



**DESARROLLO Y ESTUDIO DE NUEVOS COMPUESTOS
HETEROCÍCLICOS NO-TÓXICOS DE BAJO IMPACTO
AMBIENTAL Y DE SUS APLICACIONES TECNOLÓGICAS**

**Mauro J. Banera^{1,2}, José A. Caram¹, Ana M. Gennaro³, Claudia A. Grillo¹, Oscar E. Piro⁴ y
María V. Mirífico^{1,2,♥}**

¹*Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT La Plata-CONICET, Fac. Cs. Exactas, Departamento. Química., UNLP, La Plata, Argentina.*

²*Fac. de Ing., Área Departamental Ingeniería Química, UNLP, La Plata, Argentina.*

³*INTEC y Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina*

⁴*IFLP, CONICET, CCT La Plata y Fac. Cs. Exactas, Departamento de Física, UNLP.*

Recibido el 4 de Marzo de 2013. Aceptado el 4 de Junio de 2013.

Abstract

Two new 5-nitro and 7-nitro derivatives were synthesized by conventional nitration procedure of phenanthro [9,10-c] [1,2,5] thiadiazole 2,2-dioxide with ca. 55% of global yield. Their structures were elucidated by of X-ray diffraction studies. Stable radical-anions were obtained by chemical

♥Corresponding author: E-mail: mirifi@inifta.unlp.edu.ar

reduction of the nitrated derivatives with lithium cyanide, which were characterized by spectroscopic measurements (UV-Vis, EPR). Nitro derivatives were tested as corrosion inhibitors for Cu in 0.25 M H₂SO₄ with a maximum of inhibition efficiency of 84%. Cytotoxicity assays of the nitro compounds were performed and it was found that for concentrations lower than 10.8 μM they have not adverse effects on the cell line CHO-K1.

Keywords: thiadiazoles, corrosion, inhibitors, radical-anions.

Resumen

Se sintetizaron dos nuevos derivados 5-nitro y 7-nitrofenantro[9,10-c][1,2,5]tiadiazol 2,2-dióxido, por nitración convencional del compuesto padre, con un rendimiento global ca. 55%. Las estructuras de los dos isómeros se dilucidaron por medio de estudios de difracción de rayos-X. Por reducción química de ambos compuestos con cianuro de litio se obtuvieron aniones-radicales estables derivados de los mismos, los cuales se caracterizaron espectroscópicamente (UV-Vis, EPR). Los derivados nitrados se ensayaron como inhibidores de la corrosión de Cu en H₂SO₄ 0,25 M, lográndose una eficiencia de inhibición máxima del 84 %. Se efectuaron ensayos de citotoxicidad de los derivados nitrados, encontrándose que para concentraciones inferiores a 10,8 μM no presentan efectos desfavorables en la línea celular CHO-K1.

Palabras clave: tiadiazoles, corrosión, inhibidores, aniones-radicales.

INTRODUCCIÓN

Numerosos y variados compuestos heterocíclicos que contienen el fragmento sulfamida presentan un amplio espectro de aplicaciones [1-5]. En particular los derivados de tiadiazol se han empleado en síntesis orgánica [6], en medicina [7], como potentes pesticidas [8], como unidades estructurales en el diseño de materiales transportadores de electrones y en polímeros para la fabricación de diodos emisores de luz [9]. Recientemente nuestro grupo de trabajo informó sobre la capacidad de un derivado de 3,4-disustituido de 1,2,5-tiadiazol de 1,1-dióxido (T) de baja toxicidad como inhibidor de la corrosión de cobre en medio ácido [10].

El objetivo general del trabajo es la síntesis de heterociclos tío-nitrogenados estructuralmente relacionados y conteniendo el fragmento sulfamida, para luego estudiar sus propiedades químicas, fisicoquímicas y toxicidad. De acuerdo a los resultados obtenidos, se investigarán sus potenciales aplicaciones como inhibidores de la corrosión y/o como componentes para la fabricación materiales funcionales.

En el comienzo del trabajo prepararon por vía química convencional dos nuevos compuestos no informados en la literatura (TRN1 y TRN2, ver Figura 1). Se generaron y caracterizaron los radicales aniones de ellos derivados, se ensayaron ambos derivados TRN1,2 como inhibidores de la corrosión de cobre en medio ácido, y se comenzó el estudio de su citotoxicidad.

EXPERIMENTAL

Síntesis de 5-nitro (TRN1) y 7-nitrofenantro[9,10-c][1,2,5]tiadiazol 2,2-dióxido (TRN2).

En un balón equipado con un condensador a reflujo, sumergido en un baño de agua/hielo, se agregaron anhídrido acético, ácido nítrico (conc.) y ácido sulfúrico (conc.), y se adicionó fenantro[9,10-c][1,2,5]tiadiazol 2,2-dióxido (TR) (ver Figura 1). La mezcla reaccionante se calentó (15 min) a 60°C, manteniendo agitación magnética. El avance de la reacción se siguió por CCF. Finalizada la reacción, se volcó la mezcla ácida sobre agua helada. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (DCM), los extractos orgánicos reunidos se lavaron con abundante agua y se secaron con Na₂SO₄. El residuo sólido obtenido por evaporación de DCM se sometió a cromatografía en columna sobre sílica-gel (Merck 60, 70-230 mesh), empleando como solvente de elución CCl₄-EtAcO (15:4). Se recuperaron tres compuestos (TRN1: 23%; TRN2: 30%; y un tercer compuesto

no aún no identificado) cromatográficamente puros. Se formaron monocristales por evaporación lenta de soluciones diluidas de los compuestos en n-hexano-DCM y hasta ahora dos de ellos se caracterizaron determinando sus estructuras por difracción de rayos-x (ver Figura 1).

Obtención por vía química de aniones-radicales derivados de TRN1 y TRN2. Se prepararon soluciones de TRN1 (3 mM) y TRN2 (5 mM) en DMF seca y a cada una de ellas se le agregó cianuro de litio (relación molar $R = [\text{LiCN}] / [\text{TRN}] = 2,0$ para TRN1 y 1,2 para TRN2. Se trabajó dentro de una caja con guantes, en atmósfera de nitrógeno seco y libre de oxígeno. Los radicales-aniones se caracterizaron por métodos espectroscópicos (UV-Vis y EPR).

Ensayos de inhibición de corrosión de metales. Se midieron curvas de polarización potenciodinámica (velocidad de barrido de potencial, vb: 0,2 mV/s) utilizándose como electrodo de trabajo un cilindro-disco de Cu (Merck, pureza 99,9%) encapsulado en Teflón, como contraelectrodo una chapa Pt y como electrodo de referencia el ecs. Se empleó como medio corrosivo (SC) H_2SO_4 0,25 M, oxigenado durante 1 h y en reposo, a $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$. Los barridos de potencial se realizaron comenzando a -100 mV en dirección anódica y hasta +100 mV, después de sumergir el electrodo en el medio electrolítico, una vez alcanzado ($t = 5$ min) un valor constante para el potencial medido a circuito abierto (E_{CA}) (algunas experiencias se midieron para mayores tiempos de inmersión) y reducido a -600 mV durante 120 s. Los ensayos se realizaron por triplicado para comprobar reproducibilidad. La eficiencia de inhibición porcentual (EI%) se estimó como: $\text{EI}\% = 100 \times (j_{\text{corr,SC}} - j_{\text{corr,Inh}}) / j_{\text{corr,SC}}$. El valor de los parámetros de la extrapolación de Tafel (densidad de corriente de corrosión (j_{corr}) y pendiente anódica (b_a)) se obtuvieron de la intersección de la rama anódica con el potencial de corrosión, porque la rama catódica presentó control difusional.

Ensayos sobre citotoxicidad [11]. El efecto citotóxico de TRN1 y TRN2 se evaluó en células de la línea CHO-K1 a través del ensayo de reducción de metil tetrazolio (MTT) realizado por la enzima succinatodeshidrogenasa, que permite determinar la actividad mitocondrial (AM) de las células tratadas. Las células CHO-K1 se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de TRN1 y TRN2 (rango de dosis 0,2-22 μM) durante 24 h a 37°C en atmósfera controlada (5% de CO_2). Los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como $[(A-B)/A] \times 100$, donde A y B son la absorbancia del control y células tratadas respectivamente. Cada experimento fue repetido 3 veces haciendo un total de 48 pozos por punto experimental. Los datos fueron analizados usando el test de ANOVA.

RESULTADOS

Síntesis y caracterización de TRN1 y TRN2. Cada uno de los compuestos principales se obtuvo con un rendimiento ca. 25%. En la Figura 1 se muestra una estructura obtenida por medio de los estudios cristalográficos de rayos-x.

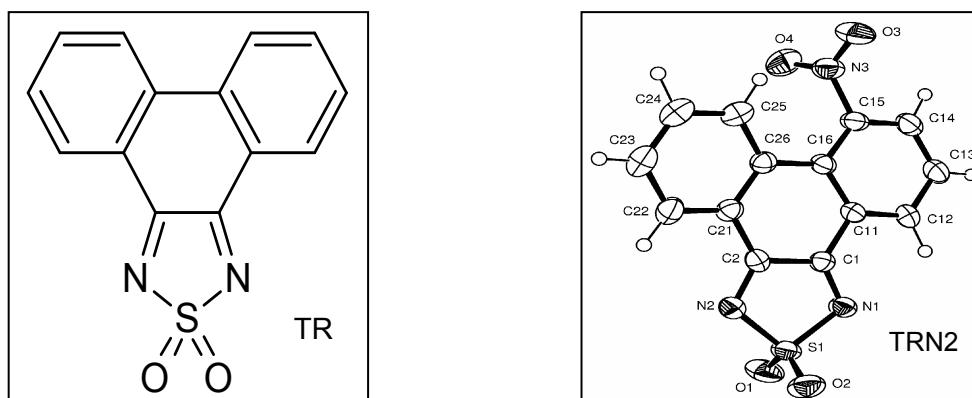


Figura 1. Fórmula estructural correspondiente a TR y estructura cristalina de uno de los nitroderivados de TR, provenientes del programa Ortep[12].

Caracterización de los aniones-radicales derivados de TRN1 y TRN2. En la Figura 2 se presentan los espectros EPR y sus correspondientes simulaciones, y en la Figura 3 los espectros UV-Vis medidos para los radicales-aniones TRN1⁻ y TRN2⁻ derivados de los compuestos preparados.

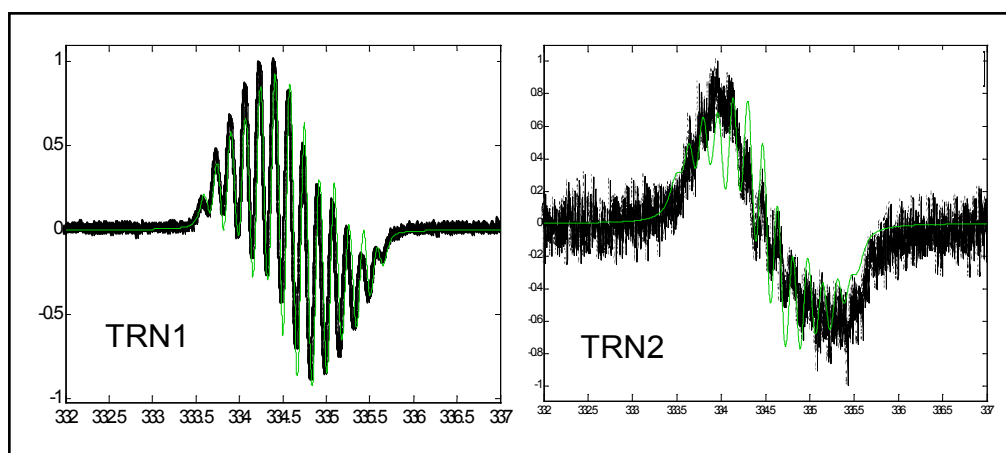


Figura 2. Espectros ERP de los compuestos TRN1 y TRN2 (líneas: —) con sus correspondientes simulaciones (líneas: —).

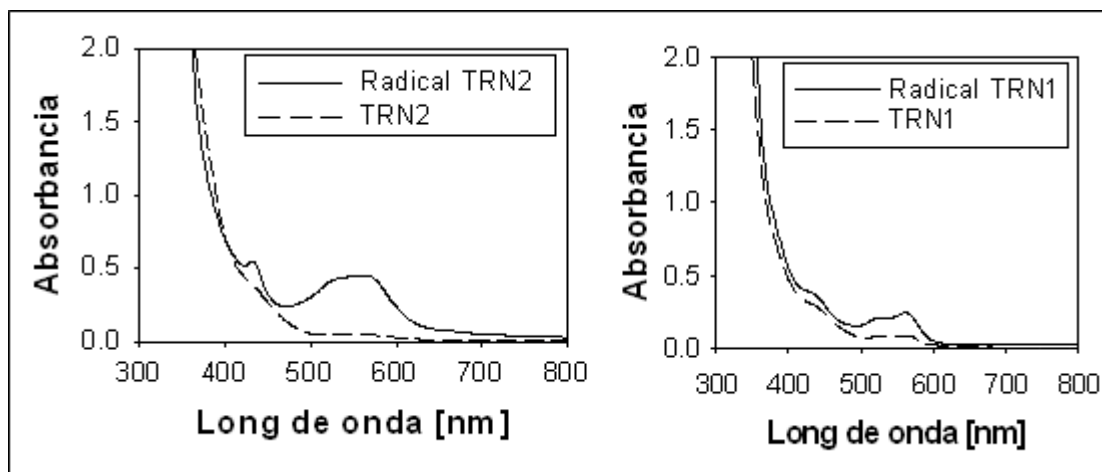


Figura 3. Espectros de absorción UV- Vis de los compuestos neutros ($362 \mu\text{M}$ TRN2 y $200 \mu\text{M}$ TRN1) en solución de DMF y sus correspondientes aniones-radicales medidos ca. 2 h después de preparadas las soluciones.

Ensayos de inhibición de corrosión de metales. Los gráficos de la Figura 4 ilustran respuestas de polarización potenciodinámica típicas ($\text{Log } j$ vs. E) obtenidas para Cu en ausencia y presencia de distintas concentraciones de TRN1 y TRN2 adicionados a la SC. En la Tabla 1 se presentan los valores para b_a , el potencial de corrosión (E_{corr}), $\text{EI}\%$ y j_{corr} para cada uno de los compuestos ensayados en diferentes concentraciones.

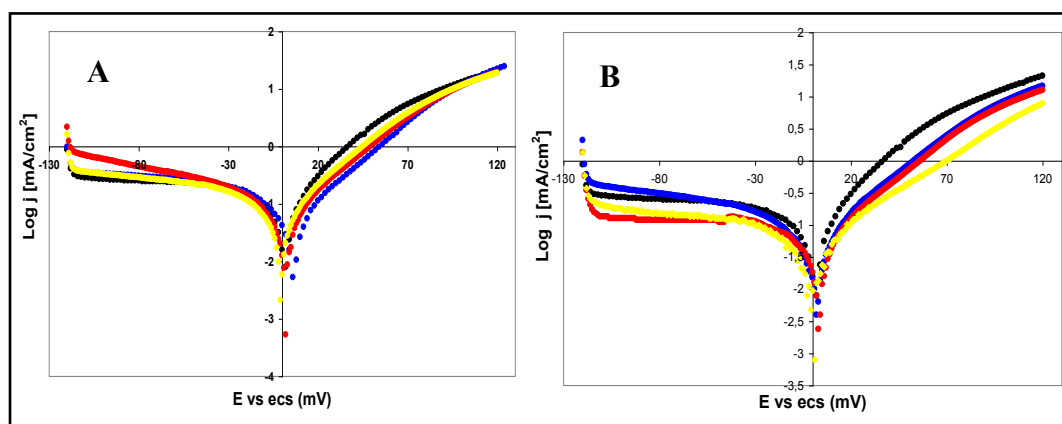


Figura 4. Curvas de polarización potenciodinámica medidas para Cu en SC y en SC conteniendo diferentes concentraciones de los potenciales inhibidores. **A:** TRN2. **B:** TRN1. (●●●): SC; (●●●): $3 \mu\text{M}$; (●●●): $6 \mu\text{M}$; (●●●): $9 \mu\text{M}$.

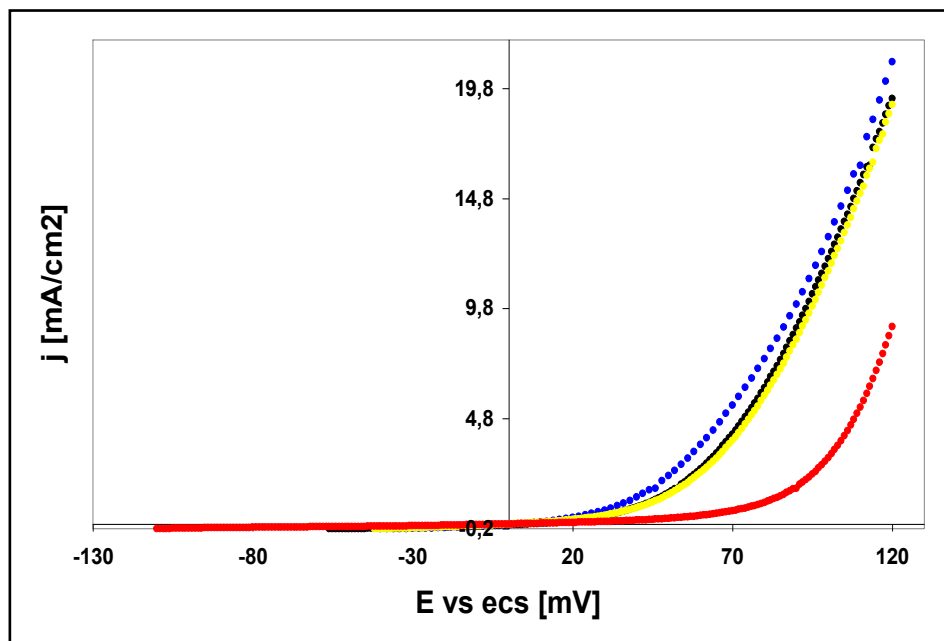


Figura 5. Efecto del tiempo de inmersión sobre las curvas de polarización potenciodinámica para Cu en SC y en presencia de $9 \mu\text{M}$ TRN2. *Tiempo de inmersión:* 5 min (•••): SC; (•••): SC+ TRN2. *Tiempo de inmersión:* 80 min (•••): SC; (•••): SC + TRN2.

Tabla 1. Parámetros obtenidos por el método de extrapolación de Tafel, para los ensayos realizados con un tiempo de contacto metal-inhibidor de 5 min.

Ensayo	b_a (mV/dc)	E_{corr} (mV)	j_{corr} (mA/cm ²)	EI%
SC	57	2	328	---
3 μM TRN1	44	2	70	79
6 μM TRN1	42	3	55	83
9 μM TRN1	55	1	52	84
3 μM TRN2	37	6	51	84
6 μM TRN2	42	2	76	77
9 μM TRN2	44	-1	96	71

Ensayos sobre citotoxicidad de TRN1 y TRN2. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad para el intervalo de concentraciones 0,2 - 22 μM , observándose una disminución significativa de la AM ($p < 0,001$) para concentraciones de TRN1 y TRN2 $> 10,8 \mu\text{M}$.

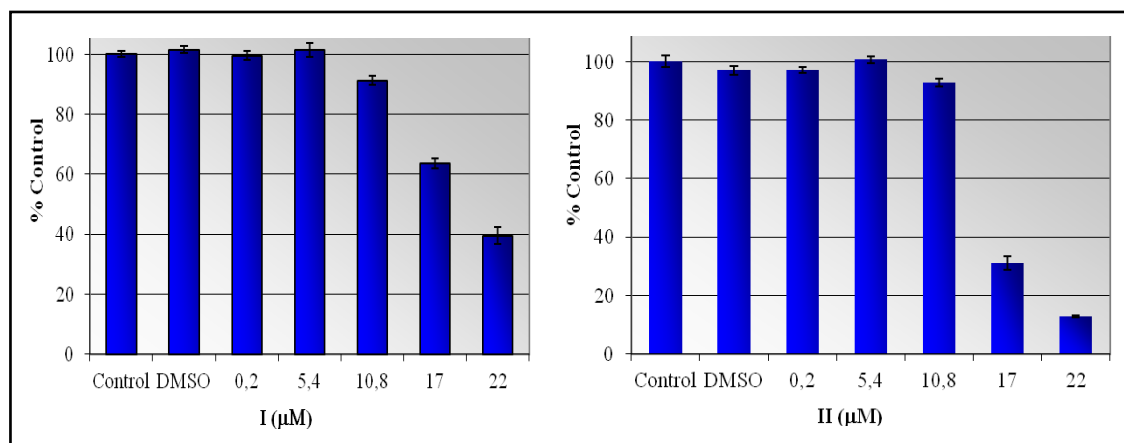


Figura 6. Citotoxicidad evaluada por el ensayo de MTT.

DISCUSIÓN

La síntesis de TRN1,2 se realizó acorde a una nitración química convencional, a partir de TR [13]. Los rendimientos molares resultantes son concordantes con los informados en literatura para otros compuestos aromáticos desactivados [14]. En la Figura 1 se muestran las estructuras cristalinas de TRN1 y TRN2. Los grupos $-\text{NO}_2$ se ubicaron en las posiciones más reactivas frente a la sustitución electrofílica aromática (SEA). El sustituyente en posición 7- (TRN2) se dispuso perpendicular al plano formado por el heterociclo fusionado al resto de fenantreno [15] como consecuencia del impedimento estérico causado por el átomo de hidrógeno unido al C25 (ver Figura 1), mientras que en 5- (TRN1) se encuentra en el mismo plano.

Se obtuvieron y caracterizaron los aniones-radicales $\text{TRN1}^{\cdot-}$ y $\text{TRN2}^{\cdot-}$ en solución de DMF. Ambos aniones-radicales son estables en el medio de síntesis, sus espectros EPR se midieron 48 h después de haber sido preparados [16].

Los ensayos sobre inhibición de la corrosión muestran que TRN1,2 inhiben la corrosión de Cu en H_2SO_4 y que la capacidad inhibitoria está relacionada con la concentración de los compuestos en el medio agresivo. Aún en bajas concentraciones (ver Tabla 1), para ambos inhibidores la eficiencia máxima fue ca. 85%, para el mínimo tiempo de contacto investigado. Además, se mostró que el efecto inhibitor de TRN2 aumenta con el tiempo de contacto del Cu con el derivado nitrado.

Los ensayos sobre citotoxicidad mostraron que concentraciones mayores que $10,8 \mu\text{M}$ de TRN1,2 ejercen efectos adversos en la línea celular estudiada, lo cual resulta alentador ya que a menor concentración la eficiencia de inhibición de ambos compuesto es aceptable (ca. 85%).

REFERENCIAS

- [1] G.A. Gazieva, A.N. Kravchenko, O.V. Lebedev. *Russ. Chem. Rev.*, **2000**, 69 (3), 221-230.
- [2] Chin. P. 1 113 758; Chem. Abstr. **1996**, 124 325 421.
- [3] Jpn. P. 10 203 902; Chem. Abstr. **1998**, 129 171 855.
- [4] US P. 5 753 599; Chem. Abstr. **1998**, 129 17 272.
- [5] US P. 5 753 599; Chem. Abstr. **1998**, 129 17 272.

- [6] F. Clerici; in *Advances in Heterocyclic Chemistry*, A. R. Katritzky, Ed.; Academic, San Diego, **2002**, 83, 71.
- [7] A.J. Robichaud, *Carr. Topics Med. Chem.*, **2006**, 6, 553.
- [8] L.B. Dungan, et al., PCT Int. Appl. WO (World Intellectual Property Organization Pat. Appl.) 6858 (2005) (Chem. Abstr., **2005**, 142, 150261).
- [9] T. Linder, E. Badiola, T. Baumgartner, T.C. Sutherland, *Org. Lett.*, **2010**, 12 (20), 4520-4523.
- [10] C.A. Grillo, M.V. Mirífico, M.L. Morales, M.A. Reigosa, M. Fernández Lorenzo de Mele. *J. Hazard. Mat.*, **2009**, 170, 1173–1178.
- [11] T. Mosmann, *J Immunol Methods*, **1983**, 65,55-63.
- [12] Johnson, C. K. ORTEP-II, A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program, Report ORNL-5138; Oak Ridge National Laboratory: Tennessee, USA, 1976.
- [13] E.L. Svartman, M.F. Rozas, O.E. Piro, E. Castellano, M.V. Mirífico. *Synthesis*, **2006**, 14, 2313-2318
- [14] Tatchell, A.R. *Vogel, Text Book of Practical Organic Chemistry*, 5th ed., Longman; London, 1989.
- [15] E.E. Castellano, O.E. Piro, J.A. Caram, M.V. Mirífico, S.L. Aimone, E.J. Vasini, A. Marquez Lucero, D. Glossman Mitnik, *Journal of Molecular Structure*, **2001**, 562, 157-166.
- [16] M. V. Mirífico, J.A.Caram, A.M. Gennaro, C.J. Cobos, E.J.Vasini, *J. Phys. Org. Chem.*, **2011**, 24, 1039–1044.