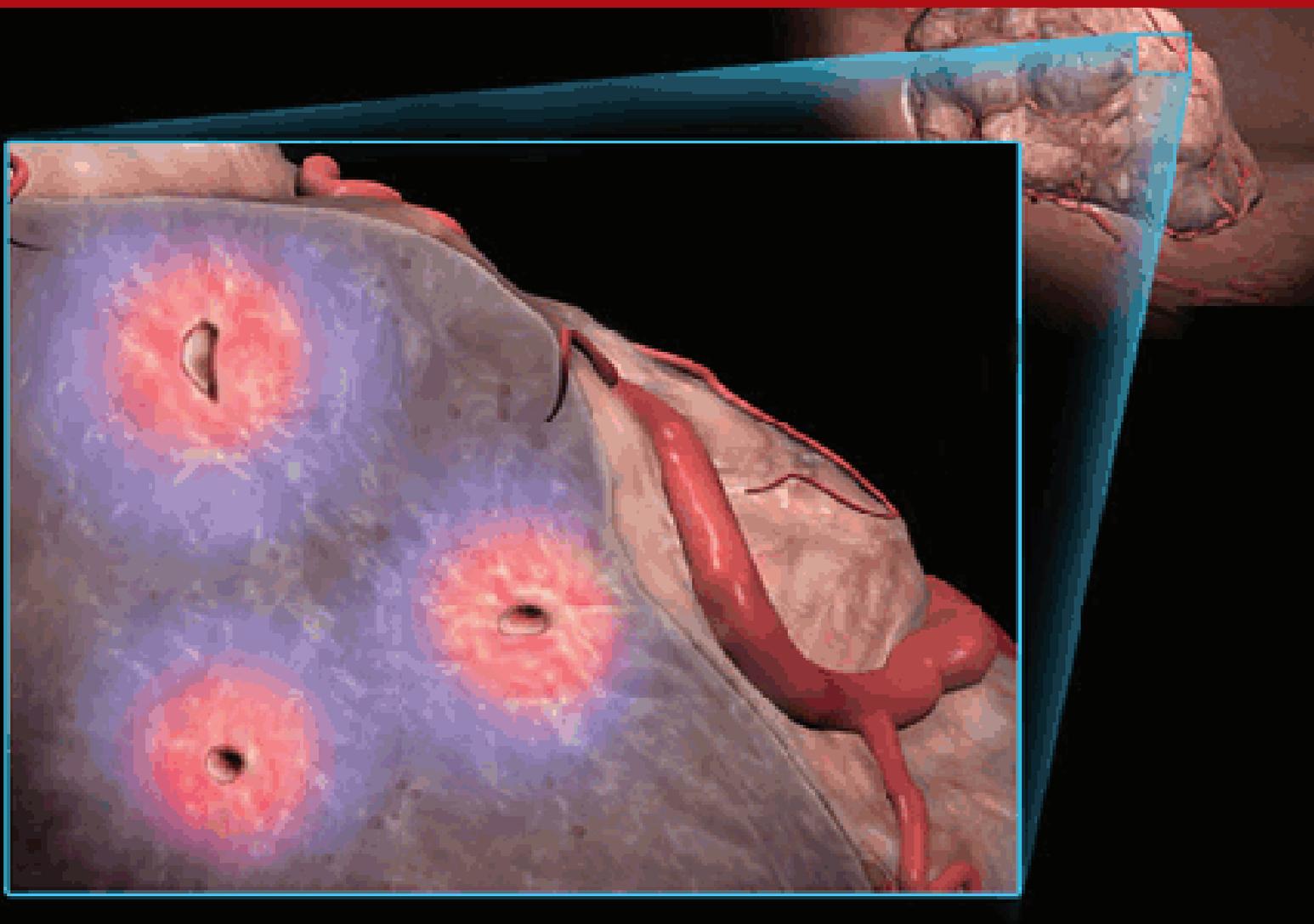


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Ciencias

Licenciatura en Bioquímica

Tesis de graduación



Derivados de N,N' -dióxido de fenazina como agentes bio-reducibles en hipoxia que interaccionan con ADN

Br. Marcos Nieves

Tutores de Tesis: Dr. Hugo Cerecetto y Dra. María Laura Lavaggi

Octubre 2011

“La formulación de un problema,
es más importante que su solución”

Albert Einstein

Científico alemán
(1879-1955)

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas y todos los que hicieron posible, de forma directa, la realización de esta tesis. A mis tutores, Hugo y María Laura, así como también a Mercedes, por las incontables horas que han dedicado al desarrollo de este trabajo. Gracias, no solo por acompañarme en mis primeros pasos como investigador, sino también por animarme a seguir adelante en los momentos que lo necesité.

Al resto de mis compañeras y compañeros del laboratorio de química orgánica, por los momentos compartidos, los consejos brindados, y la permanente disposición a dar una mano en todo lo que fuera posible.

A Adela López de Cerain y Antonio Monge, del Centro de Investigaciones de Farmacología Aplicada, por el apoyo en la realización de los ensayos de citotoxicidad. A Juan Antonio Páez (CSIC - España) y Rosa Jiménez (Universidad de Navarra), por facilitarnos los espectros de masa. Al Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias por permitirnos utilizar el espectrofotómetro para registrar los espectros de fluorescencia y a Lucía Otero por obsequiarnos parte del ADN utilizado en los ensayos.

También quiero agradecer a todos aquellos que tal vez no participaron de forma directa en esta tesis, pero sí cumplieron un rol esencial en su concreción. Gracias a mis padres, Carmela y Nelson, por haber luchado día a día para que no me falte nada. Gracias por enseñarme a salir adelante en la adversidad, a no dejar pasar las oportunidades y a perseguir mis metas incansablemente. Si no fuera por ustedes, y solo por ustedes, jamás hubiera llegado hasta aquí.

Gracias a mis hermanos, Martín y Tomás, por ser mi compañía durante tantos años. Porque a pesar de las pequeñas discusiones, me brindan alegría día a día. Por enseñarme mucho más de lo que creen, con sus reflexiones y con su ejemplo.

Gracias a mi abuela, La Nona, por acompañarme desde mis primeros pasos. Por su inagotable generosidad, por sus sabios consejos y por sus ñoquis caseros. A ella, y a toda mi familia, les agradezco profundamente.

Tampoco puedo dejar de agradecer a personas tan importantes como lo son mis amigas y amigos. Por su compañía, por aceptarme tal como soy, por estar siempre ahí, por ser quienes son. ¡Muchas gracias!

A mis compañeros del Centro de Estudiantes de Ciencias, C100, y de la FEUU. Por enseñarme, a través de las experiencias vividas, tanto o más de lo que he aprendido dentro de los salones de clase. Gracias por los proyectos llevados adelante y por todos los momentos compartidos.

A todas y todos, ¡muchas gracias!

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Generalidades del cáncer.....	1
1.2. Hipoxia tumoral.....	3
1.3. Profármacos bio-reducibles.....	5
1.4. Agentes intercalantes.....	8
1.5. Bibliografía.....	10
2. Antecedentes y diseño de nuevos compuestos	14
2.1. Diseño racional de nuevos derivados de <i>N,N'</i> -dióxido de fenazina.....	14
2.2. Bibliografía.....	17
3. Objetivos	19
4. Resultados y discusión: síntesis química	20
4.1. Síntesis de los derivados pertenecientes a la familia A.....	20
4.2. Síntesis de los derivados pertenecientes a la familia B.....	21
4.3. Síntesis del heterociclo <i>N,N'</i> -dióxido de fenazina.....	22
4.3.1. Mecanismo de reacción.....	22

4.3.2. Proporción de isómeros.....	23
4.3.3. Análisis espectroscópico.....	27
4.3.4. Rendimientos.....	29
4.4. Condensación de los derivados 1 y 2 con aminoguanidina.....	30
4.5. Reducción de los grupos <i>N</i> -óxido.....	31
4.6. Bibliografía.....	33
5. Resultados y discusión: evaluación biológica.....	35
5.1. Ensayo de citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia.....	35
5.1.1. Fundamento de la técnica.....	35
5.1.2. Diseño experimental y tratamiento de los datos.....	36
5.1.3. Discusión de los resultados.....	36
5.2. Ensayo <i>in vitro</i> de bio-reducción en normoxia e hipoxia.....	39
5.3. Evaluación de la capacidad de interacción con ADN.....	42
5.3.1. Fundamento de la técnica.....	43
5.3.2. Diseño experimental y tratamiento de los datos.....	44
5.3.3. Discusión de los resultados.....	46
5.4. Bibliografía.....	49
6. Conclusiones.....	51

7. Métodos experimentales	52
7.1. Síntesis y caracterización química.....	52
7.1.1. Síntesis de 4-(5-amino-2-fluor-4-nitrofenoxi)benzaldehído.....	52
7.1.2. Síntesis de <i>N</i> -óxido de 5(6)-fluoro-6(5)-(4-formilfenoxi)benzo[1,2c]1,2,5-oxadiazol.....	53
7.1.3. Síntesis de derivados de <i>N,N'</i> -dióxido de 2-hidroxifenazina.....	54
7.1.4. Síntesis de derivados de <i>N,N'</i> -dióxido de 2-aminofenazina.....	57
7.1.5. Síntesis de derivados aminoguanidona.....	60
7.1.6. Síntesis de derivados de 2-hidroxi y 2-aminofenazina y <i>N</i> -óxido de 2-hidroxi y 2-aminofenazina.....	61
7.2. Ensayos biológicos.....	63
7.2.1. Ensayo de citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia.....	63
7.2.2. Ensayo <i>in vitro</i> de bio-reducción en normoxia e hipoxia.....	64
7.2.3. Evaluación de la capacidad de interacción con ADN.....	65

1. Introducción

1.1. Generalidades del cáncer

A lo largo de la evolución, la selección natural ha determinado que muchos organismos transiten hacia una mayor complejidad en su organización fisiológica. Partiendo de organismos unicelulares, se dio lugar a los fenómenos de integración tisular y organización sistémica que se observan en los organismos pluricelulares. Estos cambios permitieron un mayor control de la homeostasis y por lo tanto un mayor éxito reproductivo. A partir de dicha integración celular surge la necesidad de que todas las células que componen un organismo se encuentren bajo un estricto control del ciclo celular, a fin de que todas las partes trabajen de forma cooperativa hacia la supervivencia del organismo y la perpetuación de la especie.

Sin embargo, los mismos fenómenos de selección natural que dieron lugar a los niveles de complejidad y organización recién mencionados, pueden volverse en contra de la supervivencia del individuo. Un ejemplo claro de esto es la transformación maligna de las células que da lugar al cáncer¹.

Si contemplamos el cuerpo animal como una sociedad o ecosistema cuyos miembros son células, el cáncer puede ser entendido como un fenómeno de microevolución. Los procesos que dan origen a la transformación maligna de una célula y su proliferación no son otra cosa que mutaciones que le confieren a la célula la capacidad de sortear los mecanismos de control del ciclo celular (proliferación indiscriminada), sobrevivir en condiciones adversas (adaptaciones metabólicas) e incluso colonizar nuevos tejidos (metástasis). Todos estos atributos son adaptaciones que le permiten a la célula tumoral competir con ventaja frente al resto de las células del organismo. Estos procesos de selección natural no finalizan con la transformación de la célula tumoral, sino que se continúan observando, por ejemplo, en la adquisición de resistencia de numerosos tipos de cáncer frente a distintos tratamientos².

A pesar de que se han descrito cambios epigenéticos que modifican la expresión génica causando cáncer, existen buenas razones para pensar que la mayoría de los cánceres se originan a partir de cambios en la información genética³. El desarrollo

de cáncer no es consecuencia de mutaciones individuales, por el contrario es necesario que la célula sufra un conjunto de mutaciones que la lleven a adquirir el fenotipo maligno. Esto a su vez permite identificar diferentes etapas de la progresión del cáncer, que se corresponden con la acumulación de las mencionadas mutaciones¹. Dichos procesos de microevolución se confirman cuando se observa que la tasa de incidencia del cáncer se incrementa notoriamente con la edad, señalando que la acumulación de mutaciones en las células del organismo incrementa progresivamente las probabilidades de que una de ellas adquiera la combinación de mutaciones necesaria para desarrollar cáncer⁴.

Los genes cuya mutación puede dar lugar al cáncer se clasifican en oncogenes y genes supresores de tumores. Los primeros corresponden a aquellos en los que la mutación tiene un efecto dominante, mientras que los genes supresores de tumores deben sufrir mutación en ambos cromosomas para dar lugar a la transformación maligna¹.

Según su función en los procesos celulares, los genes involucrados en el desarrollo de cáncer pueden dividirse en cuatro grandes grupos: i) los genes relacionados con la regulación del ciclo celular; ii) aquellos involucrados con los procesos de apoptosis; iii) los encargados de promover la angiogénesis; iv) y por último aquellos genes relacionados con la metástasis y la invasión de los tejidos^{2,5}.

La enorme cantidad de oncogenes y genes supresores de tumores que se han descubierto hasta la actualidad implican la existencia de una gran cantidad de combinaciones de mutaciones que pueden dar origen a una proliferación celular descontrolada y al desarrollo de cáncer. Por este motivo, cada cáncer es una enfermedad en sí misma, y las estrategias terapéuticas que se utilizan para atacar determinados tipos de cáncer, no serán necesariamente efectivas a la hora de tratar otros¹.

A pesar de los esfuerzos que toda la comunidad científica ha hecho durante años a nivel mundial, aún no se ha descubierto un tratamiento eficaz y seguro para combatir la mayoría de los tipos de cáncer. Los métodos convencionales incluyen la remoción quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia⁶. Todos ellos presentan serias deficiencias a la hora de combatir la aparición de metástasis. En particular, los fármacos quimioterápicos de uso actual, como el paclitaxel y el cisplatino, presentan un grado de selectividad por las células tumorales muy reducido. Esto conduce a

una serie de efectos secundarios que deterioran tanto la calidad de vida como la salud del paciente⁷. Por lo tanto, la búsqueda de mejores tratamientos, debe centralizarse sobre la identificación de propiedades características de las células tumorales y el diseño de estrategias que orienten los efectos del agente citotóxico hacia dichas células.

1.2. Hipoxia tumoral

Como se mencionó anteriormente, los genes encargados de promover la angiogénesis juegan un rol fundamental en el desarrollo de muchos tipos de cáncer⁵. Esto se debe a que los tumores sólidos son tejidos muy heterogéneos. La proliferación celular indiscriminada da lugar a una vascularización irregular, y por lo tanto a regiones con irrigación sanguínea muy reducida, con niveles bajos de nutrientes y oxígeno⁸. El rango de tensiones de oxígeno en los tumores sólidos está entre 10 y 30 mmHg, mientras que en los tejidos normales es de 24 a 66 mmHg^{5,9}. Estas regiones, típicamente alejadas de los capilares, se denominan hipóxicas, y sus células presentan una serie de adaptaciones metabólicas que les permiten sobrevivir. Entre dichos cambios metabólicos es de destacar la sobreexpresión de los genes involucrados en el transporte de glucosa y la glucólisis¹⁰. Debido a la ausencia de oxígeno, las células recurren a la glucólisis y la fermentación anaeróbica como la principal fuente de energía, dando lugar a grandes concentraciones de lactato y a un marcado descenso en el pH intra y extracelular¹¹. Los bajos niveles de oxígeno también inducen alteraciones en el perfil de expresión génica. El factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) juega un rol fundamental en estos cambios^{10,12}. HIF-1 es una proteína heterodimérica cuyas subunidades se denominan HIF-1 α y HIF-1 β . Mientras que HIF-1 β se expresa constitutivamente y se encuentra en el citosol a concentraciones relativamente estables, la concentración de HIF-1 α es regulada por la presencia de oxígeno. En condiciones de normoxia un residuo de prolina conservado en la subunidad α es hidroxilado, lo cuál conduce a la ubiquitinación de la proteína y su degradación en el proteosoma. Cuando las concentraciones de oxígeno son bajas, hay un marcado descenso en el grado de hidroxilación y HIF-1 α alcanza altas concentraciones. Los niveles de oxígeno no solo regulan la actividad de HIF-1 de esta forma sino que se

han detectado otros mecanismos^{5,12}.

Se han informado más de 40 genes inducidos por HIF-1 en condiciones de hipoxia. Entre estos encontramos enzimas involucradas en la glucólisis, factores de crecimiento y supervivencia celular, moléculas angiogénicas y enzimas involucradas en la metástasis e invasión de otros tejidos. Los promotores de estos genes presentan una secuencia denominada “elemento de respuesta a hipoxia” (HRE) que es un sitio de unión para HIF-1^{5,13}.

Las células hipóxicas son más resistentes a las terapias convencionales de tratamiento del cáncer. En particular, los bajos niveles de oxígeno disminuyen la efectividad de las radiaciones ionizantes así como de ciertos fármacos cuyo mecanismo de acción citotóxica depende de la generación de especies reactivas del oxígeno^{7,14}. Por otro lado, el reducido acceso de las células a los capilares sanguíneos dificulta la llegada de los agentes quimioterápicos, provocando muchas veces que estos nunca alcancen la concentración terapéutica necesaria para su acción en las regiones hipóxicas^{5,6}. En tercer lugar, los bajos niveles de oxígeno usualmente inducen la inhibición de la proliferación celular. La mayoría de los fármacos antitumorales tienen especificidad por las células en rápida multiplicación, por lo que dejan de ser útiles en estos casos⁵.

Por muchos años se vio a la hipoxia solamente como un obstáculo a la hora de combatir el cáncer, sin embargo en las últimas dos décadas se ha comenzado a explotar esta característica única de los tumores sólidos como una diana terapéutica que permite diseñar mecanismos de citotoxicidad selectivos. El primero en proponer esto fue Alan Sartorelli en 1972¹⁵.

Se han desarrollado tres estrategias terapéuticas para superar las dificultades que impone la hipoxia tumoral. Una de ellas es la oxigenación artificial del tumor (eliminando así las dificultades que impone la falta de oxígeno) y la administración de radiosensibilizadores, compuestos que estimulan la generación de radicales libres incrementando la eficacia de la radioterapia¹³. Las otras dos estrategias explotan las potencialidades que implica una característica tan única de las células tumorales como lo es la hipoxia. La primera de estas dos estrategias en ser propuesta, fue el uso de profármacos que adquieran citotoxicidad únicamente en el tejido hipóxico. Estos compuestos son moléculas inactivas en condiciones fisiológicas normales, que en condiciones de hipoxia se bio-reducen para dar lugar al

fármaco activo. Este proceso usualmente es reversible en presencia de oxígeno, lo cual confiere a estos compuestos selectividad hacia los tejidos hipóxicos^{15,16}. En segundo lugar, durante los últimos años se ha comenzado a trabajar intensamente en nuevas estrategias de terapia génica. Entre ellas, cabe destacar el diseño de vectores de expresión génica que contengan el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Dichos vectores se expresarían únicamente en los tejidos hipóxicos, donde los niveles de HIF-1 son altos. De esta forma, es posible confinar a los tumores la expresión de enzimas que colaboren en la activación de fármacos administrados simultáneamente^{7,17}.

1.3. Profármacos bio-reducibles

Como se mencionó anteriormente, las citotoxinas selectivas en hipoxia, también conocidas como profármacos bio-reducibles, son compuestos con escasa o ninguna actividad fisiológica en su estado oxidado. Estos compuestos tienen la capacidad de reducirse por acción de enzimas reductasas presentes en el organismo dando lugar a un producto con actividad citotóxica. En condiciones de normoxia, dicho producto se oxida rápidamente por acción del oxígeno presente en el medio, dando lugar al profármaco original y revirtiendo el proceso. Este fenómeno se denomina ciclo fútil. Sin embargo, cuando los niveles de oxígeno son bajos, el compuesto permanece en su estado reducido, causando daño en el ADN y desencadenando la muerte celular¹⁸.

En función de su estructura química, los profármacos bio-reducibles pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: derivados de quinona, compuestos nitroaromáticos, compuestos que presentan grupos *N*-óxido alifáticos o aromáticos, y compuestos de coordinación¹⁹.

El prototipo de profármaco bio-reducible es un derivado de quinona, la mitomicina C (*figura 1.1a*). Las propiedades selectivas hacia el tejido hipóxico de la mitomicina C se descubrieron cuando ya estaba en uso clínico. Sin embargo, su grado de selectividad es bajo, ya que presenta una citotoxicidad *in vivo* solo dos veces mayor en células hipóxicas que en células normalmente oxigenadas. La principal enzima involucrada en su bio-reducción es la citocromo P450. La misma reduce al compuesto a través de un mecanismo que involucra el intercambio de un electrón y

resulta reversible en presencia de oxígeno²⁰. El radical semi-quinona que así se genera en ausencia de oxígeno, reacciona con la molécula de ADN estableciendo entrecruzamientos que resultan letales para la célula. Sin embargo, la mitomicina C también puede ser reducida por otras enzimas, como la DT-diaforasa, en un mecanismo de reducción alternativo, vía dos electrones²¹. Este fenómeno es el responsable de su reducida selectividad, ya que dicha activación no es reversible en presencia de oxígeno, contribuyendo a la citotoxicidad del fármaco sobre células normalmente oxigenadas.

La reducida especificidad de la mitomicina C por los tejidos hipóxicos ha estimulado la búsqueda de nuevos derivados de quinona que mejoren el perfil de selectividad. Entre los más promisorios se encuentra la aziridinilindoloquinona EO9 (*figura 1.1b*), que a pesar de ser también un buen sustrato de la DT-diaforasa, presentó una selectividad en hipoxia mucho mayor¹⁹.

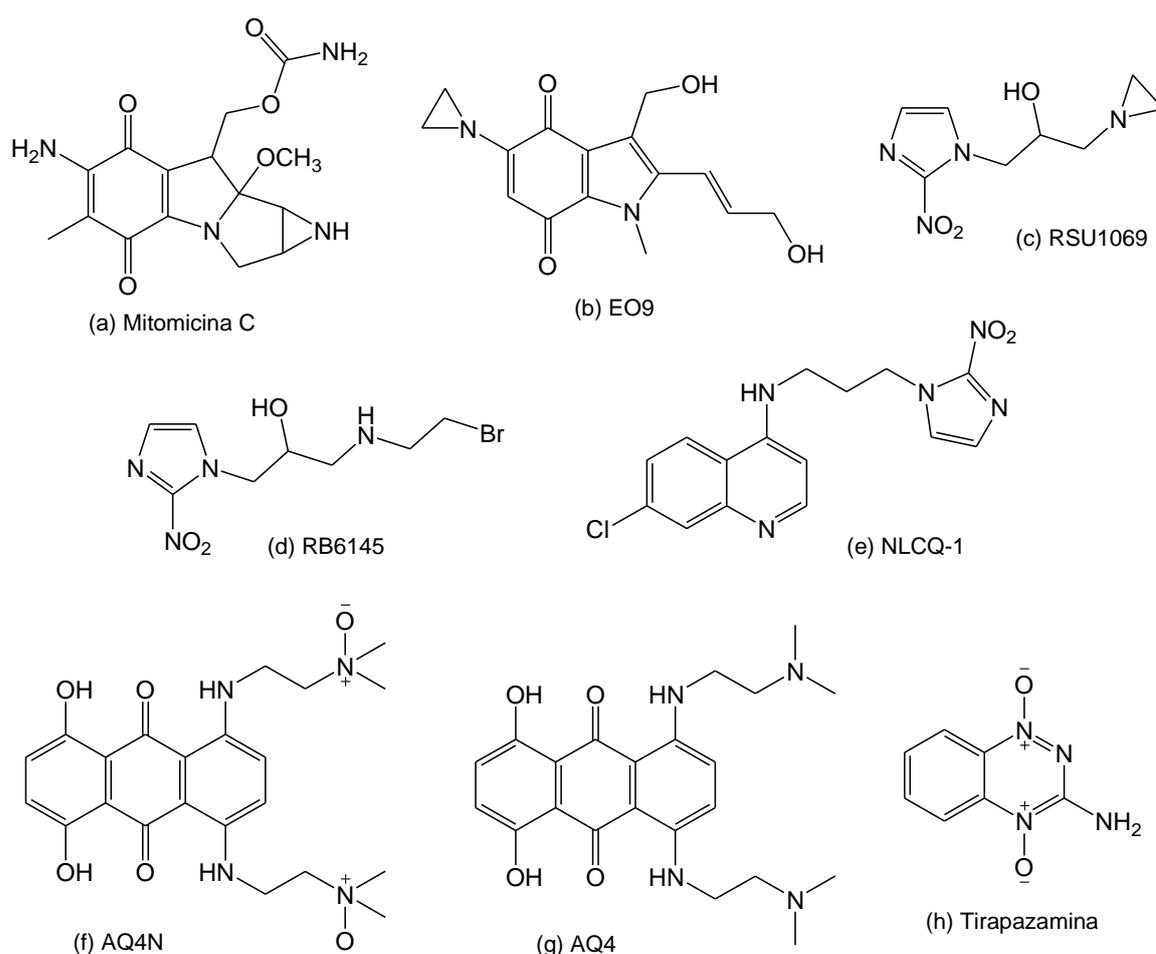


Figura 1.1: Moléculas líderes de las diferentes familias de compuestos bio-reducibles.

Entre los compuestos nitroaromáticos, los más estudiados han sido el misonidazol y el metronidazol. Inicialmente desarrollados como radiosensibilizadores para quimioterapia, ambos mostraron citotoxicidad selectiva hacia células hipóxicas. Su mecanismo de bio-reducción implica varios pasos, en cada uno de los cuales la molécula gana electrones por acción de diferentes enzimas. El primer paso es reversible en presencia de oxígeno, mientras el resto no lo es¹⁹. Debido a que la selectividad de ambos fármacos es moderada, se desarrollaron derivados con un mejor perfil de selectividad en hipoxia. Entre ellos se pueden destacar RSU1069 (*figura 1.1c*) y RB6145 (*figura 1.1d*). A pesar de presentar una mayor especificidad, ambos resultaron tóxicos a nivel gastrointestinal y de la retina respectivamente^{19,22}. También se han desarrollado derivados nitroaromáticos bio-reducibles con la capacidad de intercalarse en el ADN, como por ejemplo el derivado de quinoleína NLCQ-1 (*figura 1.1e*). Este compuesto resulta aproximadamente 40 veces más citotóxico en hipoxia que en normoxia, y es sustrato de las enzimas citocromo P450 y citocromo b₅²³. Además, su citotoxicidad sobre células hipóxicas incrementa con el tiempo de exposición, lo que ha sido asociado con la presencia de más de un grupo funcional capaz de sufrir reducción en la molécula¹⁹. Los últimos estudios han revelado que NLCQ-1 es un potente radiosensibilizador, presentando una importante acción sinérgica en combinación con la radioterapia²⁴.

El tercer grupo consiste en aquellas moléculas que presentan grupos *N*-óxido. En particular cuando son *N*-óxidos de aminas alifáticas tenemos como compuesto líder de esta familia al AQ4N (*figura 1.1f*). Su derivado reducido AQ4 (*figura 1.1g*), es un análogo de la mitoxantrona (*figura 1.2d*), un potente agente intercalante. Mientras que AQ4N presenta escasa afinidad por ADN, AQ4 se une fuertemente a la doble hebra mediante intercalación¹⁸. Además, AQ4 también pertenece a una nueva familia de potenciales agentes antitumorales, los inhibidores de topoisomerasa⁶.

Cuando el *N*-óxido es aromático surge otro grupo de compuestos. Sin duda, la molécula más estudiada dentro de esta familia es la tirapazamina¹⁸ (*figura 1.1h*). El grupo *N*-óxido adyacente al grupo amino de la molécula es susceptible de ser reducido vía un electrón por acción de enzimas reductasas, como por ejemplo citocromo P450 y óxido nítrico sintasa (NOS)^{25,26}. En ausencia de oxígeno, la entidad

así generada sufre un rearrreglo que, con la concomitante pérdida de agua, genera un radical capaz de producir roturas en una o ambas hebras de la molécula de ADN²⁶. La tirapazamina ha mostrado una citotoxicidad marcadamente selectiva hacia células en condiciones de hipoxia. Por otro lado, a diferencia de otros compuestos bio-reducibles que requieren niveles muy bajos de oxígeno para su activación, la tirapazamina puede bio-reducirse en condiciones de hipoxia moderada. Esto la hace muy útil en terapias dirigidas hacia células en condiciones de oxigenación intermedia y en su combinación con otros fármacos con un rango de acción más limitado²⁷.

1.4. Agentes intercalantes

El mecanismo de unión reversible al ADN más estudiado es la intercalación entre pares de bases, descrita por primera vez por Lerman para la proflavina (*figura 1.2a*), un derivado de la acridina²⁸. Tal como se observa en la *figura 1.2a*, la proflavina es un compuesto policíclico aromático, de tres anillos. Las moléculas que presentan cromóforos planos como el de la proflavina suelen ser buenos agentes intercalantes. Las fuerzas que determinan la intercalación corresponden principalmente a la interacción entre los orbitales π -moleculares de la molécula aromática y los orbitales π -moleculares de los pares de bases (también aromáticos) de la molécula de ADN. Este fenómeno suele denominarse apilamiento. Estudios espectroscópicos realizados con derivados del agente antitumoral amsacrina (*figura 1.2b*) y ADN de timo de ternera, revelaron que tanto las propiedades como la localización de los sustituyentes de los anillos aromáticos determinan si el mecanismo termodinámico de intercalación es regido por factores entálpicos o entrópicos^{29,30}. Por otro lado, estudios de interacción realizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN), sugieren que las moléculas bicíclicas solo logran intercalarse en el ADN cuando presentan cadenas laterales cargadas positivamente, mientras que los compuestos que presentan tres anillos fusionados, como la acridina, presentan interacciones de apilamiento lo suficientemente fuertes como para prescindir de cadenas laterales que colaboren en la unión³¹.

Numerosos fármacos anticancerígenos presentan mecanismos de citotoxicidad que involucran daño sobre la molécula de ADN mediante intercalación. En muchos casos

dichos mecanismos no han llegado a comprenderse completamente, pero se sabe que muchos agentes intercalantes son capaces de interrumpir la duplicación del ADN así como de introducir mutaciones durante la misma¹. Tanto la doxorubicina (figura 1.2c) como la mitoxantrona (figura 1.2d) son agentes intercalantes eficaces en el tratamiento de leucemias. Sin embargo, su alto grado de afinidad por el ADN determina una difusión pobre en los tejidos, haciéndolos poco efectivos a la hora de tratar tumores sólidos. Por este motivo, hoy en día se busca desarrollar agentes intercalantes de afinidad moderada, con un coeficiente de difusión que permita su utilización en tumores sólidos³².

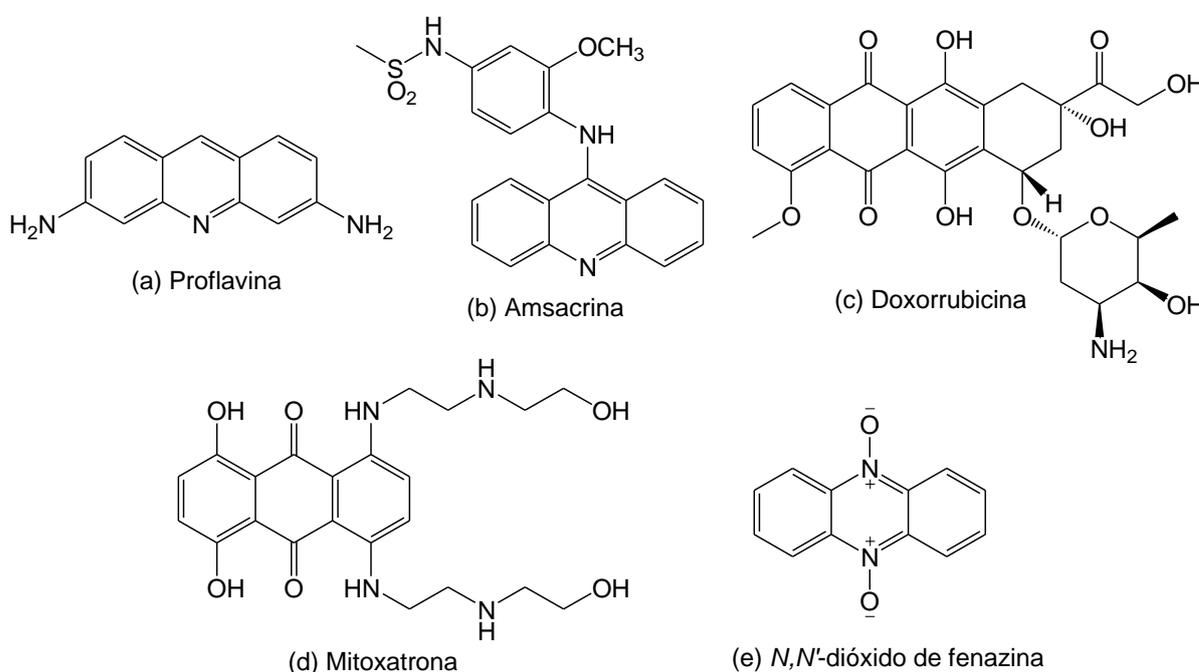


Figura 1.2: Diferentes agentes intercalantes con potencial uso en el tratamiento del cáncer.

Se han utilizado una gran cantidad de técnicas para estudiar la capacidad de intercalarse en el ADN de distintos compuestos. Entre ellas podemos mencionar espectroscopia UV-visible, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular, RMN, viscosidad, cambios en el punto de fusión del ADN y estudios electroquímicos³³⁻³⁵.

En los últimos años se han desarrollado potenciales agentes antitumorales que combinan la capacidad de intercalarse en el ADN con un mecanismo de citotoxicidad selectivo en hipoxia. Entre ellos, cabe destacar los anteriormente mencionados AQ4N^{18,36} y NLCQ-1^{37,38} y los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina^{18,39} (figura 1.2e).

En todos los casos, la molécula presenta grupos *N*-óxido que se bio-reducen de forma selectiva en hipoxia, incrementando marcadamente su capacidad para intercalarse en el ADN y por lo tanto su citotoxicidad.

1.5. Bibliografía

1. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. (2007) "*Molecular biology of the cell*". 5a. ed. Estados Unidos, Garland Science.
2. De Vita, V.T.; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S.A. (2008) "*Cancer. Principles and practice of oncology*". Volúmen 1. 8a. ed. Filadelfia, Lippincott Williams and Wilkins.
3. Schulz, W. (2007) Cancer epigenetics. En: Schulz, W. "*Molecular biology of human cancers*". Holanda, Springer.
4. Hanash, S. (2004) "Integrated global profiling of cancer". *Nature Reviews in Cancer*, 2, 638-643.
5. Kizaka-Kondoh, S.; Inoue, M.; Harada, H.; Hiraoka, M. (2003) "Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy". *Cancer Science*, 94, 1021-1028.
6. Lavaggi, M.L. (2009) "*Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: Desarrollo de profármacos selectivos de *N,N'*- dióxido de fenazina*". Tesis de Doctorado, Universidad de la República.
7. Missailidis, S. (2008) "*Anticancer therapeutics*". Reino Unido, Wiley-Blackwell.
8. Brown, J.M. (2000) "Tumour microenvironment and the response to anticancer therapy". *Cancer Biology and Therapy*, 1, 453-458.
9. Brown, J. (1999) "The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy". *Cancer Research*, 59, 5863-5870.
10. Metzen, E. (2007) "Enzyme substrate recognition, in oxygen sensing: How the HIF trap snaps?". *Biochemical Journal*, 408, e5-e9.
11. Gatenby, R.; Gillies, R. (2004) "Why do cancer cells have high aerobic glycolysis?". *Nature Reviews in Cancer*, 4, 891-899.
12. Williams, K.J.; Cowen, R.L.; Brown, L.M.; Chinje, E.C.; Jaffar M.; Stratford, I.J. (2004) "Hypoxia in tumors: molecular targets for anti-cancer therapeutics". *Advances in Enzyme Regulation*, 44, 93-108.

13. Greco, O.; Marples, B.; Joiner, M.C.; Scott, S.D. (2003) "How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy" *Journal of Cellular Physiology*, 197, 312-325.
14. Hellman, S. (2000) Principios para el manejo del cáncer: radioterapia. En: DeVita, V.T. "Cáncer: principios y práctica de oncología". Madrid, Médica Panamericana.
15. Lin, A.J.; Cosby, L.A.; Shansky, C.W.; Sartorelli, A. (1972) "Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives". *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 1247-1252.
16. Brown, J.; Giaccia, A. (2004) "The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy". *Cancer Research*, 58, 1408-1416.
17. Shibata, T.; Giaccia, A.J.; Brown, J.M. (2002) "Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy". *Neoplasia*, 4, 40-48.
18. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L. (2006) "Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update". *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327.
19. McKeown, S.R.; Coweny, R.L.; Williams, K.J. (2007) "Bioreductive drugs: from concept to clinic". *Clinical Oncology*, 19, 427-442.
20. Sartorelli, A.; Hodnick, W.; Belcourt, M.; Tomasz, M.; Haffty, B.; Fischer, J.; Rockwell, S. (1994) "Mitomycin C: a prototype bioreductive agent". *Oncology Research*, 6, 501-508.
21. Cowen, R.L.; Patterson, A.V.; Telfer, B.A. (2003) "Viral delivery of P450 reductase recapitulates the ability of constitutive overexpression of reductase enzymes to potentiate the activity of mitomycin C in human breast cancer xenografts". *Molecular Cancer Therapeutics*, 2, 901-909.
22. Horwich, A.; Holliday, S.B.; Deacon, J.M.; Peckham, M.J. (1986) "A toxicity and pharmacokinetic study in man of the hypoxic-cell radiosensitiser RSU-1069". *British Journal of Radiology*, 59, 1238-1240.
23. Papadopoulou, M.V.; Ji, M.; Rao, M.K.; Bloomer, W.D. (2003) "Reductive metabolism of the nitroimidazole based hypoxia-selective cytotoxin NLCQ-1 (NSC 709257)". *Oncology Research*, 14, 21-29.

24. Papadopoulou, M.V.; Bloomer, W.D.; Hollingshead, M.G. (2005) "NLCQ-1 (NSC 709257) in combination with radiation against human glioma U251 xenografts". *Anticancer Research*, 25, 1865-1869.
25. Chinje, E.C.; Cowen, R.L.; Feng J. (2003) "Non-nuclear localized human NOSII enhances the bioactivation and toxicity of tirapazamine (SR4233) in vitro". *Molecular Pharmacology*, 63, 1248-1255.
26. Brown, J.M. (1993) "SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours". *British Journal of Cancer*, 67, 1163-1170.
27. Koch, C.J. (1993) "Unusual oxygen concentration dependence of toxicity of SR-4233, a hypoxic cell toxin". *Cancer Research*, 53, 3992-3997.
28. Lerman, L.S. (1961) "Structural considerations in the interaction of deoxyribonucleic acid and acridines". *Journal of Molecular Biology*, 3, 18-30.
29. Wadkins, R.M.; Graves, D.E. (1986) "Interactions of anilinoacridines with nucleic acids: effects of substituent modifications on DNA-binding properties". *Biochemistry*, 25, 5902-5910.
30. Biver, T.; Secco, F.; Venturini, M. (2008) "Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids". *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1163-1177.
31. Rescifina, A.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Piperno, A.; Romeo, R. (2011) "Isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating antitumor agents" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 129-136.
32. Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C. (1987) "'Minimal' DNA-intercalating agents as anti-tumour drugs: 2-styrylquinoline analogues of amsacrine" *Anticancer Drug Design*, 2, 263-270.
33. Queiroz, M.; Castanheira, E.; Carvalho, M.; Abreu, A.; Ferreira, P.; Karadeniz, H.; Erdem, A. (2008) "New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA". *Tetrahedron*, 64, 382-391.
34. Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. (2005) "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods". *Biophysical Chemistry*, 116, 199-205.

35. Ezzati, J.; Dolatabadi, N. (2011) "Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA". *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 227-233.
36. Patterson L.H.; McKeown S.R. (2000) "AQ4N: a new approach to hypoxia activated cancer chemotherapy". *British Journal of Cancer*, 83, 1589-1593.
37. Papadopoulou, M.V.; Bloomer, W.D. (2003) "NLCQ-1 (NSC 709257): Exploiting hypoxia with a weak DNA intercalating bioreductive drug". *Clinical Cancer Research*, 9, 5714–5720.
38. Papadopoulou, M.V.; Bloomer, W.D. (2007) "DNA repair mechanisms are involved in the hypoxia-dependent toxicity of NLCQ-1 (NSC 709257) and its synergistic interaction with alkylating agents". *In vivo*, 21, 175-180.
39. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A. (2005) "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins". *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 21-23.

2. Antecedentes y diseño de nuevos compuestos

2.1. Diseño racional de nuevos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina

Como se mencionó anteriormente, un importante número de moléculas bio-reducibles presentan grupos *N*-óxido de aminas aromáticas. En tumores hipóxicos, los bajos niveles de oxígeno así como la sobreexpresión de enzimas reductasas, hacen posible la bio-reducción de dichos grupos a través de un mecanismo vía un electrón (*figura 2.1*). De esa forma, se genera un radical nitróxido, con la capacidad de generar rupturas en las hebras del ADN y establecer entrecruzamientos¹. En presencia de oxígeno molecular, el radical sería neutralizado inmediatamente, generando así un radical superóxido y evitando el daño sobre el material genético.

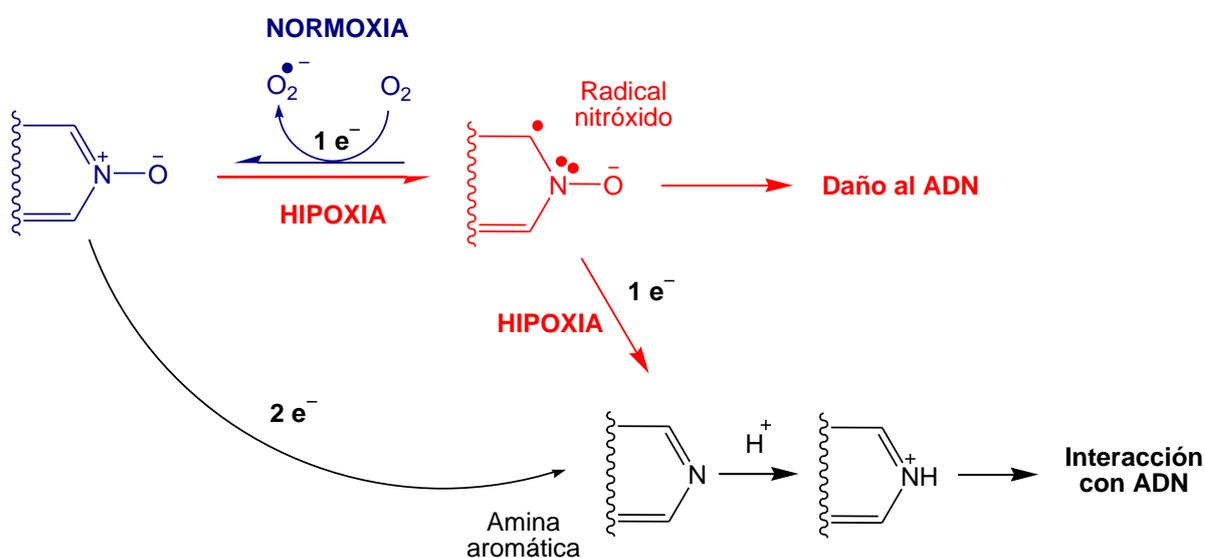


Figura 2.1: Metabolismo bio-reductor de *N*-óxidos aromáticos.

Paralelamente, la bio-reducción del profármaco vía dos electrones da lugar a la correspondiente amina aromática (*figura 2.1*). Las aminas aromáticas se protonan a pH fisiológico, proceso que se ve acentuado por la acidez característica de las células tumorales. La carga positiva que así adquiere la molécula implica un

aumento de su afinidad por ADN, además de un descenso de su lipofilia y por lo tanto de su solubilidad en la bicapa lipídica. La unión de la molécula al ADN así como su incapacidad para atravesar la membrana plasmática operarían para confinar el agente citotóxico al tejido enfermo y evitar su acción sobre células sanas².

Por otro lado, se ha reportado un importante número de potenciales agentes antitumorales cuyo principal mecanismo de citotoxicidad es la generación de daño en el material genético mediante intercalación. Entre ellos podemos mencionar a la amsacrina y la mitoxantrona³ (figura 1.2). Ambos presentan un cromóforo plano que consiste en un sistema aromático de tres anillos, responsable del fenómeno de intercalación entre pares de bases.

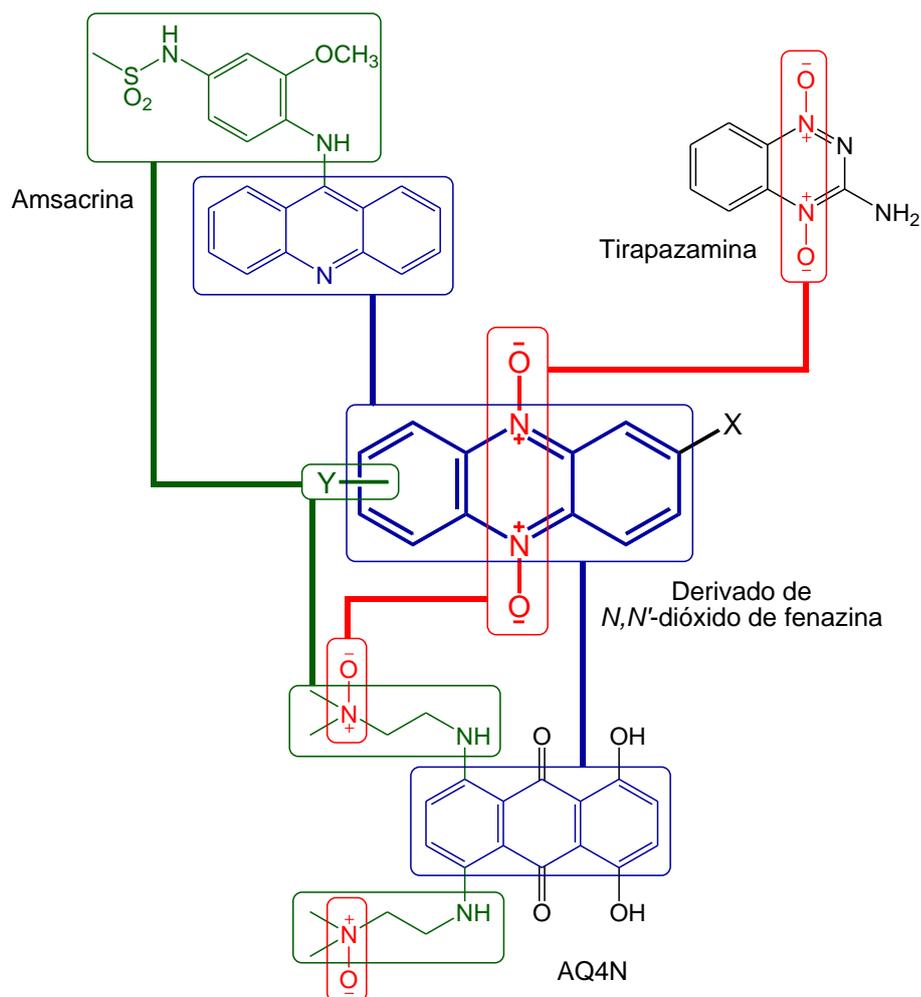


Figura 2.2: Diseño de potenciales profármacos bio-reducibles sintetizados en este trabajo, derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina.

Los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina (*figura 2.2*) han sido descritos recientemente como una nueva familia de compuestos “híbridos” que combinan la citotoxicidad selectiva en hipoxia con la capacidad para intercalarse en el ADN⁴⁻¹⁰. Dichos derivados presentan dos grupos *N*-óxido que los convierten en potenciales profármacos bio-reducibles (*figura 2.2, rojo*). Así mismo, el heterociclo fenazina es un cromóforo plano muy similar al anillo tricíclico de acridina, presente en la molécula de amsacrina (*figura 2.2, azul*). Adicionalmente, debido a que los grupos *N*-óxido forman parte del heterociclo, su reducción y la concomitante protonación de la amina resultante, favorecería de forma directa la intercalación del derivado reducido en la molécula de ADN.

En trabajos previos se ha informado que los sustituyentes presentes en el anillo de fenazina tienen una clara influencia sobre el perfil de selectividad de estos compuestos. En la *figura 2.3* se muestran tres derivados que han mostrado citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia. Los estudios realizados sobre el mecanismo de acción sugieren que no son buenos agentes intercalantes, por lo que su citotoxicidad respondería principalmente a la generación del radical nitróxido^{7,8,10}.

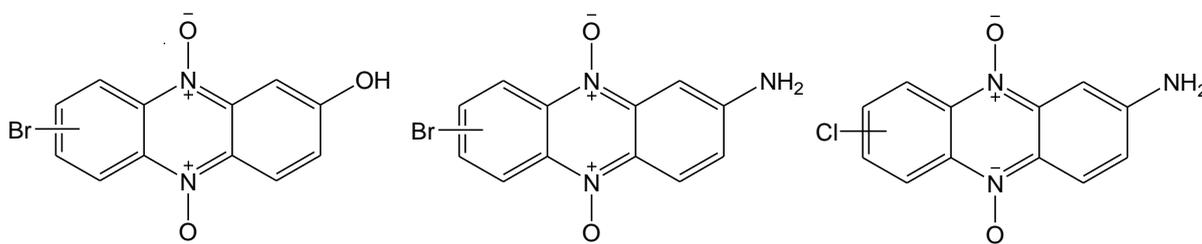


Figura 2.3: Derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina que han mostrado buen perfil de selectividad.

En este trabajo se pretende desarrollar una nueva familia de derivados *N,N'*-dióxido de fenazina que combinen las dos propiedades ya mencionadas con una tercer característica: la adición de cadenas laterales que favorezcan la interacción con el ADN. Estas cadenas (“-Y”, *figura 2.2, verde*), serían puntos de anclaje adicionales del fármaco con la biomolécula. Dicha estrategia ya ha sido propuesta para el compuesto AQ4N, cuyas cadenas laterales, luego de sufrir reducción dan lugar a aminas alifáticas que se protonarían y anclarían la molécula al esqueleto de azúcar-fosfato mediante interacciones electrostáticas¹¹.

Tal como se podrá apreciar en el capítulo 4, las cadenas laterales ensayadas en este

trabajo se pueden dividir en dos grupos. Aquellas que presentan derivados de fenilo tienen la potencialidad de intercalarse en el ADN, dando así lugar a agentes bis-intercalantes. Mientras que las que presentan el grupo funcional aminoguanidona, pueden protonarse y unirse al esqueleto de azúcar-fosfato mediante interacciones electrostáticas.

2.2. Bibliografía

1. Brown, J.M. (1993) "SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours". *British Journal of Cancer*, 67, 1163-1170.
2. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L. (2006) "Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update". *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327.
3. Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C. (1987) "'Minimal' DNA-intercalating agents as anti-tumour drugs: 2-styrylquinoline analogues of amsacrine". *Anticancer Drug Design*, 2, 263-270.
4. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A. (2005) "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins". *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 21-23.
5. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.; Aravena, M.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Bruno, A. (2006) "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins: Part II. Structure-activity relationship studies". *Medicinal Chemistry*, 2, 511-521.
6. Pachón, O.G.; Azqueta, A.; Lavaggi, M.L.; López de Cerain, A.; Creppy, E.; Collins, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Centelles, J.J.; Cascante, M. (2008) "Antitumoral effect of phenazine N5,N10-dioxide derivatives on Caco-2 cells". *Chemical Research Toxicology*, 21, 1578-1585.
7. Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; González, M.; Cerecetto, H. (2008) "Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides". *Chemical Research Toxicology*, 21, 1900-1906.
8. Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Aravena, M.A.; Olea-Azar, C.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Pachón, G.; Cascante, M.; Bruno, A.M.; Pietrasanta, L.I.; González, M.; Cerecetto, H. (2010) "Study of benzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic

cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 4433-4440.

9. Cunha, J.D.; Lavaggi, M.L.; Abasolo, M.I.; Cerecetto, H.; González M. (2011) "2D- and 3D-quantitative structure activity relationship studies for a series of phenazine *N,N'*-dioxide as antitumour agents". *Chemical and Biology Drug Design*, doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01237.x.

10. Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Pintos, C.; Arredondo, C.; Pachón, G.; Rodríguez, J.; Raymondo, S.; Pacheco, J.P.; Cascante, M.; Olea-Azar, C.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. (2011) "Novel phenazine 5,10-dioxides release \bullet OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumour volume *in vivo*". *ISRN Pharmacology*, Article ID 314209, doi:10.5402/2011/314209.

3. Objetivos

En base a los resultados preliminares, detallados en el capítulo anterior y al diseño racional de nuevos derivados, se plantean los siguientes objetivos:

- i) Síntesis y caracterización espectroscópica de nuevos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, con cadenas laterales que potencien su afinidad por la molécula de ADN.
- ii) Evaluación biológica de los derivados sintetizados: determinación de su perfil de citotoxicidad selectiva en condiciones de normoxia / hipoxia.
- iii) Aproximación al mecanismo de acción que tendrían los compuestos en caso de ser utilizados como profármacos bio-reducibles.

4. Resultados y discusión: síntesis química

En el presente trabajo se desarrollan dos nuevas familias de derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina (de ahora en más familias A y B). Ambas se representan en las figuras 4.1 y 4.2.

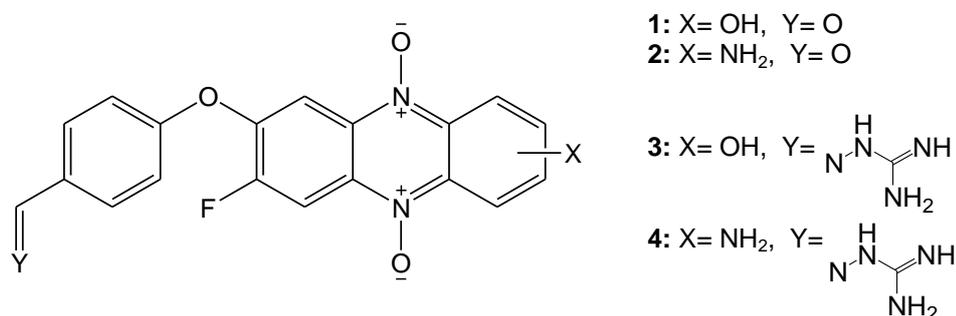


Figura 4.1: Familia A de derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina

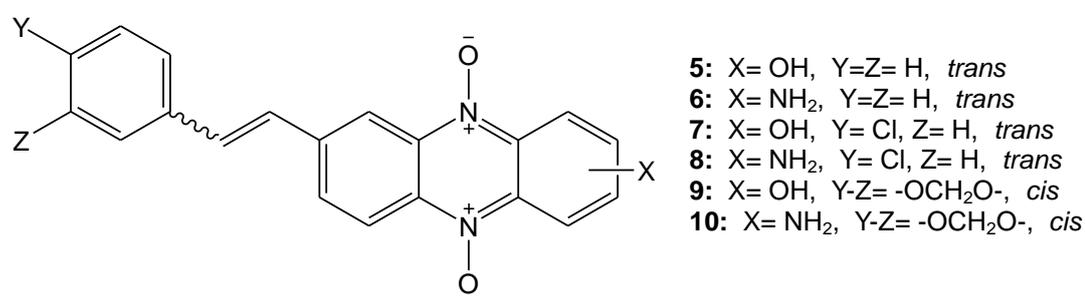


Figura 4.2: Familia B de derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina

4.1. Síntesis de los derivados pertenecientes a la familia A

Se utilizan diferentes estrategias sintéticas para obtener los derivados pertenecientes a cada familia. En el caso de la familia A, la secuencia sintética consta de cuatro etapas (figura 4.3.). En una primera etapa se realiza el ataque nucleofílico del derivado fenolato de *p*-hidroxibenzaldehído sobre la posición 5 de la molécula de 4,5-difluoro-2-nitroanilina, desplazando al sustituyente fluor que se encuentra activado por el grupo nitro en posición *para*. Posteriormente se procede con la ciclación térmica de la nitroanilina, que a través de un intermediario azida

conduce al heterociclo *N*-óxido de benzo[1,2-*c*][1,2,5]oxadiazol (benzofuroxano)¹. A continuación, mediante un proceso de Beirut², se utilizan dos derivados de fenol que en medio básico reaccionan expandiendo el agrupamiento benzofuroxano y dando lugar a los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina. En el caso de los derivados **3** y **4**, se requiere un cuarto paso de síntesis, el cual consiste en la condensación del grupo funcional aldehído con una molécula de aminoguanidina, dando lugar al correspondiente derivado aminoguanidona.

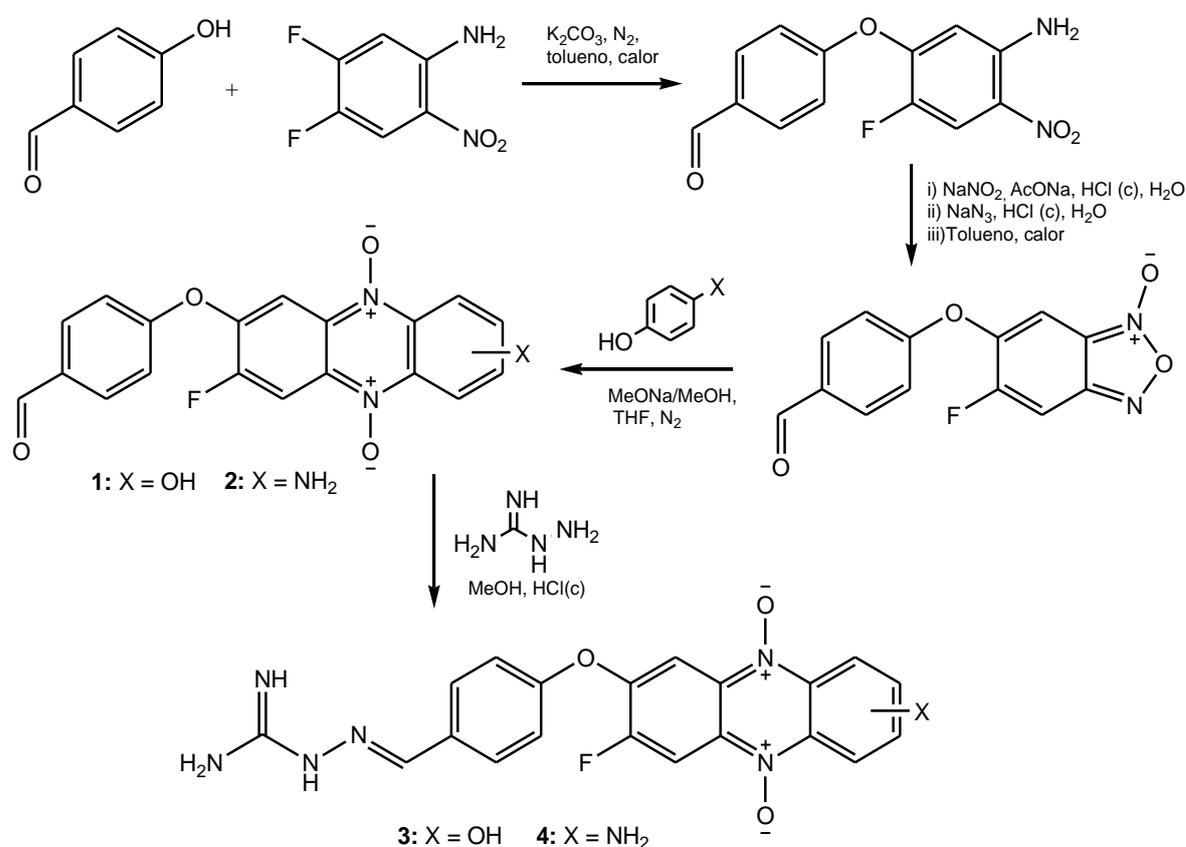


Figura 4.3: Ruta sintética elegida para la obtención de los derivados pertenecientes a la familia A

4.2. Síntesis de los derivados pertenecientes a la familia B

En este caso los reactivos de partida³ presentan tanto la agrupación benzofuroxano como los sustituyentes que confieren las diferencias estructurales entre los distintos derivados. Por este motivo se requiere una sola etapa sintética en la que se expande el heterociclo benzofuroxano, mediante la reacción de Beirut, para dar lugar al derivado de *N,N'*-dióxido de fenazina (figura 4.4.). Este paso es idéntico a la tercera

etapa de la ruta sintética diseñada para la familia A (figura 4.3.).

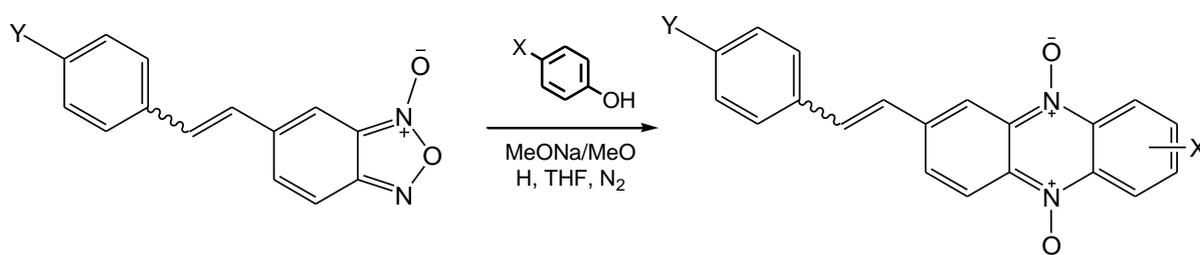


Figura 4.4: Procedimiento sintético para la obtención de los derivados de la familia B

4.3. Síntesis del heterociclo *N,N'*-dióxido de fenazina

4.3.1. Mecanismo de reacción

Tal como se mencionó anteriormente, el heterociclo *N,N'*-dióxido de fenazina se obtiene haciendo reaccionar el intermedio benzofuroxano con un derivado de fenol en medio básico.

Las reacciones de Beirut consisten en la expansión del heterociclo benzofuroxano, empleando diferentes nucleófilos. En este trabajo los nucleófilos utilizados son los derivados fenolato de *p*-aminofenol y *p*-hidroquinona, que permiten obtener los correspondientes *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina y *N,N'*-dióxido de 2-hidroxifenazina respectivamente. Para ello se sigue el proceso sintético propuesto por Ludwig y Baumgartel⁴. La base que se utiliza como generadora del fenolato es metóxido de sodio y la mezcla de disolventes elegidos (tetrahidrofurano/metanol, 50:50) permite obtener los productos de interés mediante precipitación en la mezcla de reacción.

El mecanismo propuesto para la expansión se ilustra en la figura 4.5. El metóxido presente en el medio de reacción desprotona el fenol, generando un fenolato, que mediante resonancia deposita la carga negativa sobre el carbono *orto* al fenol. El carbanión así generado ataca al nitrógeno más electrofílico del heterociclo benzofuroxano⁵, lo que desencadena un desplazamiento de cargas que confiere al nitrógeno restante una importante capacidad nucleofílica. Dicho nitrógeno ataca al carbono carbonílico, ciclando la molécula. El proceso se completa con la aromatización del anillo y la concomitante pérdida de una molécula de agua, dando lugar al heterociclo fenazina⁶.

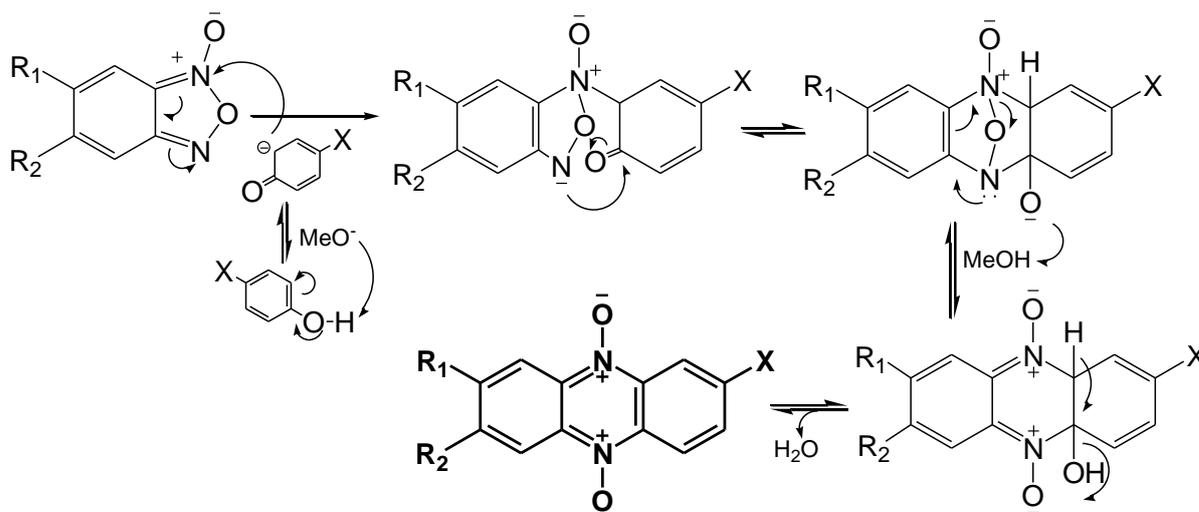


Figura 4.5: Mecanismo propuesto para la síntesis de *N,N*-dióxido de fenazina.

4.3.2. Proporción de isómeros

Al partir de benzofuroxanos mono- y disustituídos, la expansión de los mismos da lugar a dos isómeros de posición de *N,N'*-dióxido de fenazina. Las reacciones realizadas en este trabajo conducen a isómeros de posición en 7 y 8 del anillo de fenazina (*figura 4.7*)^{4,5}. En ningún caso ha sido posible separar los isómeros, ni por cristalización ni por cromatografía,

sin embargo su presencia se evidencia claramente en los espectros ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

El fenómeno responsable de la obtención de los dos isómeros es el equilibrio tautomérico que sufre el anillo de benzofuroxano a temperatura ambiente (*figura 4.7, arriba*). Se ha observado que la proporción de cada isómero en la mezcla depende del efecto mesomérico de los sustituyentes en el anillo de benzofuroxano⁵.

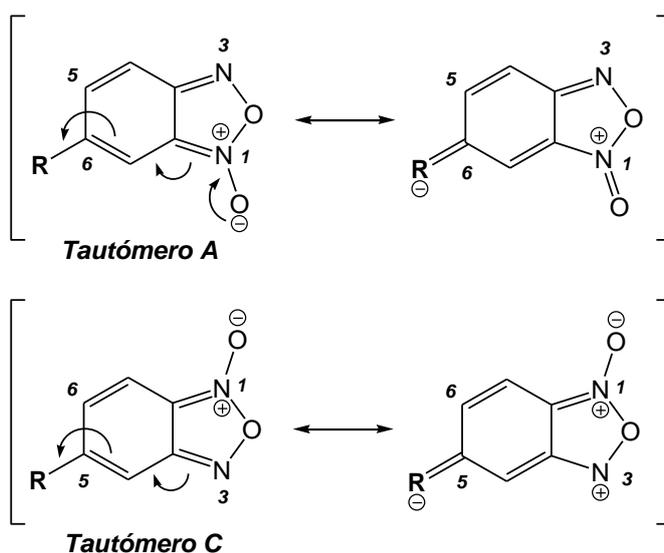


Figura 4.6: Se ilustra el efecto resonante de R cuando este es un grupo electrón-atrayente. Arriba, se puede observar el desplazamiento de cargas que estabiliza el tautómero A (6-sustituído). Mientras que en la parte inferior, se observa como R desestabilizaría el tautómero C.

Esto se debe a que los sustituyentes en posición 5 y 6 del benzofuroxano juegan un rol fundamental en la proporción tautomérica del compuesto. En particular se ha descrito que un grupo electrón-atrayente desplaza, por estabilización por resonancia, el tautomerismo hacia el benzofuroxano 6-sustituído (*figura 4.6*) permitiendo la producción del isómero derivado de la expansión del tautómero A y dando así lugar al isómero 8-sustituído (*figura 4.7*, izquierda). Por el contrario, la presencia de un sustituyente electrón-dador en posición 6 promueve un mesomerismo desfavorable, lo que lleva a que la forma tautomérica preferencial sea la del benzofuroxano 5-sustituído (tautómero C). Esto conduce a que la expansión transcurra preferencialmente hacia el isómero 7-sustituído (*figura 4.7*, derecha).

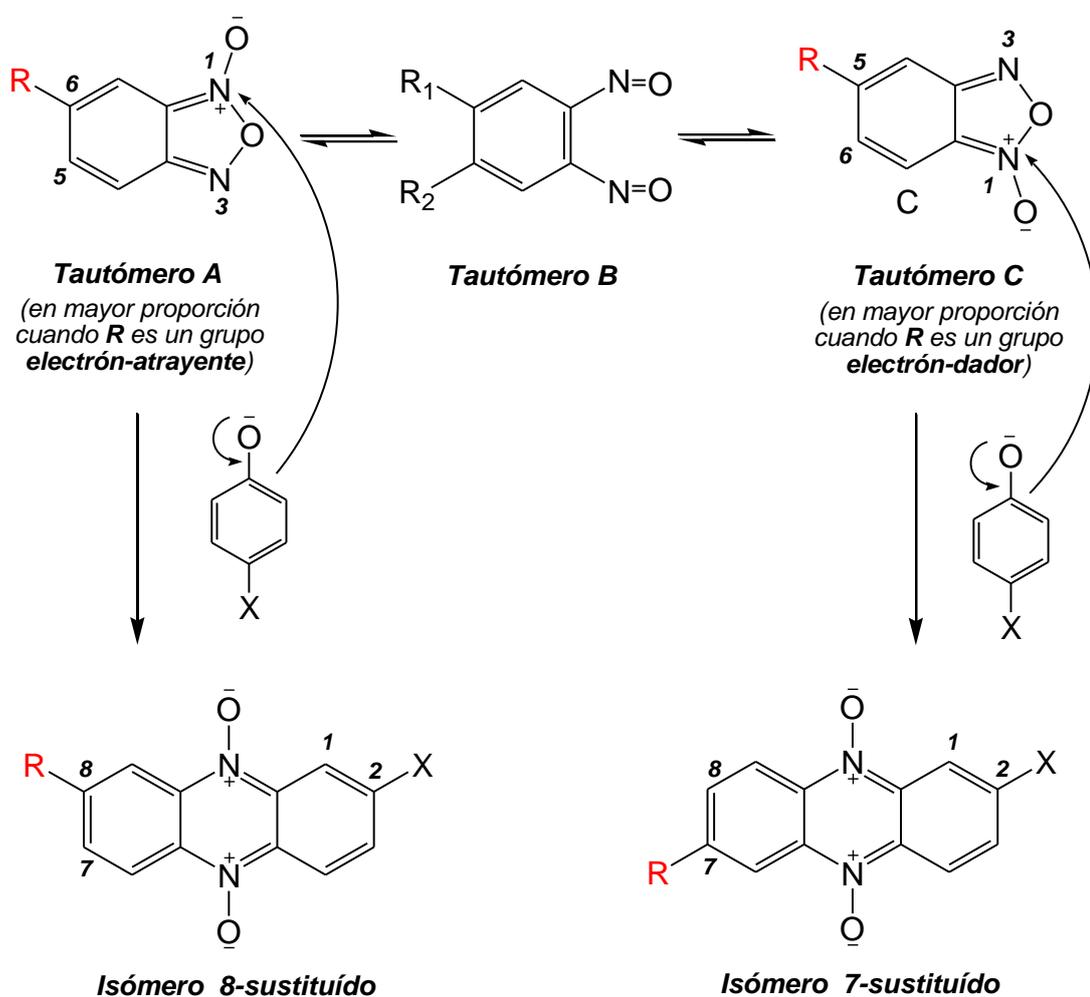


Figura 4.7: Fenómeno que explica la formación de isómeros de posición de *N,N'*-dióxido de fenazina 7- y 8-sustituídos.

En el caso de los compuestos sintetizados en el presente trabajo, ya que no se pudieron separar experimentalmente, la proporción de cada isómero se determina mediante la integración de las señales en los espectros de ^1H -RMN.

En particular, para los derivados de la familia B se observa en la región entre 8,10 y 8,30 ppm una serie de señales que constituyen una “huella digital” (*figura 4.8*). Allí se pueden observar claramente las señales de los protones H_7 y $\text{H}_{8'}$ correspondientes a los dos isómeros generados en la reacción, sin ninguna otra señal superpuesta que dificulte el análisis.

Es posible diferenciar un protón del otro ya que el protón H_7 , del isómero 8-sustituido, aparece más blindado que el protón $\text{H}_{8'}$, del isómero 7-sustituido. Esto se debe al efecto mesomérico electrón-dador del grupo $-\text{OH}$. Esto permite además determinar la proporción isomérica, a través de la integración de cada una de las señales.

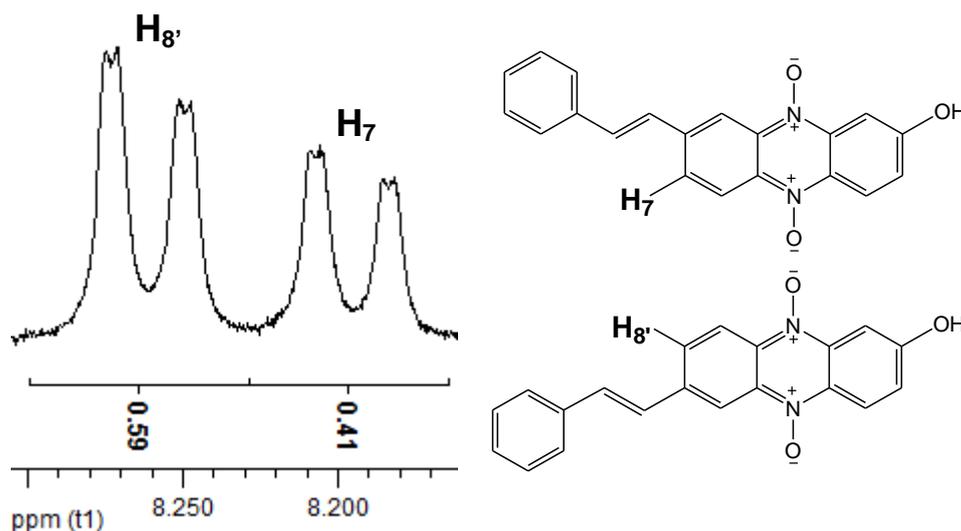
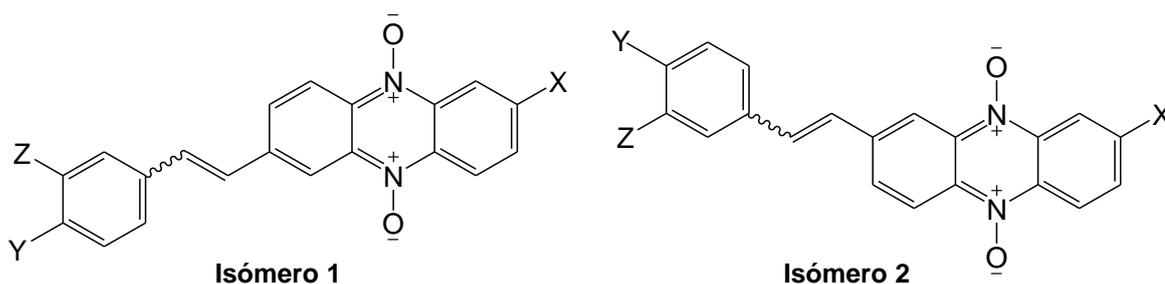


Figura 4.8: Ejemplo de la región del espectro de ^1H -RMN que constituye una “huella digital” para la familia B de compuestos. Se muestran las señales de los hidrógenos 7 y 8’ correspondientes a los isómeros presentes en el derivado **5**.

Para los derivados de la familia B, en todos los casos, se observa una mayor proporción del isómero 7-sustituido (*tabla 4.1*). Esto está indicando que los sustituyentes ariletenil presentes en la familia de derivados B actúan como electrón-dadores por resonancia. Este comportamiento se correlaciona con los valores de la constante de Hammett (σ_p)⁷: mientras que los sustituyentes electrón-dadores revelan

una constante negativa ($\sigma_p = -0.07$ para el sustituyente fenileténil y $\sigma_p = -0.27$ para el sustituyente $-\text{OCH}_3$), los grupos electrón-atrayentes suelen presentar una constante positiva ($\sigma_p = 0.57$ en el caso de $-\text{NO}_2$)⁵. Es importante mencionar también, que la diferencia entre proporciones nunca supera el 30%, lo que confirma experimentalmente que la influencia de los sustituyentes arileténil es débil en comparación con lo observado en otros casos, coincidiendo con el valor absoluto de σ_p . Se ha informado que la presencia del grupo nitro es tan influyente que conduce a



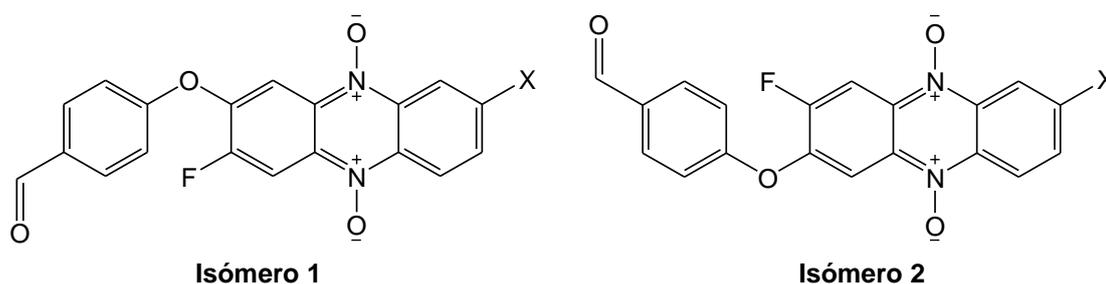
la formación de un solo isómero⁵.

Derivado	X	Y	Z	<i>cis/trans</i>	% isómero 1	% isómero 2	$\sigma_p^{a,b}$
5	OH	H	H	<i>trans</i>	59 %	41 %	-0.07
6	NH ₂	H	H	<i>trans</i>	65 %	35 %	
7	OH	Cl	H	<i>trans</i>	55 %	45 %	-0.06
8	NH ₂	Cl	H	<i>trans</i>	56 %	44 %	
9	OH	OCH ₂ O		<i>cis</i>	60 %	40 %	c
10	NH ₂	OCH ₂ O		<i>cis</i>	58 %	42 %	

^a Constante de Hammett del sustituyente arileténil. ^b Ref. 6. ^c No disponible.

Tabla 4.1: Proporción de isómeros observada para cada uno de los derivados que integran la familia B.

Para la familia A de compuestos, el análisis se vuelve algo más complejo. La “huella digital” en el espectro de ¹H-RMN no se observa ya que ambas posiciones (7 y 8) se encuentran sustituidas por un fluor y un grupo formilfenoxi. A pesar de ello, la proporción de isómeros se calcula mediante la integración de las señales del hidrógeno ilidénico (en el entorno de los 10,0 ppm) o del hidrógeno en posición 1 del sistema fenazina (en el entorno de los 7,70 ppm).



Derivado	X	% isómero 1	% isómero 2
1	OH	65 %	35 %
2	NH ₂	60 %	40 %

Tabla 4.2: Proporción de isómeros observada para cada uno de los derivados que integran la familia A.

Ambos sustituyentes presentes en los derivados de la familia A se clasifican como grupos electrón-dadores por efecto resonante, por lo que cada uno favorecerá la formación de un isómero diferente. Según lo observado experimentalmente en el presente trabajo, el efecto electrón-dador del grupo fluor es claramente superior al del grupo formilfenoxi, dando lugar a una mayor proporción del isómero en el que el fluor se encuentra en posición 7 (tabla 4.2).

4.3.3. Análisis espectroscópico

Todos los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizan disolviendo la muestra en DMSO deuterado y utilizando un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz).

Excepto la señal del hidrógeno ilidénico (derivados 1 y 2), en los espectros de ¹H-RMN de ambas familias, todas las señales correspondientes al heterociclo de fenazina y a los sustituyentes, caen dentro de un rango muy acotado que va de 7,3 ppm a 8,6 ppm. Esto conduce a una superposición de señales que frecuentemente dificulta el análisis.

En el caso de los sustituyentes de la familia A, la rápida identificación del hidrógeno ilidénico (en el entorno de los 10 ppm para los derivados 1 y 2 y 8,2 ppm para los derivados 3 y 4) permite, mediante experimentos de correlación HSQC y HMBC, la determinación de todas las señales de hidrógenos y carbonos pertenecientes al sustituyente formilfenoxi. Esta asignación se ve reforzada por el análisis de las

constantes de acoplamiento y experimentos de COSY.

Paralelamente fue posible elucidar las señales del anillo de fenazina identificando las señales de los hidrógenos en posición 1 y 3, que presentan una constante de acoplamiento en *meta* muy característica. Además, su desplazamiento químico se ve claramente reducido debido al apantallamiento del grupo electrón-dador adyacente. En particular, la señal del hidrógeno 3 es fácilmente identificable por ser un doblete de dobletes, consecuencia de su acoplamiento en *orto* con el hidrógeno 4 y en *meta* con el hidrógeno 1.

Por otro lado, las señales de los hidrógenos 4, 6 y 9 presentan un desplazamiento químico marcadamente mayor, debido al efecto desapantallante de los grupos *N*-óxido adyacentes. Para la familia A, es posible determinar la señal correspondiente al hidrógeno 6 (o 9, en el otro isómero) debido a su constante de acoplamiento en *orto* con el sustituyente fluor, la cual presenta un valor característico de entre 10 y 11 Hz.

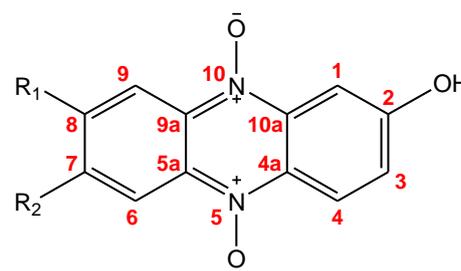


Figura 4.9: Posiciones en el heterociclo de fenazina.

En el caso de la familia B se observan dos grandes particularidades que permiten comenzar con la asignación de señales. La primera de ellas es la presencia del doble enlace alquénico en el sustituyente, cuyos hidrógenos presentan una constante de acoplamiento característica: 16 – 17 Hz para la configuración *trans* (derivados 5 - 8). La localización de dichos protones, combinado con experimentos de COSY, HMBC y HSQC, permite identificar tanto las señales que corresponden al sustituyente como a los hidrógenos 6, 7 (u 8) y 9 del heterociclo de fenazina. En segundo lugar, las señales pertenecientes a los hidrógenos 7 y 8 constituyen un grupo de señales característico de esta familia de compuestos (figura 4.8.), que no se observa en la familia A debido a que ambas posiciones se encuentran sustituidas. La rápida asignación de las mencionadas señales (dobletes de dobletes) facilita la determinación de todas las señales de la correspondiente región de la molécula. El análisis de los derivados 4 y 6 presenta serias dificultades, ya que los espectros muestran señales muy poco definidas, con baja resolución, probablemente como resultado de la baja solubilidad de los compuestos en los disolventes del

experimento (*figura 4.10a*). Sin embargo, el agregado de pequeñas cantidades de ácido sulfúrico deuterado cambia radicalmente los resultados, permitiendo obtener un espectro con señales muy bien definidas (*figura 4.10b*).

Estos resultados confirman que las dificultades iniciales en la obtención del espectro se deben a una escasa solubilidad de los compuestos en DMSO, la cual se incrementa mediante la acidificación del medio. El mencionado incremento en la solubilidad podría deberse a la protonación de los grupos amino y aminoguanidona, presentes en ambos derivados.

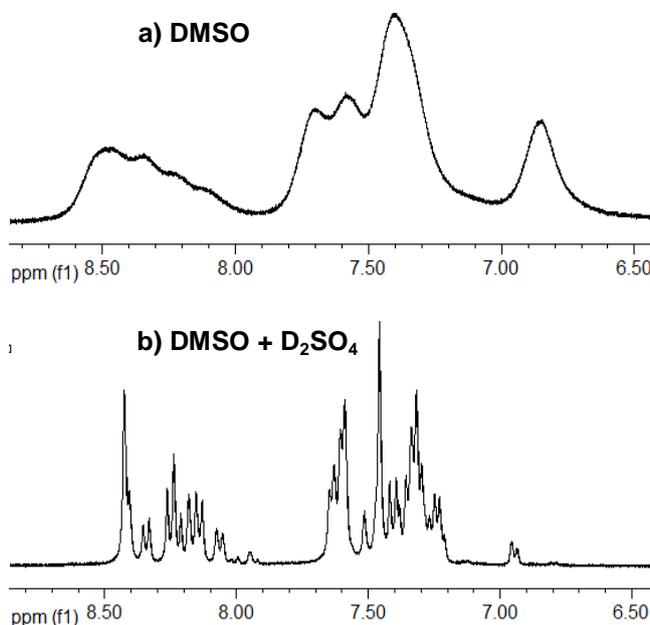


Figura 4.10: Cambios observados en el espectro de ^1H -RMN del derivado **6** al adicionar ácido sulfúrico deuterado.

4.3.4. Rendimientos

Tal como se menciona anteriormente, la estrategia sintética para la obtención del anillo de *N,N'*-dióxido de fenazina corresponde a la utilizada por Ludwig y Baumgartel, empleando como disolvente una mezcla de metanol y tetrahidrofurano, en la que el producto deseado precipita. Esta metodología permite obtener los derivados con buena pureza luego de repetidos lavados con tetrahidrofurano, sin necesidad de ser recristalizados. Los rendimientos observados van de medios a muy buenos (*tabla 4.3*), siendo el principal factor determinante, la solubilidad del producto en el medio de reacción.

En el caso del derivado **2**, el rendimiento (mostrado en la *tabla 4.3*) incluye la presencia de un producto secundario. Los experimentos de RMN sugieren que dicho compuesto corresponde a la imina producto de la condensación entre el grupo aldehído del derivado **2** y

Derivado	Rendimiento
1	57 %
2	22 %
5	36 %
6	47 %
7	77 %
8	79 %
9	19 %
10	30 %

Tabla 4.3: Rendimiento observado para la síntesis de los diferentes derivados.

el grupo amina del *p*-aminofenol (figura 4.11). Para minimizar la formación del producto secundario, la reacción se lleva a cabo a bajas temperaturas (baño de hielo- CaCl_2), agregando el *p*-aminofenol (disuelto en el disolvente de reacción) gota a gota. De esta forma se evita cualquier exceso local de *p*-aminofenol que favorezca la condensación con moléculas de producto frente a la reacción principal.

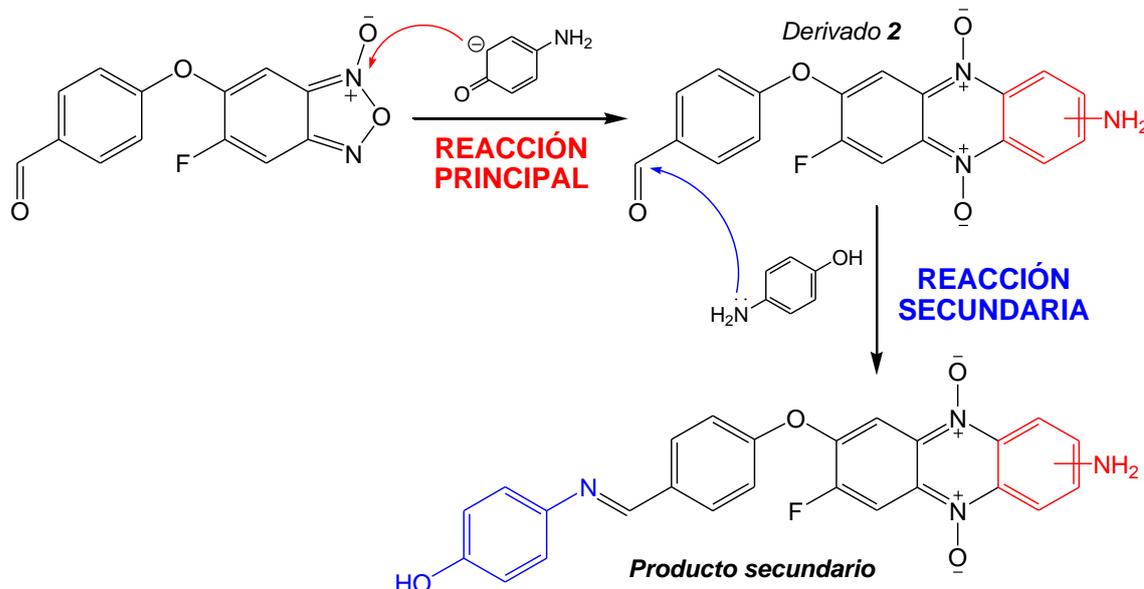


Figura 4.11: Reacción principal y secundaria observadas en la síntesis del derivado 2.

4.4. Condensación de los derivados 1 y 2 con aminoguanidina

Tal como se mencionó en la sección 4.1, la síntesis de los derivados 3 y 4 implica la condensación de los derivados 1 y 2 respectivamente, con aminoguanidina para dar la correspondiente aminoguanidona (figura 4.3). Dicha reacción se lleva a cabo utilizando metanol como disolvente y ácido clorhídrico concentrado como catalizador. En ambos casos se sigue la reacción por cromatografía en capa fina y se constata que se da de forma completa. El producto precipita en el medio de reacción, por lo que se aísla fácilmente mediante filtración.

Los rendimientos fueron buenos. El derivado 3 se obtuvo con un rendimiento del 55%, mientras que la síntesis del derivado 4 presentó un rendimiento del 59%. Para la preparación de este último, se utilizó como material de partida el derivado 2 contaminado con la imina obtenida como producto secundario (figura 4.11). Se espera así, obtener como único producto al derivado 4, ya que ambas entidades son

susceptibles de sufrir ataque nucleofílico por parte de la aminoguanidina. Efectivamente, el proceso transcurre según lo esperado con completo consumo de ambos reactivos.

El análisis espectroscópico confirma que se obtiene el compuesto esperado. Una clara evidencia de ello en el espectro de ^1H -RMN es la desaparición de la señal del protón aldehídico en el entorno de los 10 ppm (derivados **1** y **2**) y la aparición de una señal correspondiente a un único protón con un desplazamiento químico de aproximadamente 8,20 ppm (derivados **3** y **4**) del hidrógeno ilidénico del agrupamiento aminoguanidona.

4.5. Reducción de los grupos *N*-óxido

Considerando que el mecanismo de acción citotóxico propuesto para los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina es la biorreducción en condiciones de hipoxia, se hace obvia la necesidad de obtener los derivados deoxigenados de al menos uno de los compuestos estudiados en este trabajo. Estos derivados deoxigenados son útiles como patrón u objeto de comparación a la hora de realizar ensayos biológicos, ya que a diferencia de sus precursores, deberían presentar una importante citotoxicidad en condiciones de oxia e hipoxia, sin ningún tipo de selectividad.

Es así que se eligió el derivado **1** como sustrato para la reacción de reducción a nivel de los grupos *N*-óxido. La misma se llevó a cabo utilizando como agente reductor ditionito de sodio en medio ácido^{8,9} (figura 4.12).

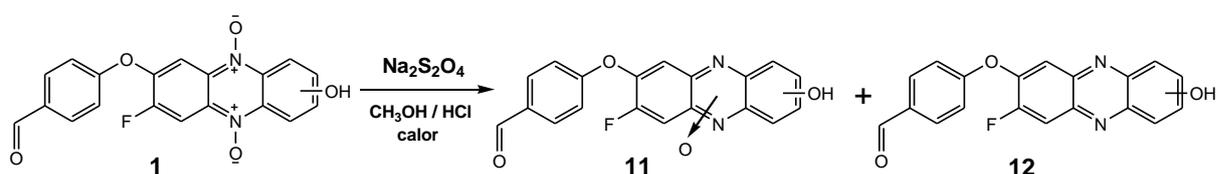


Figura 4.12: Reacción de reducción del derivado **1**.

La reacción se sigue por cromatografía en capa fina, observándose la formación de dos productos con mayor R_f que el material de partida. Los mismos se purifican por cromatografía de columna, utilizando como fase sólida sílica "flash" y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 4:6.

La *figura 4.13* ilustra el mecanismo mediante el cual se da la reducción. Se puede observar la importancia central de la electrofilia del carbono en posición α al *N*-óxido, el cual es atacado por el azufre nucleofílico del anión ditionito⁸.

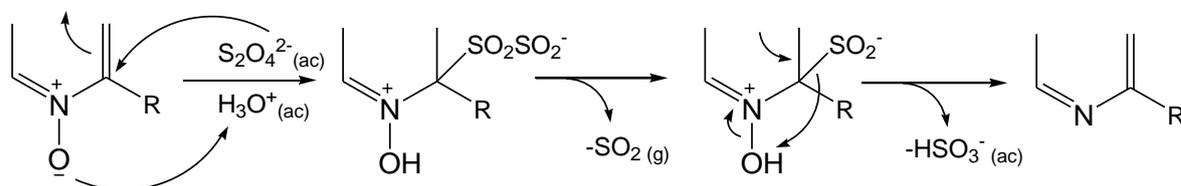
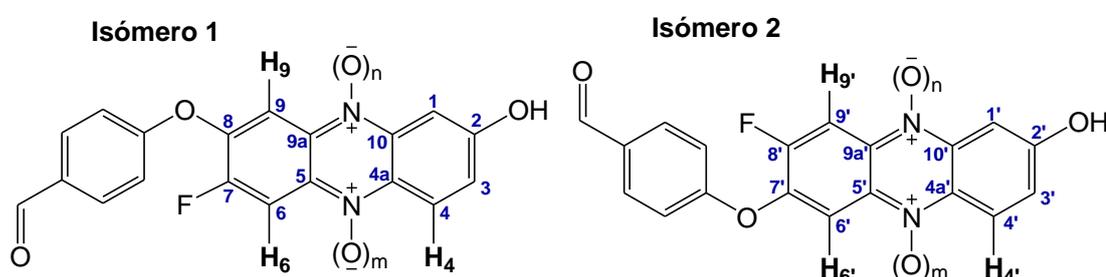


Figura 4.13: Mecanismo de reducción de grupos *N*-óxido por acción del ditionito de sodio.

El análisis espectroscópico revela que el producto con mayor R_f es el producto completamente reducido (derivado **12**), mientras que el de menor R_f es el producto de monoreducción (derivado **11**). Debido a la existencia de isómeros posicionales del derivado **1**, la monoreducción transcurre produciendo el N^5 - y el N^{10} -óxido de cada isómero de posición, 7- y 8-sustituido, dando lugar a cuatro isómeros (*tabla 4.4*). Tal como se mencionó anteriormente, a diferencia del hidrógeno 1 (cuyo desplazamiento químico es gobernado por el fuerte apantallamiento del grupo -OH), el desplazamiento químico de los hidrógenos en posición 4, 6 y 9 se ve incrementado por el desapantallamiento que generan los grupos *N*-óxido adyacentes. La *tabla 4.4* muestra el cambio en dichos desplazamientos para los diferentes estados de oxidación de la molécula. Esta información, conjuntamente con la espectrometría de masa permite confirmar la presencia del producto.

	Derivado 1 (n=1, m=1)	Derivado 11 (n=0, m=1)	Derivado 11 (n=1, m=0)	Derivado 12 (n=0, m=0)
Isómero 1	δ H ₄ (ppm)	8,39	8,41	8,10
	δ H ₆ (ppm)	8,43	8,44	8,24
	δ H ₉ (ppm)	8,03	región 7,9-8,1	7,99
Isómero 2	δ H _{4'} (ppm)	8,44	8,39	8,18
	δ H _{6'} (ppm)	7,95	7,95	7,78
	δ H _{9'} (ppm)	8,46	región 7,9-8,1	8,42

Tabla 4.4: Cambios en el desplazamiento químico de los hidrógenos 4, 6 y 9 a medida que se reducen los grupos *N*-óxido.



4.6. Bibliografía

- Leyva, S.; Castanedo, V.; Leyva, E. (2003) "Synthesis of novel fluorobenzofuroxans by oxidation of anilines and thermal cyclization of arylazides". *Journal of Fluorine Chemistry*, 121, 171-175.
- Haddadin, M.J.; Issidorides, C.H. (1965) "Enamines with isobenzofuroxan: A novel synthesis of quinoxaline-di-N-oxides". *Tetrahedron Letters*, 36, 3253-3256.
- Porcal, W.; Merlino, A.; Boiani, M.; Gerpe, A.; González, M.; Cerecetto, H. (2008). "Arylethenylbenzofuroxan Derivatives as Drugs for Chagas Disease: Multigram Batch Synthesis using a Wittig-Boden Process". *Organic Process Research Development*, 12, 156-162.
- Ludwig, G.-W.; Baumgartel, H. (1982) "Isomerengildung bei der benzofurazan N-oxide mit fenolaten". *Chemical Berichte*, 115, 2380-2382.
- Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi M.L.; Porcal, W. (2005) "Preparation of phenazine N,N-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their

expansion reaction with phenolates". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1290-12296.

6. Haddadin, M.J.; Issidorides, C. H. (1993) "The Beirut reaction". *Heterocycles*, 35, 1503-1525.

7. Hansch, C.; Leo, A. (1979) "*Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*". New York, Wiley.

8. Albin, A.; Pietra, S. (1991) "*Heterocyclic N-Oxides*". CRC: Boca. Raton.

9. Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Cerecetto, H.; González, M. (2008) "Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides". *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1900-1906.

5. Resultados y discusión: evaluación biológica

Como se mencionó anteriormente, los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina se desarrollaron por su potencial para actuar como profármacos que únicamente adquieren citotoxicidad al ingresar a una célula tumoral hipóxica. En su interior, gracias a los bajos niveles de oxígeno y alto contenido de reductasas, el profármaco se reduce por acción enzimática para dar lugar al fármaco activo, capaz de generar daño en el material genético de la célula tumoral^{1,2}.

Luego de sintetizar todos los derivados mencionados en el apartado anterior, se procede al estudio de su capacidad para actuar como profármacos selectivos bio-reducibles. Para esto se realizan tres ensayos, que permiten arrojar luz sobre la potencialidad de su uso como agentes bio-reducibles (sección 5.1) y el mecanismo de acción propuesto para esta familia de compuestos (secciones 5.2 y 5.3).

5.1. Ensayo de citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia

5.1.1. Fundamento de la técnica

Para determinadas líneas celulares es posible obtener colonias de más de 60 células sembrándolas a bajas concentraciones en placas de cultivo. Dichas colonias están conformadas por “clones” que derivan de una única célula madre, la cual se introdujo en la placa durante el sembrado. La capacidad de replicación o eficiencia clonogénica que permite la formación de dichas colonias puede verse afectada por el tratamiento con un determinado compuesto, efecto muy buscado en fármacos antitumorales. Este podría conducir a una disminución del número de colonias generadas por una determinada línea celular en determinadas condiciones de sembrado y de crecimiento. Ya que es posible contabilizar el número de colonias, se puede registrar la disminución en la eficiencia clonogénica y así determinar el porcentaje de supervivencia celular en ausencia y presencia del compuesto³.

5.1.2. Diseño experimental y tratamiento de los datos

Para el ensayo se utilizan células V79 (línea celular de fibroblastos de hámster chino), las cuales presentan una muy buena eficiencia clonogénica (98% de supervivencia en 7 días)¹. Las mismas se incuban durante 2 horas con una concentración 20µM del compuesto a estudiar. A fin de simular las condiciones de normoxia o hipoxia se gasifica el medio de cultivo con aire atmosférico o nitrógeno, respectivamente.

Luego de 7 días de incubación se contabiliza el número de colonias y se calcula la eficiencia clonogénica (PE) para cada una de las condiciones de la siguiente forma:

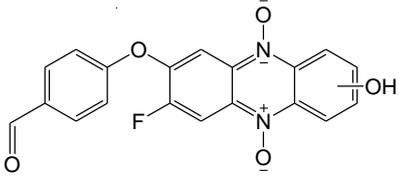
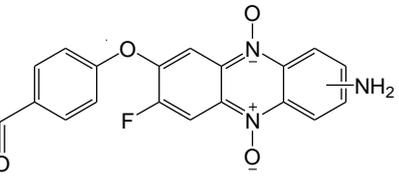
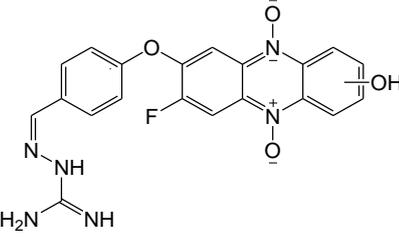
$$PE = (n^{\circ} \text{ de colonias} / n^{\circ} \text{ de células sembradas}) \times 100$$

Posteriormente se determina el porcentaje o fracción de supervivencia (FS) según:

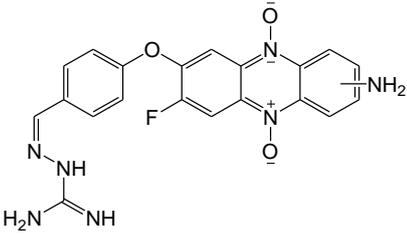
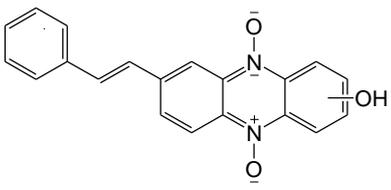
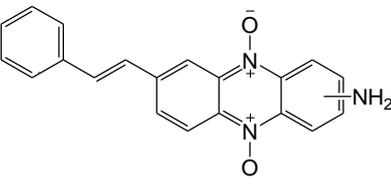
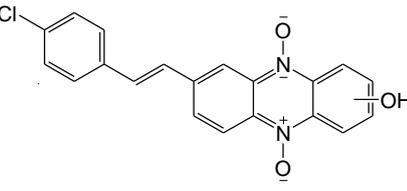
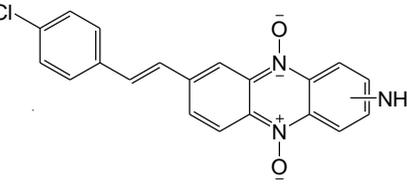
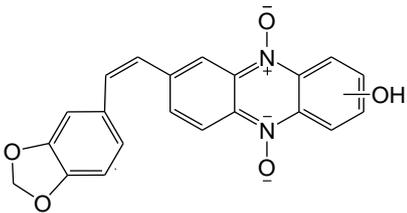
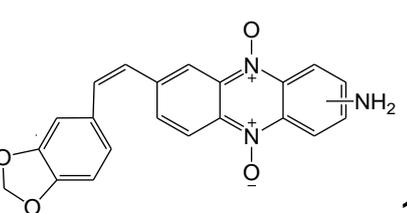
$FS = (PE \text{ tratamiento} / PE \text{ control negativo}) \times 100$, donde “PE tratamiento” es la eficiencia clonogénica en presencia del compuesto y “PE control negativo” en ausencia del mismo.

5.1.3. Discusión de los resultados

En la tabla 5.1 se resumen los valores de fracción de supervivencia determinados para los derivados sintetizados en el presente trabajo.

Derivado	FS (Normoxia)	FS (Hipoxia)
 <p style="text-align: right;">1</p>	100	95
 <p style="text-align: right;">2^a</p>	77	77
 <p style="text-align: right;">3</p>	100	73

^a Evaluado como la mezcla del producto de interés y la imina producto secundario (ver capítulo 4).

Derivado	FS (Normoxia)	FS (Hipoxia)
 <p>4</p>	100	100
 <p>5</p>	50	100
 <p>6</p>	50	100
 <p>7</p>	55	100
 <p>8</p>	100	100
 <p>9</p>	100	75
 <p>10</p>	100	45

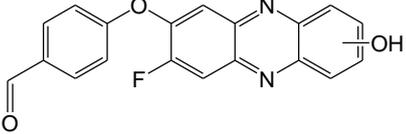
Derivado	FS (Normoxia)	FS (Hipoxia)
 <p style="text-align: right;">11</p>	98	61
 <p style="text-align: right;">12</p>	67	61

Tabla 5.1: Valores de FS determinados para los derivados 1 al 12 en condiciones de normoxia e hipoxia.

Un factor a ser tenido en cuenta a la hora de analizar los datos es la baja solubilidad que todos los compuestos presentaron en el medio de cultivo. Esto condujo a que en algunos casos el compuesto precipitara, por lo que no es posible conocer la concentración real en el ensayo.

En función de los valores de FS obtenidos se clasifican los compuestos en cuatro grupos según su comportamiento en condiciones de normoxia e hipoxia. Un primer grupo está integrado por los derivados **1**, **4** y **8** que no presentan citotoxicidad en ninguna de las condiciones ensayadas. Por otro lado, los derivados **2** y **12** pertenecen a un segundo grupo de compuestos que muestran niveles de citotoxicidad intermedios tanto en normoxia como en hipoxia.

Por otro lado, existe un grupo de compuestos que presentaron citotoxicidad selectiva en condiciones de normoxia, los derivados **5**, **6** y **7**. Dicho comportamiento estaría hablando de un mecanismo citotóxico contrario al buscado en el presente trabajo. Una posible explicación sería que dichos compuestos dañen a la célula mediante la generación de estrés oxidativo dependiente de la presencia de oxígeno en el medio (consecuencia del ciclo fútil). Otra explicación puede estar en la existencia de un daño causado por el *N,N'*-dióxido de fenazina, que no se observa en hipoxia una vez ocurrida la bio-reducción a fenazina (ver sección 5.3).

Finalmente, considerando la hipótesis de trabajo, el grupo que presenta mayor interés es el de aquellos derivados que revelaron selectividad en condiciones de

hipoxia. Este es el caso de los derivados **3**, **9**, **10** y **11**, siendo el **10** el más selectivo. Tal como se mencionó anteriormente era esperable que el derivado **12** presente citotoxicidad tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Esto probablemente sucede ya que por ser un derivado completamente reducido, el mecanismo de selectividad debido a la bio-reducción en condiciones de hipoxia no tiene lugar. En el caso de su precursor completamente oxidado (derivado **1**), se esperaría que si se reduce en las condiciones ensayadas presentara cierto grado de citotoxicidad en hipoxia, sin embargo no es así. Esto podría estar indicando que ni en condiciones de normoxia ni en hipoxia el derivado **1** es reducido enzimáticamente para dar lugar al fármaco activo (ver sección 5.2). Otro motivo, como ya se mencionó anteriormente, puede radicar en la baja solubilidad del compuesto **1** en el medio de cultivo que conduzca a un artefacto de falta de actividad cuando en realidad se deba a la baja concentración del compuesto en solución. Es interesante destacar, que por otro lado, el derivado **11** (mono-oxidado) sí presenta cierto grado de selectividad, siendo inactivo en condiciones de normoxia pero citotóxico en condiciones de hipoxia. Esto podría estar indicando que, aunque en las condiciones del ensayo el compuesto **1** no es un profármaco susceptible de ser activado, su derivado mono-oxidado sí podría serlo.

En particular, el derivado **10** presenta un adecuado comportamiento y sobre él se podría seguir trabajando en futuras modificaciones químicas de la estructura que mejoren los valores de citotoxicidad selectiva.

5.2. Ensayo *in vitro* de bio-reducción en normoxia e hipoxia

Para determinar si el derivado **1** es susceptible a la reducción por acción de enzimas celulares, se procede a realizar un ensayo de bio-reducción *in vitro*. Para esto, se incuba el compuesto con la fracción citosólica y microsomal de un homogeneizado de hepatocitos de rata. Algunas de las enzimas presentes en el homogeneizado que se han identificado como responsables de la bio-reducción de grupos *N*-óxido son: citocromo P450, xantino oxidasa, DT-diaforasa y aldehído oxidasa⁴⁻⁷.

La incubación con ambas fracciones del homogeneizado se realiza a 37°C, durante 1 hora, en ausencia y presencia de oxígeno. Además, como blanco, se incuba el

producto con buffer y demás reactivos en ausencia de las fracciones del homogeneizado. Posteriormente se inactiva la fracción y se extraen por reparto los productos de metabolización. Estos se comparan con los patrones de reducción química (derivados **11** y **12**) mediante cromatografía en capa fina⁸.

La *figura 5.1*. muestra los resultados de la incubación del derivado **1** en presencia y ausencia de oxígeno. El recuadro rojo indica la región donde, según el patrón (carril 4) se encuentran los productos de reducción. Tal como puede observarse, el compuesto sufrió una fuerte metabolización, dando lugar a un gran número de productos. El revelado con luz UV indicaría que tanto en presencia (carril 2) como en ausencia (carril 3) de oxígeno se producen dos productos cuyos R_f coinciden con los patrones de reducción química (mono-óxido **11** y producto completamente reducido **12**). Sin embargo, al revelar con una mezcla de anisaldehído:EtOH:H₂SO₄ (c)⁹ los mencionados productos de metabolización revelan con una coloración rosada, que difiere claramente del color amarillo que toman los patrones reducidos preparados químicamente. Esto podría significar que el derivado **1** no es susceptible de sufrir bio-reducción a los derivados mono- y completamente reducido por acción de las enzimas presentes en la fracción citosólica.

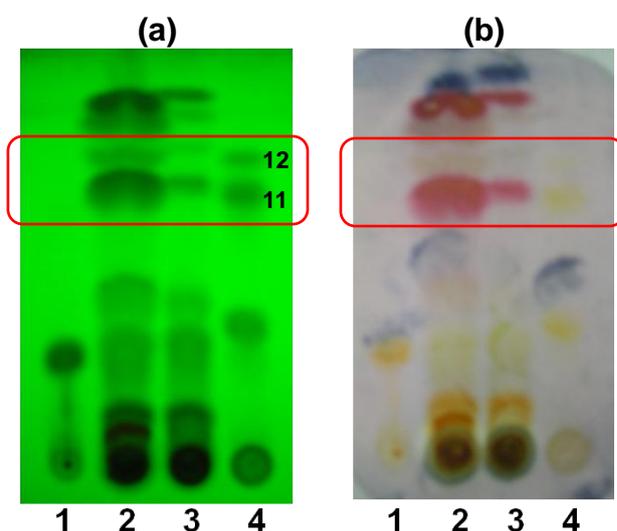


Figura 5.1: Cromatografía en capa fina de la metabolización del derivado **1** con **fracción citosólica**. En los carriles, de izquierda a derecha, se sembró:

- 1- Derivado **1**
 - 2- Incubación en presencia de oxígeno.
 - 3- Incubación en ausencia de oxígeno.
 - 4- Derivados **11** y **12** (provenientes del crudo de la reacción de reducción de la fenazina con ditionito de sodio).
- Revelado: (a) luz UV (256nm), (b) anisaldehído⁹

La metabolización del compuesto por acción de las enzimas de la fracción microsomal se puede apreciar en la *figura 5.2*. En comparación con la fracción citosólica (*figura 5.1*), se observa una metabolización que parece ser menos intensa.

Esto se evidencia tanto en el menor número de productos de metabolización, como en la presencia de una mayor concentración del compuesto sin metabolizar. Con respecto a los productos de reducción, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno parecen formarse compuestos con similar R_f , que al revelarse con la mezcla anisaldehído/ $H_2SO_4(c)$ /EtOH 95:4:1 (v/v/v) presentan la misma coloración. También es notorio, que en presencia de oxígeno la formación de dichos productos es mucho menor que en ausencia del mismo. Todo esto podría estar indicando que, por acción de enzimas presentes en la fracción microsomal, el derivado **1** se bio-reduce y lo hace de forma selectiva en ausencia de oxígeno.

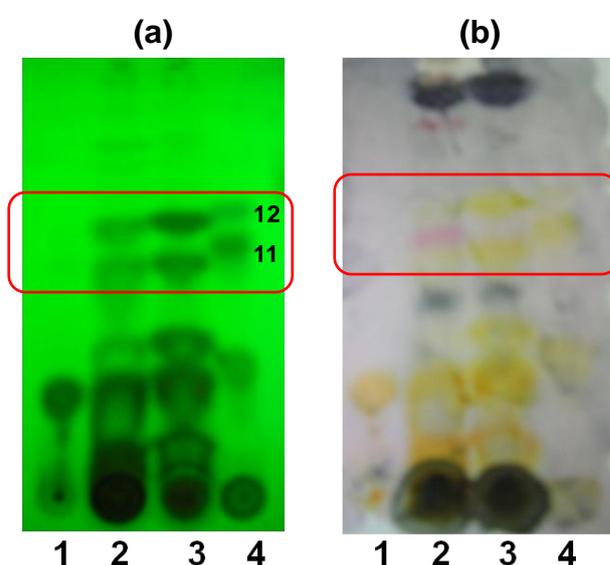


Figura 5.2: Cromatografía en capa fina de la metabolización del derivado **1** con **fracción microsomal**. En los carriles, de izquierda a derecha, se sembró:

- 1- Derivado **1**
- 2- Incubación en presencia de oxígeno.
- 3- Incubación en ausencia de oxígeno.
- 4- Derivados **11** y **12** (provenientes del crudo de la reacción de reducción de la fenazina con ditionito de sodio).

Revelado: (a) luz UV (256nm), (b) anisaldehído⁹

Estas observaciones estarían indicando que la falta de capacidad para bio-reducirse no sería el motivo por el cual el derivado **1** resulta inactivo en el ensayo de citotoxicidad (sección 5.1). Algunos factores que podrían estar determinando la falta de actividad observada son la capacidad de penetración de membrana y la solubilidad de compuesto en el medio, entre otros. Serían necesarios estudios más profundos para arrojar luz sobre este hecho.

Estudios previos revelaron que, mientras los derivados de 2-aminofenazina dan lugar tanto al producto mono-oxidado como al completamente reducido, los derivados de 2-hidroxifenazina tienden a reducirse completamente en las condiciones del ensayo, dando lugar a un único producto de reducción⁷. Esto puede deberse a que los derivados 2-hidroxi presentan una mayor capacidad para

reducirse que no permite observar cromatográficamente la presencia del mono-óxido intermedio o a que los procesos enzimáticos involucrados son diferentes a aquellos que tienen lugar en el caso de los derivados 2-amino. Sin embargo, los resultados observados en el presente trabajo no siguen dicho comportamiento. El derivado **1**, a pesar de ser un derivado de 2-hidroxifenazina, dio lugar tanto al producto mono-oxidado como al completamente reducido en las condiciones del ensayo. Esto puede deberse a la influencia de los sustituyentes fluor y fenoxi, que a través de su efecto electrón-dador modifican el potencial de reducción del compuesto o su afinidad por diferentes complejos enzimáticos.

En este ensayo no se estudió de forma particular las enzimas responsables de las bio-transformaciones observadas. Sin embargo, se ha informado que tanto la DT-diaforasa como la citocromo P450 son responsables de la bio-reducción observada para ciertos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina⁷. En el caso del derivado **1**, solo parece observarse bio-reducción en la fracción microsomal, donde se encuentran las concentraciones más elevadas de la enzima citocromo P450.

Con respecto al resto de los productos de metabolización que se observan en ambas fracciones, el derivado **1** es, por su estructura química, susceptible a un sinnúmero de modificaciones enzimáticas que pueden haber tenido lugar durante la incubación con ambas fracciones del homogeneizado. En particular, no se puede dejar de mencionar la fuerte reactividad de grupo aldehído, susceptible tanto a conjugarse con diferentes moléculas biológicas así como a oxidarse dando lugar al correspondiente ácido carboxílico. Esto último puede haber sucedido por acción de la enzima aldehído oxidasa, dando origen al producto de menor R_f que se observa en el carril 2 de la *figura 5.1*, como una franja de color naranja intenso. La aparición de dicho producto se observa únicamente en presencia de oxígeno, lo cual refuerza la idea de que un proceso de oxidación es el responsable de su aparición.

5.3. Evaluación de la capacidad de interacción con ADN

A fin de determinar la capacidad de interacción con ADN de todos los compuestos sintetizados en el presente trabajo, se puso a punto un ensayo *in vitro* en el que mediante espectroscopia de fluorescencia se determina el grado de afinidad de cada compuesto con ADN de timo de ternera.

5.3.1. Fundamento de la técnica

El heterociclo de fenazina es un fuerte fluoróforo, tanto por la predominante deslocalización electrónica, como por la presencia de heteroátomos en el anillo. Si se lo excita con radiación dentro del rango UV-visible, este irradia fotones con mayores longitudes de onda, es decir, con menor energía. Por supuesto, las modificaciones químicas del anillo, o su conjugación a diferentes grupos químicos alterarán las longitudes de onda de absorción y emisión máximas de la molécula, pero la capacidad de fluorescer es, en principio, intrínseca a toda la familia de derivados.

Cuando una molécula absorbe un fotón, pasa a un estado energético excitado (S_2), luego de lo cual puede volver al estado basal (S_0) por diferentes caminos (*figura 5.3*).

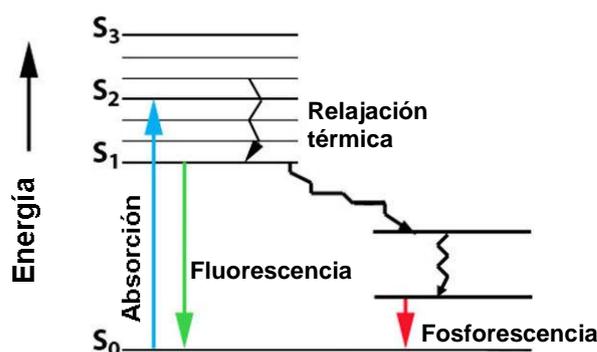


Figura 5.3: Fenómenos de excitación y relajación electrónica de una molécula.

Entre las distintas vías de desactivación se encuentran la relajación térmica, la fluorescencia y la fosforescencia. El camino más probable hacia el estado fundamental será aquel que reduzca el tiempo de vida media del estado excitado. La desactivación por fluorescencia tendrá lugar preferentemente frente a otros procesos, si tiene una constante de velocidad favorable.

En dicho marco, el agregado de una segunda molécula denominada desactivador o *quencher* funciona como una vía adicional no radiactiva para la desactivación de la molécula excitada. La molécula del desactivador forma un complejo con el fluoróforo, modificando sus características electrónicas. Esto permite que el retorno al estado basal tenga lugar sin emisión de fluorescencia¹⁰.

Cuando un fluoróforo se intercala entre las bases de la doble hebra de ADN, los orbitales moleculares deslocalizados de la molécula del compuesto interaccionan con los de las bases del ácido nucleico modificando sus características electrónicas y dando lugar al fenómeno de desactivación denominado *quenching*. Gracias a este fenómeno, es posible estudiar el grado de interacción con el ADN de los compuestos

midiendo la intensidad de fluorescencia de estos en presencia de diferentes concentraciones de ADN¹¹. Esta técnica es ampliamente utilizada para estudiar los fenómenos de intercalación en el ADN de diferentes moléculas cuya estructura planar las convierte en potenciales agentes intercalantes. Este es el caso de la mitoxantrona, un reconocido fármaco anticancerígeno¹².

5.3.2. Diseño experimental y tratamiento de los datos

En una primera instancia se debe definir la longitud de onda a la que se irradiará el compuesto. Para esto se estudia el espectro de absorción del mismo y se elige el rango de longitudes de onda donde se observa máxima absorción.

Posteriormente se incubaba el compuesto, en una concentración 20 μ M, con una serie de concentraciones de ADN de timo de ternera de alta pureza, que van desde 0 a 400 μ M. La incubación se desarrolla durante 30 minutos, a 37°C, en buffer de fosfato pH=6 que simula las condiciones ácidas del entorno e interior de una célula tumoral hipóxica¹³. Luego de la incubación, la muestra se irradia con la

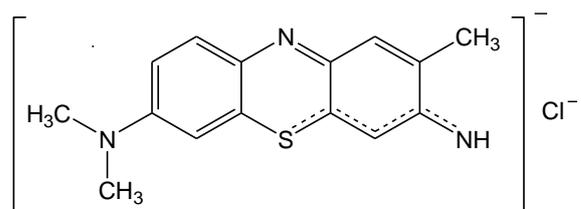


Figura 5.4: Azul de toluidina (TB).

longitud de onda anteriormente definida y se registra su espectro de emisión. Se utiliza como control positivo azul de toluidina (TB), un reconocido agente intercalante¹⁴ (figura 5.4) y como blanco, las soluciones de ADN en ausencia de compuesto. Además de los derivados **1** al **12**, también se estudian los compuestos **13**, **14** y **15** (figura 5.5.) que permitirán evaluar la influencia que los sustituyentes presentes en los derivados **1** al **12** tienen sobre la capacidad de interacción con ADN.

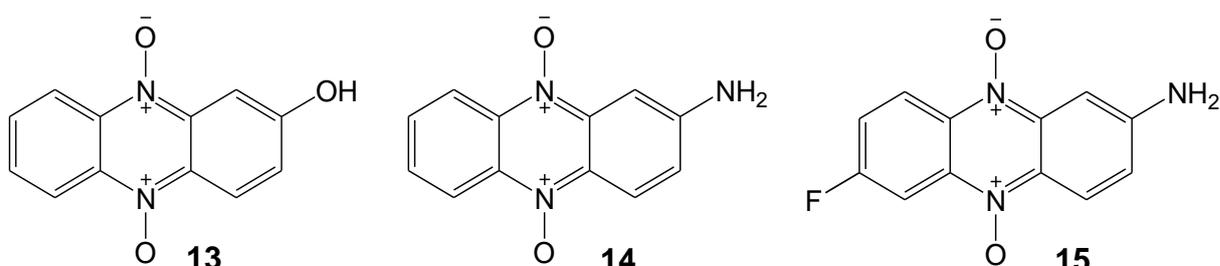


Figura 5.5: Compuestos **13**, **14** y **15** utilizados para completar los estudios de interacción con ADN por fluorescencia.

La *figura 5.6.* muestra, a modo de ejemplo, los espectros de emisión obtenidos para los de los derivados **1** y **12**. En ambos casos se observa claramente un descenso en la intensidad de fluorescencia (I_f) a medida que se incrementa la concentración de ADN. Sin embargo, hay una marcada diferencia entre la sensibilidad de ambos compuestos a la desactivación. Es notorio que el derivado **12** (producto de reducción del derivado **1**) presenta una mayor sensibilidad, lo que estaría indicando que hay un grado mayor de interacción con ADN.

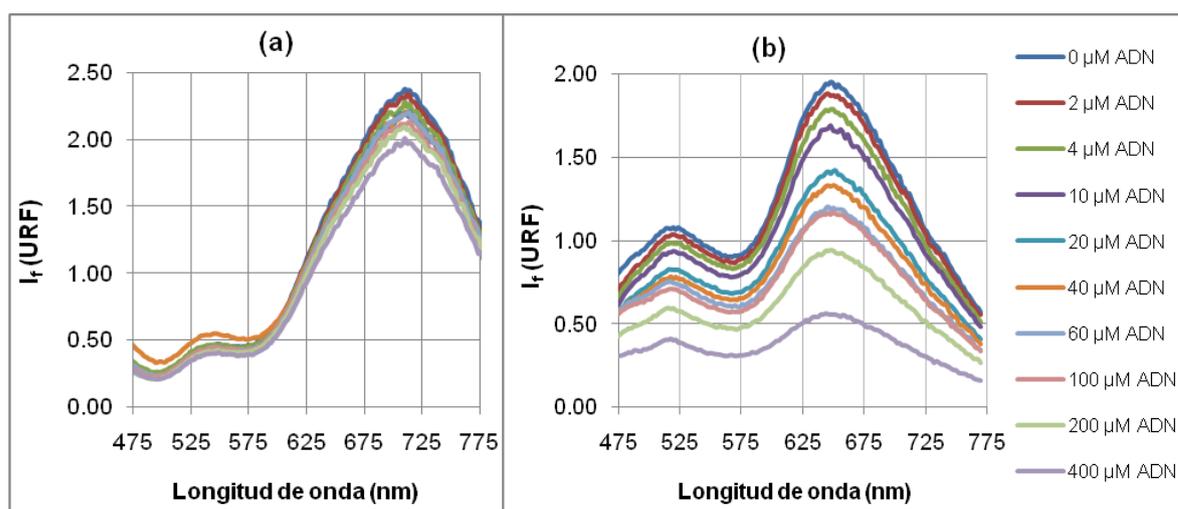


Figura 5.6: Espectros de emisión de los derivados **1** (a) y **12** (b) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de timo de ternera. Las longitudes de onda de excitación son 330 nm y 390 nm respectivamente.

A partir de los espectros de emisión es posible determinar la longitud de onda máxima de emisión. Al graficar la I_f a dicha longitud de onda en función de la concentración de ADN, se obtiene un gráfico de saturación que permite visualizar claramente el fenómeno de desactivación (*figura 5.7a*). Luego, para determinar el grado de afinidad con ADN de cada compuesto, se recurre al análisis de Stern-Volmer^{10,11}. La ecuación de Stern-Volmer (*figura 5.7b*) se aplica sobre los primeros puntos del gráfico, donde aún no se observa el fenómeno de saturación. La pendiente del gráfico I_f^0/I_f^{ADN} vs. [ADN] (*figura 5.7c*) se denomina constante de Stern-Volmer (K_{sv}) y está directamente relacionada con la afinidad del compuesto por ADN.

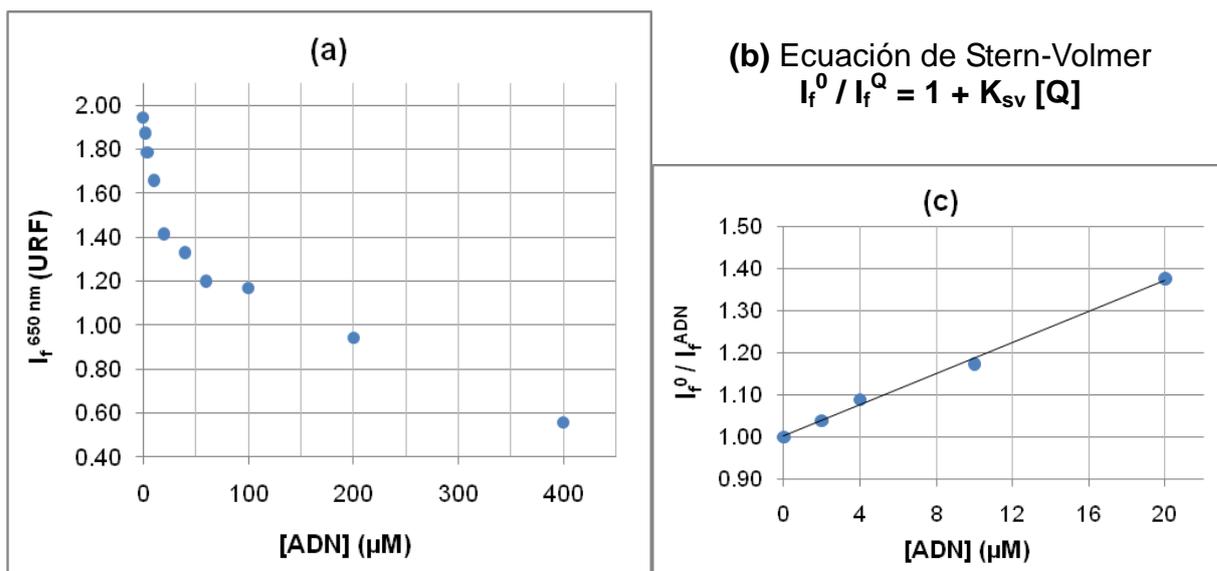


Figura 5.7: Tratamiento de los datos experimentales. (a) Gráfico de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión en función de la concentración de ADN. (b) Ecuación de Stern-Volmer, donde I_f^0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia de desactivante, I_f^{ADN} es la intensidad de fluorescencia en presencia del desactivante y $[Q]$ es la concentración del desactivante. (c) Gráfico de Stern-Volmer, cuya pendiente corresponde a K_{sv} .

5.3.3. Discusión de los resultados

La *tabla 5.1* muestra la constante de Stern-Volmer calculada para cada uno de los compuestos estudiados. El control positivo (TB) presentó un comportamiento clásico, revelando una fuerte desactivación de su fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes de ADN. La K_{sv} calculada para TB fue de $12,6 \pm 1,5$, la cual es menor a la observada para varios de los derivados sintetizados en el presente trabajo.

Si se comparan los compuestos **13**, **14** y **15** se pueden realizar dos importantes afirmaciones. En primer lugar, la presencia del grupo amino en la posición 2 del compuesto **14** claramente favorece la interacción con ADN en comparación con el grupo hidroxilo en la posición 2 del derivado **13**. Esto podría indicar que aquellos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina que presentan la agrupación amino serían mejores agentes intercalantes

Derivado	$K_{sv} (\times 10^{-3})$
1	$8,3 \pm 0,4$
2	$10,7 \pm 1,4$
3	$0,1 \pm 0,1$
4	$0,1 \pm 0,2$
5	$14,3 \pm 0,4$
6	$24,4 \pm 2,8$
7	$15,2 \pm 0,8$
8	$10,1 \pm 0,4$
9	$9,3 \pm 0,7$
10	$2,8 \pm 0,2$
11	$3,0 \pm 0,1$
12	$17,9 \pm 1,6$
13	$1,0 \pm 0,8$
14	$7,3 \pm 1,7$
15	$7,8 \pm 2,7$
TB	$12,6 \pm 1,5$

Tabla 5.1: Constantes de Stern-Volmer calculadas experimentalmente para los compuestos **1** al **15** y para el TB

que aquellos que presentan un grupo hidroxilo en su lugar. Esta observación se confirma si comparamos las parejas de compuestos **1 - 2** y **5 - 6**, en las que el derivado 2-amino siempre presenta una mayor K_{sv} que el 2-hidroxi. En segundo lugar, el sustituyente fluor parece no afectar notoriamente la capacidad del compuesto para intercalarse en el ADN, ya que los compuestos **14** y **15** no revelan importantes diferencias en su afinidad por la doble hebra. De todas formas, el átomo de fluor presenta varias ventajas que fundamentan la conveniencia de mantenerlo en la estructura química de la molécula. Por un lado, el átomo de fluor tiene una influencia muy importante en la electrofilia de la 4,5-difluor-2-nitroanilina, necesaria para que el primer paso de síntesis de la familia de derivados A (*figura 4.3*) se dé con buenos rendimientos. Por otro lado, se ha informado que la presencia de un átomo de fluor en este tipo de compuestos facilita la solubilización de los mismos en las membranas celulares y por lo tanto incrementa su bio-disponibilidad^{15,16}.

Cuando se compara las parejas **13 - 1** y **14 - 2** se observa claramente que la presencia del sustituyente 4-formilfenoxi potencia la interacción de los compuestos con ADN, sin embargo, al transformar dicho sustituyente en un 4-aminoguanidonilfenoxi para dar lugar a los derivados **3** y **4**, la K_{sv} disminuye rotundamente. Esto puede deberse a un descenso en la solubilidad de la molécula en el medio de incubación, o a la disminución de la afinidad con ADN, lo cual estaría refutando la hipótesis de que un grupo aminoguanidona potencia la interacción con el ADN al protonarse e interaccionar electrostáticamente con los grupos fosfato del ácido nucleico^{17,18}, hipótesis que fue propuesta en este trabajo.

También resulta interesante comparar los compuestos **13** y **14** con los derivados pertenecientes a la familia B (**5** al **10**). Se puede afirmar que, en general, el sustituyente arileténil incrementa la capacidad de los compuestos de intercalarse en el ADN, siendo el que lo hace con mayor eficiencia el sustituyente fenieténil presente en los derivados **5** y **6** ($K_{sv} = 14,3 \pm 0,4$ y $24,4 \pm 2,8$ respectivamente).

Tal vez, la observación más importante del trabajo, es que el derivado **12** (completamente reducido) presenta una K_{sv} cuyo valor duplica la K_{sv} del derivado **1**. Esto confirma que al reducirse, los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina dan lugar a un fármaco con mayor capacidad de generar daños en el ADN que el profármaco oxidado. Por otro lado, el derivado **11** (mono-oxidado) presenta una K_{sv} menor a la de su precursor completamente oxidado, lo cual indicaría que el primer paso de

reducción no es suficiente para activar el profármaco, sino que se requiere una reducción completa para que la capacidad intercalante se vea potenciada. Esto último coincide con lo observado en el ensayo de citotoxicidad (sección 5.1), en el que el derivado mono-oxidado no presentó citotoxicidad en condiciones de normoxia, pero sí en hipoxia, debido a su metabolización hacia el fármaco completamente reducido.

Por último, resulta muy interesante comparar los valores de K_{sv} de los derivados **1** al **12** con los niveles de citotoxicidad en condiciones de normoxia determinados en la

sección 5.1. Si observamos el gráfico de la *figura 5.8* parece haber una clara tendencia lineal, en la que el grado de interacción con ADN (representado por K_{sv}) resulta inversamente proporcional al porcentaje de supervivencia celular (FS) en condiciones de normoxia. Esto refuerza la idea de que la intercalación en el ADN es uno de los principales mecanismos mediante los

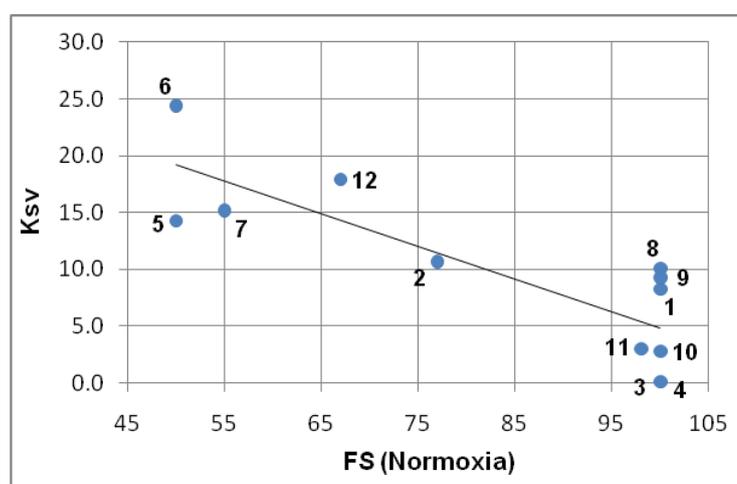


Figura 5.8: Gráfico de K_{sv} vs FS en condiciones de normoxia. Al lado de cada dato se indica el derivado al cuál corresponden los valores de K_{sv} y FS.

cuales esta familia de compuestos genera daño celular. El gráfico también permite clasificar a los derivados en tres grupos: aquellos que presentan fuerte interacción con ADN y destacable citotoxicidad en oxia (derivados **5**, **6** y **7**), aquellos que presentan una interacción con ADN de nivel intermedio y cierto grado de citotoxicidad (derivados **2** y **12**) y aquellos que presentan baja interacción con ADN y baja citotoxicidad en oxia (derivados **1**, **3**, **4** y **8** al **11**).

En el caso de los derivados **5**, **6** y **7** es preocupante que en su estado oxidado, presenten altos niveles de interacción con ADN y consecuentemente citotoxicidad, ya que esta característica perjudica el diseño racional de los mismos como profármacos selectivos en hipoxia. Por el contrario los miembros del tercer grupo (derivados **1**, **3**, **4** y **8** al **10**) serían buenos candidatos para estudiar la interacción con ADN de sus derivados reducidos. En particular, el compuesto **10** que además

presenta un buen perfil de citotoxicidad selectiva (sección 5.1) sería el más promisorio.

5.4. Bibliografía

1. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L. (2006) "Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update". *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327.
2. Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.; Aravena, M.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Bruno, A. (2006) "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins: Part II. Structure-activity relationship studies". *Medicinal Chemistry*, 2, 511-521.
3. Azqueta, A.; Pachón, G.; Cascante, M.; Creppy, E.; Monge, A.; López de Cerain, A. (2005) "Selective toxicity of a quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivative in human tumor cell lines". *Arzneimittel Forschung-Drug Research*, 55, 177-182.
4. Kim, J.Y.; Patterson, A.V.; Stratford I.J.; Hendry J.H. (2004) "The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the cytotoxicity of RH1 in human breast and non-small cell lung cancer cell lines". *Anticancer Drugs*, 15,71-77.
5. Wilson, W.R.; Hicks. K.O.; Pullen, S.M.; Ferry, D.M.; Helsby, N.A.; Patterson, A.V. (2007) "Bystander effects of bioreductive drugs: potential for exploiting pathological tumor hypoxia with dinitrobenzamide mustards". *Radiation Research*, 167, 625-36.
6. Ganley, B.; Chowdhury, G.; Bhansali, J.; Daniels, J.S.; Gates, K.S. (2001) "Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9, 2395-2401.
7. Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Cerecetto, H.; González, M. (2008) "Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides". *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1900-1906.
8. Lavaggi, M.L. (2009) "*Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: Desarrollo de profármacos selectivos de N,N'*- dióxido de fenazina". Tesis de Doctorado, Universidad de la República.
9. Wagner, H.; Blatt, S. (1996) "*Plant Drug Analysis*". Berlin, Springer-Verlag, pag. 359.
10. Van Holde, K.E.; Curtis Johnson, W.; Shing Ho, P. (2005) "*Principles of Physical*

Biochemistry". Estados Unidos, Prentice Hall.

11. Queiroz, M.; Castanheira, E.; Carvalho, M.; Abreu, A.; Ferreira, P.; Karadeniz, H.; Erdem, A. (2008) "New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA". *Tetrahedron*, 64, 382-391.
12. Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. (2005) "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods", *Biophysical Chemistry*, 116, 199-205.
13. Gatenby, R.; Gillies, R. (2004) "Why do cancer cells have high aerobic glycolysis?" *Nature Reviews in Cancer*, 4, 891-899.
14. Chi, Z.; Liu, R.; Sun, Y.; Wang, M.; Zhang, P.; Gao, C. (2010) "Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA" *Journal of Hazardous Materials*, 175, 274-278.
15. Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. (2005) "*Chimie bioorganique et médicinale du fluor*". Paris, CNRS Edition - EDP Sciences.
16. Smith, C.J.; Ali, A.; Hammond, M.L.; Li, H.; Lu, Z.; Napolitano, J.; Taylor, G.E.; Thompson, C.F.; Anderson, M.S.; Chen, Y.; Eveland, S.S.; Guo, Q.; Hyland, S.A.; Milot, D.P.; Sparrow, C.P.; Wright, S.D.; Cumiskey, A.-M.; Latham, M.; Peterson, L.B.; Rosa, R.; Pivnichny, J.V.; Tong, X.; Xu, S.S.; Sinclair, P.J. (2011) "Biphenyl-substituted oxazolidinones as cholesteryl ester transfer protein inhibitors: Modifications of the oxazolidinone ring leading to the discovery of Anacetrapib". *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 4880-4895.
17. Ohara, K.; Smietana, M.; Vasseur, J. J. (2006) "Characterization of specific noncovalent complexes between guanidinium derivatives and singlestranded DNA by MALDI". *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 17, 283-291.
18. Ohara, K.; Smietana, M.; Restouin, A.; Mollard, S.; Borg, J.-P.; Collette, Y.; Vasseur, J.-J. (2007) "Amine-guanidine switch: A promising approach to improve DNA binding and antiproliferative activities". *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 6465-6475.

6. Conclusiones

Se obtuvo diez nuevos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, con rendimientos medios a muy buenos.

A su vez se sintetizaron, con rendimiento moderado, los productos mono-reducido y completamente reducido del derivado **1**.

Se confirmó que el derivado **1** es susceptible de sufrir bio-reducción selectiva en condiciones de hipoxia, por acción de enzimas presentes en la fracción microsomal.

El conjunto de los derivados mostró una correlación lineal entre su capacidad para interaccionar con el ADN, estudiada en la sección 5.3, y su citotoxicidad en condiciones de normoxia (sección 5.1).

Se refutó la hipótesis que proponía que la protonación del grupo aminoguanidona presente en las cadenas laterales de algunos de los derivados incrementaría la afinidad por ADN. Por el contrario, condujo a un claro descenso de la misma.

El grado de unión al ADN se vio potenciado por las cadenas laterales que presentan grupos fenilo (familia B), sugiriendo un comportamiento similar al de los agentes bis-intercalantes.

A partir de los valores de interacción con ADN y del ensayo de citotoxicidad en normoxia / hipoxia, se concluye que los derivados **10** y **11** obtenidos en la presente tesis son los más promisorios para seguir trabajando en futuras investigaciones que modifiquen su estructura química y profundicen aspectos de su evaluación biológica.

7. Métodos experimentales

7.1. Síntesis y caracterización química

Los disolventes se destilan previo a su uso. Se utilizan reactivos comerciales: ALDRICH, JANSSEN, MERCK y FLUKA, entre otros. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de silicagel o alúmina con indicador fluorescente. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos: i) exposición a luz ultravioleta (254 nm), ii) asperjado con una disolución de 2,4-dinitrofenilhidrazina/H₂SO₄(c)/EtOH(75%) 1:5:30 (m/v/v) (reactivo de Brady), iii) asperjado con una mezcla de anisaldehído/H₂SO₄(c)/EtOH 1:4:95 (v/v/v) y posterior quemado, iv) exposición a vapores de yodo. Para la purificación mediante cromatografía en columna se utiliza silicagel (Merck, 60-230 mesh).

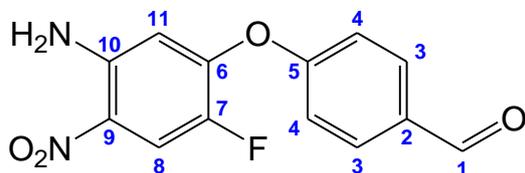
Los espectros de masa (EM) se realizan en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP 1100 EX. Se realizan ionizaciones de la muestra por impacto electrónico a 20 y 70 eV. Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los disolventes utilizados son cloroformo deuterado (CDCl₃) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las multiplicidades se designan como: **s** singulete, **d** doblete, **t** triplete, **c** cuarteto, **m** multiplete y **sa** señal ancha.

7.1.1. Síntesis de 4-(5-amino-2-fluor-4-nitrofenoxi)benzaldehído

Se adicionan 4,1 mmoles de carbonato de potasio y 4,1 mmoles de éter corona (18-crown-6) a una solución de 4,1 mmoles de *p*-hidroxibenzaldehído en 70,0 mL de tolueno. Se calienta a reflujo, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 15 minutos. El disolvente que condensa se hace pasar por tamices moleculares, que se ubican en un embudo ecualizador entre el condensador y el balón de reacción. Posteriormente se adicionan 4,5 mmoles de 4,5-difluoro-2-nitroanilina y se continúa calentando a reflujo, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 2 horas. Se destila a vacío el disolvente de reacción. El sólido así obtenido se disuelve en acetato de etilo y se extrae

utilizando como fase acuosa una solución de hidróxido de sodio. El producto de interés se obtiene en forma pura destilando a vacío la fracción orgánica.

4-(5-amino-2-fluoro-4-nitrofenoxi)benzaldehído



Rendimiento 90,7%. Sólido verde.

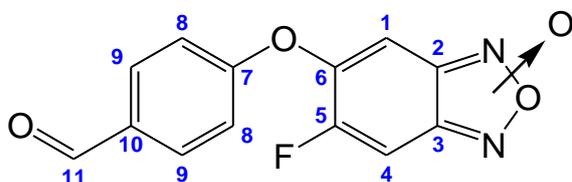
EM, m/z (%): 276 (M^+ , 100), 260 (M^+ -16, 2), 246 (M^+ -30, 10), 230 (M^+ -[NO₂], 10).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 10.01 (1H, s, H₁), 8.04 (1H, d, *J* 10.8Hz, H₈), 7.94 (2H, d, *J* 8.6 Hz, H₃), 7.21 (2H, d, *J* 8.6 Hz, H₄), 6.41 (1H, d, *J* 6.8 Hz, H₁₁).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 191.82, 160.71, 151.03, 146.55, 137.11, 132.56, 130.10, 127.48, 119.12, 114.49, 108.76.

7.1.2. Síntesis de *N*-óxido de 5(6)-fluoro-6(5)-(4-formilfenoxi)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol

Se disuelven 4,3 mmoles de 4-(5-amino-2-fluor-4-nitrofenoxi)benzaldehído en una mezcla de 19,0 mL de acetona y 12,0 mL de ácido acético glacial. Se agrega gota a gota, bajo agitación en baño de agua - hielo, una solución de 4,3 mmoles de nitrito de sodio y 1,2 mL de ácido clorhídrico (c) en 3,3 mL de agua. Se agita durante 30 minutos. Posteriormente se adiciona, también gota a gota, una solución de 4,3 mmoles de azida de sodio y 4,3 mmoles de acetato de sodio en 1,1 mL de agua. La mezcla de reacción se retira del baño de agua - hielo y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se destila a vacío la acetona y se agregan 50,0 mL de acetato de etilo. Se extrae la mezcla con una solución acuosa de hidróxido de sodio. Se destila a vacío la fracción orgánica y se disuelve el residuo en 75,0 mL de tolueno. Se calienta a reflujo durante 2 horas. Luego, el tolueno se destila al vacío. El producto se purifica por cromatografía en columna utilizando silicagel como fase estacionaria y una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2 como fase móvil.

***N*-Óxido de 5(6)-fluoro-6(5)-(4-formilfenoxi)benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol**

Rendimiento 71%. Sólido amarillo.

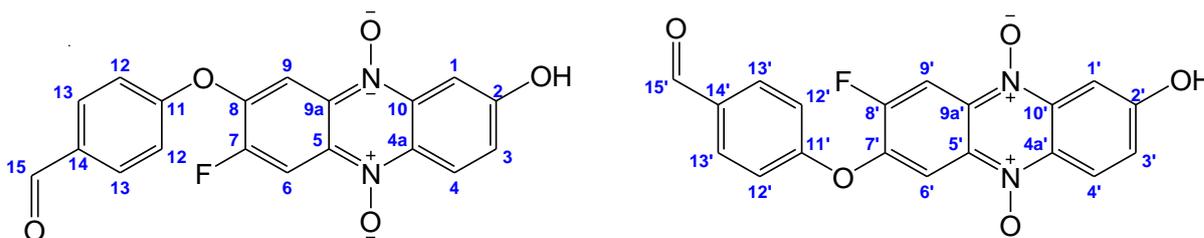
EM, m/z (%): 274 (M^+ , 100), 258 ($M^+ - [O]$, 15), 228 ($M^+ - [NO_2]$, 2), 213 ($M^+ - [N_2O_2] - [H]$, 85).

1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 10.05 (1H, s, H_{11}), 8.01 (2H, d, J 9.1 Hz, H_9), 7.30 (2H, d, J 9.0 Hz, H_8), 7.45-7.20 (1H, sa, H_1), 7.25-7.05 (1H, sa, H_4).

^{13}C RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 190.68, 159.38, 159.29, 149.04, 134.34, 132.66, 118.87, 118.41, 113.11.

7.1.3. Síntesis de derivados de *N,N'*-dióxido de 2-hidroxfenazina (derivados 1, 5, 7 y 9)

Bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara metóxido de sodio disolviendo 0,4 mmoles de sodio en 1,0 mL de metanol anhidro, en baño de cloruro de calcio – hielo ($-5^\circ C$). Por otro lado, se disuelven en 1,3 mL de metanol anhidro y 2,3 mL tetrahidrofurano anhidro, 1,8 mmoles del *N*-óxido de benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol correspondiente y 1,8 mmoles de *p*-hidroquinona. La mezcla se vuelca lentamente sobre la solución de metóxido de sodio en baño de cloruro de calcio - hielo. Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se refrigera a $-20^\circ C$ por otras 24 horas. El sólido resultante se filtra y se lava con tetrahidrofurano hasta obtener un sólido cristalino.

***N,N'*-dióxido de 7(8)-fluoro-8(7)-(4-formilfenoxi)-2-hidroxfenazina**

Rendimiento 57%. Sólido rojo.

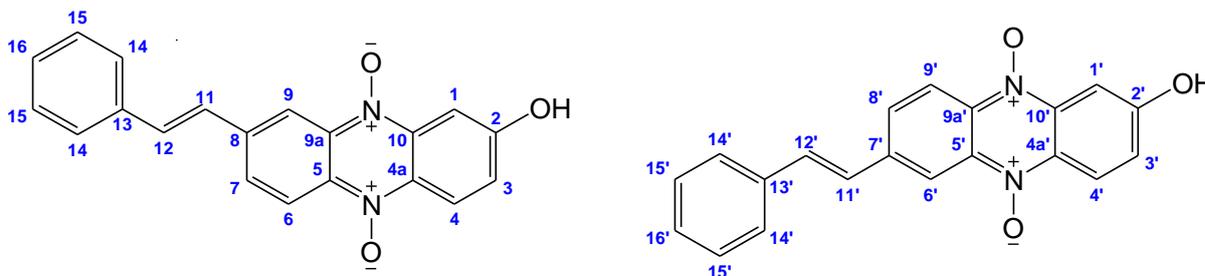
EM, m/z (%): 366 (M^+ , 7), 350 ($M^+ - [O]$, 100), 334 ($M^+ - 2[O]$, 55), 317 ($M^+ - 2[O]$

-[OH], 6), 305 ($M^+ - 2[O] - [HCO]$, 44).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 10.02 (1H, s, $H_{15'}$), 10.01 (1H, s, H_{15}), 8.46 (1H, d, J 10.8Hz, H_9), 8.44 (1H, d, J 9.6Hz, $H_{4'}$), 8.43 (1H, d, J 10.4Hz, H_6), 8.39 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.07 (2H, d, J 7.2Hz, $H_{13'}$), 8.05 (2H, d, J 8.8Hz, H_{13}), 8.03 (1H, d, J 8.4Hz, H_9), 7.95 (1H, d, J 7.6Hz, $H_{6'}$), 7.72 (1H, d, J 2.4Hz, H_1), 7.66 (1H, d, J 2.4Hz, H_1), 7.50-7.45 (6H, dd, J_1 8.8 Hz, J_2 2.4Hz; $H_{3'}$, dd, J_2 2.4Hz; H_3 , d, J 7.2, H_{12} , $12'$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 192.28, 192.25, 161.22, 161.15, 160.31, 159.97, 157.47, 154.90, 148.60, 148.44, 147.15, 146.98, 137.28, 137.27, 133.77, 133.57, 133.54, 133.45, 132.74, 132.71, 131.99, 131.49, 125.71, 125.53, 122.12, 122.09, 119.93, 119.52, 109.81, 108.62, 107.01, 106.76, 100.01, 99.94.

N,N'-dióxido de 7(8)-(E-2-feniletetil)-2-hidroxfenazina

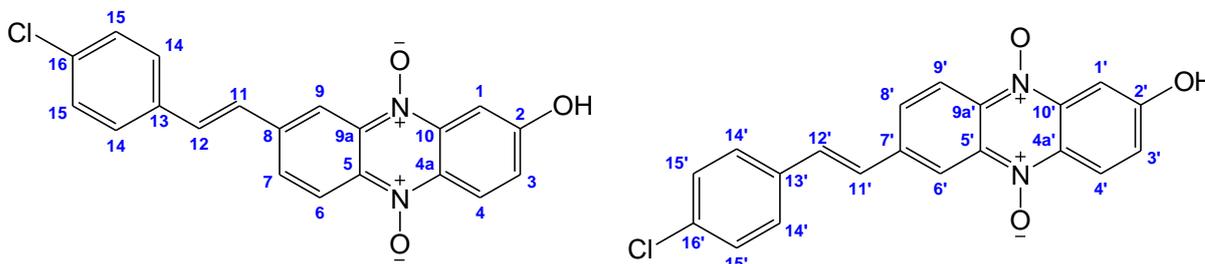


Rendimiento 36%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 330 (M^+ , 1), 314 ($M^+ - [O]$, 14), 297 ($M^+ - [O] - [OH]$, 100), 282 ($M^+ - 2[O] - [OH]$, 1).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.55 (1H, d, J 1.3Hz, $H_{6'}$), 8.54 (1H, d, J 1.2Hz, H_9), 8.49 (1H, d, J 9.3Hz, H_6), 8.47 (1H, d, J 9.0Hz, $H_{9'}$), 8.44 (1H, d, J 9.7Hz, $H_{4'}$), 8.44 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.26 (1H, dd, J_1 9.4Hz, J_2 1.4Hz, H_8), 8.18 (1H, dd, J_1 9.6Hz, J_2 1.4Hz, H_7), 7.72 (2H, d, J 7.34Hz, H_{15}), 7.72 (2H, d, J 7.2Hz, $H_{15'}$), 7.64 (1H, d, J 18.0Hz, H_{11}), 7.69 (1H, s, $H_{1'}$), 7.63 (1H, d, J 16.8Hz, $H_{11'}$), 7.68, (1H, s, H_1), 7.60 (1H, d, J 17.3Hz, H_{12}), 7.58 (1H, d, J 16.4Hz, $H_{12'}$), 7.43 (4H, m, H_{14} , $H_{14'}$, H_{16} , $H_{16'}$), 7.35 (1H, d, J 7.18Hz, H_3), 7.34 (1H, d, J 7.2Hz, $H_{3'}$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 162.29, 162.18, 150.04, 149.08, 141.50, 140.52, 139.03, 137.74, 137.26, 136.96, 136.89, 136.71, 136.37, 135.31, 134.48, 133.80, 133.42, 133.34, 132.80, 131.76, 131.52, 130.98, 129.31, 129.18, 127.64, 127.55, 122.11, 122.01, 120.55, 120.12, 117.60, 117.22, 116.72, 112.76, 100.10, 99.97.

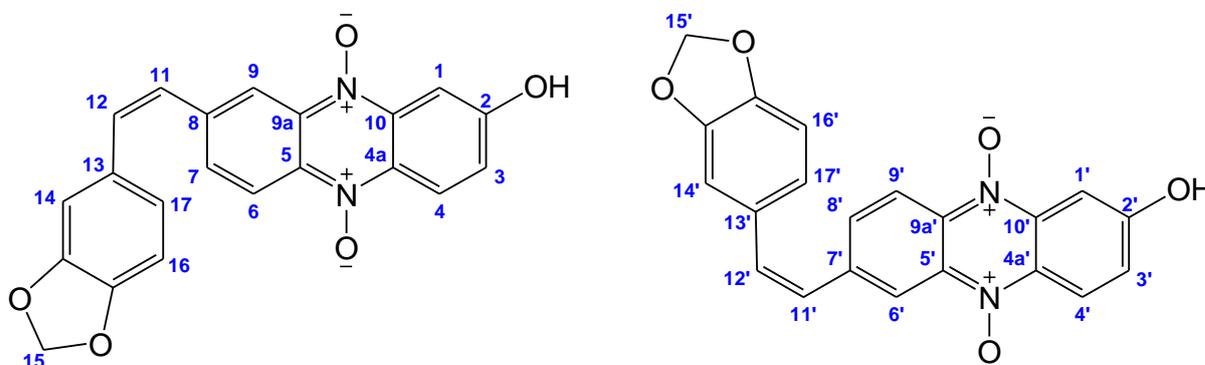
***N,N'*-dióxido de 7(8)-[*E*-2-(4-clorofenil)etenil]-2-hidroxifenazina**

Rendimiento 77%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 364 (M^+ , 4), 347 (M^+ -[OH], 17), 332 (M^+ -[O] -[OH], 64), 297 (M^+ -[O] -[OH] -[Cl], 17).

^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.56 (1H, d, J 1.2Hz, $H_{6'}$), 8.54 (1H, d, J 1.2Hz, H_9), 8.50 (1H, d, J 9.7Hz, H_6), 8.48 (1H, d, J 9.8Hz, $H_{9'}$), 8.43 (1H, d, J 9.6Hz, $H_{4'}$), 8.43 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.24 (1H, dd, J_1 9.2Hz, J_2 1.5Hz, H_8), 8.17 (1H, dd, J_1 9.3Hz, J_2 1.4Hz, H_7), 7.75 (2H, d, J 8.6Hz, H_{15}), 7.74 (2H, d, J 8.6Hz, $H_{15'}$), 7.66 (1H, d, J 16.4Hz, H_{11}), 7.65 (1H, d, J 2.5Hz, $H_{1'}$), 7.64 (1H, d, J 16.5Hz, $H_{11'}$), 7.64 (1H, d, J 2.8Hz, H_1), 7.60 (1H, d, J 16.8Hz, H_{12}), 7.57 (1H, d, J 16.4Hz, $H_{12'}$), 7.49 (2H, d, J 8.6Hz, H_{14}), 7.49 (2H, d, J 8.5Hz, $H_{14'}$), 7.43 (1H, dd, J_1 9.6Hz, J_2 2.5Hz, H_3), 7.42 (1H, dd, J_1 9.6Hz, J_2 2.5Hz, $H_{3'}$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 161.91, 161.19, 141.35, 139.51, 136.90, 136.12, 134.77, 134.63, 134.27, 133.26, 132.55, 132.18, 131.73, 131.34, 130.19, 130.08, 129.52, 129.20, 129.13, 129.06, 128.19, 128.00, 127.91, 127.58, 126.44, 126.01, 125.34, 125.20, 123.76, 123.48, 120.18, 119.35, 116.61, 116.18, 98.71, 98.13.

***N,N'*-dióxido de 7(8)-[*E*-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]-2-hidroxifenazina**

Rendimiento 19%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 374 (M^+ , 4), 357 (M^+ -[OH], 21), 341 (M^+ -[O] -[OH], 46), 328 (M^+

-[O₂CH₂], 2).

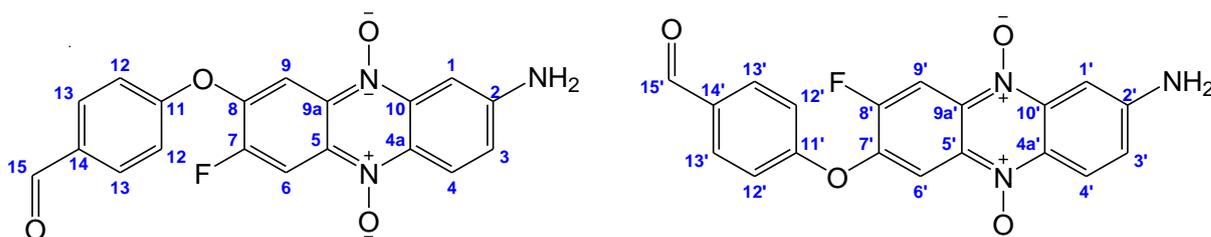
¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ: 8.32 (1H, s, H_{6'}), 8.26 (1H, d, *J* 7.9Hz, H₆), 8.26 (1H, s, *J* 9.1Hz, H₉), 8.18 (1H, d, *J* 9.3Hz, H₉), 8.16 (1H, d, *J* 8.1Hz, H_{4'}), 8.14 (1H, d, *J* 7.6Hz, H₄), 7.89 (2H, dd, *J*₁ 7.3Hz, *J*₂ 2.0Hz, H₇, H_{8'}), 7.52 (1H, d, *J* 2.0Hz, H_{1'}), 7.50 (1H, d, *J* 2.0Hz, H₁), 7.33 (1H, dd, *J*₁ 9.6Hz, *J*₂ 2.0Hz, H₃), 7.31 (1H, dd, *J*₁ 9.6Hz, *J*₂ 1.9Hz, H₃), 6.87 (1H, d, *J* 6.5Hz, H₁₁), 6.85 (1H, d, *J* 7.0Hz, H_{11'}), 6.81 (1H, d, *J* 8.4Hz, H₁₆), 6.80 (1H, d, *J* 7.6Hz, H_{16'}), 6.80 (1H, d, *J* 7.8Hz, H₁₇), 6.79 (1H, d, *J* 8.1Hz, H_{17'}), 6.75 (2H, s, H₁₄, H_{14'}), 6.71 (1H, d, *J* 6.0Hz, H_{12'}), 6.68 (1H, d, *J* 6.2Hz, H₁₂), 6.04 (1H, s, H_{15'}), 6.03 (1H, s, H₁₅).

¹³C RMN (400 MHz, DMSO) δ: 151.26, 151.11, 147.91, 147.76, 146.82, 146.51, 137.23, 136.88, 136.21, 136.14, 135.69, 134.15, 133.51, 132.28, 131.08, 131.50, 130.92, 130.71, 129.64, 129.19, 128.79, 128.55, 127.32, 127.04, 126.24, 125.94, 125.36, 125.22, 122.37, 121.81, 120.66, 120.17, 119.31, 118.54, 117.91, 117.00, 110.29, 109.47, 99.01, 97.96, 94.87, 94.56.

7.1.4. Síntesis de derivados de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina (derivados **2**, **6**, **8** y **10**)

Bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara metóxido de sodio disolviendo 0,4 mmoles de sodio en 1,0 mL de metanol anhidro, en baño de cloruro de calcio – hielo (-5°C). Por otro lado, se disuelven en 1,3 mL de metanol anhidro y 2,3 mL tetrahidrofurano anhidro, 1,8 mmoles del *N*-óxido de benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol correspondiente y 1,8 mmoles de *p*-aminofenol. La mezcla se vuelca lentamente sobre la solución de metóxido de sodio en baño de cloruro de calcio - hielo. Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se refrigera a -20 °C por otras 24 horas. El sólido resultante se filtra y se lava con tetrahidrofurano hasta obtener un sólido cristalino.

N,N'-dióxido de 7(8)-fluoro-8(7)-(4-formilfenoxi)-2-aminofenazina

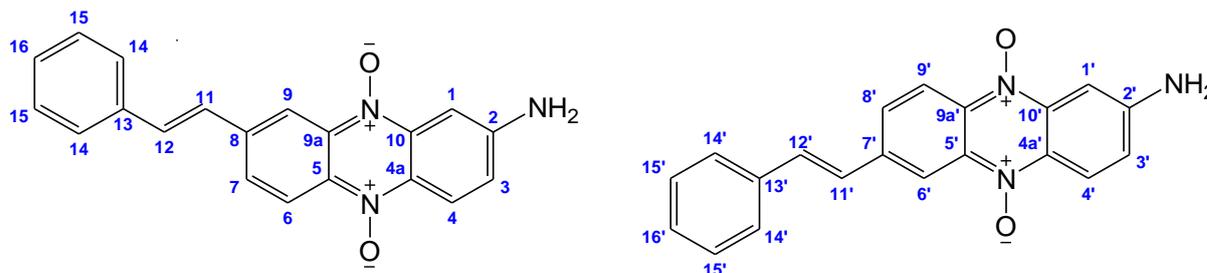


Rendimiento 22%. Sólido negro.

El producto se obtiene como la mezcla de los productos de interés y las iminas correspondientes (ver discusión en la sección 4.3.4).

EM, m/z (%): 365 (M^+ , 3), 349 ($M^+ - [O]$, 100), 333 ($M^+ - 2[O]$, 61), 304 ($M^+ - 2[O] - [HCO]$, 19).

N,N'-dióxido de 7(8)-(E-2-feniletetil)-2-aminofenazina



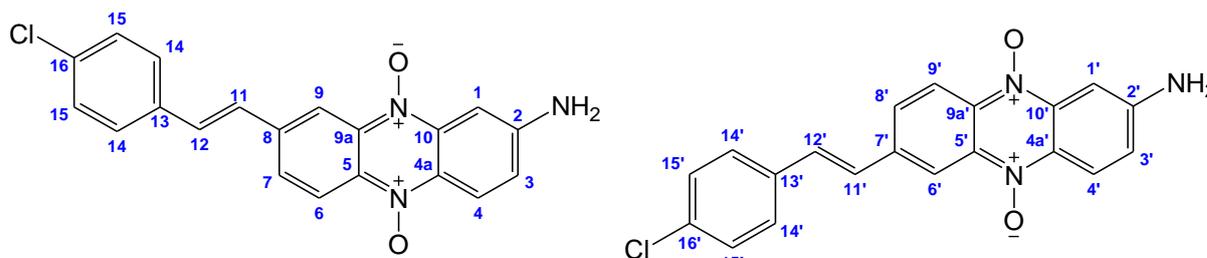
Rendimiento 47%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 329 (M^+ , 2), 313 ($M^+ - [O]$, 37), 297 ($M^+ - 2[O]$, 47), 281 ($M^+ - 2[O] - [NH_2]$, 1).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.43 (1H, s, H_{6'}), 8.40 (1H, s, H₉), 8.34 (1H, d, *J* 8.7Hz, H₆), 8.25 (1H, d, *J* 10.0Hz, H₉), 8.14 (1H, d, *J* 9.5Hz, H_{4'}), 8.14 (1H, d, *J* 9.5Hz, H₄), 8.14 (1H, d, *J* 9.3Hz, H_{8'}), 8.06 (1H, d, *J* 9.3Hz, H₇), 7.63 (2H, d, *J* 7.2Hz, H₁₅), 7.60 (2H, d, *J* 6.9Hz, H_{15'}), 7.49 (1H, d, *J* 17.5Hz, H₁₁), 7.47 (1H, d, *J* 15.8Hz, H_{11'}), 7.46 (1H, s, H_{1'}), 7.46 (1H, s, H₁), 7.40 (1H, d, *J* 17.3Hz, H₁₂), 7.37 (1H, d, *J* 15.1Hz, H_{12'}), 7.32 (4H, m, H₁₄, H_{14'}, H₁₆, H_{16'}), 7.26 (1H, d, *J* 8.1Hz, H₃), 7.20 (1H, d, *J* 7.5Hz, H_{3'}).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 157.64, 157.17, 150.10, 149.97, 144.74, 139.00, 138.27, 137.30, 136.68, 136.34, 135.54, 135.44, 134.24, 133.45, 133.37, 133.30, 129.23, 128.97, 127.86, 127.57, 127.44, 127.14, 126.67, 126.47, 126.40, 125.94, 125.74, 123.04, 122.87, 120.81, 117.22, 116.92, 113.09, 112.98, 101.49, 100.26.

N,N'-dióxido de 7(8)-[E-2-(4-clorofenil)etenil]-2-aminofenazina



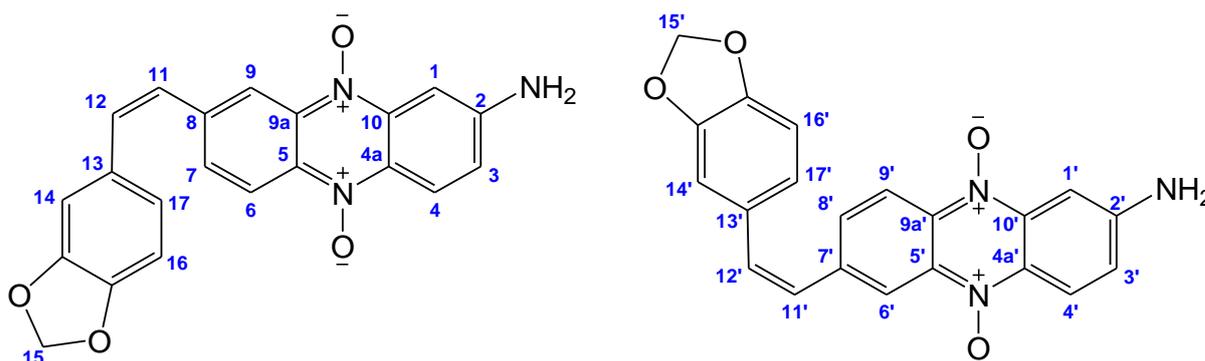
Rendimiento 79%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 363 (M^+ , 5), 347 ($M^+ - [O]$, 30), 331 ($M^+ - 2[O]$, 39), 328 ($M^+ - [Cl]$, 2).

^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.55 (1H, d, J 1.2Hz, H_6), 8.53 (1H, d, J 1.3Hz, H_9), 8.49 (1H, d, J 9.4Hz, H_6), 8.47 (1H, d, J 9.4Hz, H_9), 8.43 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.42 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.23 (1H, dd, J_1 9.5Hz, J_2 1.4Hz, H_8), 8.16 (1H, dd, J_1 9.3Hz, J_2 1.6Hz, H_7), 7.74 (2H, d, J 8.5Hz, H_{15}), 7.73 (2H, d, J 8.5Hz, $\text{H}_{15'}$), 7.66 (1H, d, J 16.3Hz, H_{11}), 7.66 (1H, d, J 3.0Hz, $\text{H}_{1'}$), 7.64 (1H, d, J 16.7Hz, $\text{H}_{11'}$), 7.60, (1H, d, J 2.8Hz, H_1), 7.58 (1H, d, J 16.7Hz, H_{12}), 7.56 (1H, d, J 16.7Hz, $\text{H}_{12'}$), 7.48 (2H, d, J 8.3Hz, H_{14}), 7.48 (2H, d, J 8.5Hz, $\text{H}_{14'}$), 7.43 (1H, dd, J_1 9.6Hz, J_2 3.0Hz, H_3), 7.42 (1H, dd, J_1 9.6Hz, J_2 2.9Hz, H_3).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 162.87, 162.79, 140.21, 138.60, 137.82, 137.39, 136.30, 135.95, 135.87, 135.31, 134.30, 133.39, 133.34, 133.25, 131.87, 131.42, 131.28, 130.92, 129.39, 129.29, 129.23, 129.14, 129.08, 128.16, 128.12, 127.50, 126.55, 126.20, 122.02, 121.92, 120.58, 120.12, 117.85, 117.45, 99.99, 99.86.

N,N'-dióxido de 7(8)-[*E*-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]-2-aminofenazina



Rendimiento 30%. Sólido negro.

EM, m/z (%): 373 (M^+ , 2), 357 ($\text{M}^+ - [\text{O}]$, 44), 341 ($\text{M}^+ - 2[\text{O}]$, 42), 327 ($\text{M}^+ - [\text{O}_2\text{CH}_2]$, 1).

^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.38 (1H, d, J 1.5Hz, H_6), 8.36 (1H, d, J 1.5Hz, H_9), 8.32 (1H, d, J 9.1Hz, H_6), 8.32 (1H, d, J 9.0Hz, H_9), 8.31 (1H, d, J 10.0Hz, H_4), 8.30 (1H, d, J 9.0Hz, H_4), 7.61 (1H, dd, J_1 9.3Hz, J_2 1.7Hz, H_8), 7.50 (1H, dd, J_1 9.2Hz, J_2 1.6Hz, H_7), 7.38 (1H, d, J 2.3Hz, $\text{H}_{1'}$), 7.36 (1H, d, J 2.3Hz, H_1), 7.34 (1H, dd, J_1 9.4Hz, J_2 2.3Hz, H_3), 7.33 (1H, dd, J_1 9.5Hz, J_2 2.2Hz, H_3), 6.85 (2H, d, J 8.5Hz, H_{11} , $\text{H}_{11'}$), 6.80 (2H, d, J 7.8Hz, H_{16} , $\text{H}_{16'}$), 6.79 (2H, d, J 7.7Hz, H_{17} , $\text{H}_{17'}$), 6.78 (2H, d, J 8.4Hz, H_{12} , $\text{H}_{12'}$), 6.77 (2H, s, H_{14} , $\text{H}_{14'}$), 6.02 (1H, s, H_{15}), 6.01 (1H, s, $\text{H}_{15'}$).

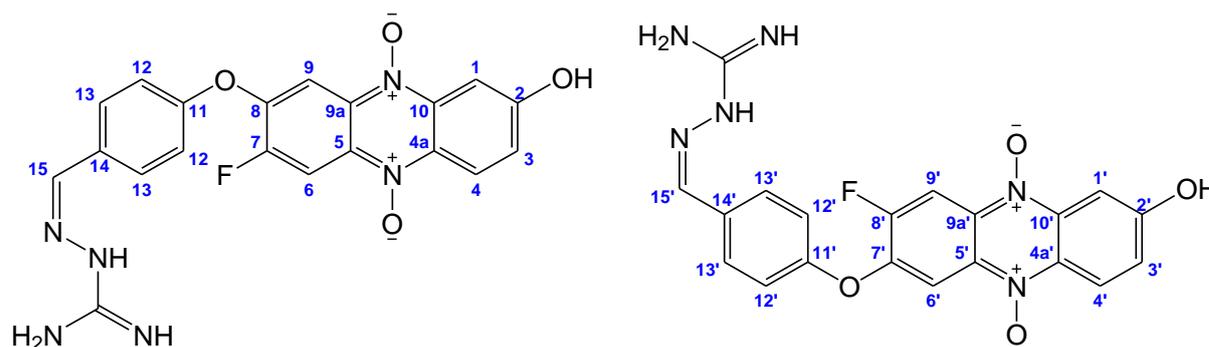
^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 152.44, 152.31, 147.78, 147.64, 147.52, 147.45, 140.49, 137.98, 137.90, 137.65, 135.99, 134.89, 134.04, 133.37, 133.17, 132.92,

132.23, 132.07, 130.44, 130.39, 130.36, 130.10, 129.82, 127.66, 127.59, 127.34, 125.16, 124.97, 123.62, 123.49, 121.41, 121.36, 119.99, 119.26, 119.15, 118.54, 109.17, 108.98, 101.61, 98.52, 94.28, 94.14.

7.1.5. Síntesis de derivados aminoguanidona (derivados **3** y **4**)

Se disuelven 0,4 mmoles del correspondiente *N,N'*-dióxido de 7(8)-formilfenoxifenazina (derivados **1** ó **2**) y 0,4 mmoles de bicarbonato de aminoguanidina en 2,5 mL de metanol. Se adicionan 2 gotas de ácido clorhídrico (c) y se agita a temperatura ambiente durante 8 horas. Posteriormente se adiciona 1,0 mL de éter etílico y se filtra la mezcla a vacío. El sólido así obtenido se lava con éter etílico hasta obtener un sólido cristalino.

N,N'-dióxido de 7(8)-fluoro-8(7)-[4-(aminoguanidil)fenoxi]-2-hidroxifenazina

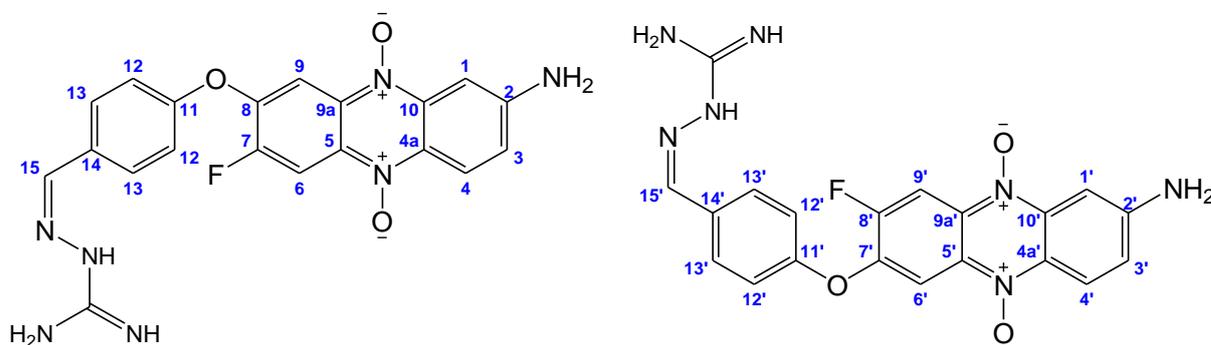


Rendimiento 55%. Sólido naranja.

EM, m/z (%): 420 ($M^+ - 2[H]$, 1), 364 ($M^+ - [CN_3H_4]$, 6), 348 ($M^+ - [CN_3H_4] - [O]$, 2), 331 ($M^+ - [CN_3H_4] - 2[O]$, 27).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.45 (1H, d, J 10.7Hz, H_9), 8.44 (1H, d, J 9.3Hz, H_4), 8.42 (1H, d, J 9.9Hz, H_6), 8.38 (1H, d, J 9.7Hz, $H_{4'}$), δ 8.25 (1H, s, H_{15}), 8.24 (1H, s, $H_{15'}$), 8.07 (2H, d, J 8.0Hz, H_{13}), 8.05 (2H, d, J 7.1Hz, $H_{13'}$), 7.83 (1H, d, J 8.0Hz, $H_{6'}$), 7.76 (1H, d, J 8.2Hz, H_9), 7.68 (2H, d, J 2.3Hz, $H_1, H_{1'}$), 7.50 (2H, dd, J_1 9.3 Hz, J_2 1.5Hz, $H_3, H_{3'}$), 7.43 (2H, d, J 8.6Hz, H_{12}), 7.40 (2H, d, J 8.0Hz, $H_{12'}$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 161.22, 161.02, 156.47, 156.17, 155.79, 153.59, 150.13, 149.98, 148.74, 146.31, 137.26, 137.13, 133.74, 131.95, 131.69, 131.47, 131.31, 131.02, 130.94, 130.49, 125.65, 125.34, 123.95, 122.09, 122.00, 121.04, 120.71, 120.37, 107.29, 107.12, 106.86, 106.24, 100.08, 99.98.

***N,N'*-dióxido de 7(8)-fluoro-8(7)-[4-(aminoguanidil)fenoxi]-2-aminofenazina**

Rendimiento 59%. Sólido negro.

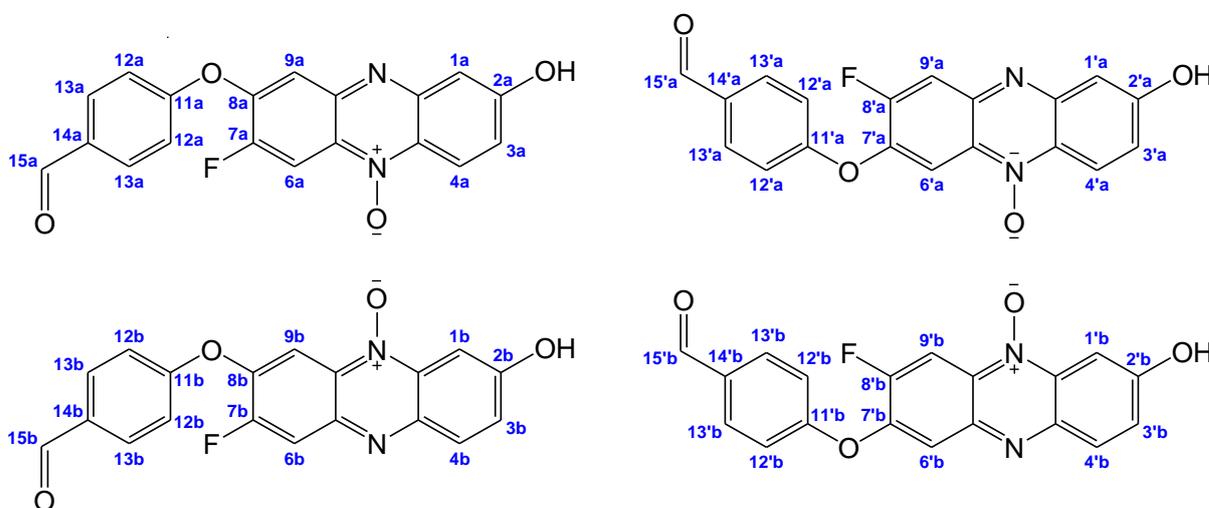
EM, m/z (%): 421 (M^+ , 2), 373 ($M^+ - 2[O] - [NH_2]$, 4), 363 ($M^+ - [CN_3H_4]$, 13), 363 ($M^+ - [CN_3H_4] - [NH_2]$, 2).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 8.32 (1H, d, J 9.8Hz, H_9), 8.29 (1H, d, J 9.1Hz, H_4), 8.27 (1H, d, J 9.6Hz, H_6), 8.25 (1H, d, J 9.8Hz, $H_{4'}$), δ 8.21 (1H, s, H_{15}), 8.19 (1H, s, $H_{15'}$), 8.04 (2H, d, J 8.2Hz, H_{13}), 8.02 (2H, d, J 7.6Hz, $H_{13'}$), 7.72 (1H, d, J 8.0Hz, $H_{6'}$), 7.65 (1H, d, J 8.4Hz, H_9), 7.53 (1H, d, J 2.1Hz, H_1), 7.49 (1H, d, J 1.8Hz, $H_{1'}$), 7.40 (4H, d, J 8.2Hz, H_{12} , $H_{12'}$), 7.35 (1H, dd, J_1 9.4 Hz, J_2 1.7Hz, H_3), 7.31 (1H, dd, J_1 9.6 Hz, J_2 1.6Hz, H_3).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 160.34, 159.53, 155.07, 154.69, 153.99, 152.85, 150.24, 150.12, 148.51, 145.22, 136.38, 135.91, 133.00, 131.17, 130.43, 129.87, 129.72, 129.32, 129.05, 128.58, 125.25, 125.20, 123.78, 122.01, 121.90, 121.17, 120.52, 120.13, 106.43, 106.14, 106.11, 105.32, 99.08, 98.73.

7.1.6. Síntesis de derivados de 2-hidroxi y 2-aminofenazina y *N*-óxido de 2-hidroxi y 2-aminofenazina (derivados 11 y 12)

Se disuelven 0,2 mmoles del *N,N'*-dióxido de fenazina en 7,0 mL de metanol. Se agregan, agitando simultáneamente, 2 gotas de ácido clorhídrico (c) y 0,8 mmoles de ditionito de sodio. La reacción se agita calentando a 50°C durante 3 horas. Se destila el disolvente a vacío y se trata el residuo con una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrae con acetato de etilo. La fracción orgánica se destila a vacío. El residuo es purificado por cromatografía en columna, utilizando silicagel como fase estacionaria y una mezcla hexano/acetato de etilo 4:6 como fase móvil. Se obtienen tanto el derivado monooxidado como el completamente reducido.

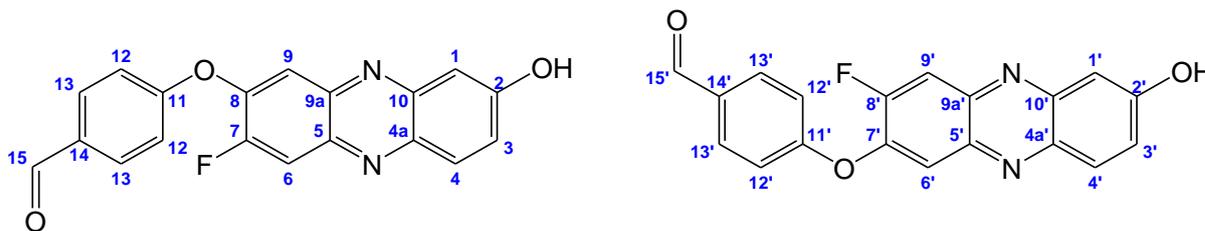
***N*-Óxido de 7(8)-fluoro-8(7)-formilfenoxi-2-aminofenazina**

Rendimiento 24%. Sólido amarillo.

EM, m/z (%): 350 (M^+ , 1), 279 ($M^+ - [HCO] - 2[N] - [O]$, 9), 263 ($M^+ - [HCO] - 2[N] - [O] - [OH]$, 1).

1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 10.04 – 9.98 (4H, m, H_{15a} $H_{15'a}$ H_{15b} $H_{15'b}$), 8,47 – 8,38 (4H, m, H_{4a} , $H_{4'a}$, H_{6a} , $H_{9'b}$), 8.24 (1H, d, J 11.2Hz, $H_{9'a}$), 8.19 (1H, d, J 10.6Hz, H_{6b}), 8.13 – 7.97 (12H, m, H_{4b} , $H_{4'b}$, H_{9a} , H_{9b} , H_{13a} , $H_{13'a}$, H_{13b} , $H_{13'b}$), 7.95 (1H, d, J 8.1Hz, $H_{6'a}$), 7.78 (1H, d, J 8.1Hz, $H_{6'b}$), 7.71 (1H, s, H_{1b}), 7.65 (1H, s, $H_{1'b}$), 7.59 – 7.34 (12H, m, H_{3a} , $H_{3'a}$, H_{3b} , $H_{3'b}$, H_{12a} , $H_{12'a}$, H_{12b} , $H_{12'b}$), 7.31 (1H, s, $H_{1'a}$), 7.27 (1H, s, H_{1a}).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 192.40, 192.25, 192.18, 161.19, 160.97, 160.86, 160.37, 153.49, 148.07, 147.96, 147.79, 147.63, 143.99, 143.89, 143.22, 143.12, 141.79, 141.67, 141.23, 140.81, 140.78, 140.51, 137.02, 137.00, 136.67, 136.34, 135.47, 134.80, 134.78, 134.61, 133.92, 133.58, 132.99, 132.71, 132.65, 132.63, 132.42, 132.36, 132.14, 131.03, 129.88, 129.35, 127.20, 126.94, 126.54, 126.51, 125.77, 125.73, 120.93, 120.88, 120.84, 120.56, 120.51, 120.33, 120.28, 119.72, 119.27, 119.20, 118.93, 118.46, 115.95, 115.77, 115.53, 114.77, 108.86, 108.80, 107.28, 106.03, 105.30, 105.06, 103.92, 102.69, 98.41, 98.28.

7(8)-fluoro-8(7)-formilfenoxi-2-aminofenazina

Rendimiento 19%. Sólido blanco.

EM, m/z (%): 334 (M^+ , 1), 317 (M^+ -[OH], 1), 315 (M^+ -[F], 1), 279 (M^+ -2[N] -[HCO], 11)

^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ : 10.01 (1H, s, H_{15}), 9.99 (1H, s, H_{15}), 8.20 (1H, d, J 11.6Hz, H_9), 8.15 (1H, d, J 12.4Hz, H_6), 8.12 (1H, d, J 9.2Hz, $H_{4'}$), 8.08 (1H, d, J 9.6Hz, H_4), 8.03 (2H, d, J 8.8Hz, $H_{13'}$), 8.01 (2H, d, J 8.8Hz, H_{13}), 7.93 (1H, d, J 8.8Hz, H_9), 7.80 (1H, d, J 8.8Hz, $H_{6'}$), 7.60 (1H, dd, J_1 9.9Hz, J_2 2.6Hz, $H_{3'}$), 7.43 (2H, d, J 8.8Hz, $H_{12'}$), 7.43 (1H, dd, H_3), 7.40 (2H, d, J 8.4Hz, H_{12}), 7.34 (1H, d, J 2.4Hz, H_1), 7.30 (1H, d, J 2.8Hz, H_1).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO) δ : 192.20, 192.16, 161.06, 160.99, 160.29, 160.28, 156.07, 155.90, 153.53, 153.51, 150.18, 147.24, 147.07, 146.22, 145.00, 144.97, 141.50, 141.49, 139.65, 139.61, 139.15, 139.14, 138.28, 138.19, 133.05, 132.83, 132.64, 132.62, 131.00, 130.99, 127.08, 127.07, 118.80, 118.32.

7.2. Ensayos biológicos**7.2.1. Ensayo de citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia**

Los estudios de actividad biológica se realizan con cultivos en suspensión de la línea celular V79 (fibroblastos de pulmón de hámster chino), obtenida de la ATCC (American Type Cell Culture Collection). El cultivo se prepara a partir de un cultivo en monocapa en crecimiento exponencial. Se tripsinizan las células y se realiza el recuento de la suspensión celular obtenida. Se ajusta el volumen para obtener una suspensión celular de 3×10^4 células/mL en medio mínimo esencial (DMEM líquido con HEPES 25 mM, suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina). Se dispensan 30 mL de esta suspensión celular en matraces Erlenmeyers de 50 mL con un agitador magnético en su interior.

Los matraces Erlenmeyers se cierran herméticamente con un tapón de goma y se colocan en un baño a 37 °C. Cada tapón se perfora con 2 agujas para posibilitar el

intercambio gaseoso. Un motor inmerso en el baño mantiene las células en agitación continua por el agitador magnético dentro del matraz. Éstos se gasifican con aire (condiciones de normoxia) o nitrógeno (condiciones de hipoxia) a través de tubos de goma conectados por un lado a balas de aire o nitrógeno y por otro lado a una de las agujas que perforan el tapón. Se gasifica a una presión de salida de 0,1 bar. Entre el tubo de goma y la aguja se coloca un filtro de 0.2 μm para evitar la contaminación. El aire y nitrógeno se humidifican haciéndolos burbujear en agua colocada en un frasco lavador de gases. Las células se gasifican durante 20 minutos antes de comenzar el tratamiento hasta su finalización, 2 horas después.

Los compuestos se disuelven en DMSO puro y se añaden 200 μL de estas disoluciones a los 30 mL de suspensión celular contenidos en cada matraz. Así, la concentración final de DMSO en el medio de cultivo no supera el 0.7 %. El tratamiento dura 2 horas. Se utiliza como control negativo DMSO puro. Posteriormente se interrumpe la gasificación, y el volumen total de cada matraz se traspasa a un tubo de centrifuga que se centrifuga a 175 g durante 5 minutos. Tras finalizar la centrifugación se retira el sobrenadante de los tubos y las células se resuspenden con jeringas de 2 mL y agujas 21G en 1mL de medio de cultivo. Se realiza el recuento de la suspensión celular con un hemocitómetro y se procede a la siembra de las células en placas de 6 pocillos. Por cada producto y concentración se siembra una placa: en 3 pocillos se siembran 100 células y en los otros 1000 células. En el caso del control negativo se siembran 3 pocillos con 60 células y otros 3 con 90 células.

7.2.2. Ensayo *in vitro* de bio-reducción en normoxia e hipoxia

Se disuelven 10 μL de MgCl_2 130 mM, 10 μL de NADP^+ 40 μM , 10 μL de glucosa-6-fosfato 350 mM y 10 μL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 50 U/mL en 950 μL de buffer fosfato (0,1M; EDTA 1,5 mM; pH 7,4). Para simular condiciones de hipoxia, la solución se gasea con nitrógeno durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionan 10 μL de una solución 40 μM del compuesto a estudiar en DMSO y fracciones microsomales o citosólicas obtenidas de un homogeneizado de hígado de rata Wistar de 3 semanas de 200g de peso corporal (1mg/mL). Se incuba la mezcla durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detiene agregando 400 μL de metanol. Los productos se aíslan realizando tres extracciones con 400 μL de

acetato de etilo. El disolvente orgánico se destila a vacío y se resuspende en un volumen mínimo de acetato de etilo. Los productos de metabolización se analizan por cromatografía en capa fina, comparándose con patrones de posibles metabolitos previamente sintetizados.

7.2.3. Evaluación de la capacidad de interacción con ADN

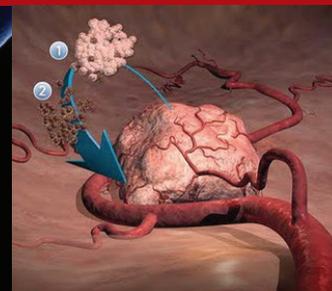
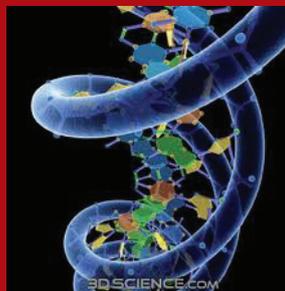
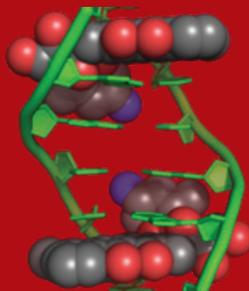
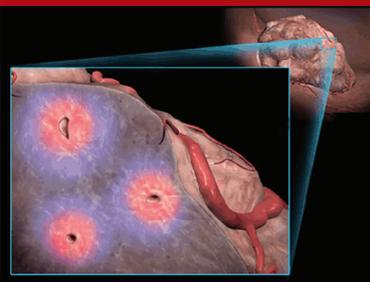
Se prepara una solución de ADN 2,5 mg/mL, disolviendo 12,5 mg de ADN puro de timo de ternera, (Sigma Chemical Co., USA) en 5,0 mL de buffer fosfato (50 mM; pH 6,0). La solución se agita magnéticamente a 4°C durante 16 h. A partir de esta solución se hacen las correspondientes diluciones.

Las medidas de fluorescencia se registran en un espectrofotómetro Varioskan Flash 2.4.1. Para los estudios de quenching se mantiene la concentración de compuesto constante (20 μ M) y se varía la concentración de ADN en un rango de 0 a 400 μ M, manteniendo constante el volumen de la solución, con un 20% de DMSO. Se incuba el compuesto con el ADN a 37°C durante 30 minutos y luego se procede a realizar las medidas. Los espectros de emisión se registran entre 425 nm y 825 nm, excitando a la longitud de onda de absorción máxima, con un ancho de banda de 12 nm. Todas las lecturas se realizan por triplicado.

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Ciencias
Licenciatura en Bioquímica
Tesis de graduación

Derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina como agentes
bio-reducibles en hipoxia que
interaccionan con ADN



Br. Marcos Nieves

Tutores de Tesis: Dr. Hugo Cerecetto y Dra. María Laura Lavaggi

Octubre 2011