



**Universidad de la República**  
**Informe de pasantía**  
**Licenciatura en Biología Humana**

**Perfil:**

**Biología Molecular y Química Orgánica aplicada a la biología humana**

**Título:** Precursores de compuestos híbridos combinando agrupamientos nitrona y 1,3-tiazol, inhibidores de caspasa-3, como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

**Estudiante:** Adriana Paola Silveira Coitiño.

**Tutor:** Maria Laura Lavaggi.

**Orientador de pasantía:** Maria Laura Lavaggi.

**Laboratorio de Química Biológica Ambiental de Rivera, Centro Universitario de Rivera. UdelaR.**

## Índice

1. Resumen .....	Pág 3
2. Introducción y antecedentes .....	Pág 5
3. Desarrollo de compuestos derivados de tiazol como inhibidores de caspasa .....	Pág 7
4. Objetivos .....	Pág 10
4.1 Objetivo general .....	Pág 10
4.2 Objetivo específico .....	Pág 10
5. Material y Métodos .....	Pág 10
5.1 Consideraciones generales de la síntesis orgánica .....	Pág 10
5.2 Síntesis del derivado de 4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol ( <b>1a</b> ) .....	Pág 11
5.3 Síntesis de 4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol ( <b>1b</b> ) .....	Pág 12
5.4 Síntesis de 4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol ( <b>1c</b> ) .....	Pág 12
5.5 Síntesis de 4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol ( <b>1d</b> ) .....	Pág 13
5.6 Síntesis de 4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol ( <b>2a</b> ) .....	Pág13
5.7 Determinación de las estructuras de los derivados sintetizados.....	Pág 13
6. Resultados .....	Pág 13
6.1 Ruta de la síntesis .....	Pág 14
6.2 Síntesis de derivados de 4-aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.....	Pág 14
7. Discusión .....	Pág 21
8. Conclusión.....	Pág 22
9. Perspectivas.....	Pág 22
10. Bibliografía .....	Pág 23
11. Anexo .....	Pág 25

**Título:** Precursores de compuestos híbridos combinando agrupamientos nitrona y 1,3-tiazol, inhibidores de caspasa-3, como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

### **1. Resumen:**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurológico progresivo e irreversible que deteriora de manera gradual la memoria y las capacidades cognitivas de la persona. La EA es una de las demencias más comunes en todo el mundo, aproximadamente 47 millones de personas fueron afectadas en el año 2015; esperándose que dentro de 35 años este número aumente a 131,5 millones.

Hasta la actualidad no se ha encontrado la cura para esta enfermedad, sí se utilizan fármacos para su tratamiento que suelen proporcionarle al paciente una mejora temporal a los síntomas, sin revertir o detener el daño neural que esta enfermedad ocasiona.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas para la síntesis de precursores de derivados híbridos de nitrona y 4-aril-1,3-tiazol como inhibidores de caspasa-3, diseñados y sintetizados por nuestro grupo de investigación en el marco de un proyecto de investigación de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

De los precursores sintetizados se logró obtener un rendimiento de 89% del derivado de 4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1a), siendo el mismo el de mayor rendimiento. Se obtuvo 43% del derivado 4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1b), del derivado 4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1c) 50%, del derivado 4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1d) se obtuvo el rendimiento de 40% y por último se logró obtener un rendimiento de 65% del derivado 4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol (2a). Los rendimientos obtenidos de estos precursores derivados híbridos de nitrona y 4-aril-1,3-tiazol están en el rango de buenos a moderados. La explicación en la diferencia de los rendimientos obtenidos de los distintos derivados sintetizados está relacionada con el efecto electrónico de los sustituyentes del anillo aromático del derivado de la bromoacetofenona de partida.

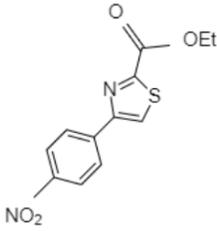
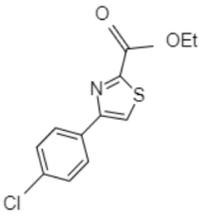
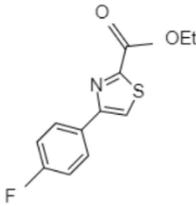
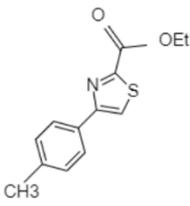
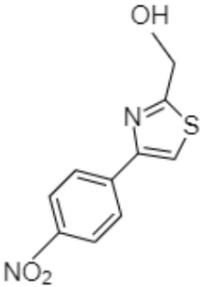
 <p>4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1a)</p>	 <p>4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1b)</p>
 <p>4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1c)</p>	 <p>4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1d)</p>
 <p>4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol (2a)</p>	

Tabla 1. Estructura de compuestos precursores de nitrona y tiazol.

**Palabras clave:** enfermedad de Alzheimer, síntesis de tiazol, caspasa-3.

## **2. Introducción y antecedentes**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico que provoca la muerte de las neuronas, causando un desorden neurológico avanzado que deteriora de manera gradual la memoria y las capacidades cognitivas de la persona. Además, puede ir acompañada de comportamientos como cambios de humor, desorientación, depresión y delirio. Esta enfermedad es una de las causas más comunes de demencia y aumenta de forma exponencial a medida que la edad avanza. La EA se presenta más frecuentemente en mujeres que en hombres y puede llegar a durar 10 años aproximadamente; durante los primeros años, los síntomas suelen ser escasos y la enfermedad se manifiesta de manera leve. Luego suele ir avanzando y provocando un deterioro mental en la memoria y la función cognitiva. Las personas afectadas con esta enfermedad, que se encuentran en la última etapa presentan síntomas como incapacidad de comunicación y deglución, además se vuelven pacientes dependientes de familiares o personas encargadas del cuidado de ellos y requieren una supervisión continua. La enfermedad de Alzheimer puede ser mortal debido a que ocasiona también complicaciones extra cerebrales (Dharmarajan *et al.*, 2009).

La EA es una de las demencias más comunes a nivel global, aproximadamente 47 millones de personas fueron afectadas en el año 2015; esperándose que dentro de 35 años este número aumente a 131,5 millones (Minini, *et al.*, 2017). Dada la sintomatología que presentan los pacientes, esta patología representa un problema importante para la salud pública ya que tiene un impacto socioeconómico alto. En especial las familias de bajos recursos económicos en las cuales existen personas afectadas por la enfermedad, no acceden a los cuidados paliativos que permiten mejorar la calidad de vida de los pacientes (World Alzheimer Report, 2015).

Hasta el momento no se ha encontrado un tratamiento efectivo para esta enfermedad, aunque se utilizan fármacos para su tratamiento, que suelen proporcionarle al paciente una mejora temporal a los síntomas, sin revertir o detener el daño neural que esta enfermedad ocasiona (Massoud & Léger, 2011).

La patología en la EA está caracterizada por un aumento en las placas amiloides extracelulares y enredos u ovillos neurofibrilares intraneurales, llevando a la destrucción de neuronas en distintas

zonas del cerebro y causando una deficiencia de acetilcolina. Esto se relaciona con la evaluación clínica que describe una pérdida progresiva de memoria, cambios en la personalidad y trastornos en el comportamiento (Ashrafian *et al.*, 2020).

Se ha identificado a la enzima caspasa-3 como un blanco molecular potencial para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. (Płóciennik *et al.*, 2015).

La caspasa-3 puede conducir a la escisión de la proteína precursora amiloide, a la formación de placas seniles extracelulares y de ovillos neurofibrilares intraneuronales, y a la pérdida neuronal. Además, contribuye a la disfunción de la plasticidad sináptica y cognitiva, más que nada en la etapa inicial de la enfermedad (Dharmarajan *et al.*, 2009).

Esta enzima participa en procesos apoptóticos en la etapa avanzada de la enfermedad y, además, es muy importante en la patogénesis de la EA ya que está involucrada en procesos no apoptóticos en las etapas iniciales de la misma (Płóciennik *et al.*, 2015).

La inhibición de caspasas no es una tarea sencilla debido a la función que cumplen estas enzimas en el funcionamiento normal de la célula. La inhibición reversible y selectiva de caspasa-3 con el objetivo de modular su sobre activación en condiciones patológicas surge como una alternativa terapéutica novedosa e interesante (McIlwain *et al.*, 2013).

De este modo, una regulación precisa de la actividad de la caspasa-3 en condiciones patológicas, podría controlar la aparición de procesos aberrantes sin afectar las funciones normales de la enzima. A la hora de diseñar inhibidores selectivos de la caspasa-3 es importante tener en cuenta que otras enzimas pueden presentar similitudes estructurales y de secuencia de aminoácidos que dificulten el diseño de los mismos. En ese sentido la caspasa-3 presenta un 56% de identidad de secuencia y un 73% de similitud con la caspasa-7 (Walsh *et al.*, 2008), siendo el grado de similitud con otras caspasas considerablemente más reducido. De esta manera se debería considerar en el diseño experimental si la inhibición de la caspasa-3 es selectiva en relación a la caspasa-7. Las caspasas, como otras proteasas, presentan un sitio extenso de unión al sustrato con subsitios definidos denominados S1-S5. Si bien los aminoácidos correspondientes a los subsitios S1 y S2 son iguales entre las caspasa-3 y caspasa-7, existen diferencias a nivel de los subsitios S3-S5 que pueden ser explotadas en la búsqueda de inhibidores selectivos (Figura 1) (Fang *et al.*, 2006 &

2009). De este modo se toma en cuenta para el diseño de los posibles inhibidores las diferencias a nivel de los subsitios de ambas enzimas para mejorar la selectividad de los compuestos.

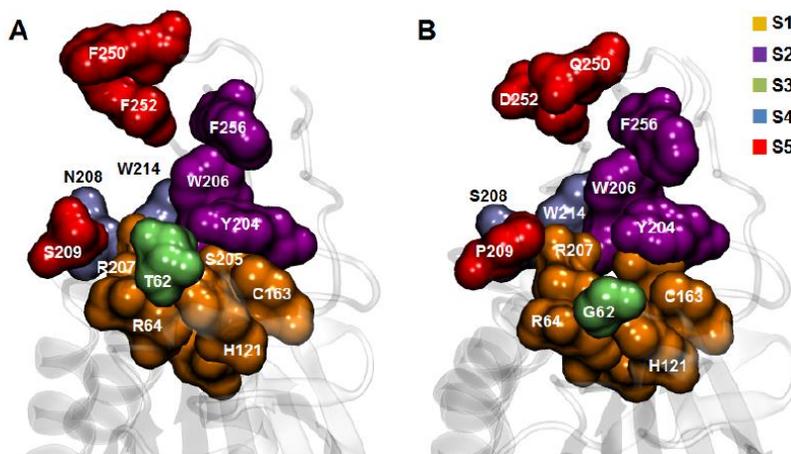


Figura 1. Residuos que forman parte de subsitios S1-S5 en la hendidura de unión del sustrato en las caspasa-3 (a) y caspasa-7 (b). Adaptado de referencia Cancela *et al*, 2020.

### **3. Desarrollo de compuestos derivados de tiazol como inhibidores de la caspasa-3.**

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en el desarrollo de derivados de 4-fenil-1,3-tiazol, (figura 2) como inhibidores de la caspasa-3. En observaciones preliminares, estos derivados presentaron buena actividad inhibitoria frente a la caspasa-3, se unen al sitio activo de la enzima realizando una acción recíproca con los residuos fundamentales para la estabilidad de la misma, alternando la dinámica de varios *loops* sustanciales para la actividad catalítica.

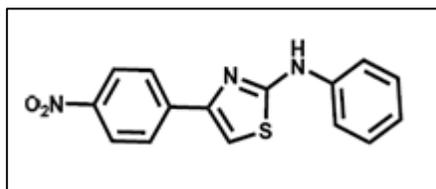


Figura 2. Derivado del 4-fenil-1,3 tiazol sintetizado por nuestro grupo.

Por otro lado, actualmente, se está desarrollando un proyecto de investigación sobre la síntesis y evaluación biológica de derivados híbridos de nitronas y 1,3-tiazol como fármacos con actividad neuroprotectora e inhibidora de la caspasa-3, figura 3. Para ello, está previsto sintetizar diversos compuestos diseñados derivados híbridos de nitrona y tiazol, y realizar estudios *in vitro* de actividad biológica e *in vivo* en un modelo de la EA.

Dichos derivados fueron diseñados considerando que el agrupamiento nitrona tiene capacidad neuroprotectora, y que algunos compuestos derivados sintetizados previamente han sido útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, además de la prolongación de la vida debido a sus efectos neuroprotectores (Cancela *et al.*, 2020). Estos derivados de nitronas fueron capaces de reducir significativamente el porcentaje de caspasa-3 activa en las células. La reducción de caspasa-3 activa puede darse mediante la interacción de las nitronas con la proteína induciendo cambios conformacionales en la misma y alterando su reconocimiento por medio de anticuerpos.

La síntesis de los compuestos objetivo se realiza en cuatro etapas, como se observa en la figura 4. La ruta sintética fue diseñada de manera que partiendo de bromoacetofenonas con distintos grupos sustituyentes en la posición 4 del anillo aromático y tiooxamato de etilo, se pudieran obtener los correspondientes derivados de 4-aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol. A nivel del anillo aromático de la bromoacetofenona de partida, se incluyen variaciones en los sustituyes en posición 4, de manera de incluir agrupamientos con diferentes propiedades estereo-electrónicas, que otorgan variabilidad a la serie diseñada. Atendiendo a la disponibilidad de reactivos, se incluyeron: el grupo nitro, halógenos (cloro y flúor) y el agrupamiento metilo.

Es importante que en los primeros pasos de la síntesis los derivados sean obtenidos con muy buenos rendimientos para poder obtener cantidades suficientes de los compuestos para realizar los distintos ensayos biológicos, especialmente para realizar los ensayos *in vivo*, que generalmente requieren de cantidades mayores a un gramo de compuesto sintetizado. En ese sentido, la presente pasantía se enmarca en la optimización de la primera etapa de la síntesis de los compuestos híbridos derivados de nitrona y 4-aril-1,3-tiazol.

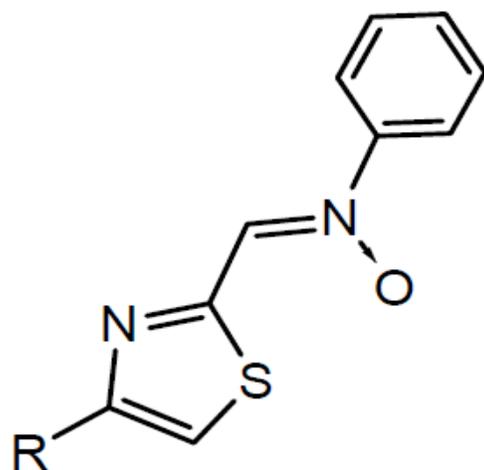


Figura 3. Estructura química del compuesto híbrido combinando el agrupamiento nitrona 1,3-tiazol

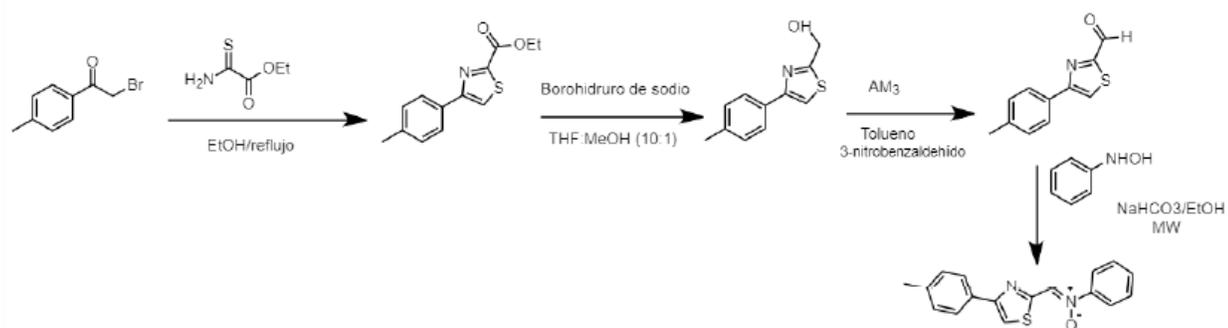


Figura 4. Ruta sintética para la obtención de compuestos híbridos con potencial inhibitorio de la caspasa-3.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Determinar las condiciones óptimas para la síntesis de precursores de derivados híbridos de nitrona y 4-aril-1,3-tiazol como posibles fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Síntesis química de derivados de 4-aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.
2. Síntesis química de derivados de 4-aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.
3. Análisis del efecto de los sustituyentes del anillo aromático en posición 4 en el rendimiento de los derivados sintetizados.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Consideraciones generales de la síntesis orgánica.**

Se utilizaron reactivos comerciales provenientes de Aldrich, Merck y Fluka con calidad P.A. Todos los disolventes utilizados se destilaron previo a su uso o se adquirieron comercialmente con calidad P.A. El avance de las reacciones y la pureza de los productos fue determinado por cromatografía en capa fina (TLC). Para ello se utilizaron placas de silicagel (Merck) con indicador fluorescente para observar la absorción de la luz ultravioleta de los compuestos. Las placas de TLC se revelaron por exposición a luz ultravioleta a 254 nm o 365 nm o exposición a vapores de yodo. Las cromatografías en columna (CC) fueron realizadas utilizando silicagel (Merck, 35-70  $\mu\text{m}$ ).

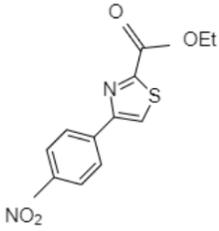
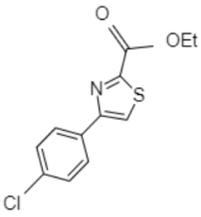
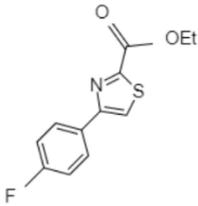
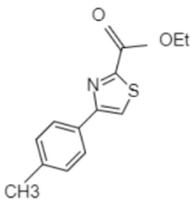
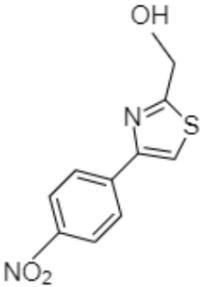
 <p>4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1a)</p>	 <p>4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1b)</p>
 <p>4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1c)</p>	 <p>4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (1d)</p>
 <p>4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol (2a)</p>	

Tabla 1. Estructura de compuestos precursores.

## 5. 2 Síntesis del derivado de 4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol **1a** (PF: 278 g/mol.):

Se partió de 0,25 g de 2-bromo-4'-nitroacetofenona como sólido ( $1,02 \times 10^{-3}$  moles, PF: 244,04 g/mol), y se lo hizo reaccionar con 0,143 g de tiooxamato de etilo ( $1,02 \times 10^{-3}$  moles, PF: 133,17 g/mol) en 25 mL de etanol. Se calentó a reflujo con agitación durante 5 horas. El control de la reacción se realizó por TLC de sílica gel como fase estacionaria y se utilizó como fase móvil una mezcla de hexano:acetato de etilo con una proporción 8:2. Posteriormente, se destiló el

disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano: acetato de etilo 8:2; fase estacionaria de sílica gel. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro. Rf: (TLC)= 0,68. (Anexo 1)

### 5.3 Síntesis de 4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol **1b** (PF: 267.45 g/mol):

Se partió de 0,25 g de 2-bromo-4'-cloroacetofenona como sólido ( $1,07 \times 10^{-3}$  moles, PF: 233,49 g/mol), y se lo hizo reaccionar con 0,143 g de tiooxamato de etilo ( $1,07 \times 10^{-3}$  moles, PF: 133,17 g/mol) en 25 mL de etanol. Se calentó a reflujo con agitación durante 7 horas y 30 minutos. El control de la reacción se realizó por TLC de sílica gel como fase estacionaria, empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo con una proporción 9:1. Completada la reacción se destiló el disolvente a vacío, se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Se logró obtener el producto deseado para luego purificarlo mediante cromatografía en columna de fase estacionaria de sílica gel, empleando una fase móvil compuesta de hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1. Se obtuvo un compuesto de color blanco. Rf: (TLC)= 0,75. (Anexo 1)

### 5.4 Síntesis de 4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol **1c** (PF: 251 g/mol.):

Se partió de 0,25 g de 2-bromo-4'-fluoroacetofenona como sólido ( $1,15 \times 10^{-3}$  moles, PF: 217,04 g/mol), y se lo hizo reaccionar con 0,153 g de tiooxamato de etilo ( $1,15 \times 10^{-3}$  moles; PF: 133,17 g/mol) en 25 mL de etanol. Se calentó a reflujo con agitación durante 5 horas. El control de la reacción se realizó por TLC de sílica gel como fase estacionaria, empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo con una proporción 9:1. Completada la reacción se destiló el disolvente a vacío, se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Se logró obtener el producto deseado para luego purificarlo mediante cromatografía en columna de fase estacionaria sílica gel, empleando una fase móvil compuesta de hexano: acetato de etilo en una proporción 9:1. Una vez evaporado a vacío, se obtuvo un compuesto de color blanco cristalino. Rf: (TLC)= 0,54. (Anexo 1)

#### 5.5 Síntesis de 4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol **1d** (PF: 246 g/ mol):

Se partió de 0,25 g de 2-bromo-4'-metilacetofenona como sólido ( $1,17 \times 10^{-3}$  moles; PF: 213,07 g/mol), y se lo hizo reaccionar con 0,155 g de tiooxamato de etilo ( $1,17 \times 10^{-3}$  moles, PF: 133,17 g/mol) en 25 mL de etanol. Se calentó a reflujo con agitación durante 4 horas. El control de la reacción se realizó por TLC de sílica gel como fase estacionaria, empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo con una proporción 9:1. Completada la reacción se filtró y se obtuvo un producto de color amarillo claro. Rf: (TLC)= 0,75. (Anexo 1)

#### 5.6 Síntesis de 4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol **2a** (PF: 234 g/mol):

Se colocaron a reaccionar 0,1 g del compuesto **1a** ( $4,03 \times 10^{-3}$  moles) con un reductor suave ( $\text{NaBH}_4$ ) disuelto en 4,65 mL de THF (Tetrahidrofurano) y 0,77 mL de metanol proporción 8,6:1,4. Se calentó a reflujo con agitación durante 6 horas. El control de la reacción se realizó mediante TLC de sílica gel como fase estacionaria, empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo con una proporción 8:2. Completada la reacción se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. Se obtuvo un sólido de color amarillo pálido. Rf: (TLC)= 0,42. (Anexo 1)

#### 5.7 Determinación de las estructuras de los derivados sintetizados:

En todos los casos, los derivados 1a-1d y 2a obtenidos fueron comparados mediante TLC con patrones de compuestos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación, los que a su vez fueron elucidados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). (Cancela, 2020).

### **6. Resultados**

En el presente trabajo se sintetizaron derivados precursores de la síntesis de híbridos de 4-aril-1,3- tiazol y fenilnitronas; empleando técnicas de síntesis orgánica convencional. La secuencia escogida para la síntesis consta de 4 pasos de reacción descrito en la figura 4.

### 6.1 Ruta de la síntesis de compuestos híbridos con potencial inhibitorio de la caspasa-3.

Para obtener los derivados de nitrona y 1,3-tiazol, se inicia la secuencia sintética a partir de la mezcla 2-bromoacetofenona con diferentes sustituyentes en la posición 4 del anillo aromático (grupo nitro, cloro, bromo y metilo) y tiooxamato de etilo, dando lugar a la ciclación del anillo de tiazol para obtener los derivados de 4-aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol mediante la reacción de Hantzsch, esta etapa se realiza a reflujo con etanol como disolvente (Hantzsch & Weber 1887). Luego en la segunda etapa, se realiza la reducción del grupo éster ubicado en la posición 2 del anillo de tiazol utilizando  $\text{NaBH}_4$  en THF:MeOH para obtener un grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}$  en la misma posición. En la tercer y cuarta etapa se realiza la oxidación del grupo alcohol a un grupo aldehído y posteriormente se pone a reaccionar con fenilhidroxilamina para lograr sintetizar los derivados de  $\alpha$ -(4-aril-1,3-tiazol-2-il)-N-fenilnitrona. En este trabajo se desarrolla la síntesis de precursores para estos derivados, descrita en la figura 5 en donde se realizan las etapas uno y dos (para uno de los derivados) de la secuencia completa.

### 6.2 Síntesis de derivados de 4-aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol

Partiendo de derivados de 2-bromoacetofenona adecuadamente sustituidos en posición 4 del anillo aromático (por los grupos nitro, cloro, bromo y metilo), y tiooxamato de etilo a reflujo en etanol, se realizó la síntesis del anillo tiazólico (figura 6).

Se planteó obtener derivados con sustituyentes con diferentes propiedades estero-electrónicas que incluyeran grupos electrón dadores y electrón atrayente para agregar variabilidad a la familia de compuestos a sintetizar.

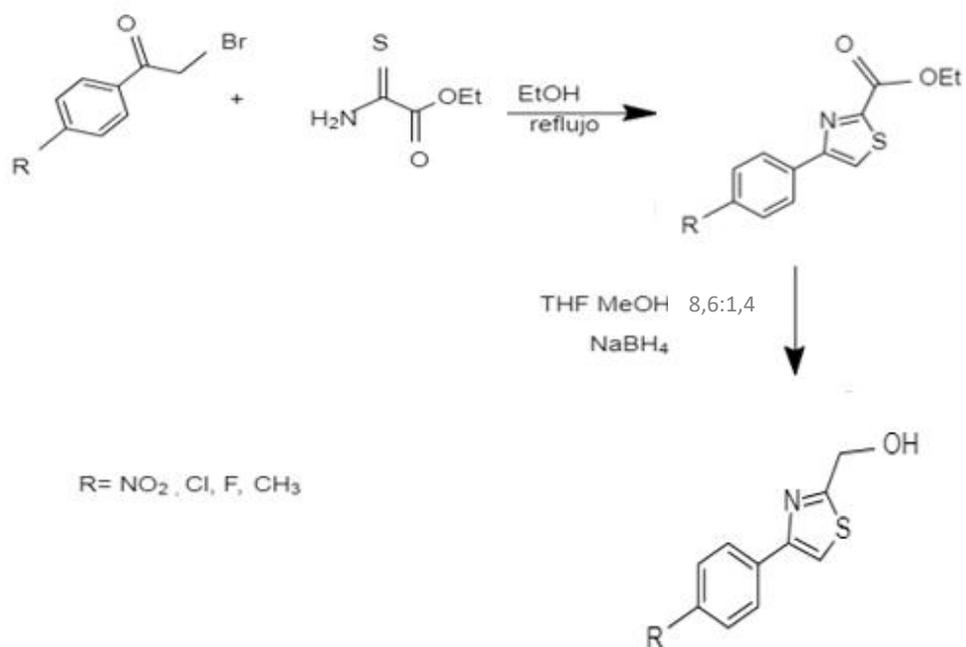


Figura 5. Ruta de síntesis para la obtención del tiazol y reducción de éster a alcohol.

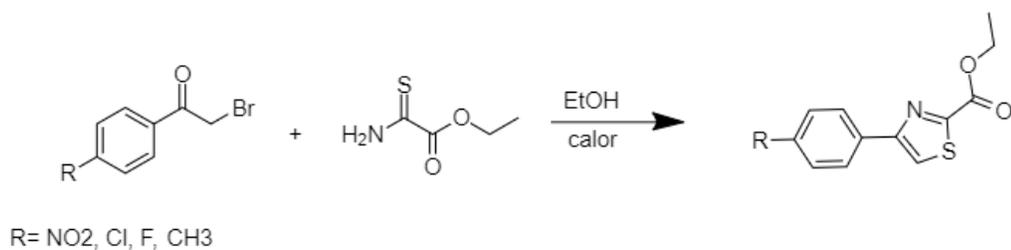


Figura 6. Ruta sintética de los compuestos 4-aryl-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.

La reacción de síntesis de todos los compuestos ocurre a través de la síntesis de Hantzsch que posibilita la formación del anillo tiazólico. Ocurre un ataque nucleofílico por parte del azufre que se encuentra en el tiooxamato de etilo (como sulfuro) al carbono alfa del derivado de la

bromoacetofenona, luego se da el ataque del nitrógeno de la imina del compuesto intermedio al carbonilo adyacente del anillo aromático, y formándose el anillo tiazólico (figura 7).

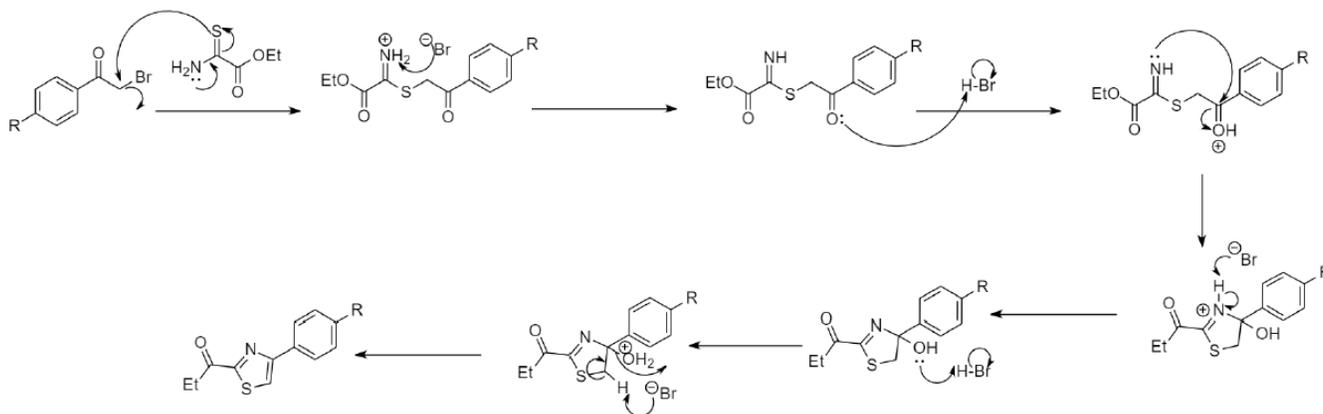


Figura 7. Mecanismo propuesto de síntesis del anillo de tiazol.

Para realizar la síntesis del derivado **1a** se partió de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona y tiooxamato de etilo, los cuales, a reflujo, condujeron a la formación del anillo tiazólico correspondiente, como se indica en la figura 8.

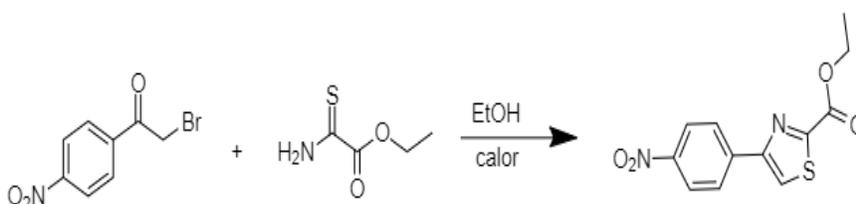


Figura 8. Síntesis del compuesto **1a**

En un primer paso, la reacción se realizó en 5 horas y posterior a su purificación se obtuvo un derivado con un rendimiento de 89 %. Como forma de optimizar este primer paso en la ruta sintética, se planteó realizar un escalado de la reacción, aumentando la masa de reactivos progresivamente, como se observa en la tabla 2.

En ese sentido se realizaron las siguientes reacciones:

N°de reacción	Tiempo (h, m)	Masa de 2-bromo-4'-nitroacetofenona (g)	Rendimiento %	Masa obtenida del producto 4-(4-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol ( <b>1a</b> ). (g)
I	5 h	0,050	89	0,052
II	5 h	0,200	50	0,119
III	5 h 50 m	0,200	59	0,141
IV	5 h	0,250	69	0,195
V	6 h 30 m	0,250	56	0,158
VI	7 h	0,250	77	0,217
VII	8 h	0,250	89	0,251

Tabla N° 2. Escalado de síntesis de derivados de 4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.  
(h)horas, (m)minutos.

En la reacción I, fue posible obtener el derivado de interés con un rendimiento de 89%, siendo el más alto de toda la serie (junto a la reacción VII). Durante el transcurso de la misma, se observó por TLC la aparición de un producto secundario, y que los reactivos de partida no se consumieron totalmente. Por lo tanto, se procedió a realizar una purificación mediante cromatografía en columna. En la reacción II, se cuadruplicó la masa de los reactivos y se realizó en el mismo tiempo que la reacción I. Se obtuvo un rendimiento visiblemente menor, 50%, y también fue necesario realizar una purificación en columna. En la reacción III, se cuadruplicó la masa de los reactivos y se aumentó el tiempo de reacción, lo que generó un leve aumento del rendimiento de la reacción, siendo el mismo un 59% (tabla 2).

En las siguientes reacciones (IV a VII) se quintuplicó la masa de los reactivos y se observó que la

a medida que aumentaba el tiempo de reacción, los rendimientos aumentaban, excepto en la reacción V que no sucedió de tal forma. En todos los casos fue necesario realizar un paso de purificación mediante cromatografía en columna. Cuando la reacción transcurrió en un tiempo de 8 horas, fue posible obtener el derivado de interés con un muy buen rendimiento (89%, reacción VII).

Considerando estos resultados, se realizó la síntesis de los derivados **1b-1d** en condiciones similares a las de las reacciones IV-VII de síntesis del derivado **1a**.

Para la síntesis del derivado **1b**, 4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol se puso a reaccionar 2-bromo-4'-cloroacetofenona y tiooxamato de etilo en etanol, a reflujo para formar el anillo tiazólico correspondiente (figura 9). El mismo se formó mediante el mecanismo de síntesis de Hantzsch al igual que el compuesto **1a**.

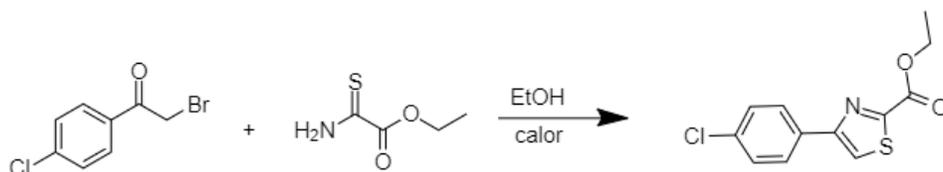


Figura 9. Síntesis del compuesto **1b**

La reacción se realizó durante 7 horas y 30 minutos y se detuvo cuando no se observó avance mediante su monitoreo por TLC. Se obtuvo el compuesto de interés mediante purificación por cromatografía en columna con un rendimiento de 43% y se obtuvo una masa práctica de 0,122 gramos.

Para realizar la síntesis del derivado **1c**, 4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, se partió de 2-bromo-4'-fluoroacetofenona y tiooxamato de etilo, los cuales, a reflujo, condujeron a la formación del anillo tiazólico por el mecanismo anteriormente descrito (figura 10)

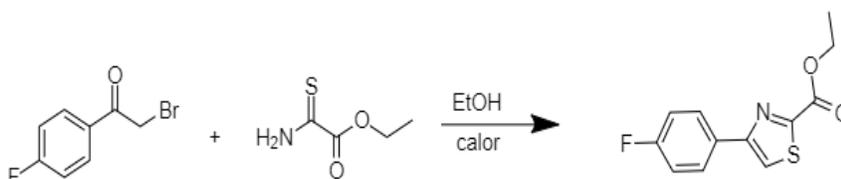


Figura 10. Síntesis del compuesto **1c**

La reacción se realizó durante 5 horas y se detuvo cuando no se observó avance mediante su monitoreo por TLC. Se obtuvo el derivado deseado mediante una purificación por cromatografía en columna con un rendimiento de 50% y se obtuvo una masa práctica de 0,144 gramos.

Para realizar la síntesis del derivado **1d**, 4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, se partió de 2-bromo-4'-metilacetofenona y tiooxamato de etilo. La reacción se sometió a reflujo durante 4 horas y condujo a la formación del anillo tiazólico correspondiente, al igual que los otros compuestos mencionados anteriormente (figura 11). El rendimiento de esta reacción fue de 40 % y una masa práctica de 0,114 gramos.

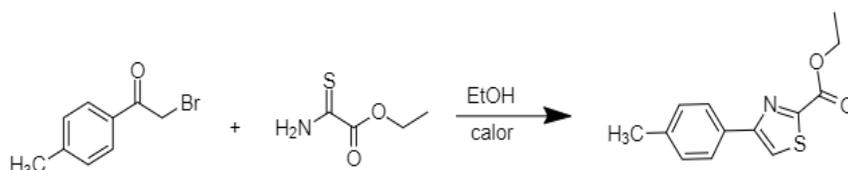


Figura 11. Síntesis del compuesto **1d**

A continuación, se muestra un resumen de las condiciones de obtención de los derivados con distintos grupos sustituyentes en el anillo de benceno (tabla 3):

Compuesto	Tiempo (h)	Masa de 2-bromo-4'-aril acetofenona (g)	Rendimiento	Masa obtenida de los productos
1a	8h	0,250	89%	0,251
1b	7 h 30 m	0,250	43%	0,122
1c	4 h	0,250	50%	0,144
1d	4 h	0,250	40%	0,114

Tabla 3. Condiciones de obtención de derivados tiazólicos con distintos grupos sustituyentes (h)horas, (m)minutos.

Para realizar la síntesis del derivado **2a**, 4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol, se partió de 100 mg de masa del producto **1a** y se puso a reaccionar con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) los cuales, a reflujo, condujeron a la reducción del grupo éster al alcohol correspondiente (figura 12). El producto de interés se obtuvo con un rendimiento del 65% y una masa práctica de 0,61 gramos.

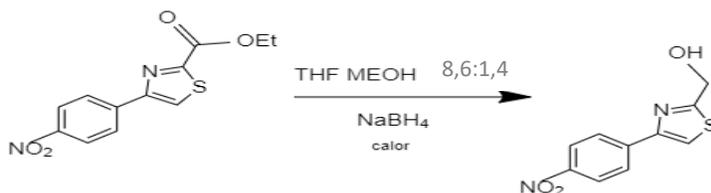


Figura 12. Reacción de obtención del compuesto **2a**.

## 7. Discusión:

El compuesto **1a** se obtuvo con un muy buen rendimiento y esto puede deberse a la presencia del agrupamiento nitro en la posición *para* del anillo aromático del derivado de la bromoacetofenona. El efecto electrónico del grupo nitro es electrón atrayente por efecto inductivo (-I) y electrón atrayente por efecto mesomérico (-M), por lo que podría contribuir a aumentar la electrofilia del carbonilo del derivado de la bromoacetofenona, y de esa manera contribuir a mejorar el rendimiento de la reacción ante el ataque nucleofílico del tiooxamato de etilo (figura 7).

Por otro lado, el rendimiento de obtención de los derivados **1b** y **1c** donde ambos son sustituyentes halógenos (cloro y flúor) es bueno, aunque menor al del derivado **1a**. El producto **1b** tiene al cloro como sustituyente, siendo electrón atrayente por efecto inductivo (-I) y electrón dador por efecto mesomérico (+M). El compuesto **1c** con sustituyente flúor posee las mismas características electrónicas que las del cloro, siendo más electronegativo que este. De esta manera, los sustituyentes cloro y flúor pueden contribuir a aumentar la electrofilia del carbonilo del derivado de la bromoacetofenona en menor medida que el sustituyente nitro del derivado **1a**, por lo que el rendimiento de reacción sería menor.

El compuesto **1d** con el sustituyente metilo posee características de electrón dador por efecto inductivo (+I) y no posee efecto mesomérico, por lo que no estaría contribuyendo a mejorar la electrofilia del carbonilo del derivado de la bromoacetofenona y puede explicar el rendimiento obtenido, el más bajo de toda la serie de compuestos sintetizados.

Es importante destacar que en la etapa de síntesis del derivado **1a** se observó que a medida que se aumenta la masa de reactivos se debe aumentar el tiempo la reacción para lograr un mayor rendimiento. En el caso de los derivados con sustituyentes halógenos y metilo en el anillo aromático, los rendimientos son menores con respecto al de la obtención del derivado **1a**. Este hecho podría deberse como se explicó anteriormente al efecto electrónico diferencial del grupo

nitro presente en el derivado **1a** con respecto a los derivados halogenados **1b** y **1c** y al derivado alquílico **1d**.

El derivado 2a fue obtenido con un buen rendimiento por lo que la metodología utilizada para la síntesis de este precursor sería adecuada para continuar con los siguientes pasos de la ruta sintética planteada para la obtención de los derivados híbridos de nitrona y tiazol.

## **8. Conclusiones:**

Fue posible obtener 4-(4'-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol con muy buenos rendimientos. Se determinó que el aumento del tiempo de reacción favorece el rendimiento cuando se realiza el escalado de la reacción.

Fue posible obtener 4-(4'-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, 4-(4'-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol y 4-(4'-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol con rendimientos de buenos a moderados. Fue posible obtener el derivado de 4-(4'-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol con muy buen rendimiento.

El efecto electrónico de los sustituyentes del anillo aromático del derivado de la bromoacetofenona de partida podría explicar la diferencia de rendimientos observados en la obtención de los derivados **1a-1d**.

## **9. Perspectivas:**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se continuará la ruta de síntesis planteada para lograr obtener los derivados híbridos de nitrona y tiazol deseado, estos derivados serán evaluados biológicamente para determinar su inhibición de caspasa 3 y determinar su potencial avance hacia fases posteriores de su desarrollo como fármaco.

## **10. Bibliografía:**

Ashrafian, H., Zadeh, E. H., & Khan, R. H. 2020. Review on Alzheimer's disease: inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *International journal of biological macromolecules* 167: 382-394.

Cancela, S. 2020. *Nitronas como potenciales fármacos neuroprotectores para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer: un abordaje multidisciplinario.2020* [Tesis de Maestría publicada]. Facultad de Química-UdelaR

Cancela, S., Canclini, L., Mourglia-Ettlin, G., Hernández, P., Merlino, A. 2020. Neuroprotective effects of novel nitrones: In vitro and in silico studies. *Eur J Pharmacol.* 871:172926. doi: 10.1016/j.ejphar.2020. 172926.

Dharmarajan, T. S., & Gunturu, S. G. 2009. Alzheimer's Disease: A Healthcare Burden of Epidemic Proportion. *American health & drug benefits* 2: 39-47.

Fang, B., Boross, P. I., Tozser, J., & Weber, I. T. 2006. Structural and Kinetic Analysis of Caspase-3 Reveals Role for S5 Binding Site in Substrate Recognition. *Journal of molecular biology* 360: 654-666.

Fang, B., Fu, G., Agniswamy, J., Harrison, R., Weber, I. 2009. Caspase-3 binds diverse P4 residues in peptides as revealed by crystallography and structural modeling. *Apoptosis* 14: 741–752.

Hantzsch, A., & Weber, J. 1887. Ueber verbindungen des thiazols (pyridins derthiophenreihe). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 20: 3118-3132.

Massoud, F., & Léger, G. 2011. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *The Canadian Journal of Psychiatry* 56: 579-588.

McIlwain, D., Berger, T., Mak, T. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–28.

Minini, L., Ferraro, F., Cancela, S., Merlino, A. 2017. Insight into the mechanism of action and selectivity of caspase-3 reversible inhibitors through in silico studies. *Journal of Molecular Structure* 1147: 558-568

Płóciennik, A., Predecki, M., Zuba, E., Siudzinski, M., Dorszewska, J. 2015. Activated Caspase-3 and Neurodegeneration and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease. *Advances in Alzheimer's Disease* 04: 63–77.

Walsh, J., Cullen, S., Sheridan, C., Lüthi, A., Gerner, C., Martin, S. 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 12815–12819.

World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends,2015. *Recuperado de* <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>.

## 11. Anexo

- Cromatografía en capa fina correspondiente al derivado sintetizado 1a (carril izquierdo) y el correspondiente derivado 1a cuya estructura fue confirmada por RMN (carril derecho). Rf: (TLC)= 0,68. (Cancela, 2020)



- Cromatografía en capa fina correspondiente al derivado sintetizado 1b (carril izquierdo) y el correspondiente derivado 1b cuya estructura fue confirmada por RMN (carril derecho). Rf: (TLC)= 0,75 (Cancela, 2020)



- Cromatografía en capa fina correspondiente al derivado sintetizado 1c (carril izquierdo) y el correspondiente derivado 1c cuya estructura fue confirmada por RMN (carril derecho). Rf: (TLC)= 0,54. (Cancela, 2020)



- Cromatografía en capa fina correspondiente al derivado sintetizado 1d (carril izquierdo) y el correspondiente derivado 1d cuya estructura fue confirmada por RMN (carril derecho). Rf: (TLC)= 0,75 (Cancela, 2020)



- Cromatografía en capa fina correspondiente al derivado sintetizado 2a (carril izquierdo) y el correspondiente derivado 2a cuya estructura fue confirmada por RMN (carril derecho). Rf: (TLC)= 0,42 (Cancela, 2020)

