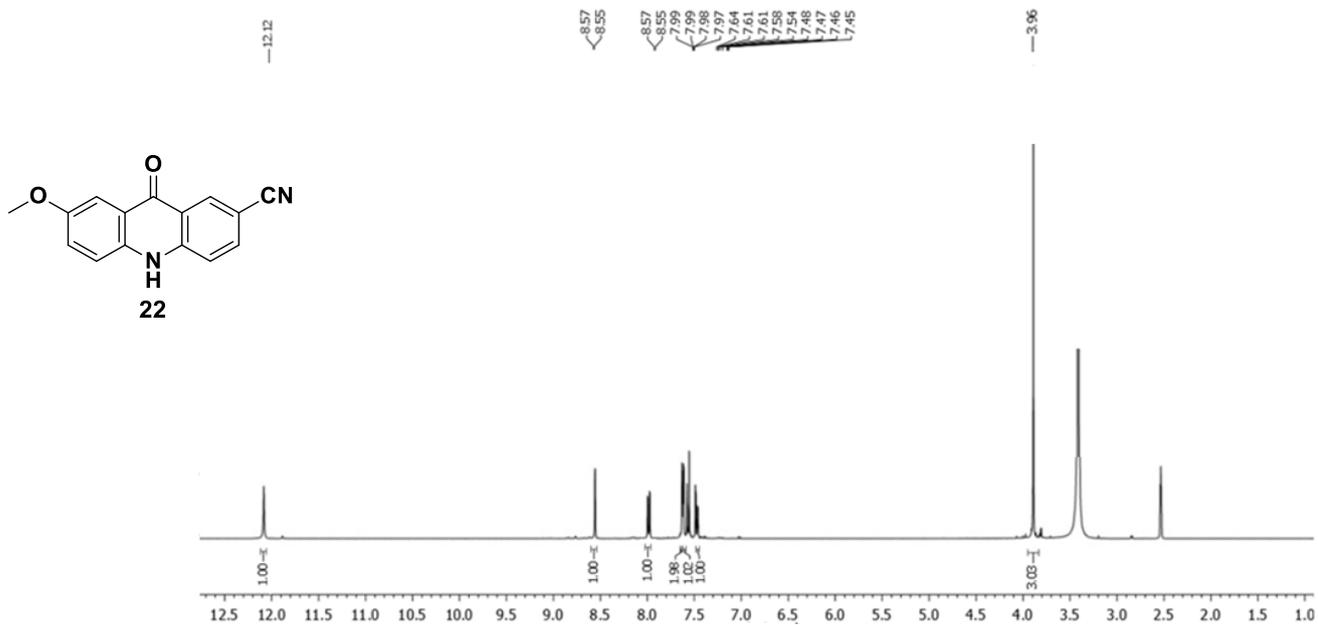


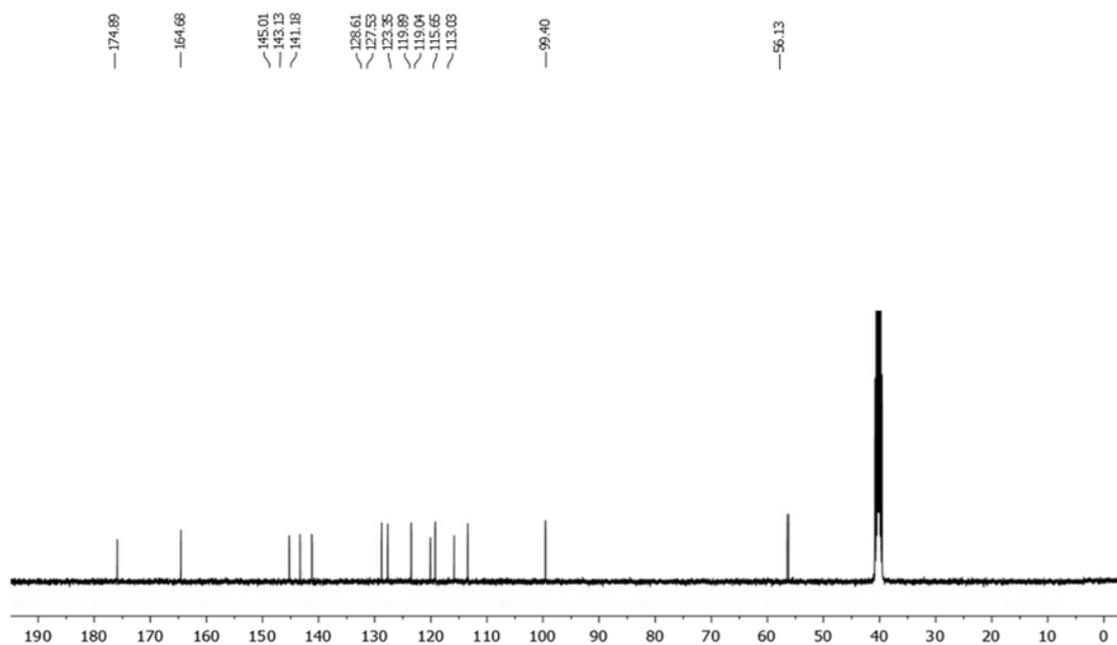
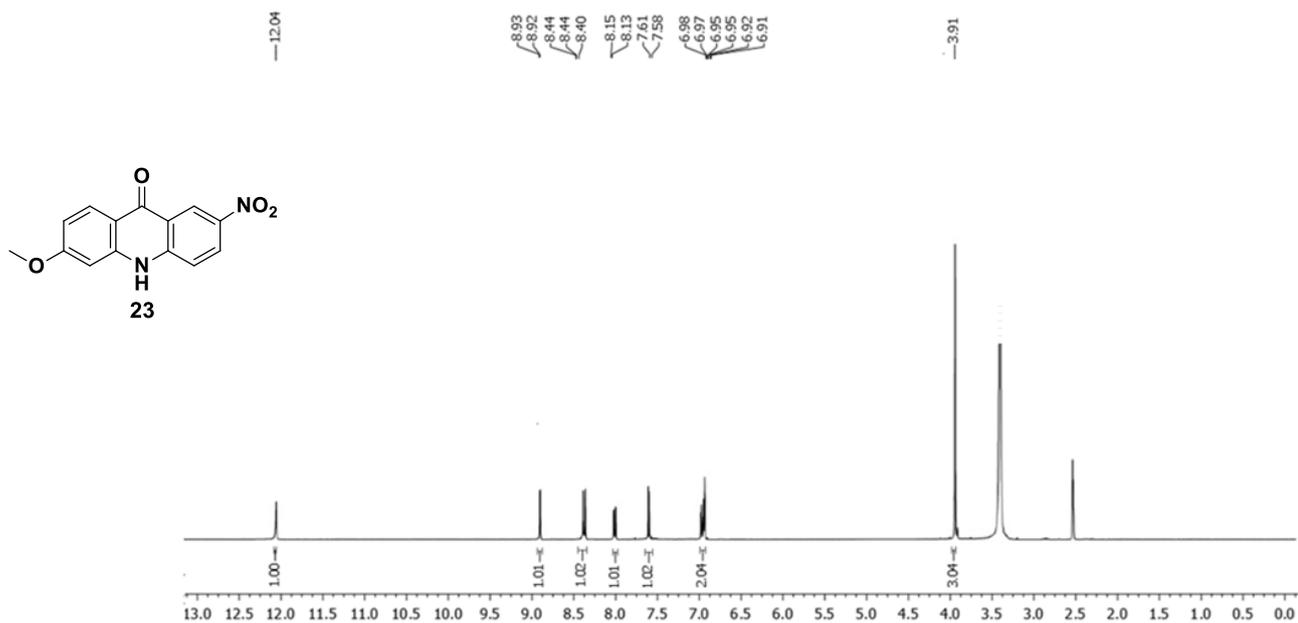


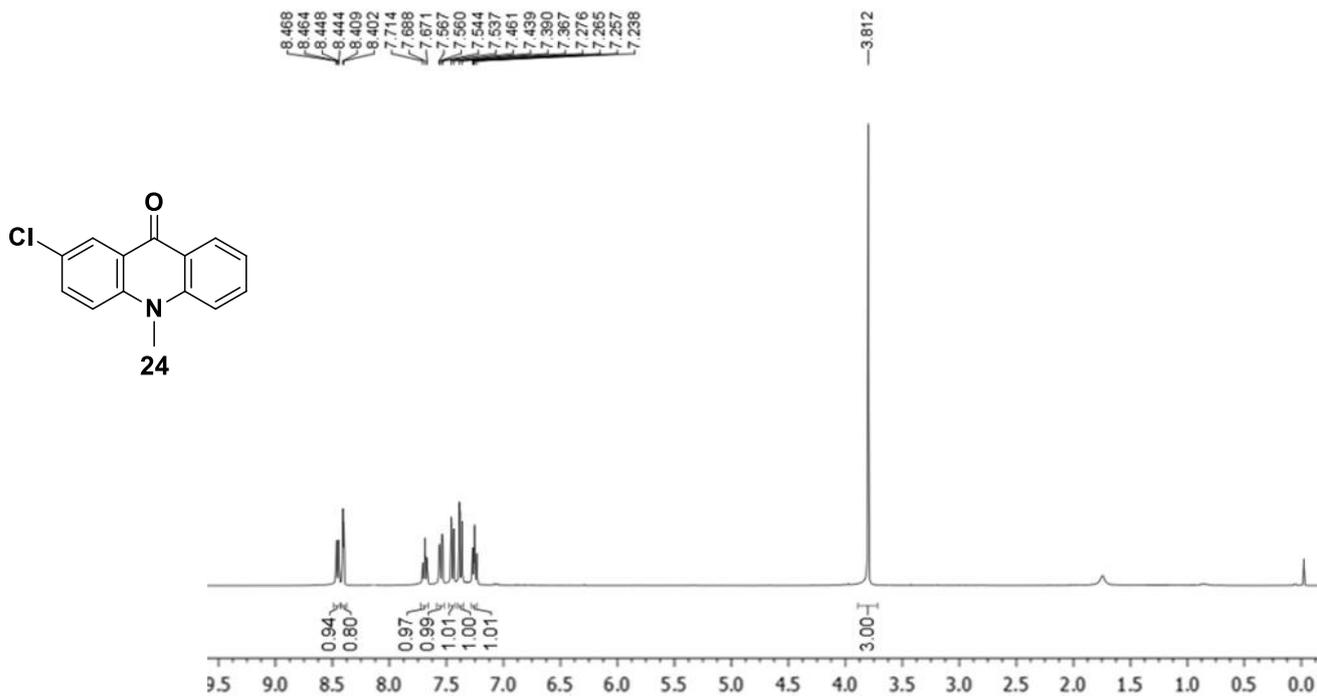
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9-metilbenzo[*c*]acridin-7(12*H*)-ona (**21**)



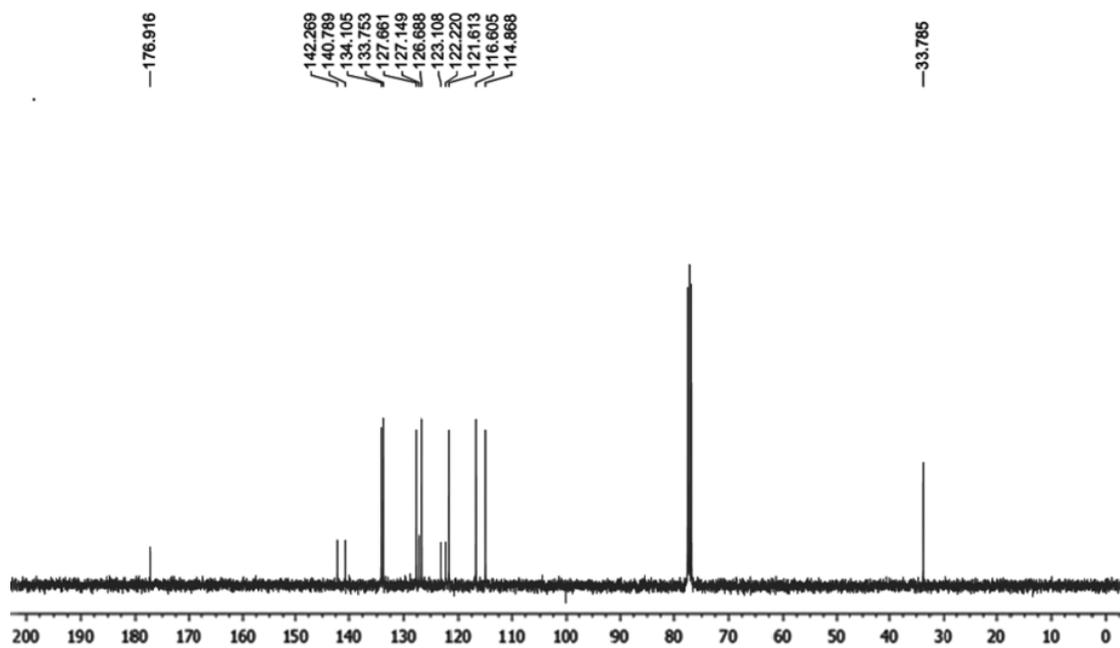
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 9-metilbenzo[*c*]acridin-7(12*H*)-ona (**21**)



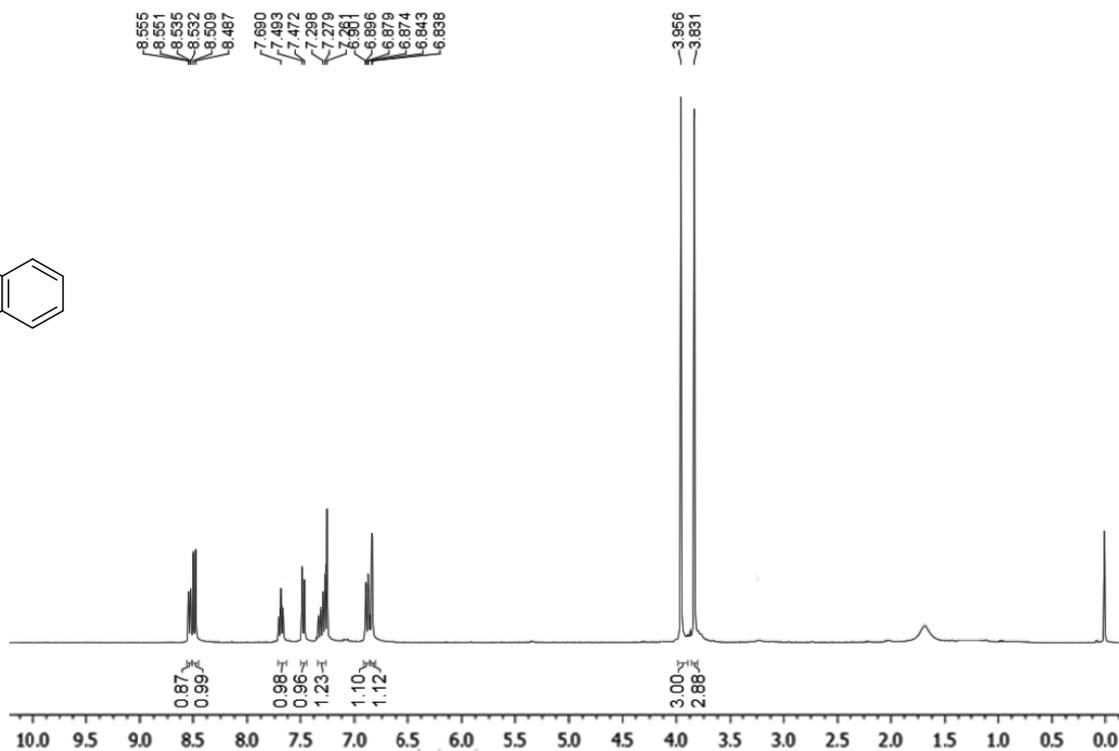
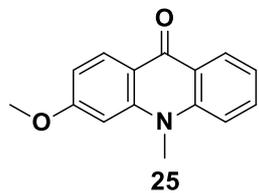




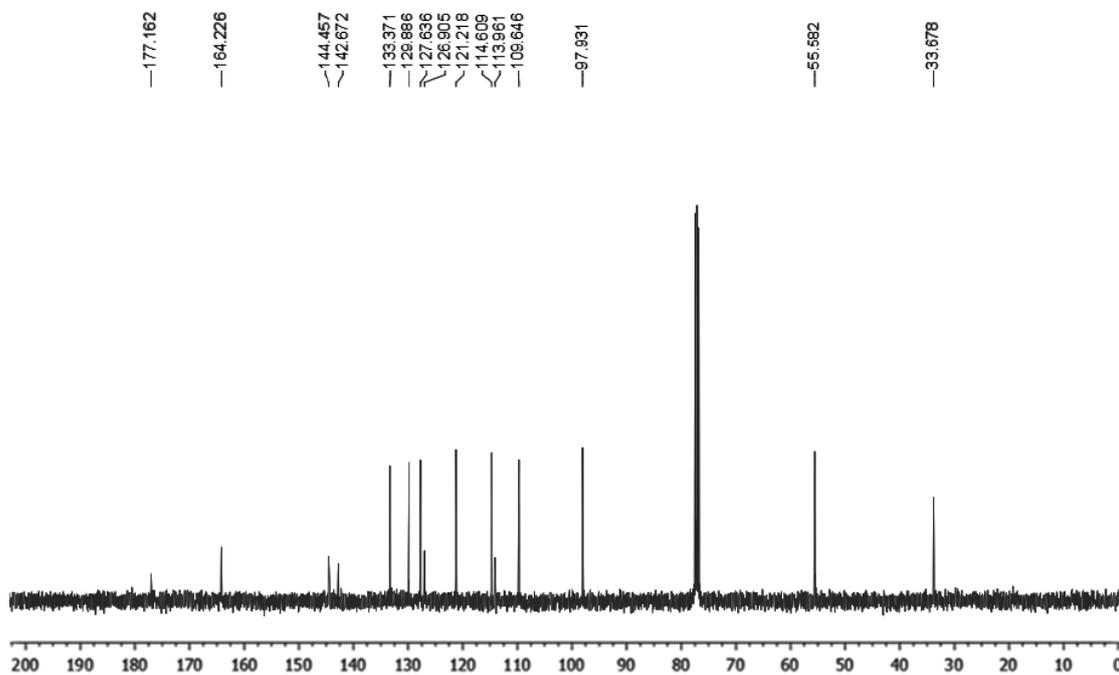
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) de 2-cloro-10-metilacridin-9(10H)-ona (**24**)



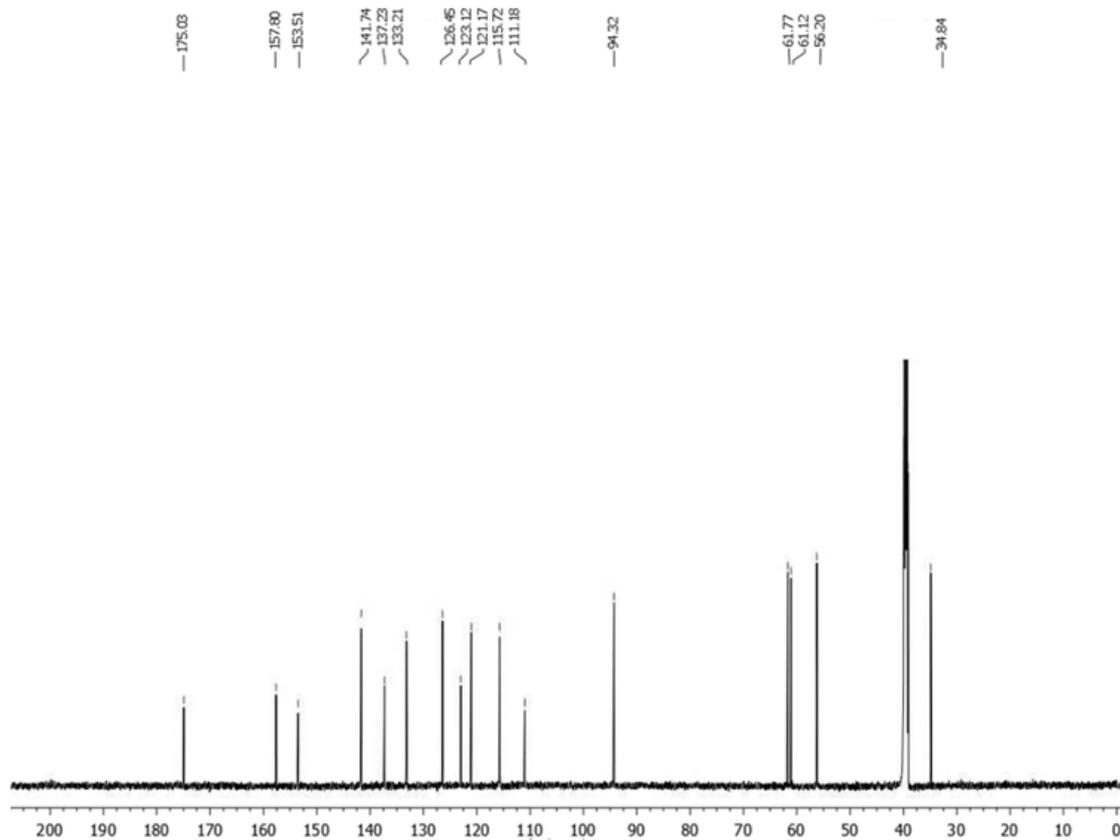
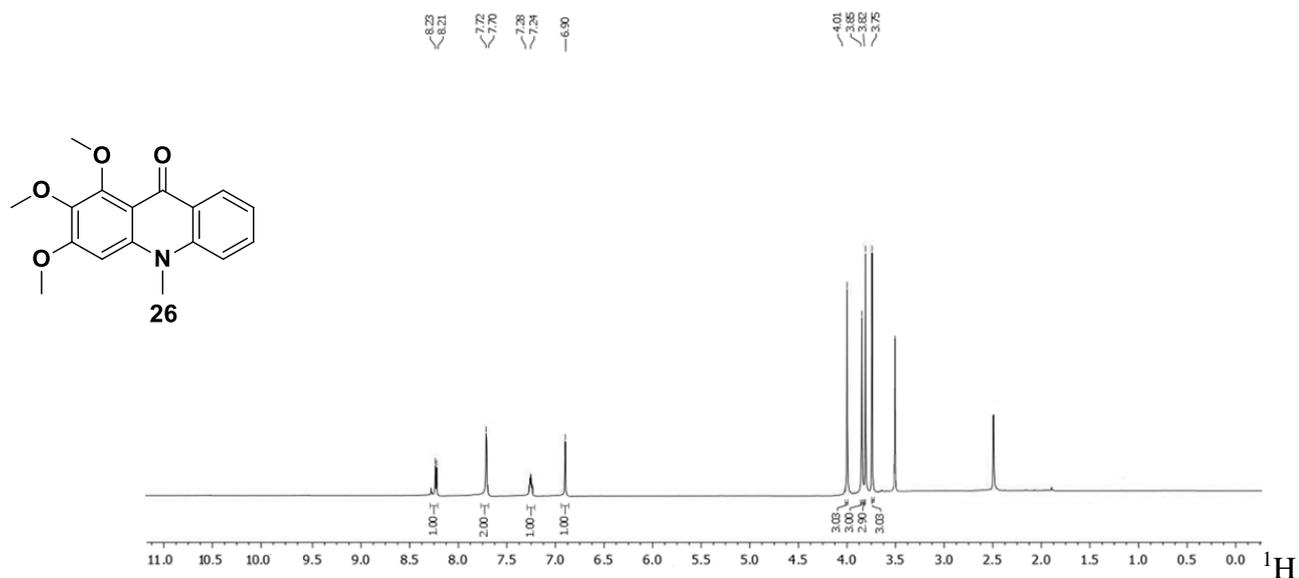
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) de 2-cloro-10-metilacridin-9(10H)-ona (**24**)

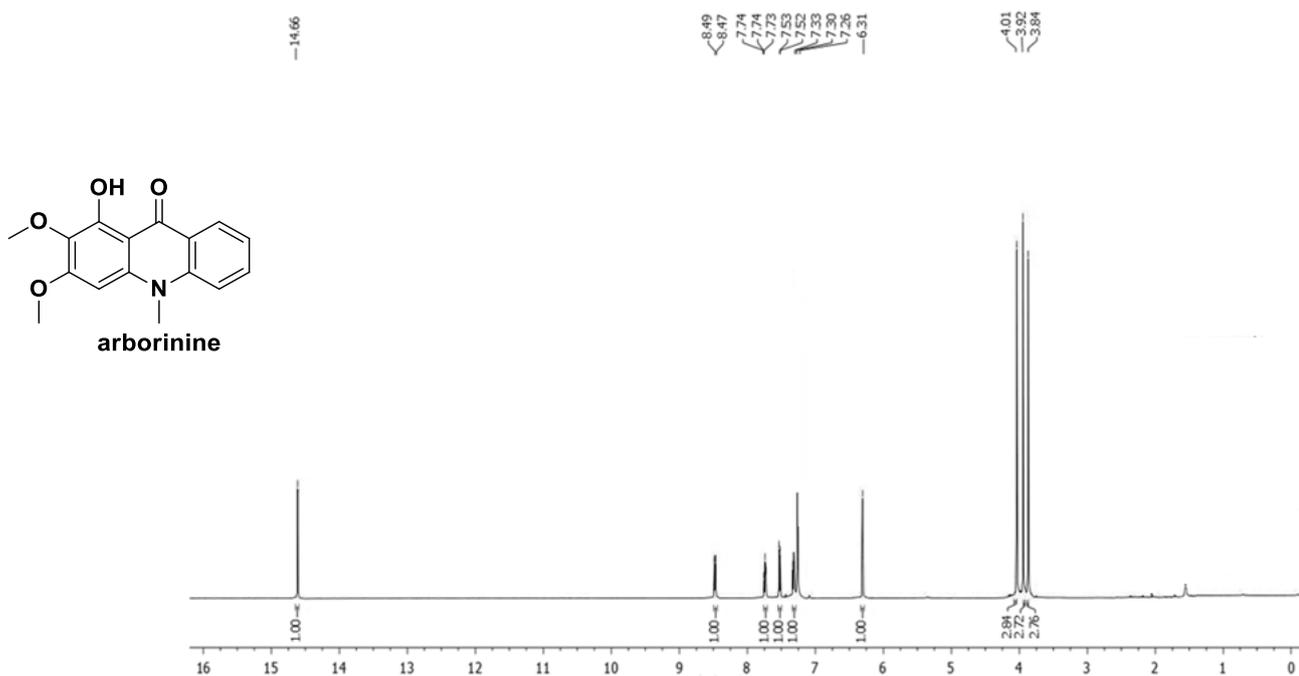


^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) de 3-metoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (**25**)

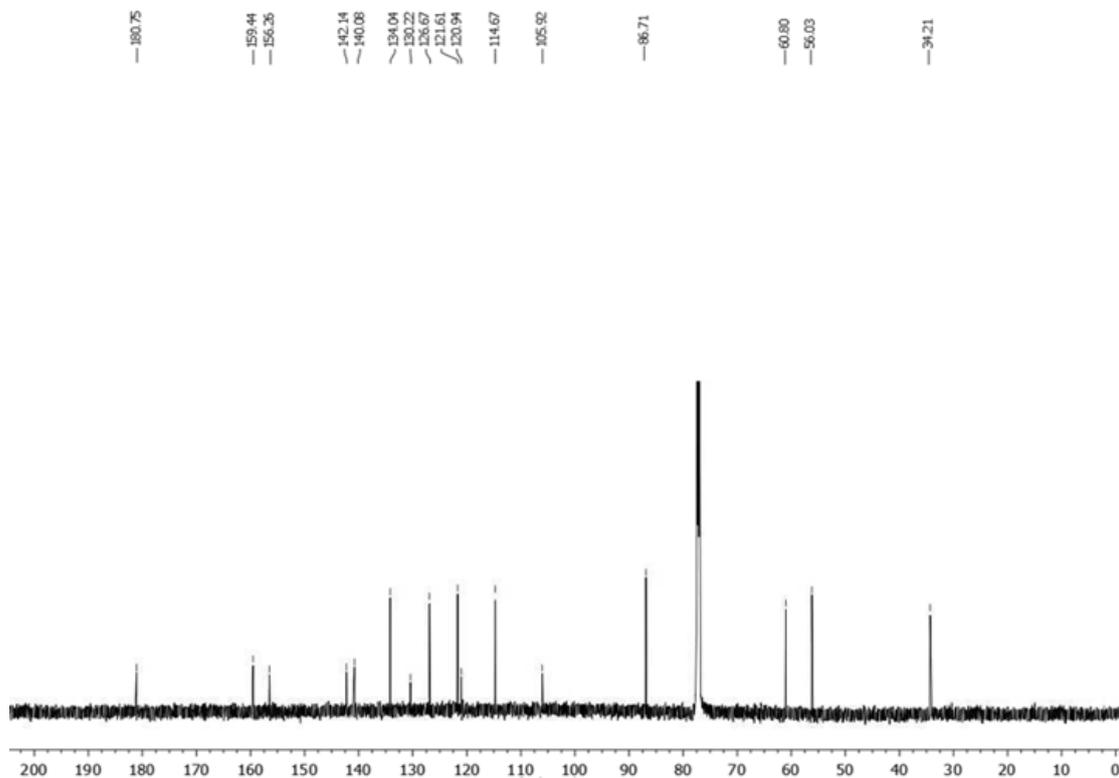


^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) de 3-metoxi-10-metilacridin-9(10H)-ona (**25**)



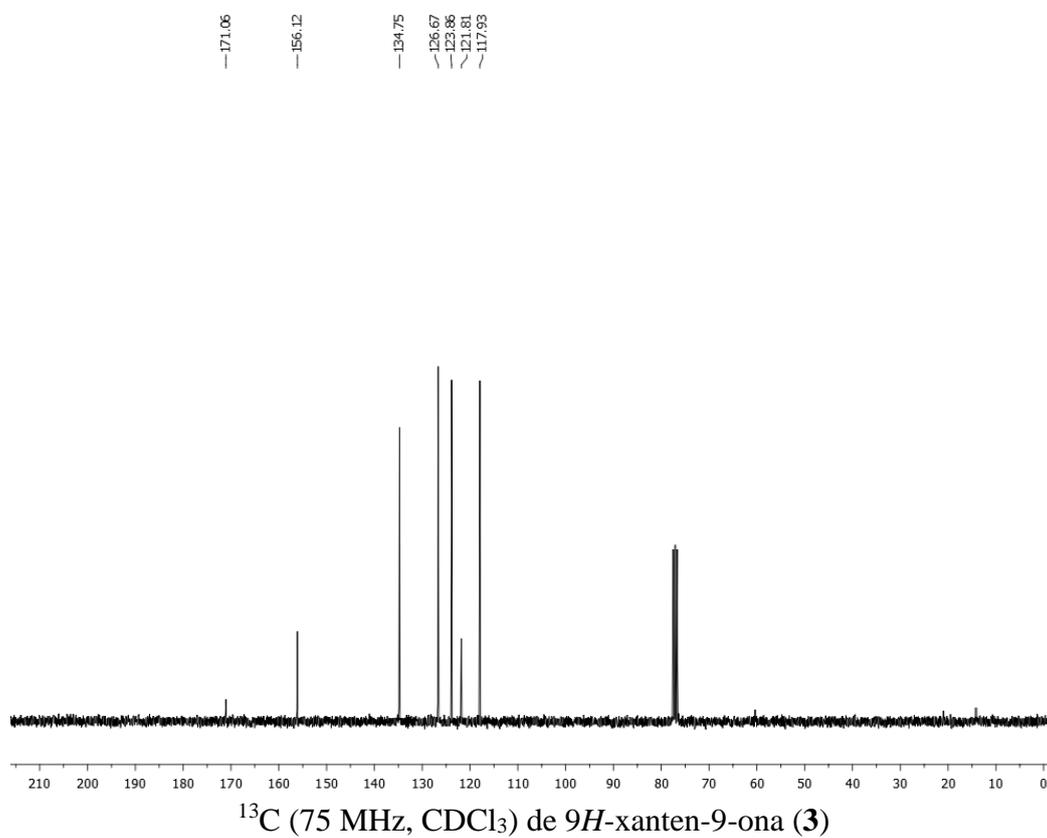
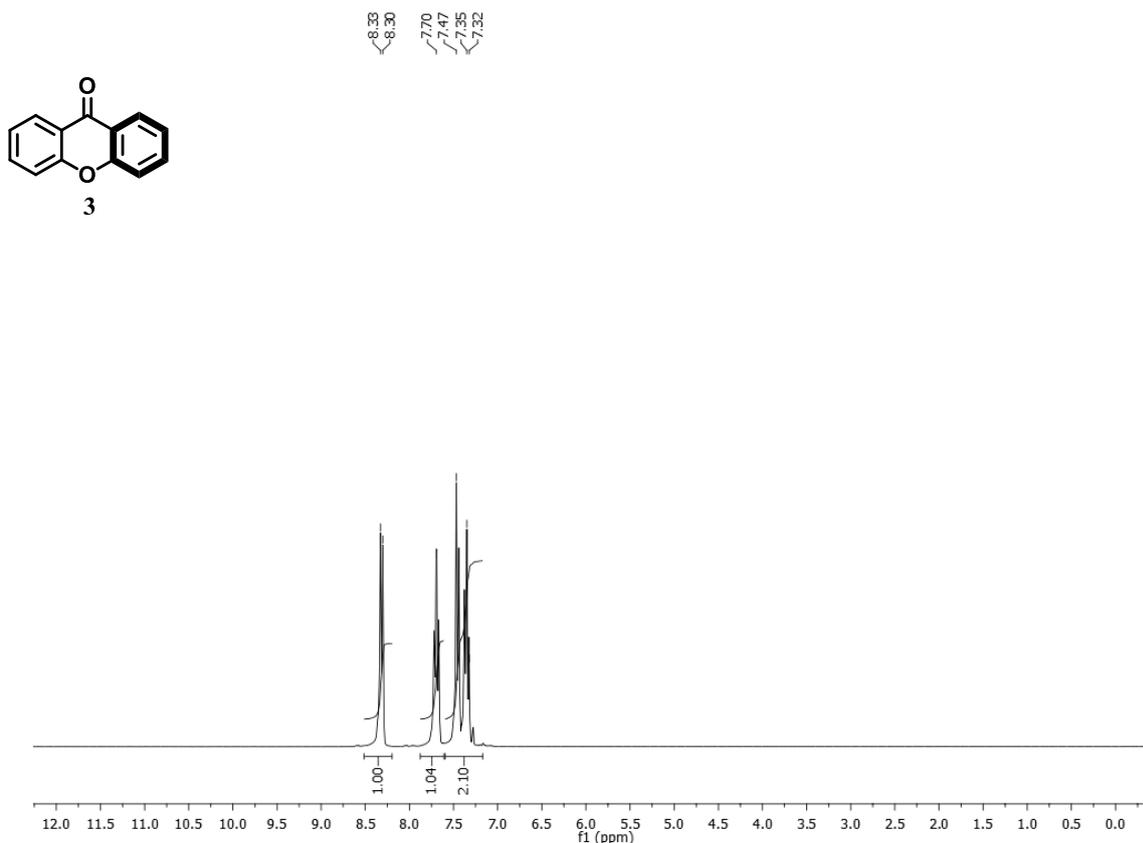


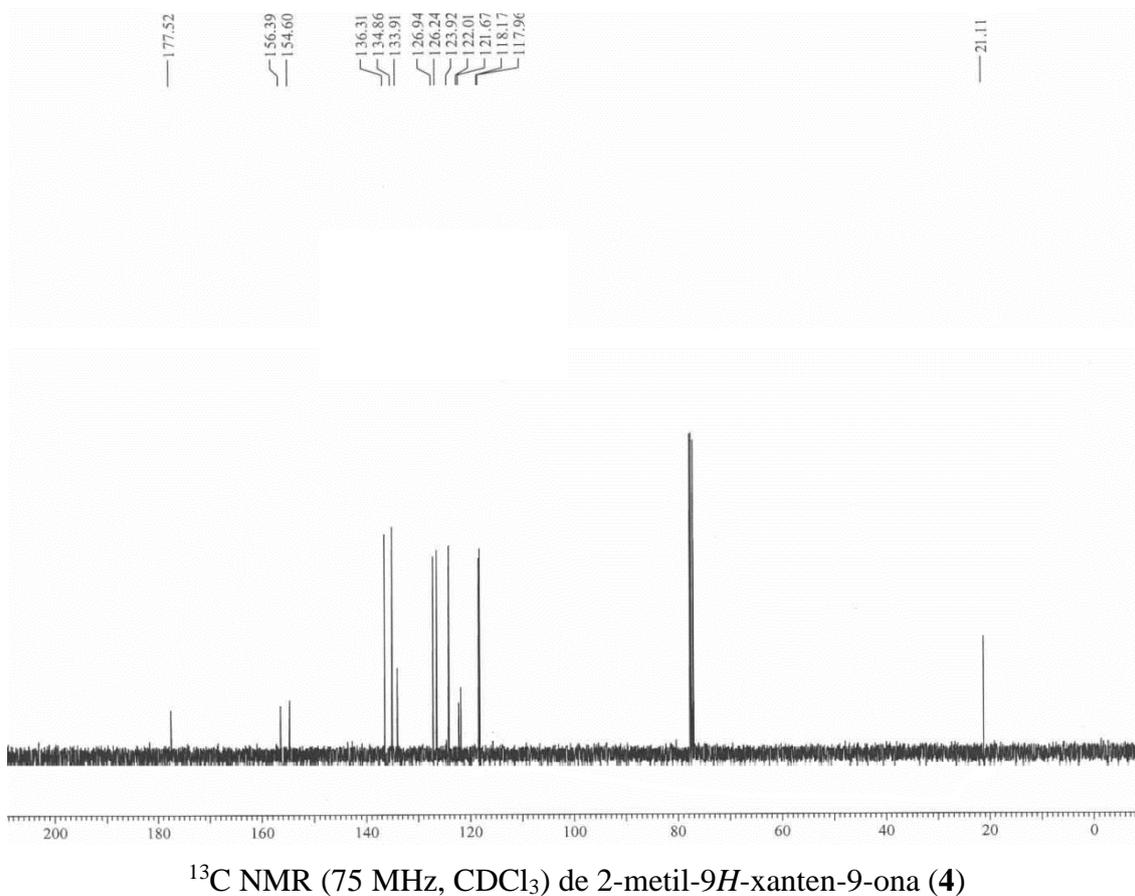
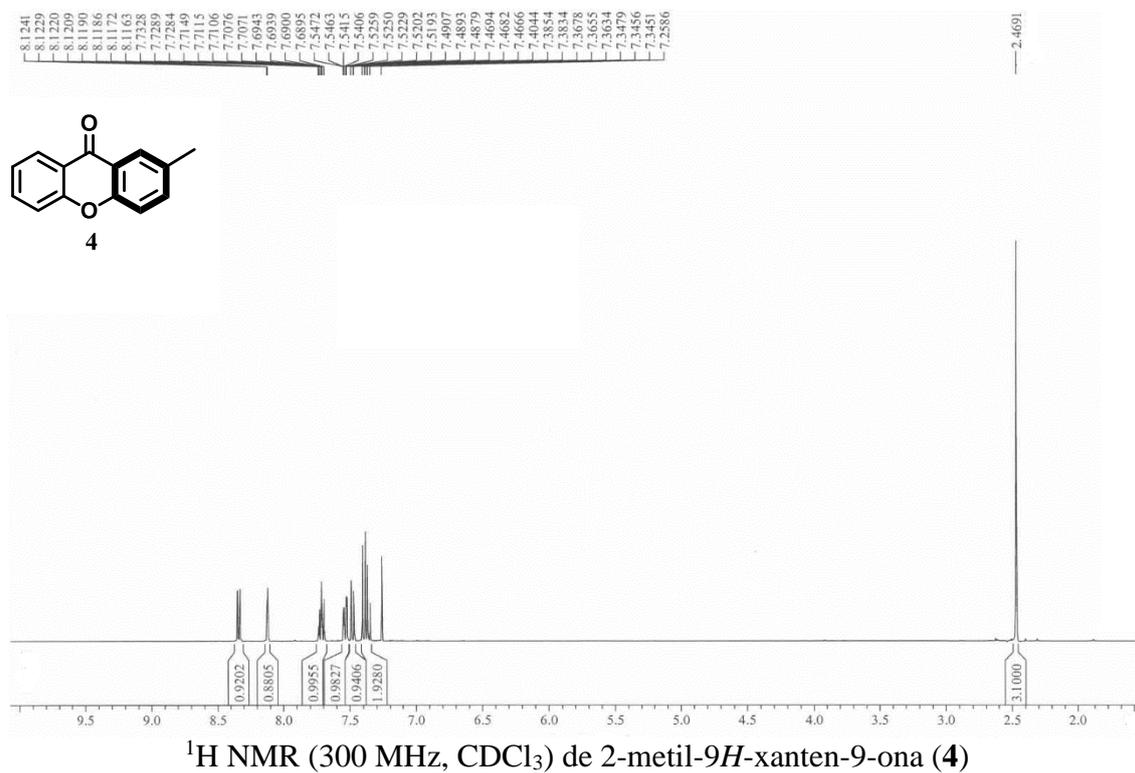
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de arborinina

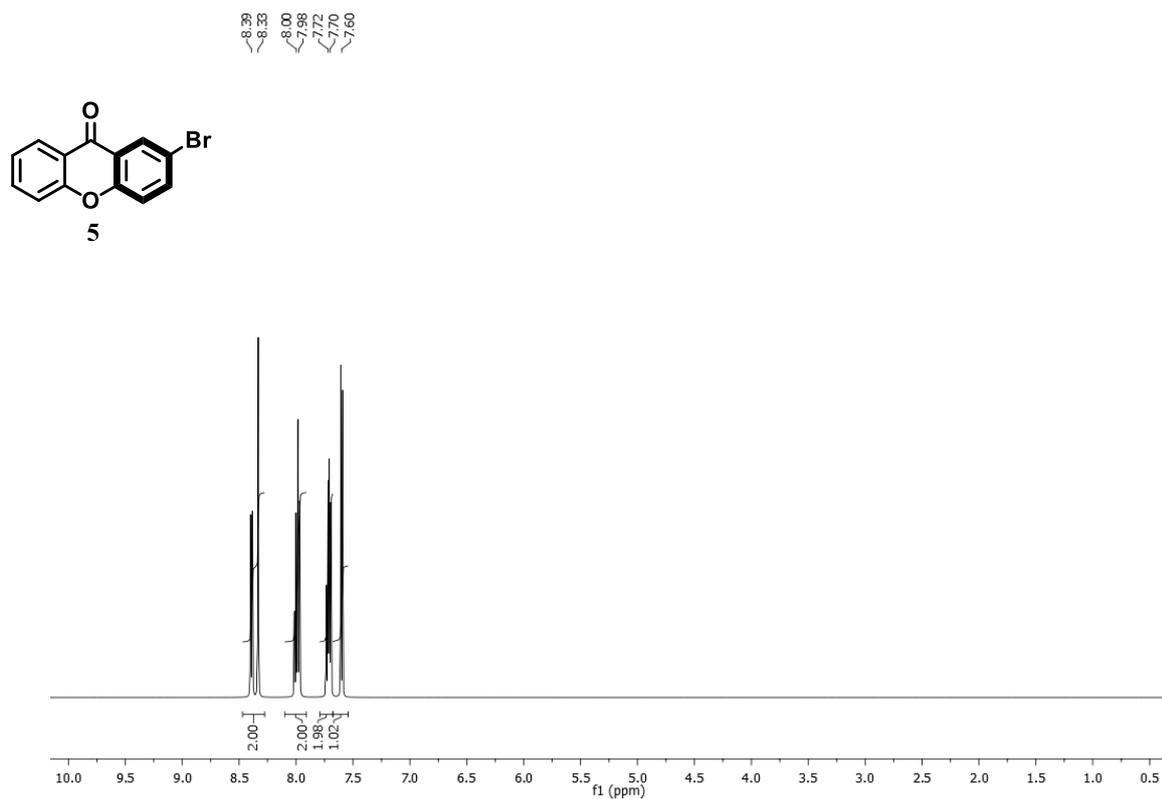


¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de arborinina

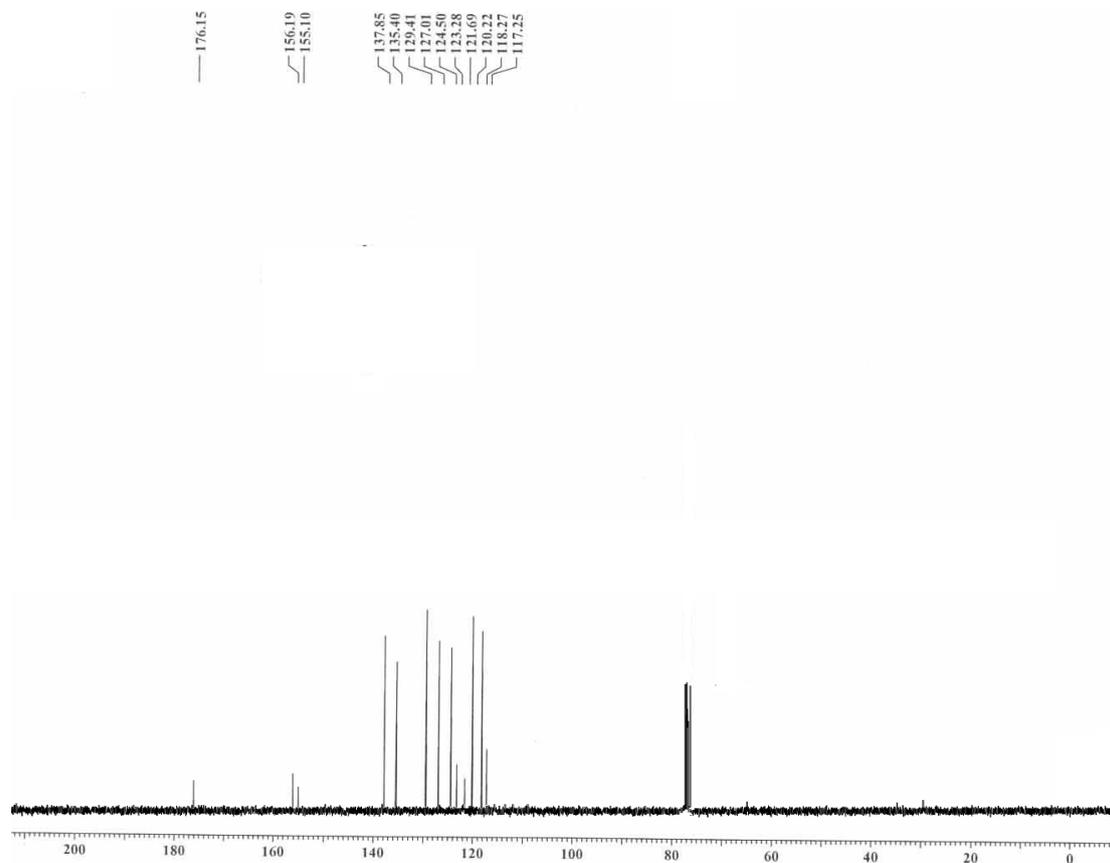
3. Xantonas



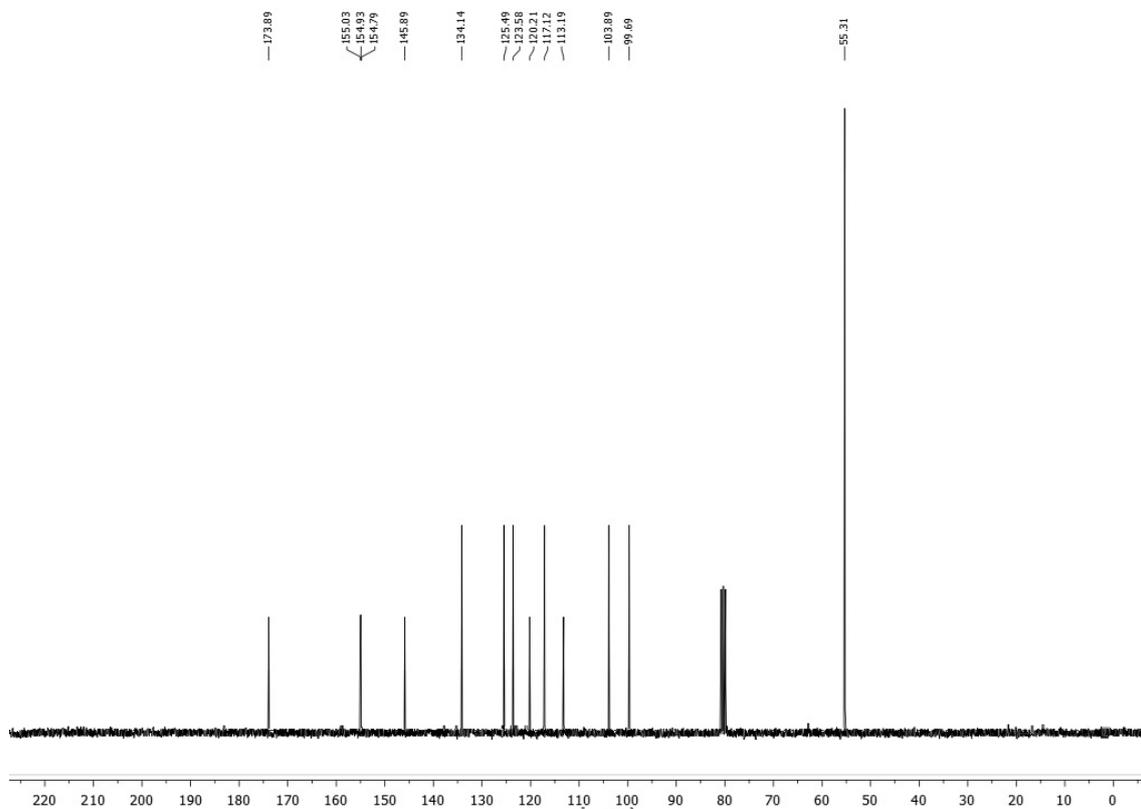
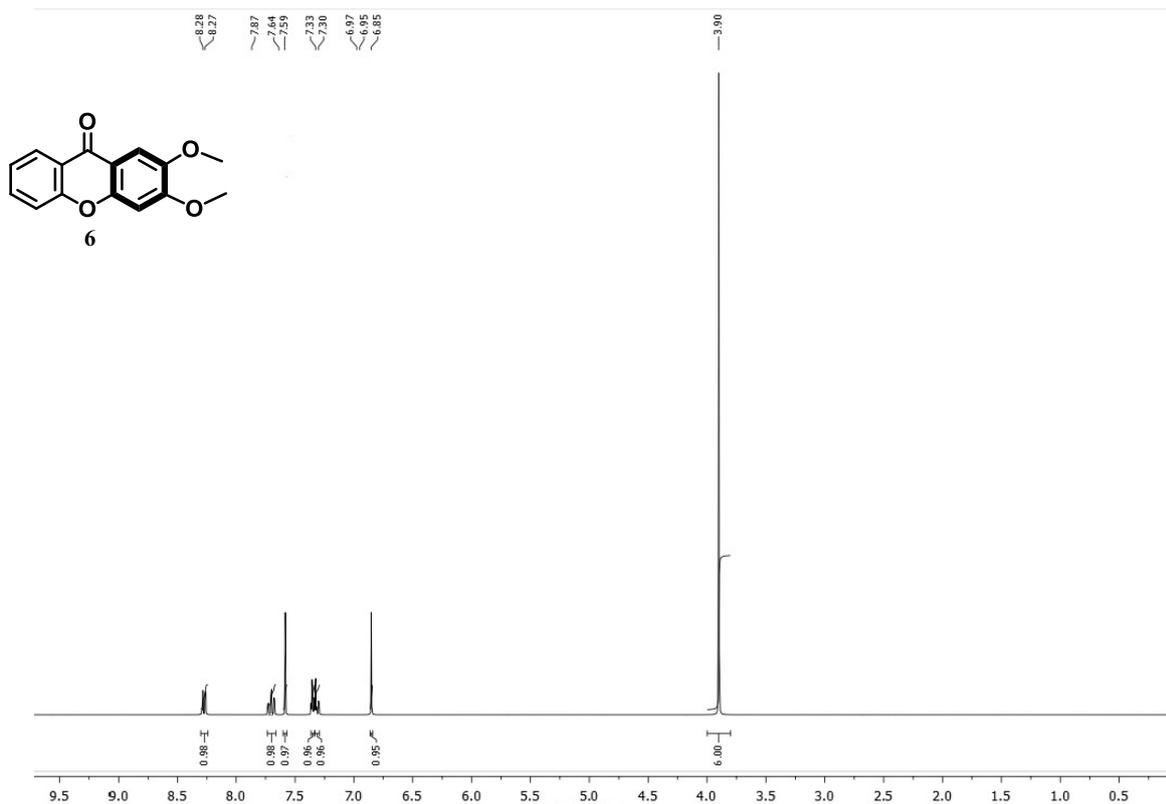




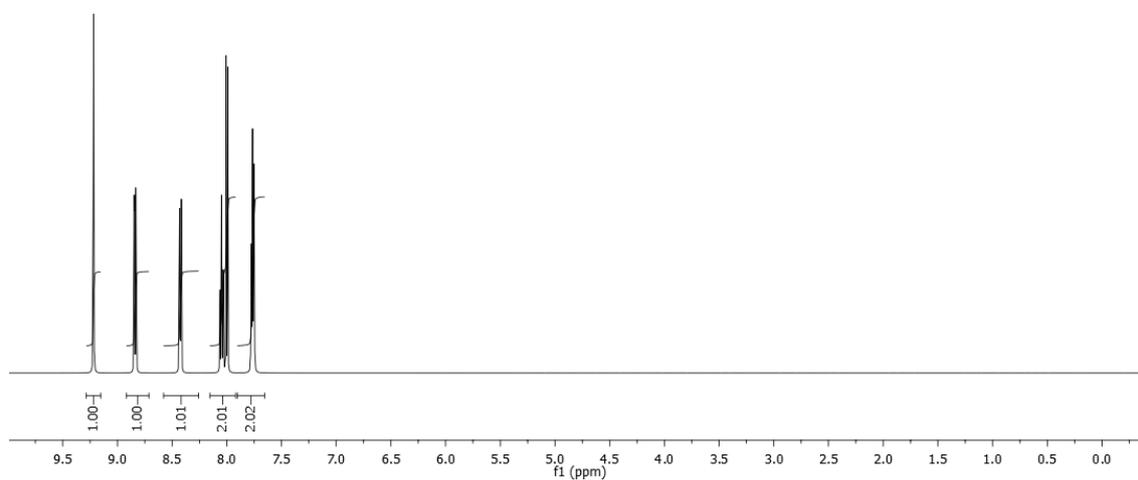
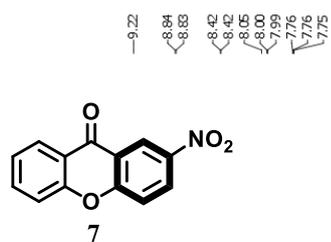
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 2-bromo-9H-xanten-9-ona (**5**)



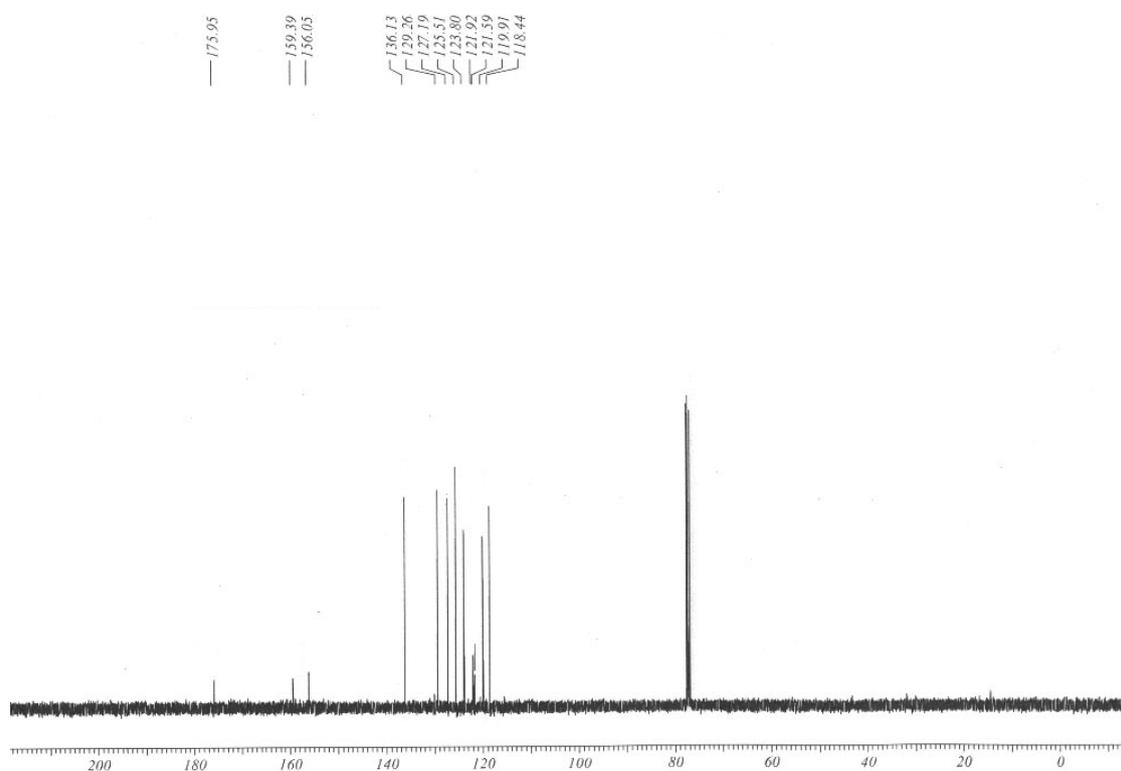
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 2-bromo-9H-xanten-9-ona (**5**)



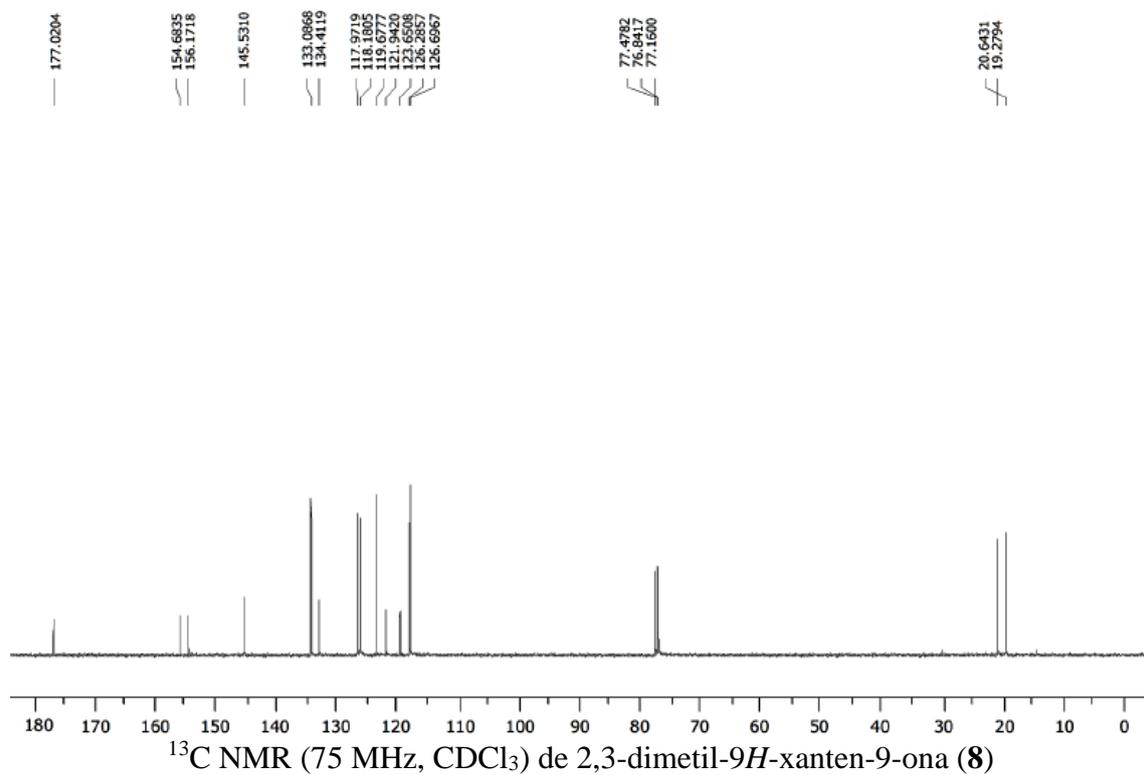
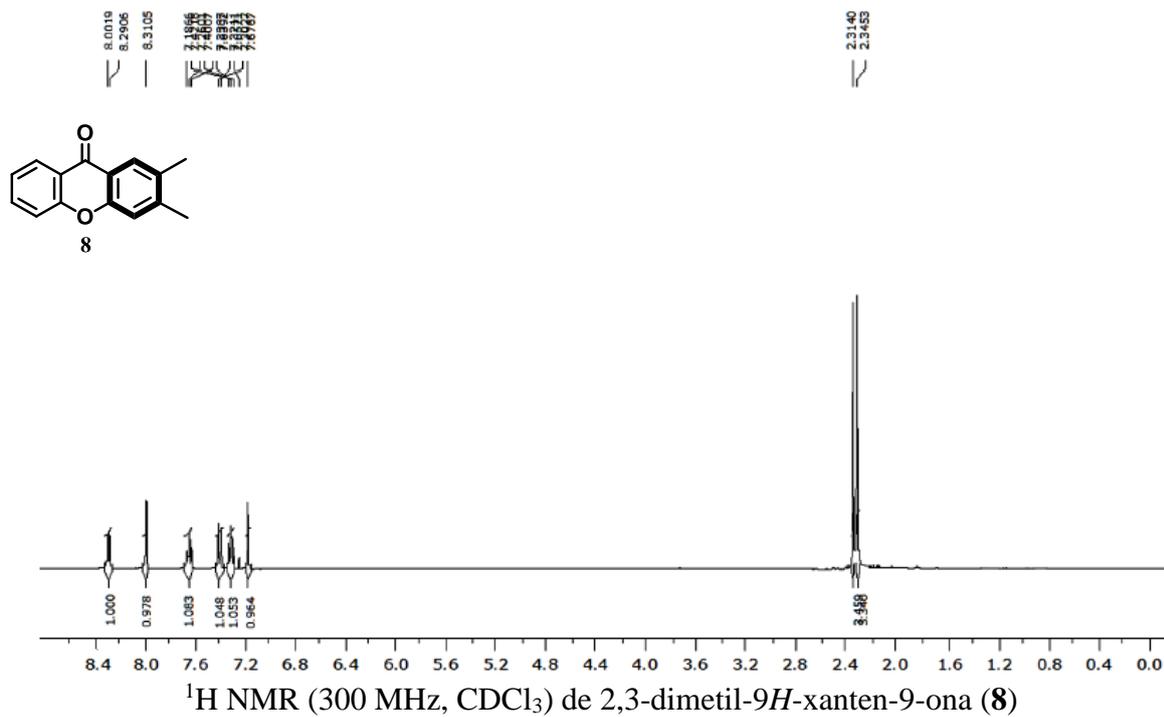
Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
Apéndice



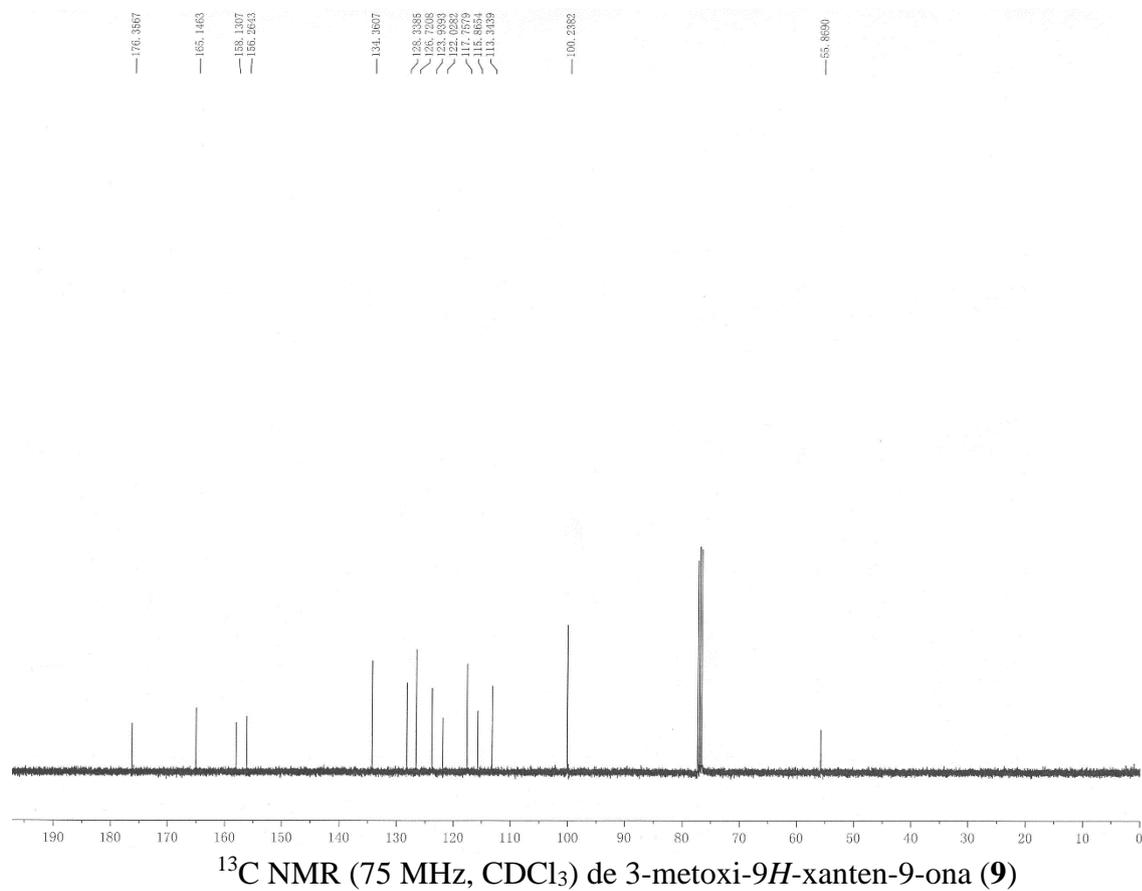
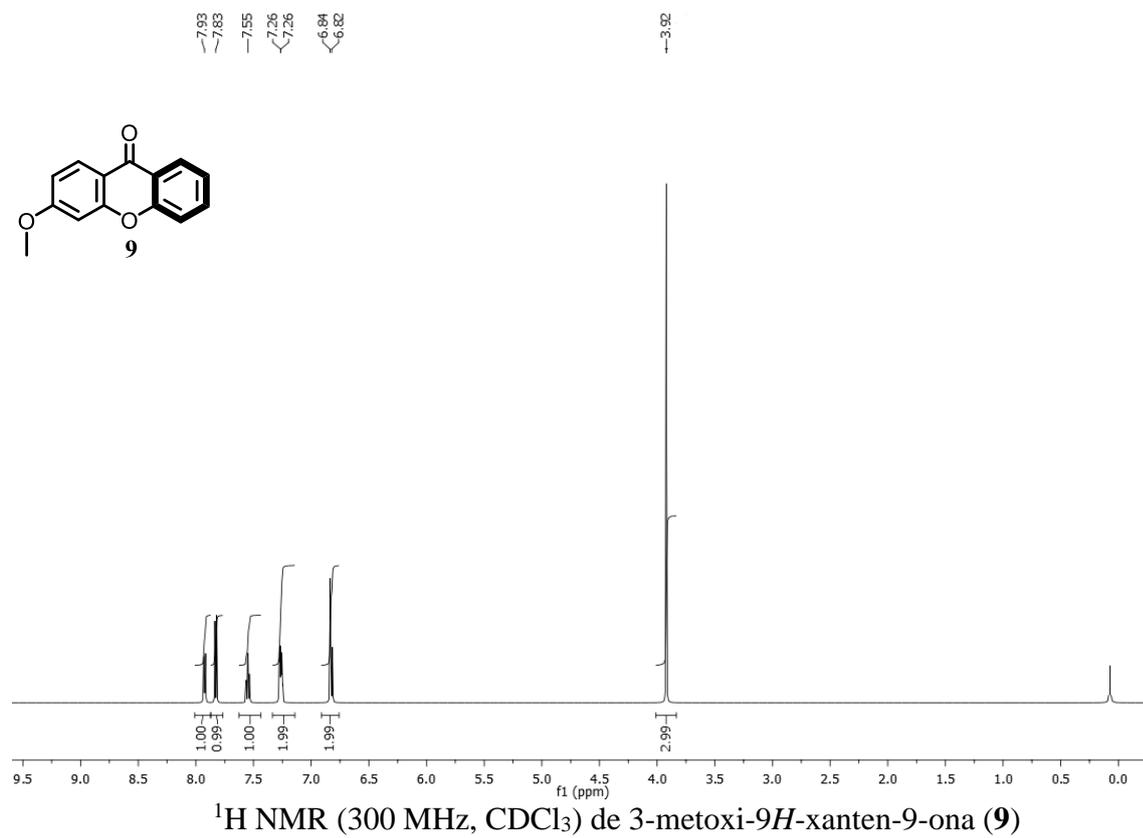
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 2-nitro-9H-xanten-9-ona (7)

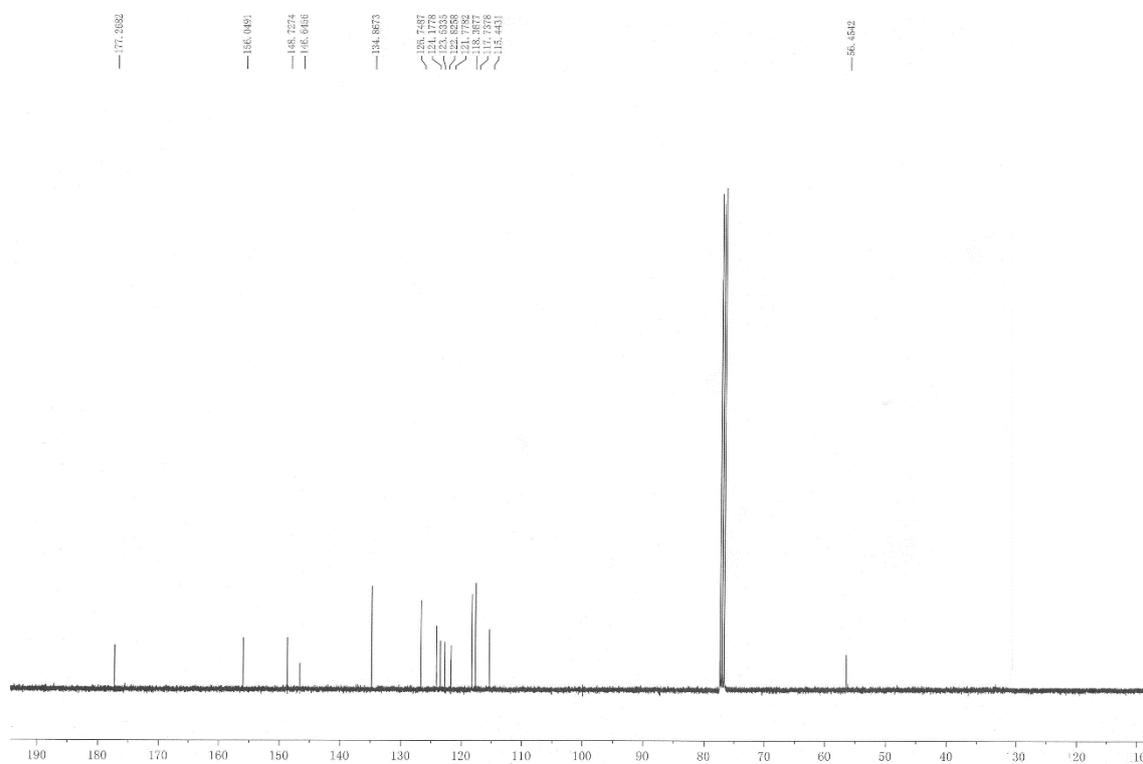
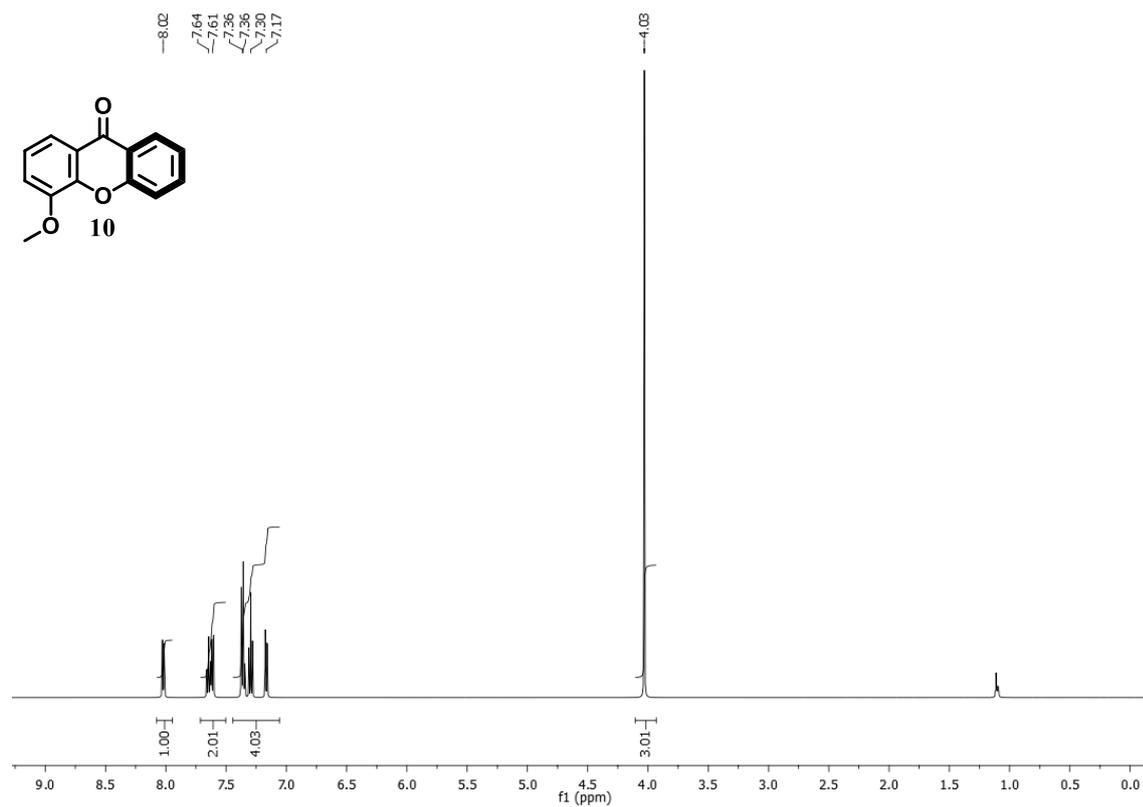


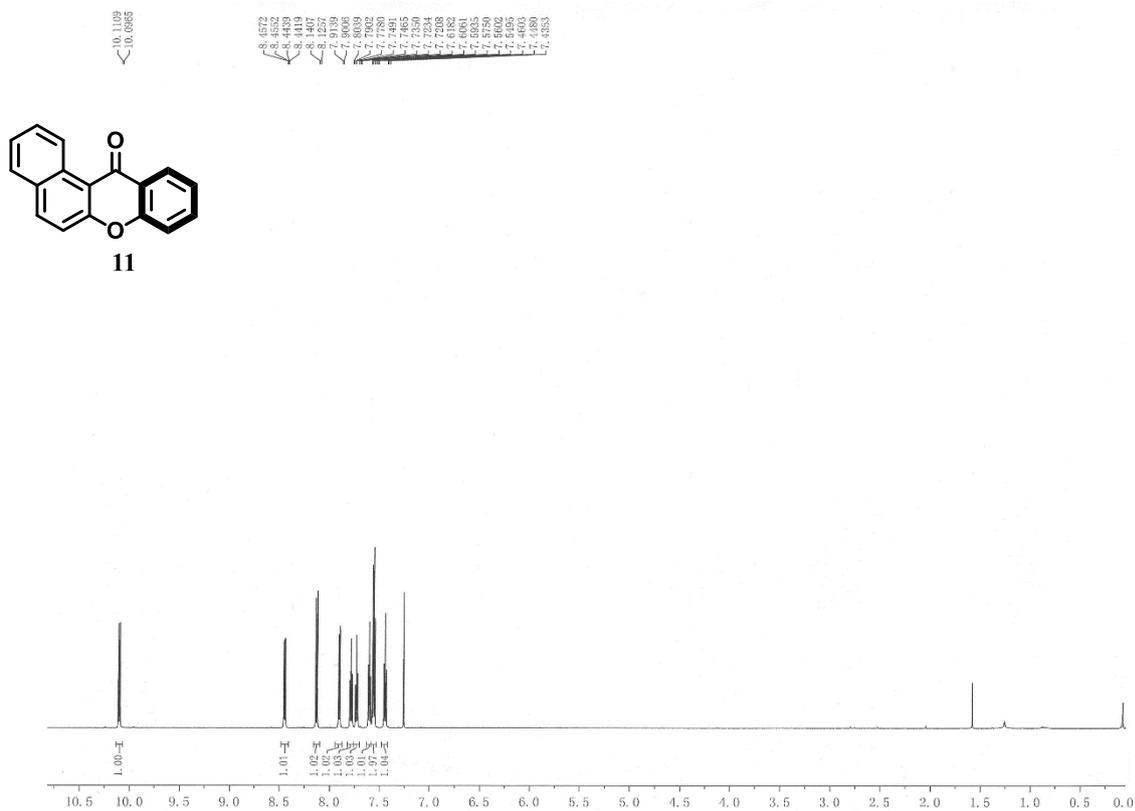
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 2-nitro-9H-xanten-9-ona (7)



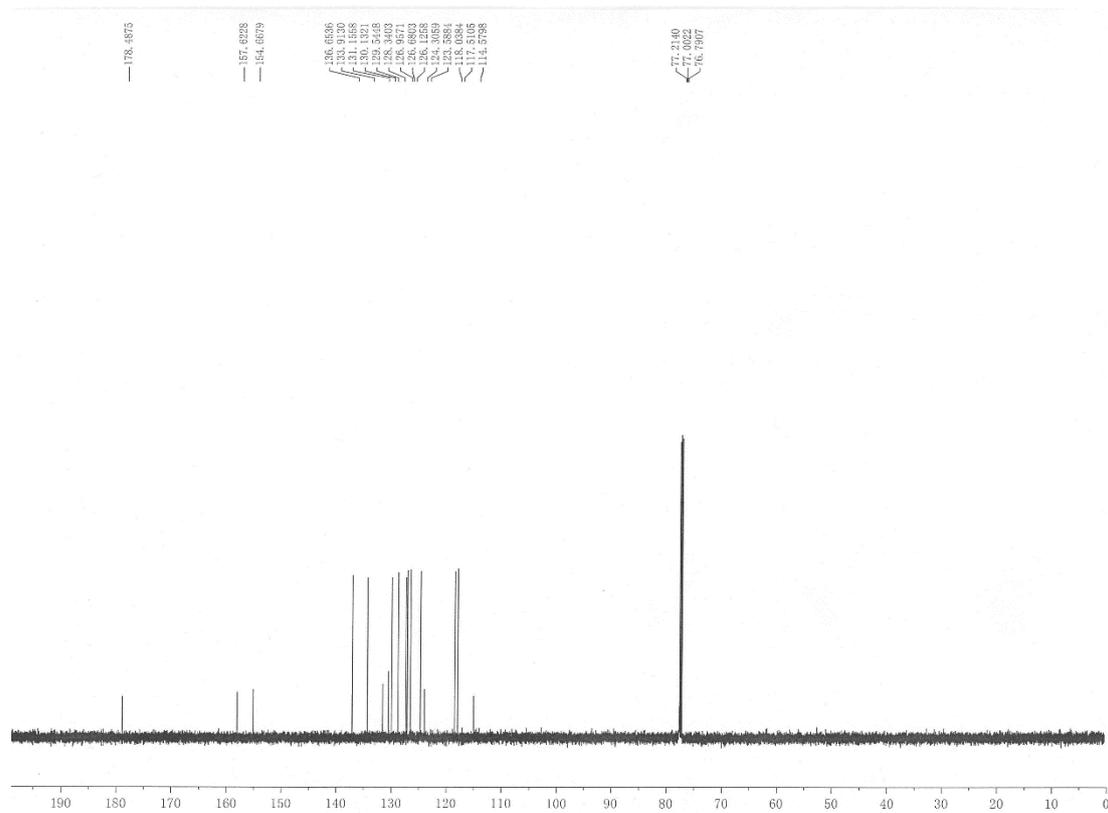
Diseño, síntesis y estudio de derivados de xantona sobre membranas lipídicas modelo
Apéndice



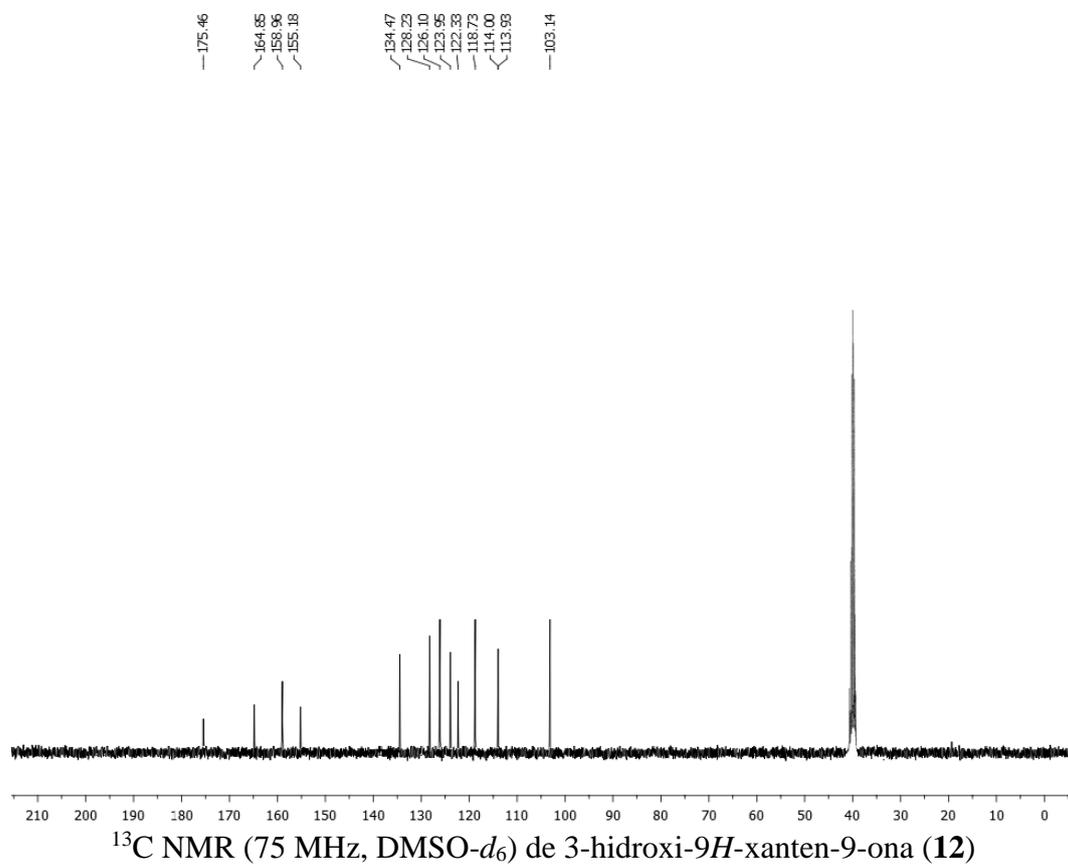
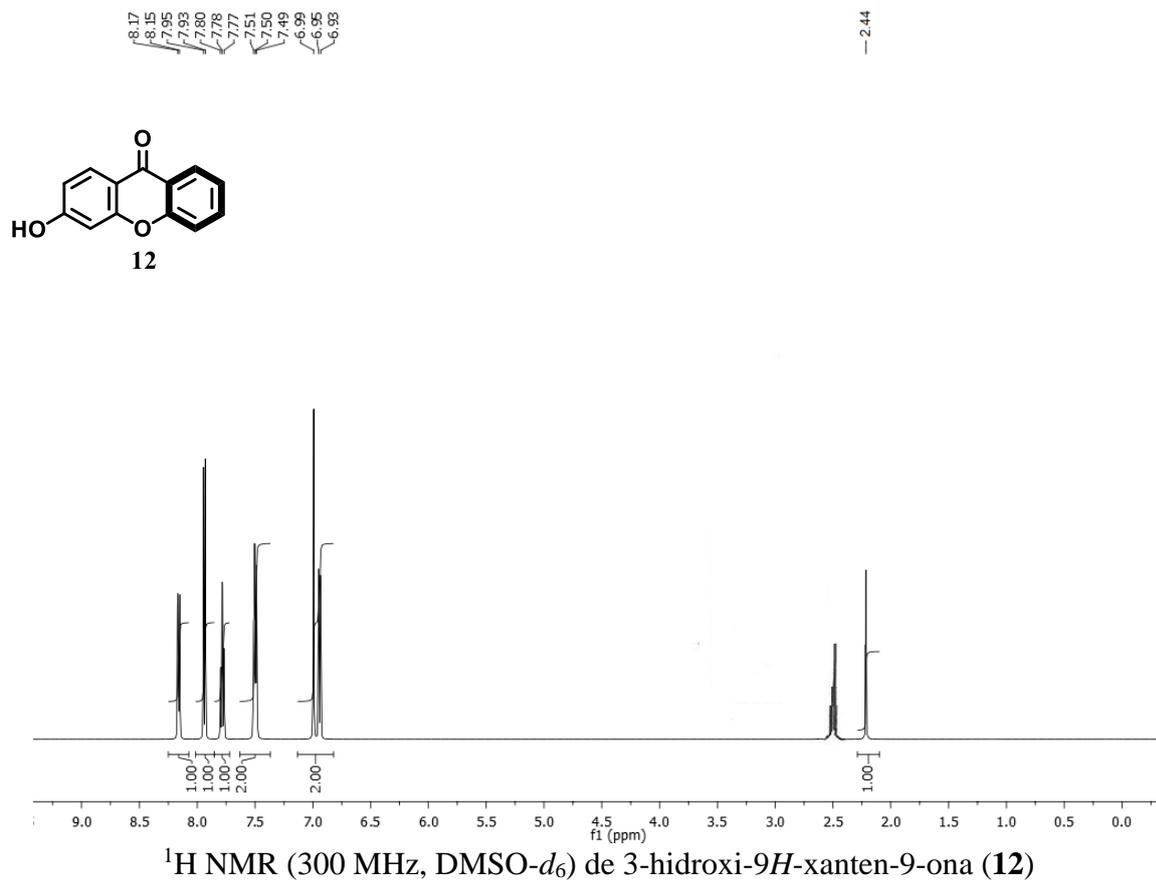


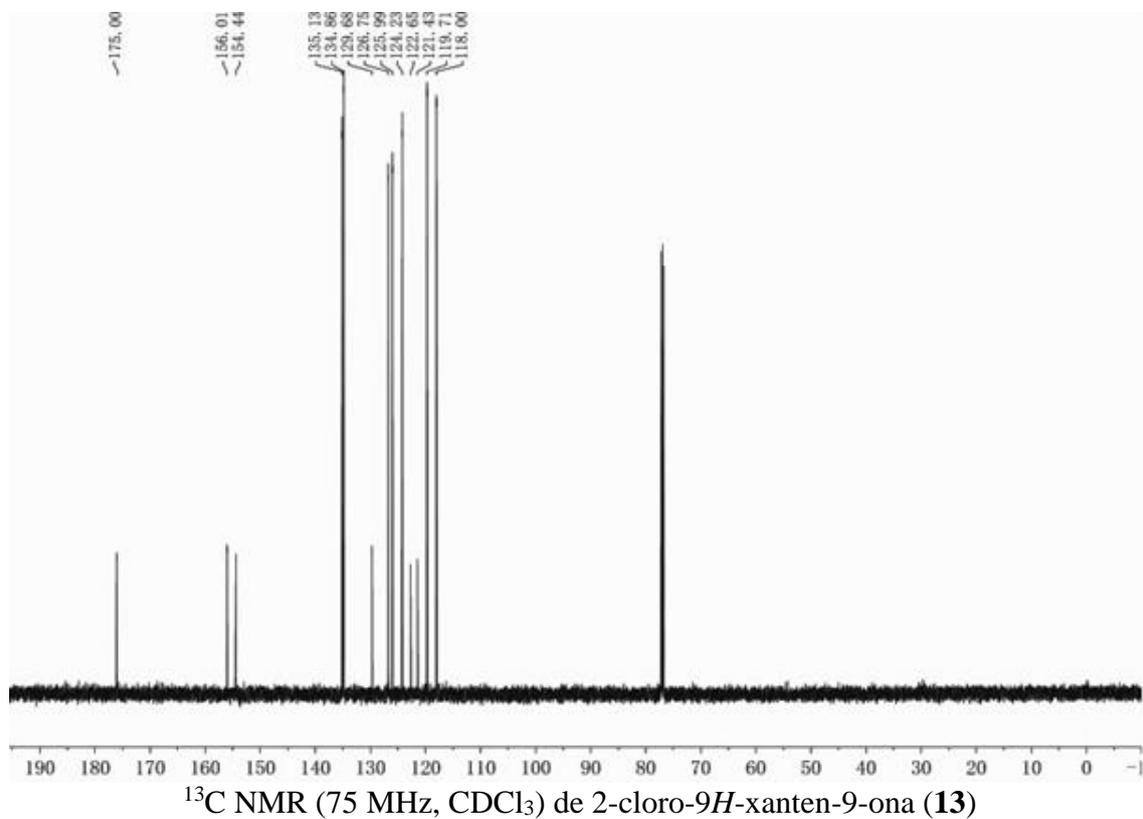
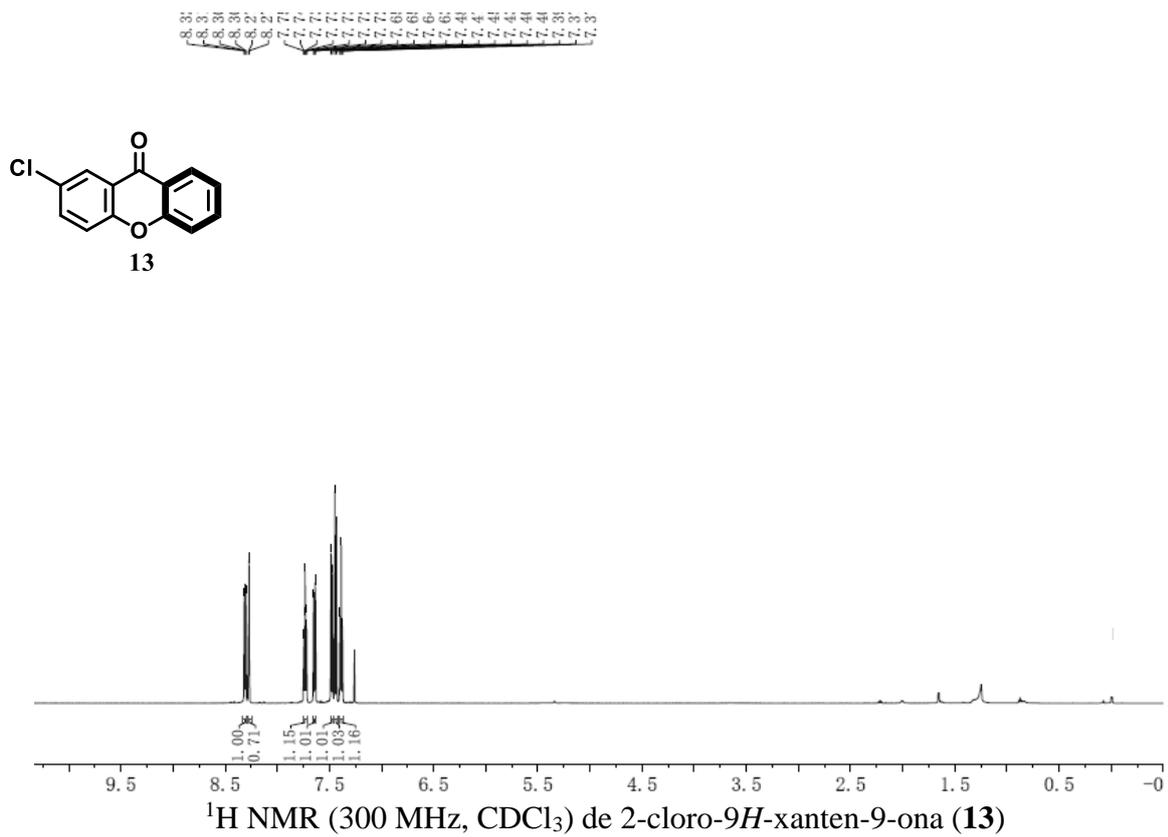


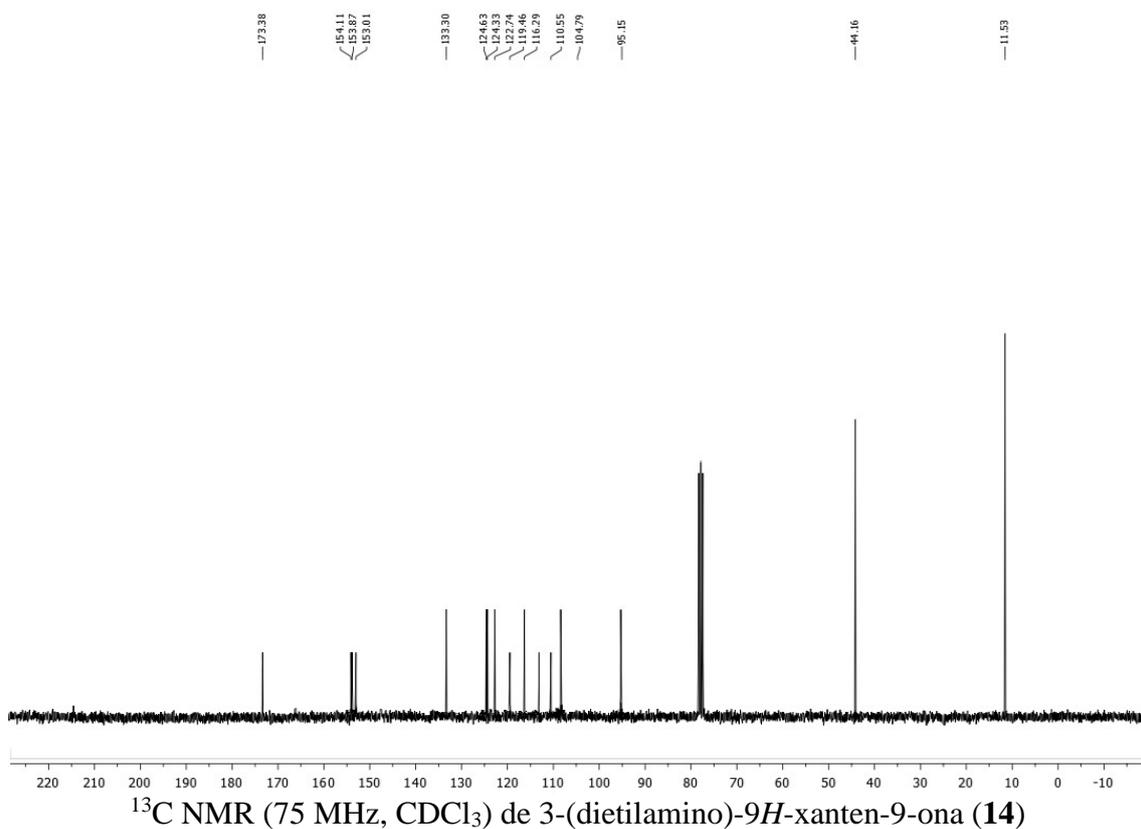
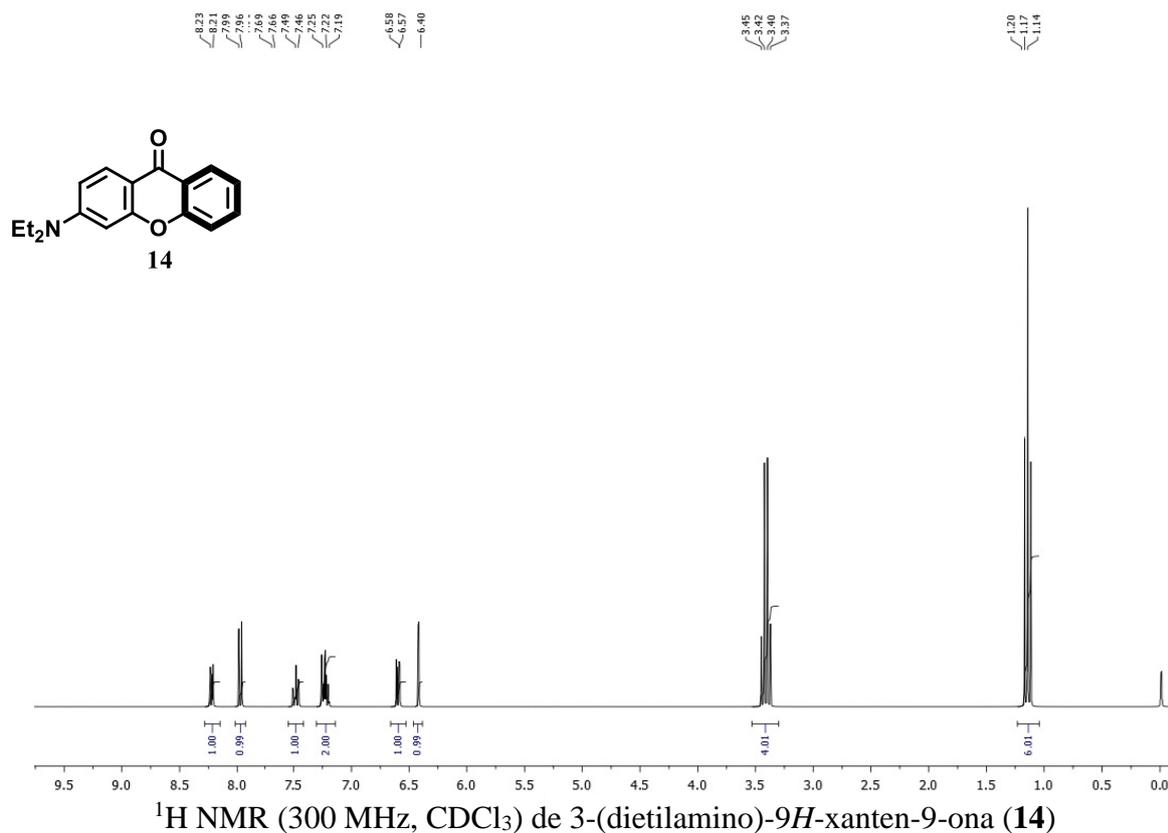
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 12H-benzo[a]xanten-12-ona (11)

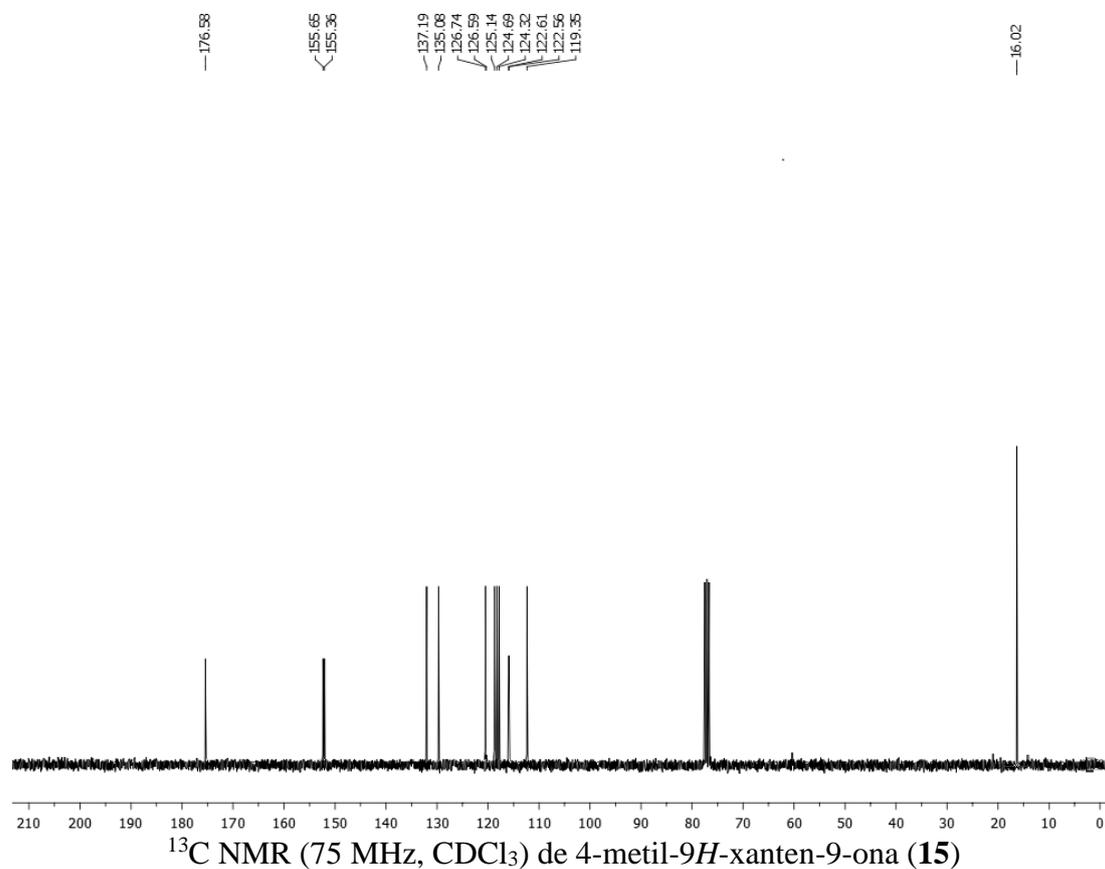
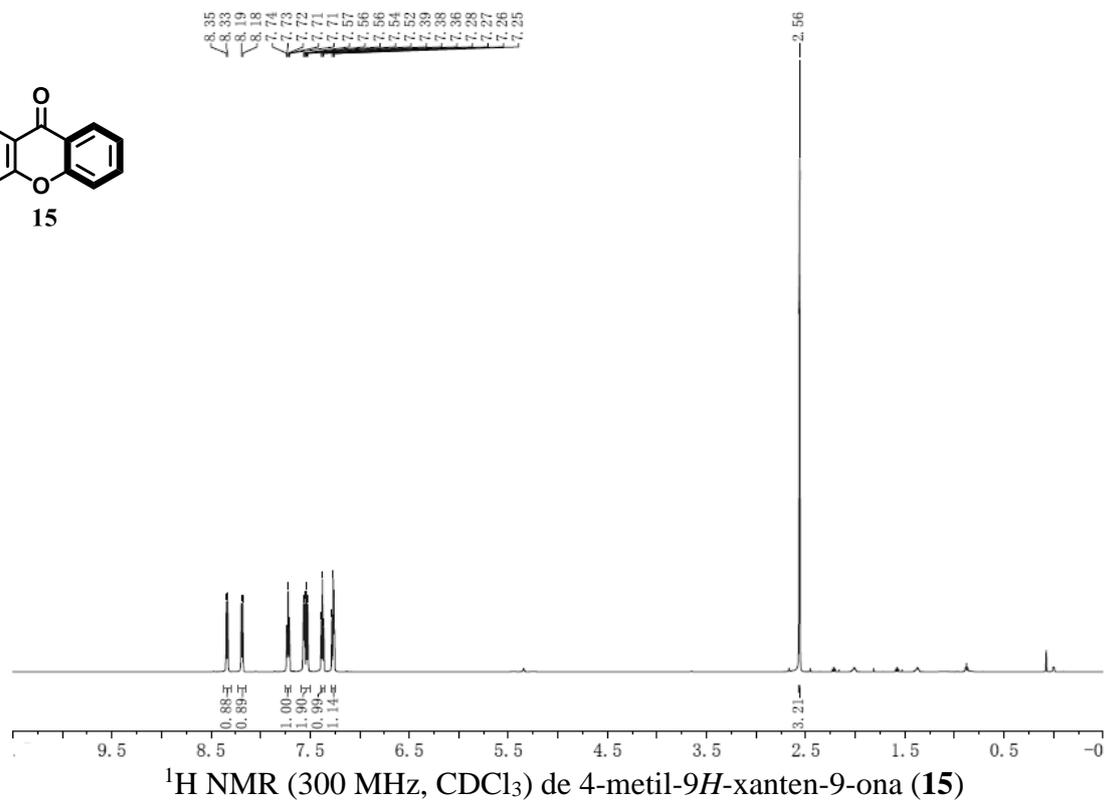
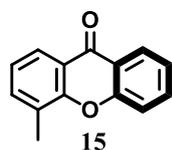


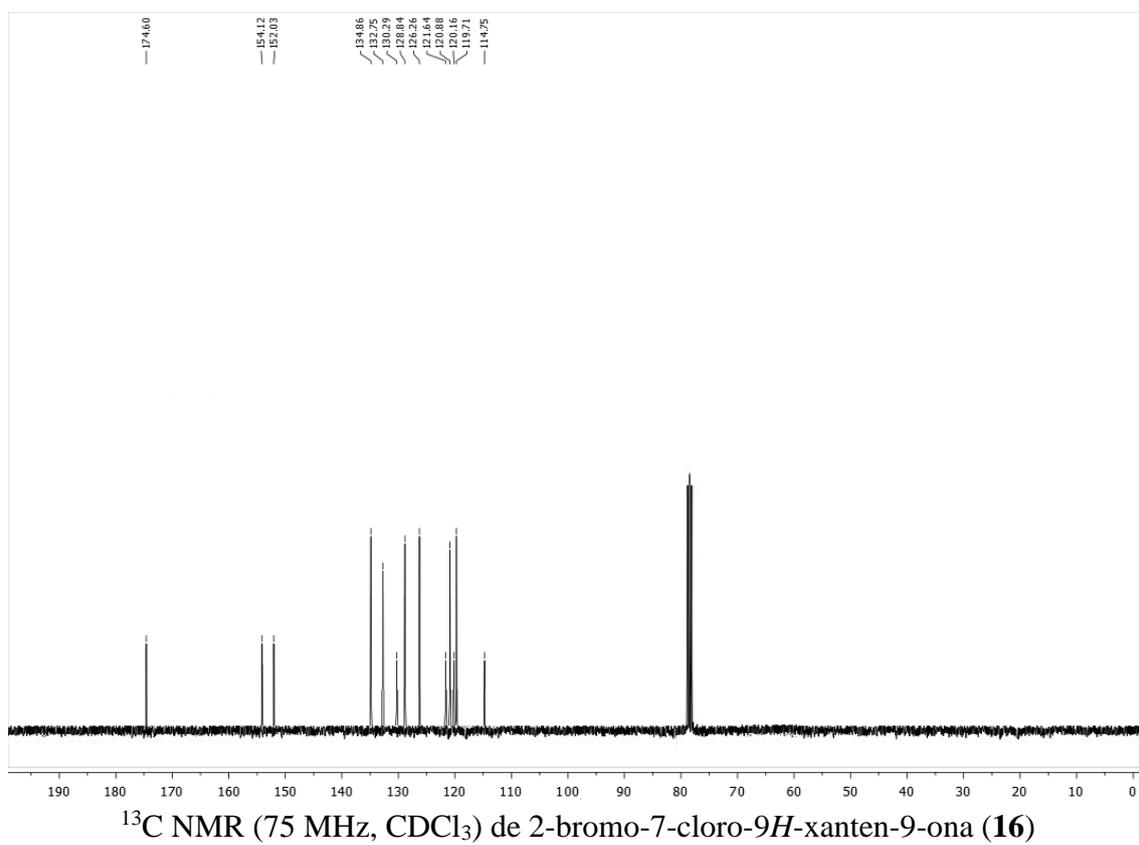
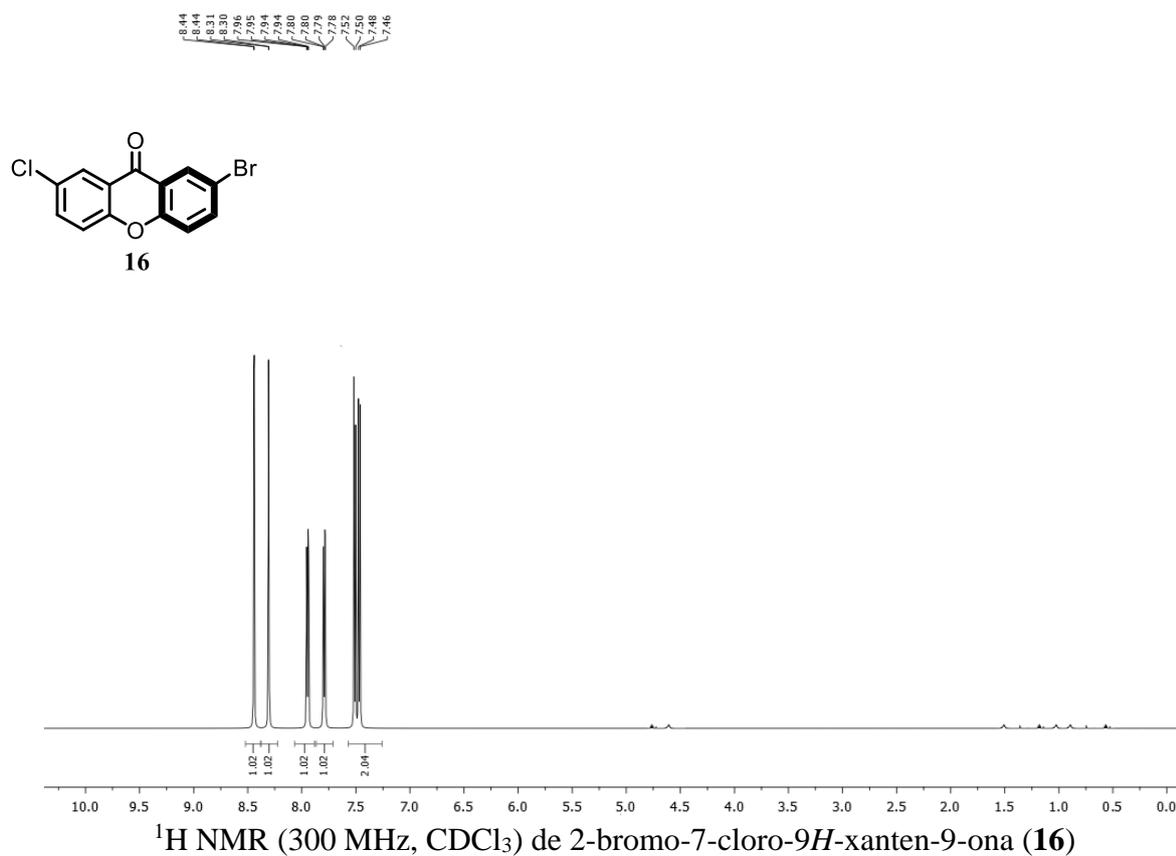
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 12H-benzo[a]xanten-12-ona (11)

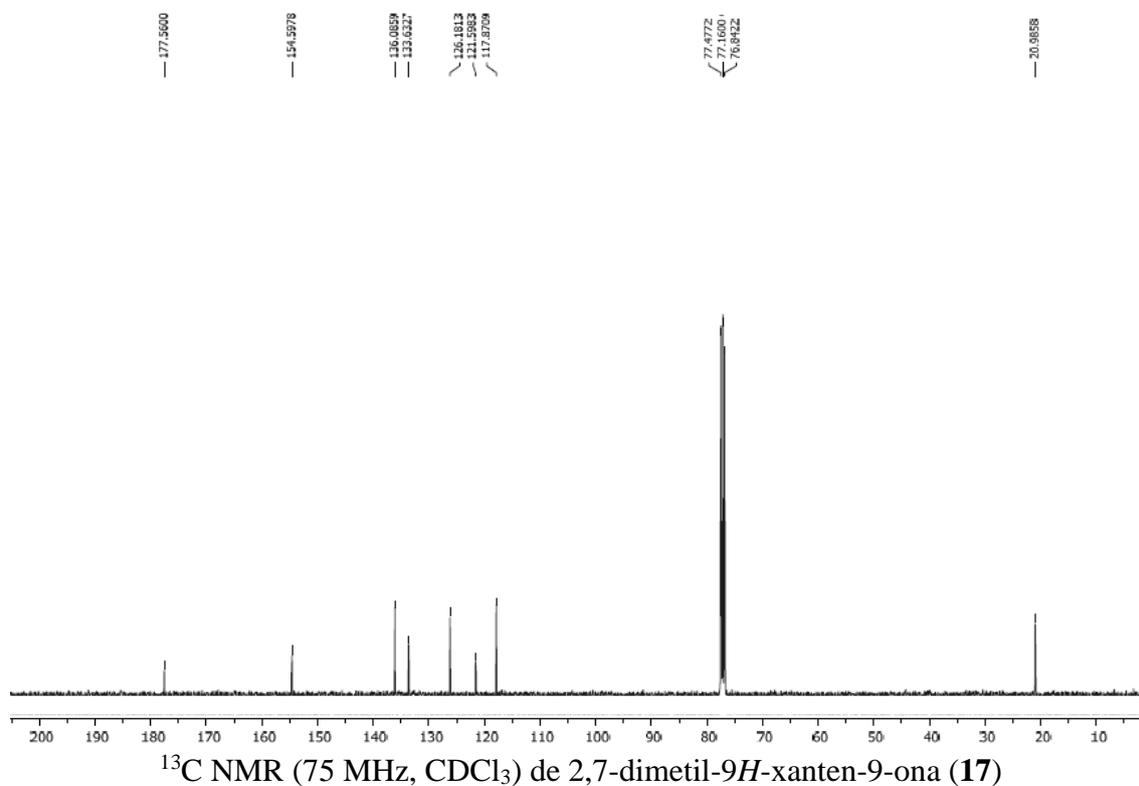
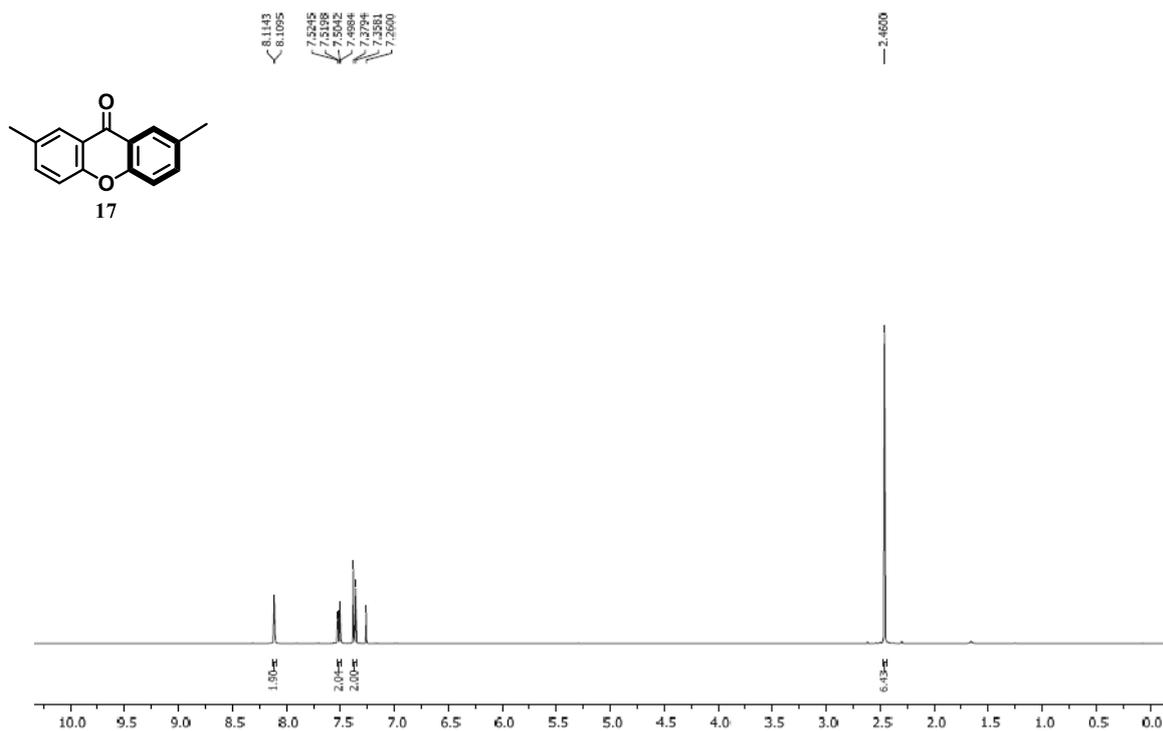


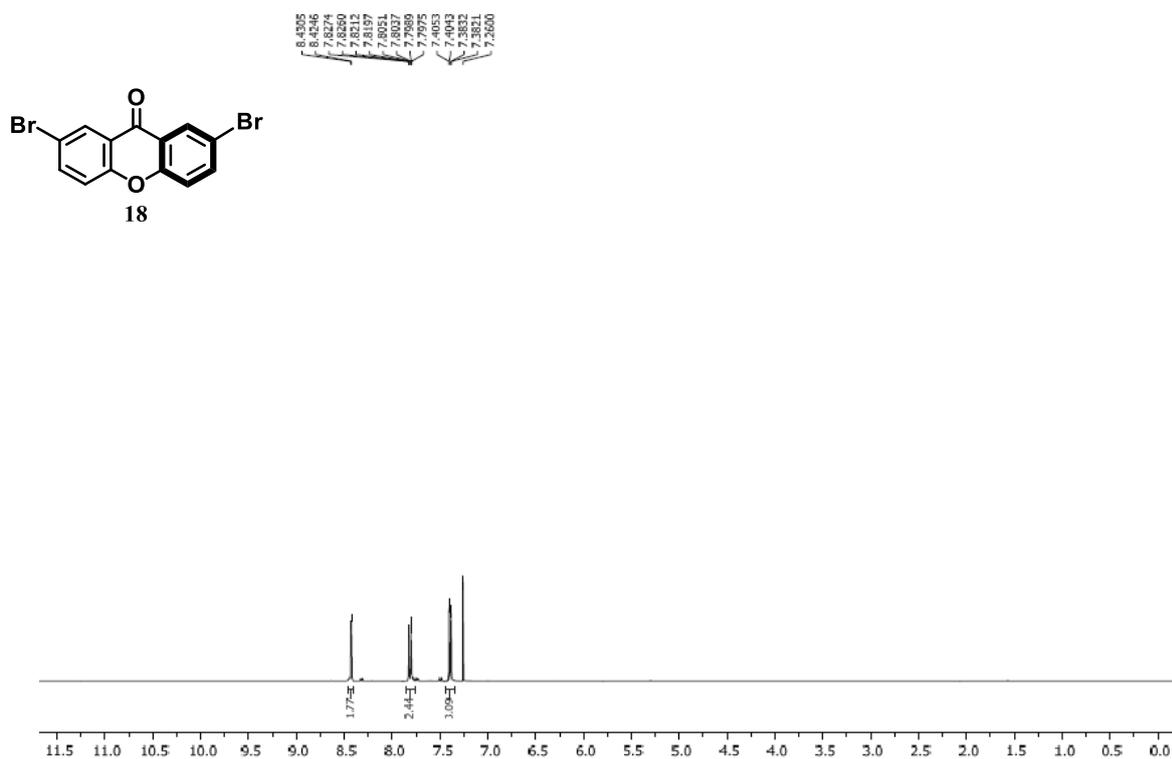




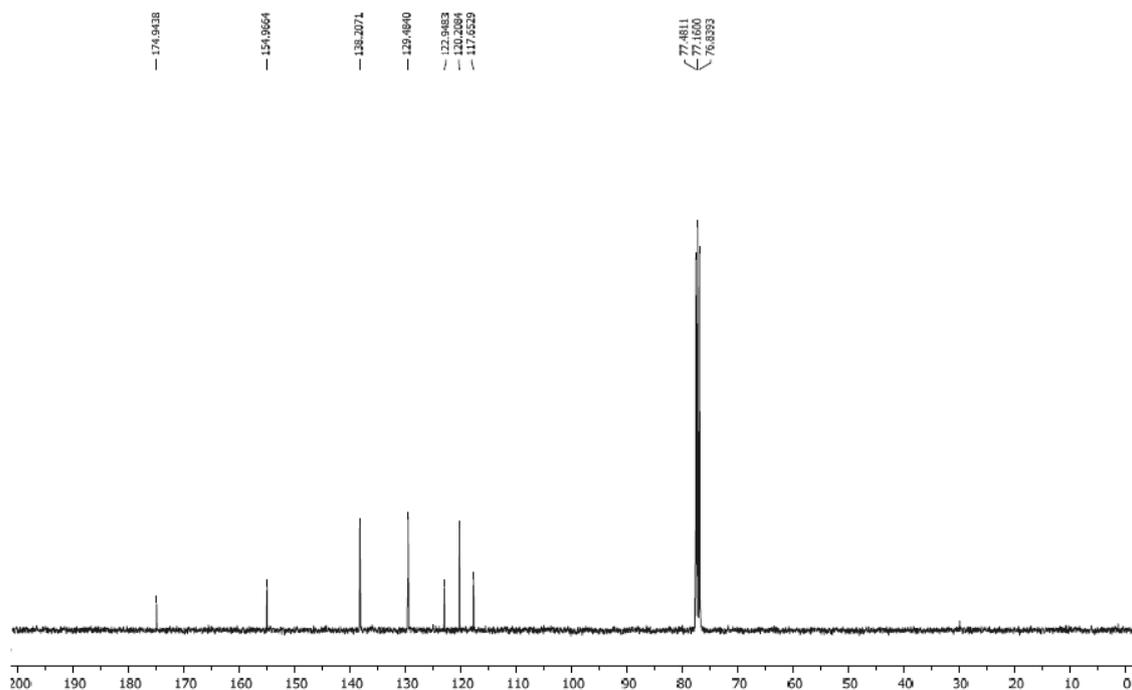




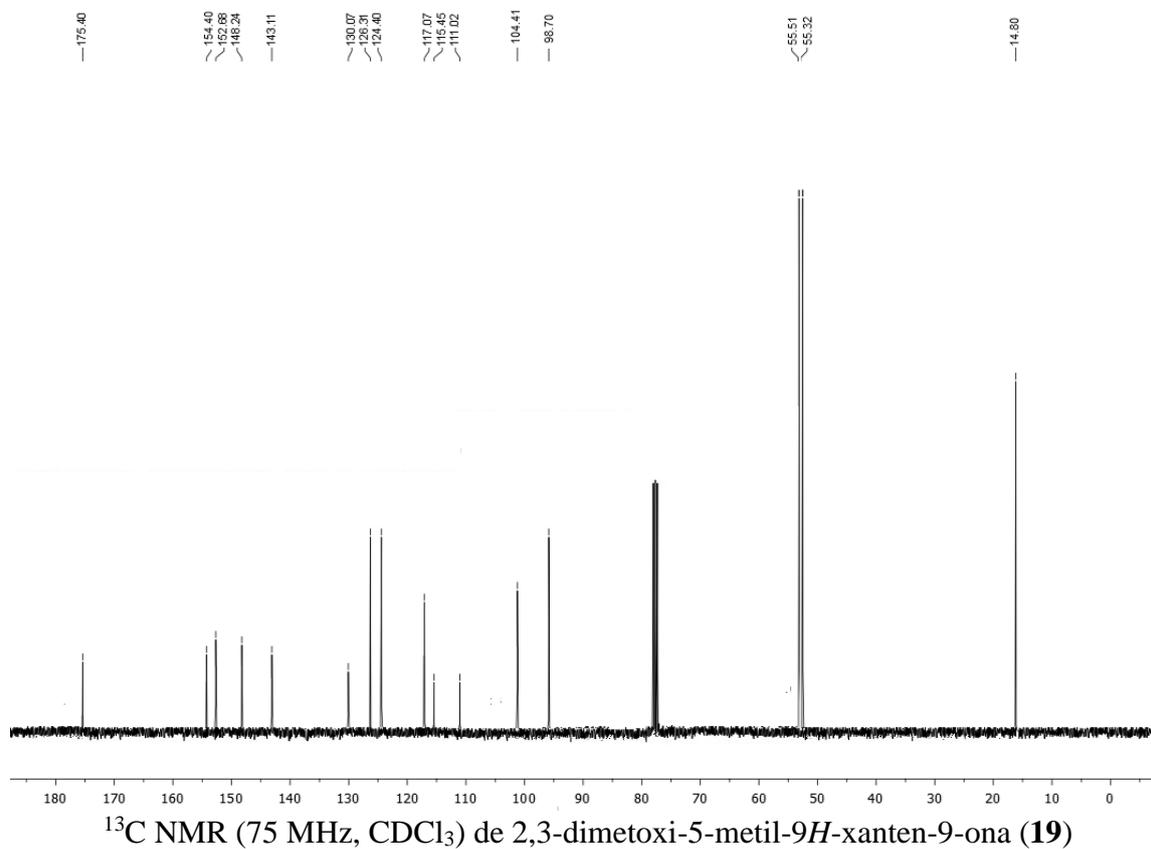
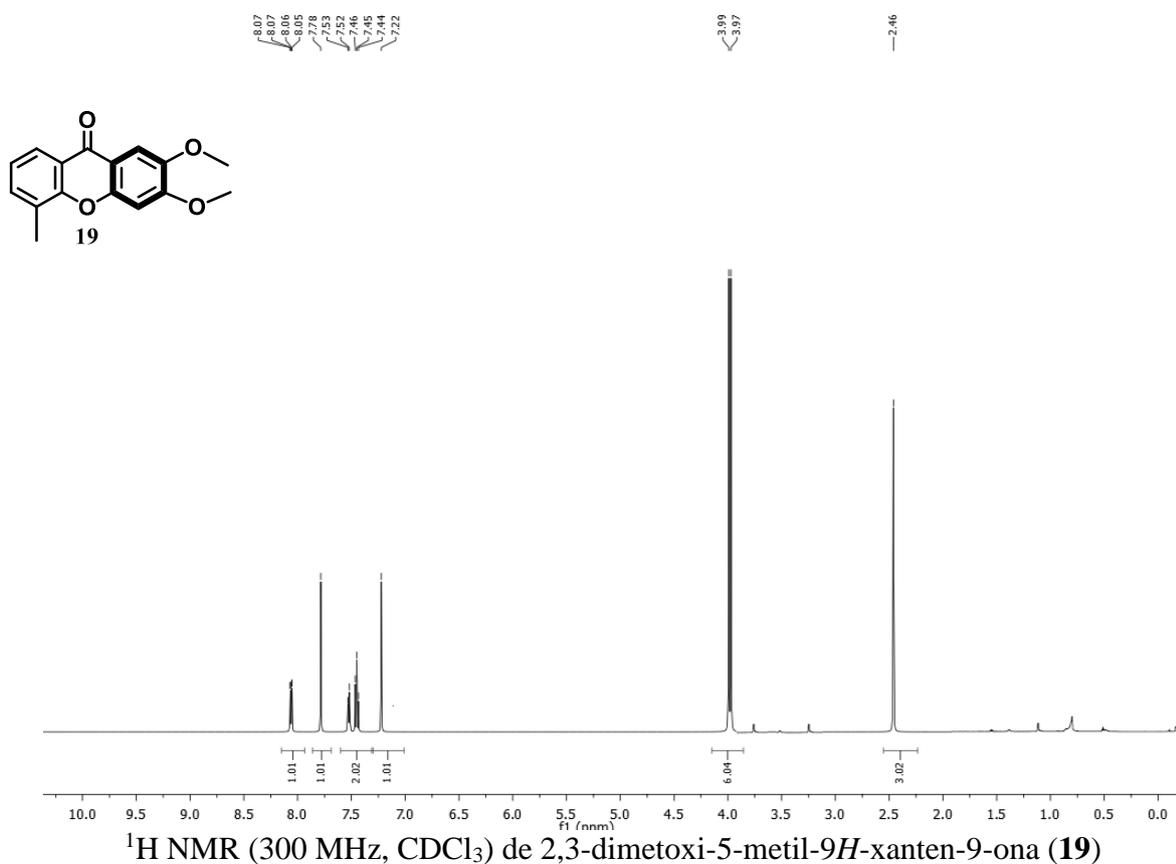


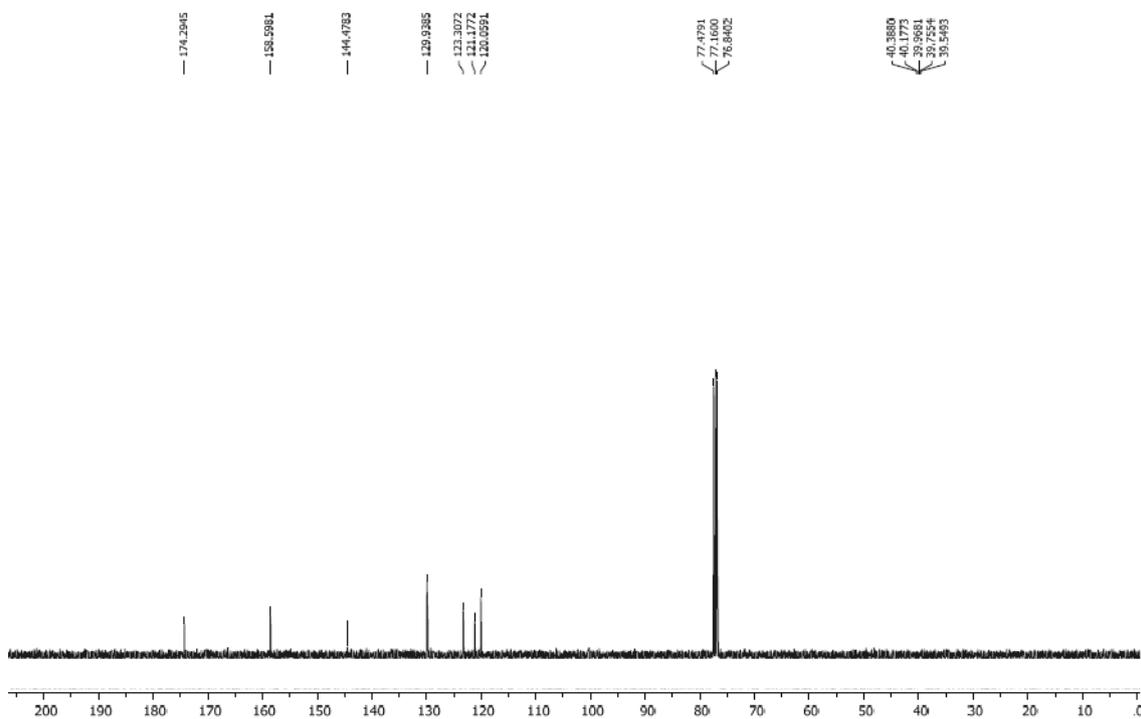
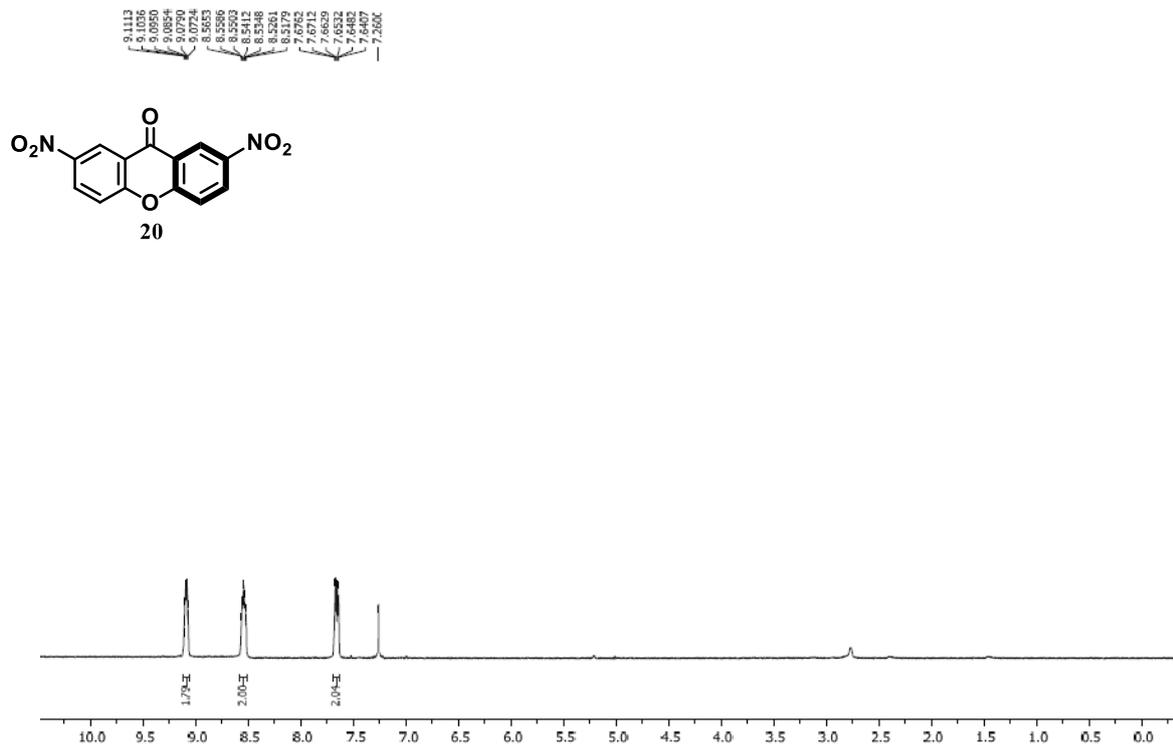


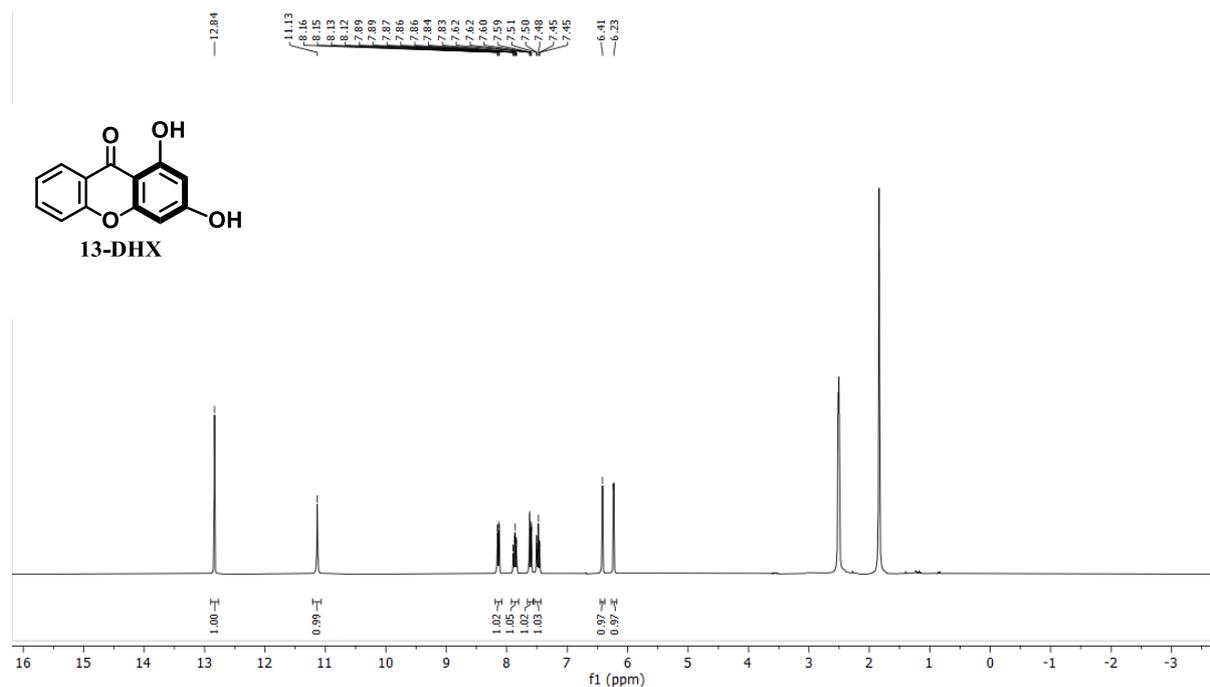
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 2,7-dibromo-9H-xanten-9-ona (**18**)



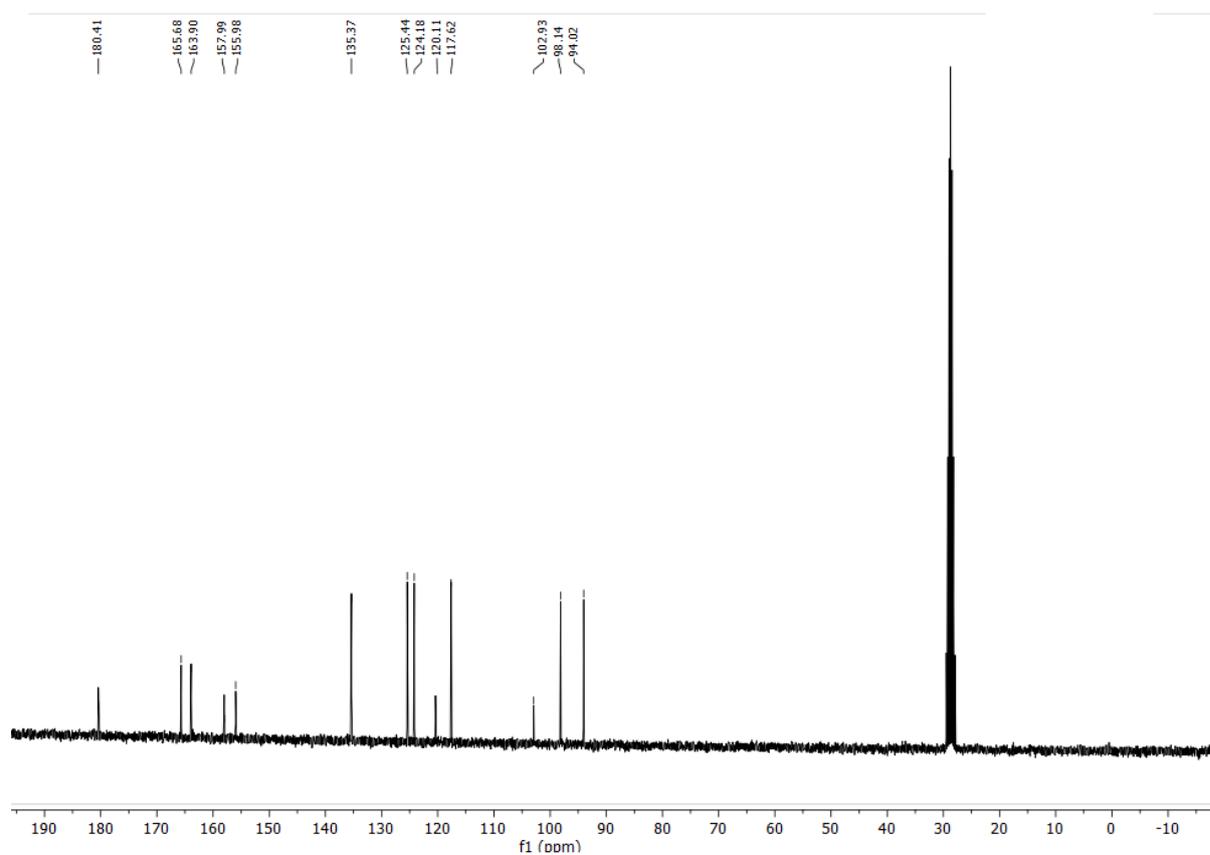
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 2,7-dibromo-9H-xanten-9-ona (**18**)



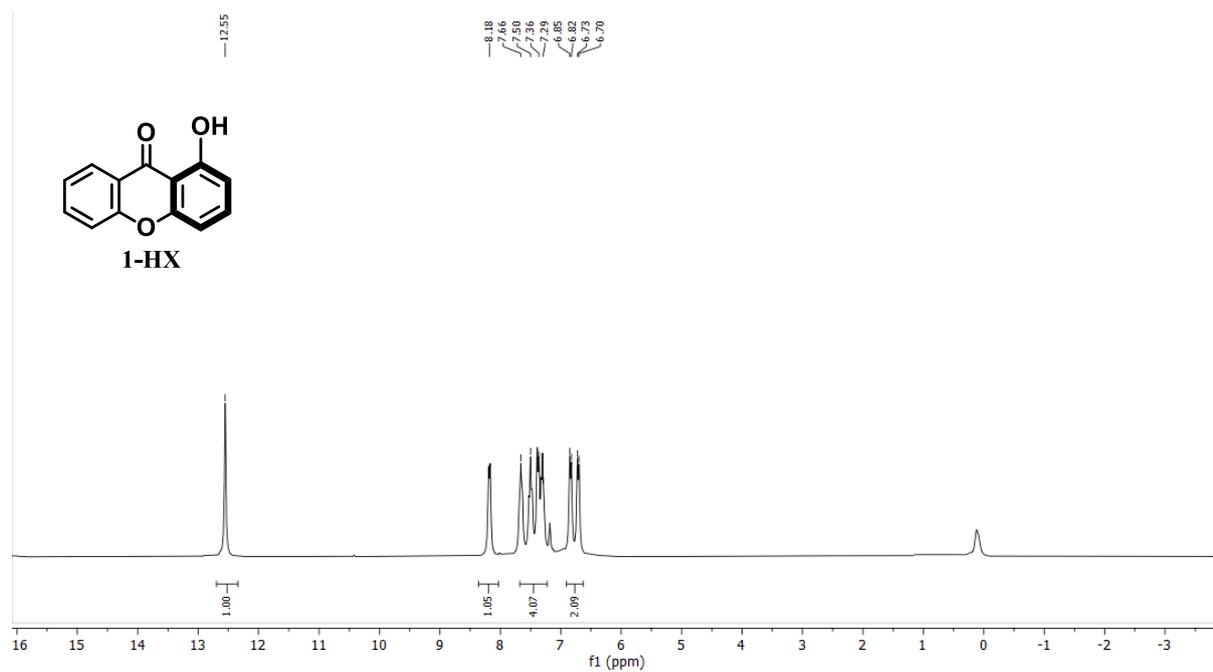




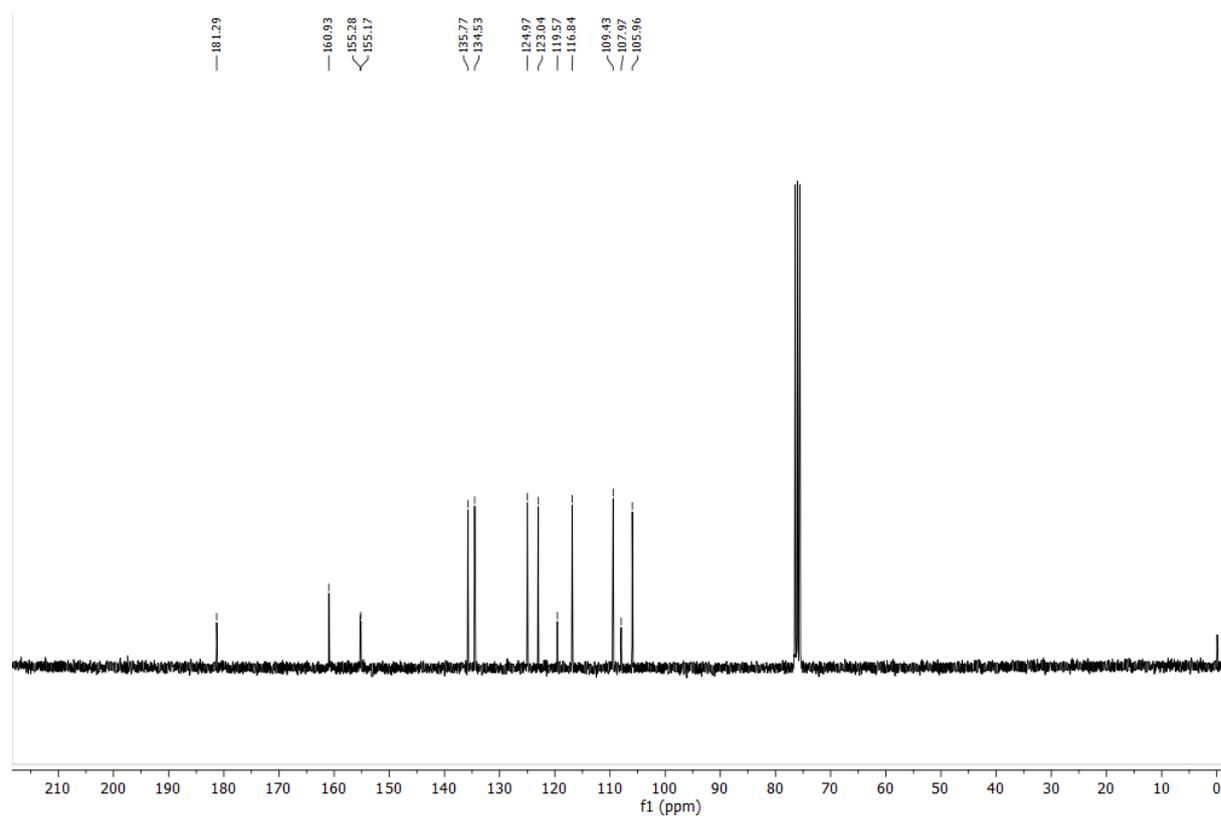
¹H NMR (300 MHz, acetona-d₆) de 1,3-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (**21**)



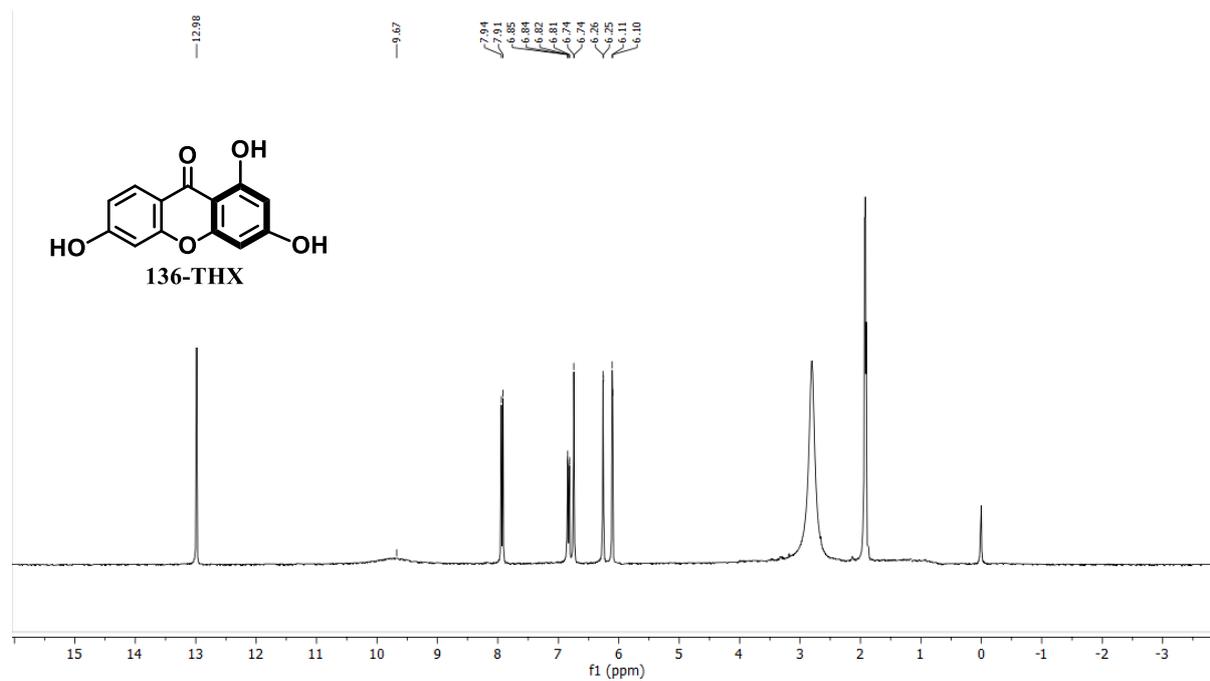
¹³C NMR (75 MHz, acetona-d₆) de 1,3-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (**21**)



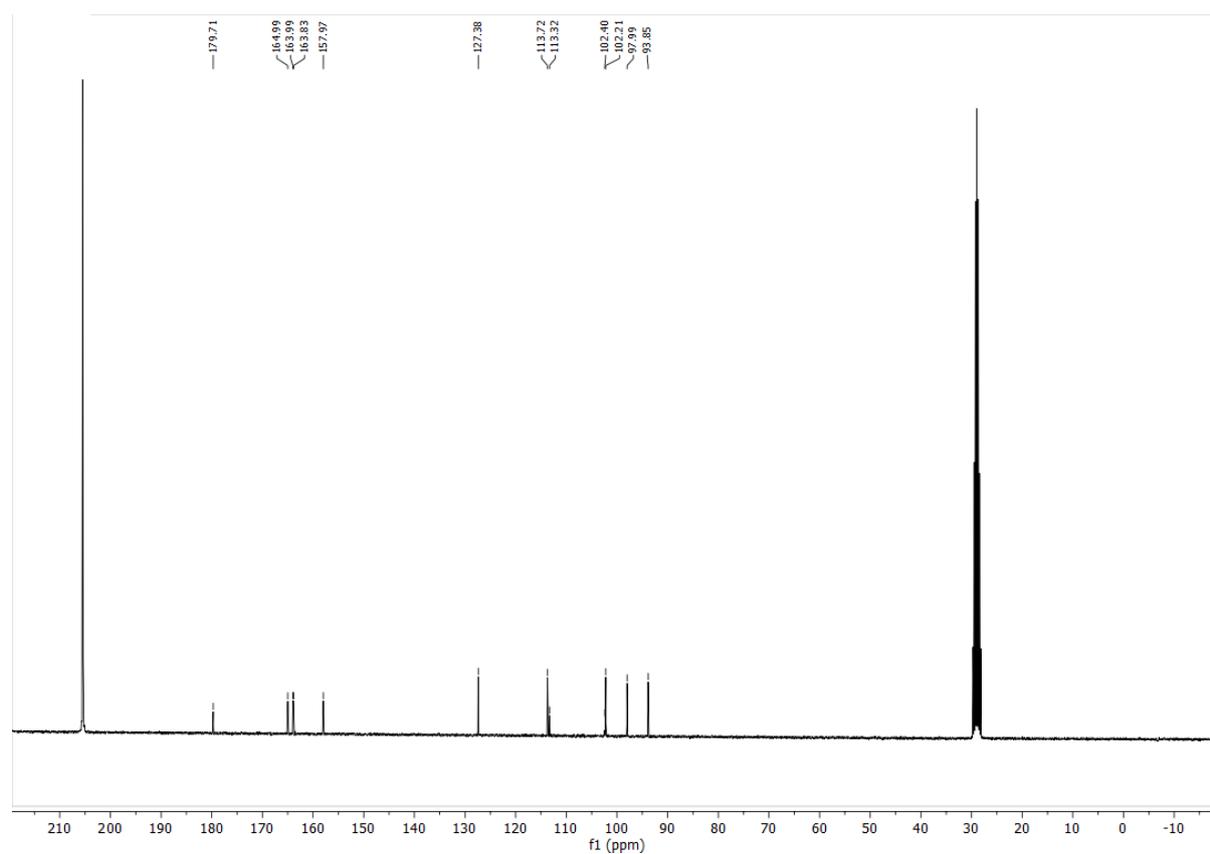
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (22)



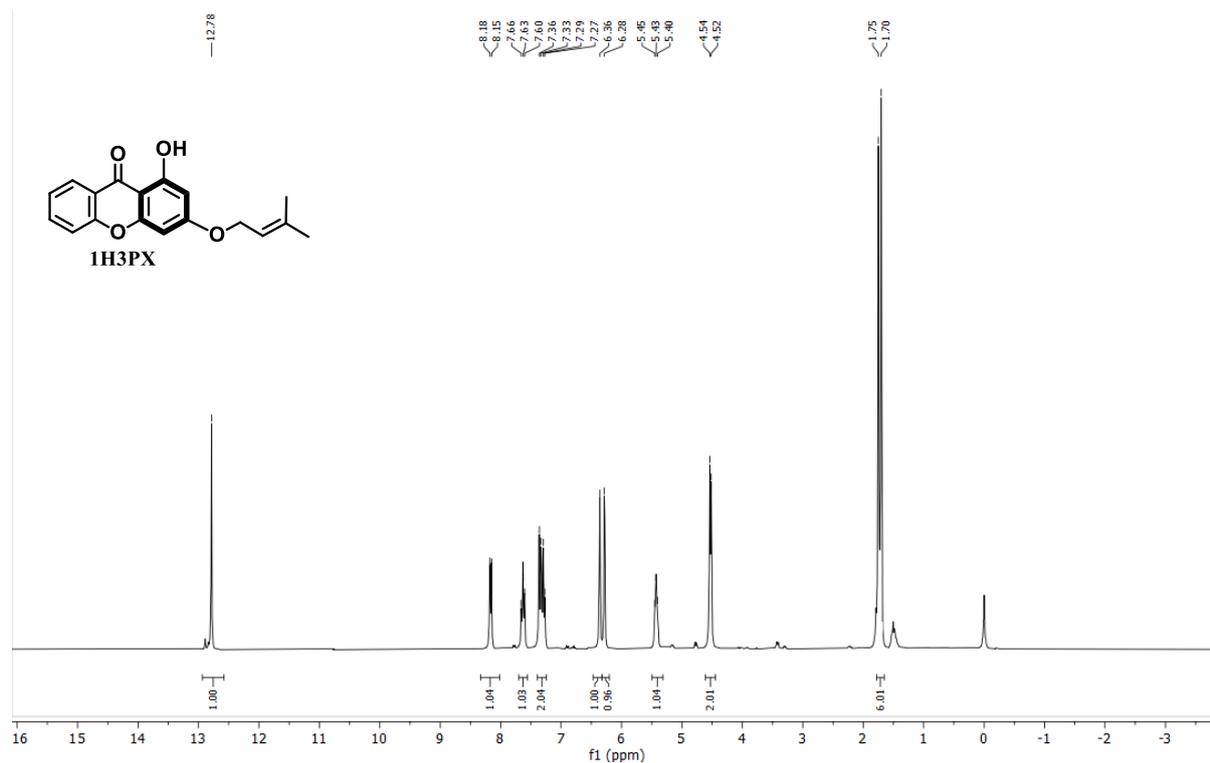
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (22)



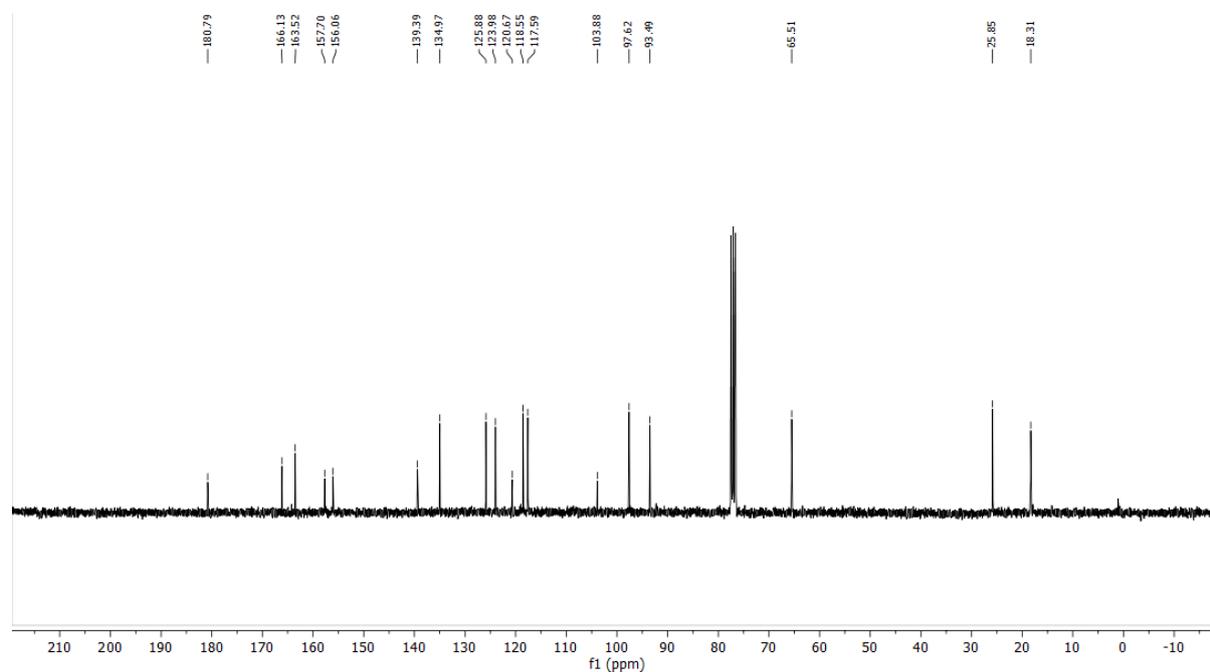
^1H NMR (300 MHz, acetona- d_6) de 1,3,6-trihidroxi-9H-xanten-9-ona (**23**)



^{13}C NMR (75 MHz, acetona- d_6) de 1,3,6-trihidroxi-9H-xanten-9-ona (**23**)



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) de 1-hidroxi-3-preniloxi-9H-xanten-9-ona (1H3PX)



¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) de 1-hidroxi-3-preniloxi-9H-xanten-9-ona (1H3PX)

