

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
1*H* y 2*H*-BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS CON ACTIVIDAD
ANTI-CÁNCER

Por

IBQ. GLADIOLA NOEMI MACHUCA PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Farmacia

Noviembre, 2020

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE 1H y 2H-BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS
CON ACTIVIDAD ANTI-CÁNCER**

Revisión de tesis:

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Director de Tesis

Dra. Susana Thelma López Cortina
Co-Director de Tesis

Dr. Ernesto Torres López
Co-Director externo de Tesis

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dra. Tannya Rocio Ibarra Rivera
Comité Tutorial

Dr. Víctor Manuel Rosas García
Comité Tutorial

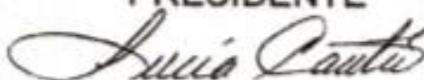
Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE 1H y 2H-BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS
CON ACTIVIDAD ANTI-CÁNCER

Aprobación de la Tesis



Dr. Eugenio Hernández Fernández
PRESIDENTE



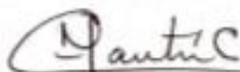
Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
SECRETARIO



Dr. Víctor Manuel Rosas García
VOCAL



Dra. Tannya Rocío Ibarra Rivera
SUPLENTE



Dra. María Elena Cantú Cárdenas

SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DEDICATORIA

A la brisa suave y delicada, 1 Re 19, 11-13

Al buen pastor, Jn 10, 10-12

Al alfa y la omega Ap 1, 8

A quienes han hecho de mí lo que soy, mis padres

A quienes me han apoyado en todos mis sueños, mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que es el dador de la vida, a mis padres Francisco Machuca y Emma Pérez por todo el esfuerzo que hicieron para apoyarme a cumplir este y todos mis sueños, gracias por motivarme, por inspirarme y por darme las palabras de aliento y consejos cuando los necesité. Gracias a mis hermanos que siempre han estado junto a mí y me han apoyado de mil maneras, agradezco a mis sobrinos porque son la mejor bendición que Dios me ha dado, gracias por todo el amor y la alegría que me dan. Agradezco también a mi compañero de viaje, a la promesa de Dios, al amor de mi vida, mi esposo Jesús S. Montoya por llegar en esta etapa, por apoyarme a cumplir mis objetivos y por alentarme a seguir soñando.

De manera muy especial agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Eugenio Hernández Fernández por confiar en mí este proyecto y por apoyarme desde el primer día, gracias por su entusiasmo, por ser un ejemplo a seguir, por cada una de sus palabras llenas de conocimientos, gracias por la paciencia, por su dedicación y por su templanza al corregir pero sobre todo, gracias por darme su apoyo aun fuera del aula. Agradezco a mis co-asesores la Dra. Susana T. López y al Dr. Ernesto Torres, a los miembros de mi comité tutorial la Dra. Lucía G. Cantú, la Dra. Tannya R. Ibarra y el Dr. Víctor M. Rosas por el tiempo dedicado, por extenderme sus conocimientos, por las correcciones compartidas y también por las palabras de aliento.

Quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos que Dios puso en mi vida durante esta etapa, a Laura, Marthi, Juan José de Jesús (J), Karla, Alejandro, Evelyn, mis compañeros de laboratorio Juan Reyna, por haber sido un gran apoyo y por hacer de cada día de trabajo un día divertido, gracias por tu paciencia y afecto. Agradezco a Miguel, Jorge, Edgar, al Dr. Miguel por siempre estar dispuestos a ayudarme y a compartir sus conocimientos.

Por último pero no menos importante, agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme las puertas a este sueño, a la Facultad de Ciencias Químicas por darme un lugar para cumplir mis objetivos, agradezco a la Facultad de Medicina y a la Facultad de Biología por el apoyo para la realización de este proyecto, a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona por la estancia realizada y agradezco todo el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca 444965 para llevar a término este objetivo.

RESUMEN

Gladiola Noemi Machuca Pérez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: Noviembre, 2020

Título del Estudio: Síntesis, caracterización y evaluación biológica de *1H* y *2H*-benzotriazolil-acrilonitrilos con actividad anti-cáncer

Número de Páginas: 189

**Candidato para el grado de Maestro en
Ciencias con orientación en Farmacia**

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Métodos de Estudio: Con el propósito de implementar una metodología para la síntesis de derivados del *1H*- y *2H*-benzotriazolil-acrilonitrilos y, considerando que éstos representan un área de oportunidad para el desarrollo de fármacos, en el presente proyecto se sintetizaron ocho nuevos derivados y se evaluó su actividad anti-cáncer así como la citotoxicidad y su genotoxicidad.

Contribuciones y conclusiones: Se realizó la síntesis de los derivados de benzotriazolil acetonitrilo **17a** y **17b**, con rendimientos del 25% y 70%. Se sintetizaron los derivados de *1H*- y *2H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20** y **21a-d** mediante condiciones de reflujo con rendimientos químicos del 34-78%. La actividad anti-cáncer de los acrilonitrilos fue evaluada, encontrándose que los compuestos **20a**, **20b** y **21d** presentaron la mayor actividad en la línea celular MCF-7. Por otro lado, se evaluó la citotóxicidad y genotóxicidad de los compuestos más activos, siendo los compuestos **20a** y **21d** los menos citotóxicos en células de sangre periférica en comparación con la citotoxicidad causada por el fármaco de referencia doxorubicina.

Firma del director: _____



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE 1H y 2H-BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS
CON ACTIVIDAD ANTI-CÁNCER**

Presentado por:

Gladiola Noemi Machuca Pérez

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Industrial, del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas, en el Laboratorio 6 de Inmunología y Virología de la Unidad C de Facultad de Biología y en el Laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Eugenio Hernández Fernández, con recursos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto CB2015/256359 y por la beca otorgada 444965.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
CAPÍTULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1. Cáncer.....	1
1.1.2. Cáncer a nivel mundial.....	1
1.1.3. Cáncer en México.....	2
1.1.4. Causas del cáncer.....	3
1.1.5. Diagnóstico y tratamiento.....	4
1.1.6. Fármacos antineoplásicos.....	6
CAPÍTULO II.....	9
2.1. ANTECEDENTES.....	9
2.1.1. Oxazolinas.....	10
2.1.2. Azoles y su actividad biológica.....	16
2.1.3. Oxazolinas y su actividad biológica.....	21
2.2.4. Benzotriazolil-nitrilos.....	24
CAPÍTULO III.....	30
3.1. HIPÓTESIS.....	30
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	30
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
CAPÍTULO IV.....	32
4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
4.1.1. Materiales y equipos.....	32
4.1.2. Métodos biológicos.....	33
4.1.3. Manejo y disposición de los residuos generados.....	34
4.2. Métodos sintéticos.....	35
4.2.1. Procedimiento general para la preparación de azolil-ésteres 3a-b	35
4.2.1.1. Preparación del compuesto 1 <i>H</i> -pirazolil-acetato de etilo 3a	36

4.2.1.2. Preparación del compuesto benzimidazolil-acetato de etilo 3b	36
4.2.2. Procedimiento general para la preparación de azolil-ésteres 5a y 5b	37
4.2.3. Procedimiento general para la preparación de hidroxicetamidas.....	39
4.2.3.1. Preparación de <i>N</i> -(2-hidroxietil)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida 7a	39
4.2.3.2. Preparación de (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida 7b	40
4.2.3.3. Preparación de (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida 7c	41
4.2.3.4. Preparación de (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida 7d	42
4.2.3.5. Preparación de (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-feniletíl)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida 7e	43
4.2.3.6. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(2-hidroxietil)acetamida 8a	44
4.2.3.7. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 8b	45
4.2.3.8. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 8c	46
4.2.3.9. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida 8d	47
4.2.3.10. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)- <i>N</i> -(2-hidroxietil)acetamida 9a	48
4.2.3.11. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 9b	49
4.2.3.12. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 9c	50
4.2.3.13. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida 9d	51
4.2.3.14. Preparación de (<i>S</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)- <i>N</i> -(2-hidroxietil)-1-feniletíl) acetamida 9e	52
4.2.3.15. Preparación de 2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)- <i>N</i> -(2-hidroxietil)acetamida 10a	53
4.2.3.16. Preparación de (<i>S</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 10b	53
4.2.3.17. Preparación de (<i>S</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 10c	54

4.2.3.18. Preparación de (S)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)- <i>N</i> -(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida 10d	55
4.2.3.19. Preparación de (S)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)- <i>N</i> -(2-hidroxi-1-feniletíl) acetamida 10e	56
4.2.4. Procedimiento general para la preparación de ácidos carboxílicos.....	56
4.2.4.1. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il) ácido acético 15a	57
4.2.4.2. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il) ácido acético 15b	57
4.2.4.3. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il) ácido acético 15c	58
4.2.4.4. Preparación de 2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il) ácido acético 15d	58
4.2.5. Preparación de 2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il) acetonitrilo y 2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il) acetonitrilo 17a-b	59
4.2.6. Procedimiento general para la preparación de 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d	60
4.2.6.1. Preparación de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetil amino)fenil)acrilonitrilo 20a	61
4.2.6.2. Preparación de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino) fenil)acrilonitrilo 20b	62
4.2.6.3. Preparación de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolino fenil)acrilonitrilo 20c	62
4.2.6.4. Preparación de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenil amino)fenil)acrilonitrilo 20d	63
4.2.6.5. Preparación de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dimetil amino)fenil)acrilonitrilo 21a	64
4.2.6.6. Preparación de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietil amino)fenil)acrilonitrilo 21b	65
4.2.6.7. Preparación de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolino fenil)acrilonitrilo 21c	66
4.2.6.8. Preparación de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenil amino)fenil)acrilonitrilo 21d	67
4.3. Métodos biológicos.....	68
4.3.1. Actividad anticancerígena <i>in vitro</i> de los derivados 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en las líneas celulares MCF-7 y 4T1 por el método de resazurina.....	68
4.3.2. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los derivados 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en esplenocitos murinos por el método de resazurina.....	69

4.3.3. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los derivados 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en células mononucleares de sangre periférica por el método de resazurina	70
4.3.4. Ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de los derivados 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en células mononucleares de sangre periférica	71
CAPÍTULO V	74
5.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, SÍNTESIS ORGÁNICA.....	74
5.1.1. AZOLIL ACETATOS DE ETILO 3a-b , 5a-b	74
5.1.1.1. Síntesis de los compuestos 3a-b	74
5.1.1.2. Purificación de los compuestos 3a-b	75
5.1.1.3. Rendimiento de los compuestos 3a-b	76
5.1.1.4. Caracterización de los compuestos 3a-b	77
5.1.1.5. Síntesis de los compuestos 5a-b	82
5.1.1.6. Purificación de los compuestos 5a-b	83
5.1.1.7. Rendimiento de los compuestos 5a-b	84
5.1.1.8. Caracterización de los compuestos 5a-b	85
5.1.2. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 1	88
5.1.3. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 2	90
5.1.4. ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	94
5.1.5. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 3	97
5.1.6. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 4	100
5.1.7. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 5	102
5.1.8. HIDROXIACETAMIDAS	103
5.1.8.1. Síntesis de pirazolil-hidroxiacetamidas 7a-e	103
5.1.8.2. Purificación de los compuestos 7a-e	104
5.1.8.3. Rendimiento de los compuestos 7a-e	105
5.1.8.4. Síntesis de benzimidazolil-hidroxiacetamidas 8a-d	105
5.1.8.5. Purificación de los compuestos 8a-d	106
5.1.8.6. Rendimiento de los compuestos 8a-d	107
5.1.8.7. Síntesis de 1 <i>H</i> -benzotrizolil-hidroxiacetamidas 9a-e	107
5.1.8.8. Purificación de los compuestos 9a-e	108
5.1.8.9. Rendimiento de los compuestos 9a-e	109
5.1.8.10. Síntesis de 2 <i>H</i> -benzotriazolil-hidroxiacetamidas 10a-e	109

5.1.8.11. Purificación de los compuestos 10a-e	110
5.1.8.12. Rendimiento de los compuestos 10a-e	111
5.1.8.13. Síntesis de compuestos 11a-e	112
5.1.8.14. Purificación de los compuestos 11a-e	114
5.1.8.15. Síntesis de los compuestos 12a-d	115
5.1.8.16. Purificación de los compuestos 12a-d	116
5.1.8.17. Síntesis de los compuestos 13a-e	116
5.1.8.18. Purificación de los compuestos 13a-e	117
5.1.8.19. Síntesis de los compuestos 14a-e	117
5.1.8.20. Purificación de los compuestos 14a-e	119
5.1.8.21. Caracterización de los compuestos 11-14a-e	119
5.1.9. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 6	124
5.1.10. AZOLIL-ACETONITRILOS 17a, 17b	124
5.1.10.1. Purificación de los compuestos 17a-b	125
5.1.10.2. Rendimiento de los compuestos 17a-b	126
5.1.10.3. Caracterización de los compuestos 17a-b	126
5.1.11. ARIL-ACRILONITRILOS	132
5.1.11.1. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino) fenil) acrilonitrilo 20a	133
5.1.11.2. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino) fenil) acrilonitrilo 20b	134
5.1.11.3. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 20c	134
5.1.11.4. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino) fenil)acrilonitrilo 20d	134
5.1.11.5. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dimetilamino) fenil)acrilonitrilo 21a	135
5.1.11.6. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino) fenil)acrilonitrilo 21b	135
5.1.11.7. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 21c	135
5.1.11.8. Síntesis de (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino) fenil) acrilonitrilo 21d	136
5.1.11.9. Caracterización del compuesto 20a	136
5.1.11.10. Caracterización del compuesto 21a	140

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, EVALUACIÓN BIOLÓGICA	144
5.2.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS DEL 1 <i>H</i> Y 2 <i>H</i> -BENZOTRIAZOLIL ACRILONITRILOS 20a-d Y 21a-d EN LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7 Y 4T1	145
5.2.1.1. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil) acrilonitrilo 20a	146
5.2.1.2. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino)fenil) acrilonitrilo 20b	147
5.2.1.3. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 20c	149
5.2.1.4. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo 20d	150
5.2.1.5. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil) acrilonitrilo 21a	152
5.2.1.6. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil) acrilonitrilo 21b	153
5.2.1.7. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 21c	154
5.2.1.8. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo 21d	156
5.2.1.9. Comparación de la viabilidad de la línea MCF-7 expuestas a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d	158
5.2.1.10. Comparación de la viabilidad de la línea 4T1 expuesta a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d	159
5.2.1.11. Comparación de la viabilidad de las líneas celulares MCF-7 y 4T1 expuesta a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo 20a-d y 21a-d	160
5.2.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS DEL 1 <i>H</i> Y 2 <i>H</i> -BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS 20a-d Y 21a-d EN ESPLENOCITOS MURINOS	164

5.2.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS DEL 1 <i>H</i> Y 2 <i>H</i> - BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS 20a-d Y 21a-d EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE HUMANO	168
5.2.4. ACTIVIDAD GENOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS DEL 1 <i>H</i> Y 2 <i>H</i> - BENZOTRIAZOLIL-ACRILONITRILOS 20a-d Y 21a-d EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE EL ENSAYO COMETA	173
CAPITULO VI	181
6.1 CONCLUSIONES	181
6.2 PERSPECTIVAS	184
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Actividad anti-cáncer de derivados de benzotriazol.	17
2. Actividad anti-cáncer de derivados de benzimidazol.	18
3. Actividad anti-cáncer en MCF-7 y WM266.4 e inhibición de BRAF ^{V600E}	21
4. Actividad anti-cáncer de aril-acrilonitrilos.	27
5. Actividad anti-cáncer de difenilacrilonitrilos.	28
6. Disposición de residuos químicos.	34
7. Disposición de residuos biológicos.	35
8. Resultados de la síntesis de los compuestos 3a y 3b	76
9. Asignación de bandas para el espectro IR del compuesto 3b	80
10. Resultados de la síntesis de 5a-b	85
11. Resultados obtenidos para los compuestos 7a-e	105
12. Resultados obtenidos para los compuestos 8a-d	107
13. Resultados obtenidos para los compuestos 9a-e	109
14. Resultados obtenidos para los compuestos 10a-e	111
15. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo 20a	146
16. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo 20b	148
17. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo 20c	149
18. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo 20d	151
19. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo 21a	152
20. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo 21b	153
21. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo 21c	155
22. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo 21d	157
23. Valores de IC ₅₀ de los compuestos más activos en las líneas MCF-7 y 4T1.	161
24. Compuestos con actividad anticancerígena en distintas líneas celulares.	164
25. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo 20a-d y 21a-d a una concentración de 1000 µg/mL.	165
26. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a y 21d	166

27. Viabilidad relativa de los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d sobre sangre periférica de humano a una concentración de 1000 µg/mL.....	168
28. Viabilidad relativa del compuesto 20b sobre células mononucleares de sangre periférica.....	170
29. Porcentaje de genotoxicidad de los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d sobre sangre periférica.....	174

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anillos de oxazolinas.	9
2. Compuestos del tipo azol.	10
3. Espectro de RMN ¹ H para 3a	78
4. Espectro de ¹³ C para el compuesto 3a	81
5. Espectros de RMN ¹ H para 5a y 5b	87
6. Espectro de RMN ¹ H, ruta 1	90
7. Placa cromatográfica para el compuesto 12a	92
8. Espectro de RMN ¹ H, ruta 2	93
9. Espectro de masas para 15b	96
10. Ácidos carboxílicos.	97
11. Placa cromatográfica, ruta 3	98
12. Cromatografía en capa fina para 11a , 11b , 11c , 11d y 11e	114
13. Cromatografía en capa fina para 12a , 12b , 12c y 12d	115
14. Cromatografía en capa fina para 13a , 13b , 13c , 13d y 13e	117
15. Cromatografía en capa fina para 14a , 14b , 14c , 14d y 14e	118
16. Espectro de RMN ¹ H para 14a	120
17. Espectro de masas de baja resolución para 14a	122
18. Patrones de fragmentación para 14a	123
19. Cromatografía en capa fina para los compuestos 17a y 17b	125
20. Espectro de RMN ¹ H para 17a	127
21. Espectro de RMN ¹³ C para 17a	128
22. Cromatografía en capa fina para la el compuesto 13a	130
23. Espectro de RMN ¹ H para 20a	138
24. Espectro de RMN ¹ H para 21a	141
25. Espectro de RMN ¹³ C para 21a	143
26. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo 20a	147
27. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo 20b	148
28. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo 20c	150
29. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(1 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo 20d	151
30. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo 21a	153
31. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo 21b	154
32. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo 21c	156
33. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (<i>E</i>)-2-(2 <i>H</i> -benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo 21d	158

34. Viabilidad relativa de la línea MCF-7 expuesta a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20 y 21a-d	159
35. Viabilidad relativa de la línea 4T1 expuesta a los derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d	160
36. Derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo con mayor actividad anticancerígena.	160
37. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los compuestos derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo 20a-d y 21a-d a una concentración de 1000 µg/mL.....	166
38. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los compuestos derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo 20a y 21d	167
39. Viabilidad relativa de los compuestos derivados del 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acrilonitrilo 20a-d y 21a-d sobre sangre periférica de humano a una concentración de 1000 µg/mL.....	169
40. Viabilidad relativa del compuesto 20b sobre sangre periférica de humano.....	171
41. Citotoxicidad de la doxorubicina sobre células PNT1A de tejido prostático sano.....	172
42. Genotoxicidad de los compuestos 20a-d y 21a-d sobre sangre periférica humana.....	175
43. Morfología de los núcleos expuestos a los compuestos 20a , 20c y 21b en el ensayo cometa.	175
44. Morfología de los núcleos expuestos a los compuestos 20a , 20b y 21d en el ensayo cometa.	177
45. Imágenes representativas del ensayo cometa alcalino en células U251.....	178
46. Actividad hemolítica de la doxorubicina sobre eritrocitos.	179
47. Compuestos propuestos para evaluarlos como marcadores fluorescentes.	180

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
1. Síntesis de aril-oxazolinias.	11
2. Síntesis de fenil-oxazolinias.....	11
3. Síntesis de 2-oxazolinias en tres pasos.....	12
4. Síntesis de 2-oxazolinias disustituidas.....	13
5. Síntesis de 2-oxazolinias asistida por MW.....	14
6. Síntesis de oxazolinias quirales asistida por MW.....	15
7. Síntesis de 2-Aril-heteroaril-oxazolinias.....	16
8. Síntesis de derivados de benzotriazol.....	17
9. Síntesis de derivados de benzimidazol.....	18
10. Síntesis de derivados de 1 <i>H</i> -pirazol.....	19
11. Derivados de isoxazolinias y oxazolinias.....	22
12. Formación de complejos Co (II) y Pd (II).....	23
13. Ruta de síntesis para la preparación de aril-acrilonitrilos.....	26
14. Ruta de síntesis para la preparación de difenil-acrilonitrilos.....	28
15. Síntesis de azolil-ésteres 3a-b	74
16. Síntesis de azolil-ésteres 5a-b	82
17. Formas tautoméricas del benzotriazol.....	82
18. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 1.....	88
19. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 2.....	91
20. Síntesis del compuesto 12a	91
21. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de ésteres.....	94
22. Síntesis de ácidos carboxílicos 15a-d	95
23. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 3.....	97
24. Mecanismo de reacción para la formación de hidroxiacetamidas.....	99
25. Ruta de síntesis propuesta por Díaz <i>et al.</i>	100
26. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 4.....	101
27. Ruta propuesta por Ávalos-Alanís.....	102
28. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 5.....	102
29. Síntesis de hidroxiacetamidas 7-10a-e	103
30. Síntesis de pirazolil-hidroxiacetamidas 7a-e	104
31. Síntesis de benzimidazolil-hidroxiacetamidas 8a-d	106
32. Síntesis de 1 <i>H</i> -benzotriazolil-hidroxiacetamidas 9a-e	108
33. Síntesis de 2 <i>H</i> -benzotriazolil-hidroxiacetamidas 10a-e	110
34. Síntesis de azolil-oxazolinias, ruta 5.....	112
35. Ruta de síntesis propuesta por Garg, P. <i>et al.</i>	124
36. Síntesis de 1 <i>H</i> y 2 <i>H</i> -benzotriazolil-acetonitrilos 17a y 17b	125
37. Síntesis del compuesto 13a , ruta 6.....	129
38. Ruta descrita para preparación de oxazolinias, hidroxiacetamidas y acetamidas.....	132
39. Ruta de síntesis para la preparación de benzotriazolil-acrilonitrilos 20-21a-d	133

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A549	Línea celular de cáncer de pulmón
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CaO	Óxido de Calcio
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
CCRF	Línea celular de leucemia aguda
CCR FSB	Línea celular de leucemia linfoblástica aguda
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3CN	Acetonitrilo
CO_2	Dióxido de carbono
d	Doble
DCM	Diclorometano

DDQ-Ph ₃ P	(2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona-trifenilfosfina)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMEM	Medio Esencial Mínimo Dubelco
DU-145	Línea celular de cáncer de próstata
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ER	Receptor de Estrógeno
ER- α	Receptor de Estrógeno alfa
Eq	Equivalentes
ESI ⁺	Ionización por Electrospray
FAB ⁺	Ionización mediante Bombardeo de Átomos rápidos
FAK	Quinasa de adhesión focal
FSC	Suero Fetal Bovino
g	Gramos
GI	Grado Industrial
h	Horas
Hex	Hexano
Hz	Hertz
HeLa	Línea celular de cáncer de colon

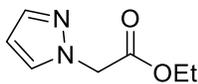
HCTIS	Línea celular de cáncer de cérvix
HER-2	Factor de crecimiento epidérmico 2 quinasa
HDAC	Histona deacetilasa
H460	Línea celular de cáncer de pulmón
IARC	Agencia Internacional para la Investigación
<i>i</i> -bu	Isobutilo
IC ₅₀	Concentración de inhibición media
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<i>i</i> -pr	Isopropilo
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KOH	Hidróxido de potasio
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
LHRH	Línea celular de cáncer de próstata
LNCap	Luteinizing Hormone-releasing hormone
<i>m</i>	meta
Me	Metilo
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	Microlitros

μg	Microgramos
μM	Micromolar
Mmol	Milimol
MHz	Mega Hertz
mA	Miliamperes
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MW	Microondas
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-468	Línea celular de cáncer de mama
MKN45	Línea celular de adenocarcinoma gástrico
MRSE	Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno
Na_2SO_4	Sulfato de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NaBr	Bromuro de sodio
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaOEt	Etóxido de Sodio
nm	Nanómetros
<i>o</i>	orto
OMS	Organización Mundial de la Salud

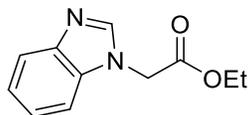
ρ	para
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer Fosfato Salino
PNT1A	Línea celular de tejido prostático
PPSE	Ácido polifosfórico trimetilsilil éster
P388	Línea celular de leucemia murina
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
SK-OV-3	Línea celular de cáncer de ovario
SK-MEL-2	Línea celular de cáncer de piel
SIRT 1	Sirtuina 1, enzima desacetilasa
SiHa	Línea celular de cáncer de cérvix
SOCl_2	Cloruro de tionilo
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TNF- β	Factor de Necrosis Tumoral Beta

U251	Línea celular de tumor cerebral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
4T1	Línea celular modelo de cáncer de mama
WM266.4	Línea celular de melanoma humano

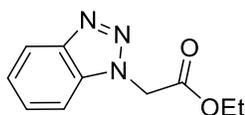
CATÁLOGO DE ESTRUCTURAS



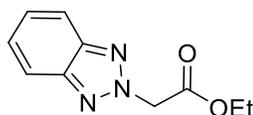
2-(1*H*-pirazol-1-il) acetato de etilo
(**3a**)



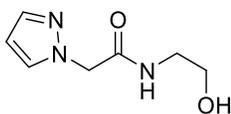
2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il) acetato de etilo
(**3b**)



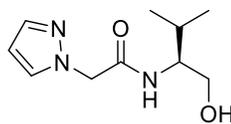
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il) acetato de etilo
(**5a**)



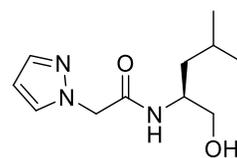
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il) acetato de etilo
(**5b**)



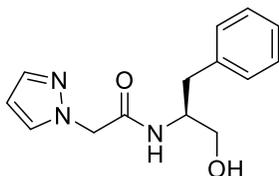
N-(2-hidroxietil)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida
(**7a**)



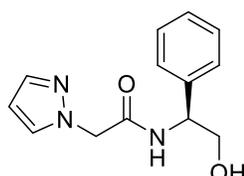
(*S*)-*N*-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida
(**7b**)



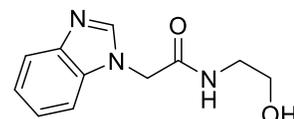
(*S*)-*N*-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida
(**7c**)



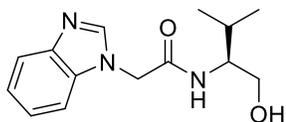
(*S*)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida
(**7d**)



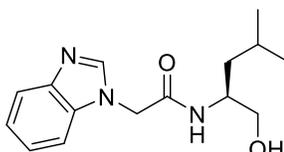
(*S*)-*N*-(1-hidroxi-1-feniletíl)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida
(**7e**)



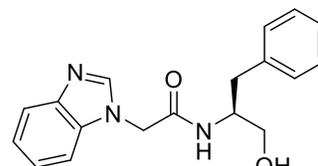
2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(2-hidroxietil) acetamida
(**8a**)



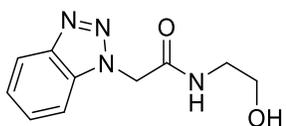
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida
(**8b**)



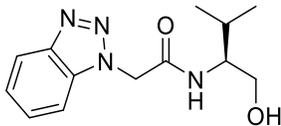
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida
(**8c**)



(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida
(**8d**)



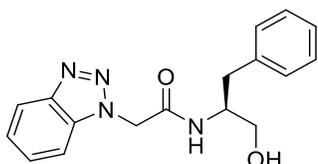
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-
N-(1-hidroxiopropan-2-il)
acetamida
(9a)



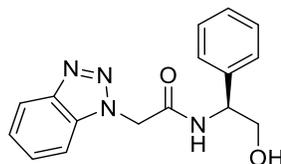
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-
N-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il)
acetamida
(9b)



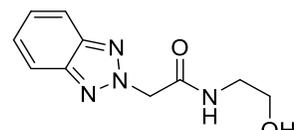
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-
N-(1-hidroxi-4-metilpentan-
2-il) acetamida
(9c)



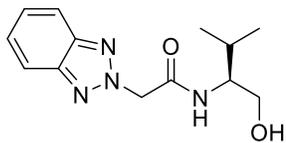
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-
N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)
acetamida
(9d)



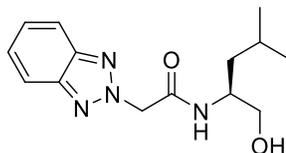
(*S*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-
N-(2-hidroxi-1-feniletíl)
acetamida
(9e)



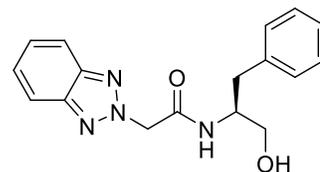
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-
N-(2-hidroxietyl) acetamida
(10a)



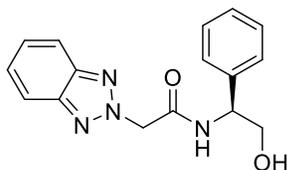
(*S*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-
N-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-
il) acetamida
(10b)



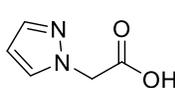
(*S*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-
N-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-
il) acetamida
(10c)



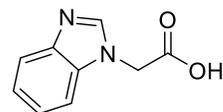
(*S*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-
N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-
2-il) acetamida
(10d)



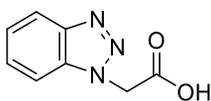
(*S*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]
triazol-2-il)-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)
acetamida
(10e)



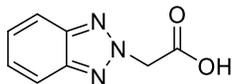
2-(1*H*-pirazol-1-il)
ácido acético
(15a)



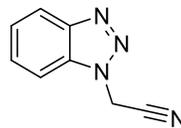
2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-
1-il)ácido acético
(15b)



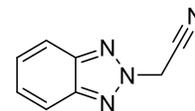
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)ácido acético
(15c)



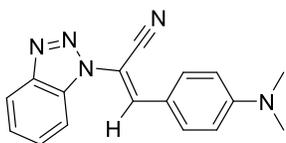
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-yl)ácido acético
(15d)



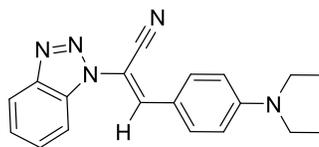
2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)acetonitrilo
(17a)



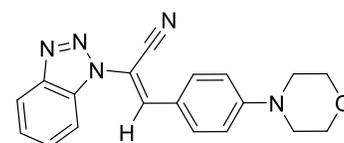
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)acetonitrilo
(17b)



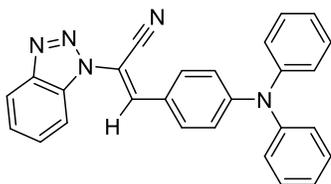
(*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo
(20a)



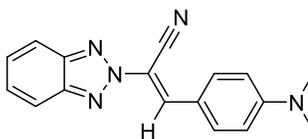
(*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo
(20b)



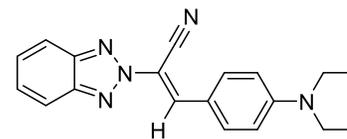
(*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo
(20c)



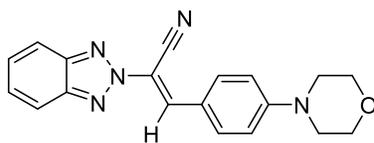
(*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo
(20d)



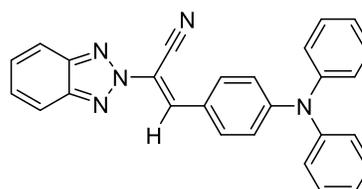
(*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-yl)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo
(21a)



(*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-yl)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo
(21b)



(*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-yl)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo
(21c)



(*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-yl)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo
(21d)

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al “cáncer” como un conjunto de enfermedades relacionadas que pueden afectar a cualquier parte del organismo; de la misma forma hace referencia a “tumores malignos o neoplasias malignas”. La característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, por un proceso conocido como metástasis.¹

Este término engloba más de 100 diferentes tipos de enfermedades que presentan esta característica y en la mayoría de los casos hace referencia a padecimientos crónico-degenerativos por lo que la incidencia y la tasa de mortalidad tienden a incrementar con la edad.

Por otro lado, algunos tipos de cáncer presentan mayor incidencia en mujeres que en hombres y viceversa, y otros se presentan indistintamente.²

1.1.2. Cáncer a nivel mundial

En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial ocupando el segundo lugar debido a que, cada año mueren en el mundo cerca de 10 millones de personas a consecuencia de esta enfermedad.¹

De acuerdo con los datos reportados por la OMS en el 2018, se considera que una de cada seis muertes en el mundo es a consecuencia de este padecimiento, es decir, 9.6 millones de muertes.³

Por otro lado, los tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres que se reportaron en este mismo año fueron, el cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado; mientras que el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, pulmonar, cervical y tiroideo fueron los más comunes en mujeres. Es importante resaltar que, en términos de mortalidad, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar.^{2, 3}

1.1.3. Cáncer en México

Recientemente se ha reportado que en nuestro país el cáncer se considera la tercera causa de muerte, sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes; desde el año 2000 la mortalidad a causa de esta enfermedad incrementó en un 20%. Por otro lado, el Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), reporta que entre 2010 y 2018 las defunciones relacionadas con el cáncer, o tumores malignos, han pasado de 70,240 a 85,754. Los datos más recientes del INEGI revelan que son las mujeres las que registran un mayor número de decesos, ya que en 2018 se reportaron 44,164 casos, lo que representa un incremento de 23.2% respecto a 2010, año en el que hubo 35,823 decesos.⁴

El Instituto Nacional de Cancerología (INCan) informó recientemente que en nuestro país se diagnostican 191,000 casos de cáncer al año, de los cuales

84,000 fallecen; es por eso que esta enfermedad se ubica como la tercera causa de mortalidad en México y la segunda en Latinoamérica.⁴

1.1.4. Causas del cáncer

Recientemente la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en su informe mundial sobre el cáncer, reportó que la inducción de esta enfermedad es multifactorial y a la fecha no se conocen muchos de estos factores; no obstante, lo que sí está bien establecido son los factores genéticos, ambientales y nutricionales. De donde el cáncer inicia con la transformación de una célula normal en tumoral por un proceso multifisiológico y que consiste en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes.
- Carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas o el arsénico.
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus o bacterias principalmente.

Como ya se ha mencionado, el envejecimiento es otro factor importante para el desarrollo de cáncer debido a que se combina la acumulación

general de factores de riesgo y la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad.⁵

1.1.5. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se basa en un examen patológico y la búsqueda de biomarcadores específicos en cada tipo de cáncer e implica la evaluación del historial del paciente, los exámenes clínicos, la revisión de los resultados de las pruebas de laboratorio, datos radiológicos y el examen microscópico de las muestras de tejido obtenidas mediante biopsia o por aspiración con aguja fina. Para la determinación de un tratamiento adecuado es importante conocer la fase de la enfermedad, para que el tratamiento ayude a reducir la carga del tumor o aliviar los síntomas.

A continuación, se enlistan las fases que puede presentar el cáncer:

- «Cáncer temprano» hace referencia a las fases I y II
- «Cáncer avanzado» hace referencia a las fases III y IV.⁶

El tratamiento contra el cáncer consiste en una serie de intervenciones dirigidas a curar la enfermedad o prolongar considerablemente la vida del paciente (durante varios años) y al mismo tiempo que se mejora su calidad de vida. Algunos de los principales tratamientos para el cáncer son:

- **Cirugía:** existen diferentes tipos de cirugía según el objetivo, la cantidad de tejido que debe extirparse y la preferencia del paciente. Puede tratarse de una cirugía abierta o invasiva y dependiendo del tipo de cáncer y de la fase en que se encuentre, la cirugía puede usarse

para extirpar el tumor o para reducirlo. Los efectos adversos que presenta son el dolor después de la cirugía, riesgo de infección, hemorragias, daño a tejidos cercanos y las posibles reacciones a la anestesia.

- **Radioterapia:** es un tratamiento que se puede aplicar en altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores. En las dosis altas, se destruyen las células cancerosas y hace lento el crecimiento al dañar su ADN. La radioterapia se puede usar antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor, durante la cirugía para dirigirla o después de la cirugía para destruir las células cancerosas remanentes. Sin embargo, los efectos adversos que surgen ante este tratamiento, a menudo, dependen de la parte del cuerpo donde se aplica; entre los que destacan esta la caída de pelo, cambios en la piel, fatiga, náuseas y vómitos.
- **Quimioterapia:** se refiere al uso de fármacos que tienen la capacidad de detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerosas, las cuales tienen la característica de crecer y dividirse rápidamente. Dicho tratamiento puede usarse para curar el cáncer, para detenerlo o bien, para evitar que regrese. Puede emplearse para tratar distintos tipos de cáncer, como único tratamiento o en combinación con otros. Debido a la poca selectividad que presenta este tratamiento además de destruir las células cancerosas, también destruye las células sanas que crecen y se dividen con rapidez. Dentro de los efectos adversos

más graves que se presentan se encuentra la mielosupresión, neutropenia y trombocitopenia

- **Inmunoterapia:** es un tipo de terapia biológica que, haciendo uso de sustancias producidas por el organismo, ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer. Algunos de los tipos de inmunoterapia son el uso de anticuerpos monoclonales, la transferencia adoptiva celular, citocinas y vacunas de tratamiento. Aun cuando este es uno de los tratamientos más selectivos, presenta algunos efectos secundarios como son dolor, hinchazón, irritación, prurito, fiebre, mareos, diarrea, náuseas y vómito.
- **Terapia hormonal:** se trata del uso de hormonas para hacer lento o detener el cáncer y puede ser de dos tipos; 1) tratamiento en el que se bloquea la capacidad del cuerpo para producir hormonas y 2) donde se interfiere el comportamiento de las hormonas en el cuerpo. Esta terapia se puede emplear para tratar cáncer de próstata y de mama. Los efectos secundarios que se presentan tanto en hombres como mujeres son la disminución de la libido, náuseas, cambios de ánimo y fatiga.^{7, 9}

1.1.6. Fármacos antineoplásicos

Se ha reportado que los fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular y esto se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de

duplicación del tumor; es decir, cuando hay una mayor proliferación se prevé una mayor respuesta al tratamiento citostático. En la evolución del cáncer se van produciendo nuevas alteraciones genéticas, que están estrechamente ligadas a la aparición de resistencias.

Un mismo fármaco tiene varios mecanismos de acción sobre la célula tumoral, aunque habitualmente predomina uno de ellos. La clasificación que se utiliza actualmente se basa en la diana o punto de acción del antineoplásico:

- Antineoplásicos que actúan sobre el ADN (ácido desoxirribonucleico): agentes alquilantes, antibióticos como antraciclinas y análogos, antimetabolitos, derivados del platino y derivados de camptotecinas.
- Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis sin afectar al ADN: antineoplásicos de origen vegetal.
- Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular: antagonistas de estrógenos, antagonistas de andrógenos, progestágenos, interferones y análogos de la hormona liberadora de la hormona leutinizante, LHRH (del inglés Luteinizing hormone-releasing hormone).
- Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario: TNF- β o factor de necrosis tumoral, interleucinas, anticuerpos monoclonales como el Rituximab y vacunas como la BCG (*Bacilo Calmette Guerin*).^{8, 9, 10}

Debido a que el desarrollo del cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, surge la necesidad de sintetizar nuevos fármacos con mejores características a los ya existentes en el mercado, y con menores efectos adversos. Una gran oportunidad para el desarrollo de estos nuevos medicamentos es precisamente la síntesis de nuevos compuestos que tengan en su estructura heterociclos de cinco miembros tales como grupos azoles y oxazolininas con distintos sustituyentes, para así evaluar su actividad biológica sobre células cancerosas y establecer una relación de estructura-actividad.

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES

Dentro de la industria farmacéutica, numerosas investigaciones han centrado su atención en compuestos heterocíclicos tales como las oxazolininas, las cuales son formadas por un anillo de cinco miembros que incorporan átomos de nitrógeno y oxígeno y un doble enlace, que puede ser localizado en tres diferentes posiciones, originando así los tres tipos de anillos de oxazolininas existentes (Figura 1).

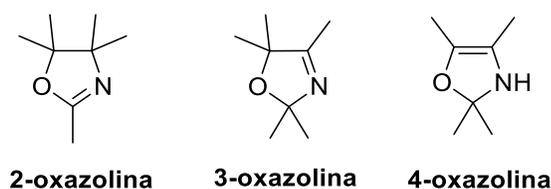


Figura 1. Anillos de oxazolininas.

Este tipo de estructuras ha tomado importancia porque se considera que son responsables de la actividad farmacológica de los compuestos donde se integran, presentando actividad antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, antipirética, antiviral, incluyendo el efecto anti-VIH, antimalaria, antitumoral, antiinflamatoria y como estimulantes del sistema nervioso central (SNC).¹¹

Otro grupo de heterociclos de importancia biológica son aquellos que incorporan en su estructura más de un átomo de nitrógeno (Figura 2), como los azoles, que son heterociclos aromáticos de cinco miembros que incorporan dos heteroátomos, de los cuales uno es un nitrógeno de tipo imina, tales como el pirazol e imidazol, entre otros; también existen los benzoazoles aromáticos, que son azoles fusionados a un benceno que pueden contener dos o más heteroátomos en el azol, entre los que se encuentran el benzimidazol y benzotriazol.¹²

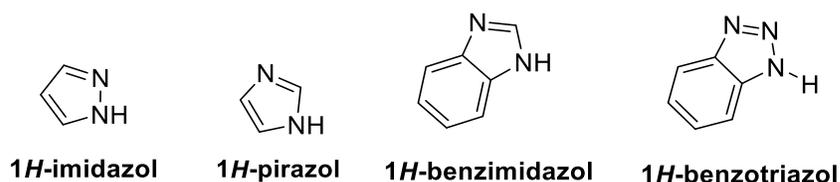
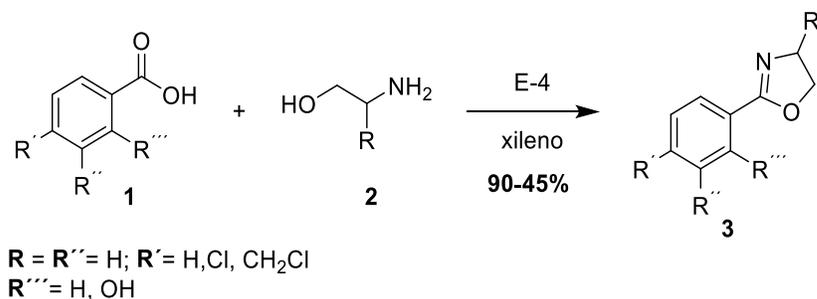


Figura 2. Compuestos del tipo azol.

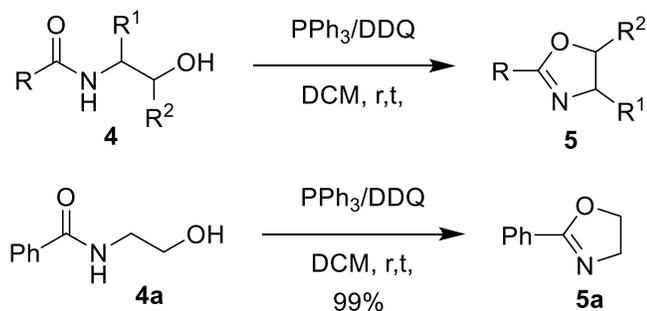
2.1.1. Oxazolinas

Las oxazolinas pueden ser sintetizadas mediante la reacción de distintos compuestos como ácidos carboxílicos, aldehídos, nitrilos, amidas y ésteres en combinación con un aminoalcohol a condiciones particulares según lo requiera la reacción. Por ejemplo, Cwik *et al.*,¹³ reportaron la síntesis de 2-oxazolinas a partir la *N*-acilación de 2-aminoetanol con un ácido carboxílico, en presencia de un absorbente Ersorb-4 (E-4) en tolueno o xileno a reflujo por 5 horas (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de aril-oxazolinas.

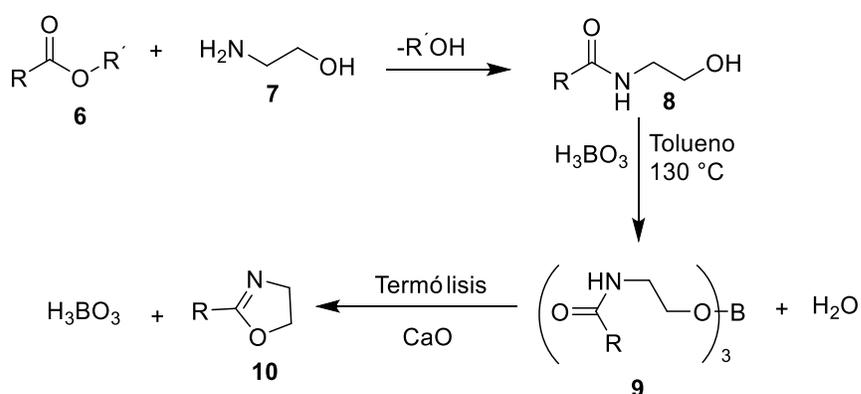
Otro método para la preparación de oxazolinas es mediante la deshidratación-ciclación de *N*-(2-hidroxi) etil amidas. Por ejemplo, Xu y Li ¹⁴ en 2009 reportaron la síntesis de 2-oxazolinas utilizando un sistema DDQ-Ph₃P (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona-trifenilfosfina) que resultó ser eficiente para convertir *N*-(2-hidroxi) etil benzamida a 2-feniloxazolina, obteniéndose con un 99% de rendimiento al utilizar como disolvente diclorometano (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de fenil-oxazolinas.

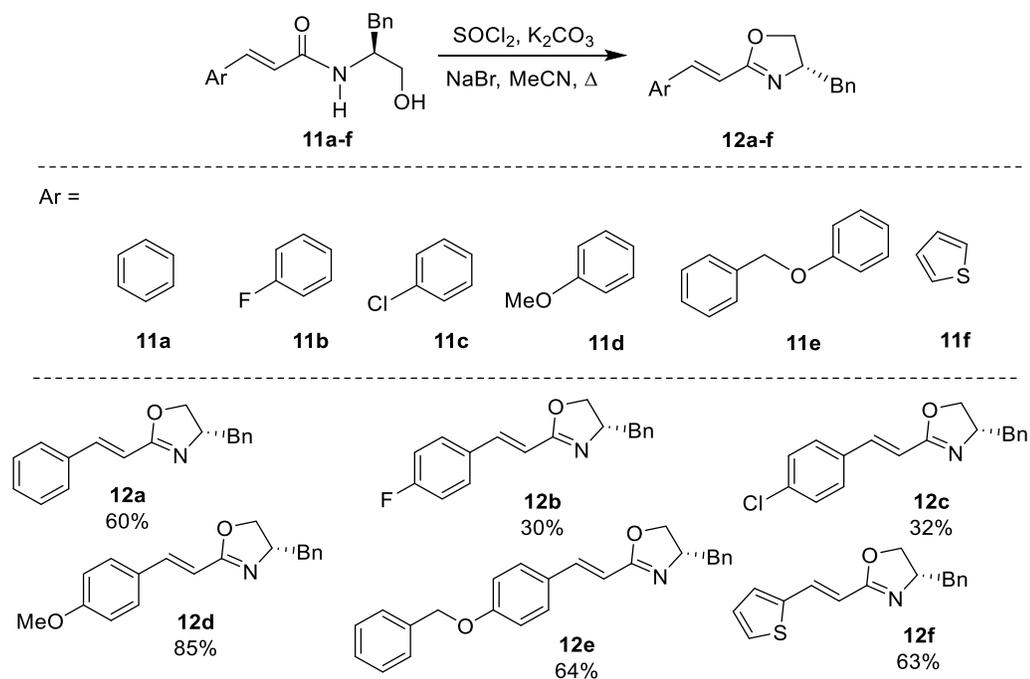
La síntesis de oxazolinas a partir de ésteres también ha resultado favorable, B. Ilkgul *et al.*¹⁵, en el 2010, describieron un nuevo método para

obtener 2-oxazolinas con alto grado de pureza y alto rendimiento. El método propuesto consistió en la termólisis de compuestos de boro, derivados de *N*-(2-hidroxietil) amidas a una temperatura de 240-260 °C. Primeramente se llevó a cabo la preparación de los derivados de boro y posteriormente la termólisis en presencia de CaO, obteniéndose rendimientos de 75% a 95% (Esquema 3).



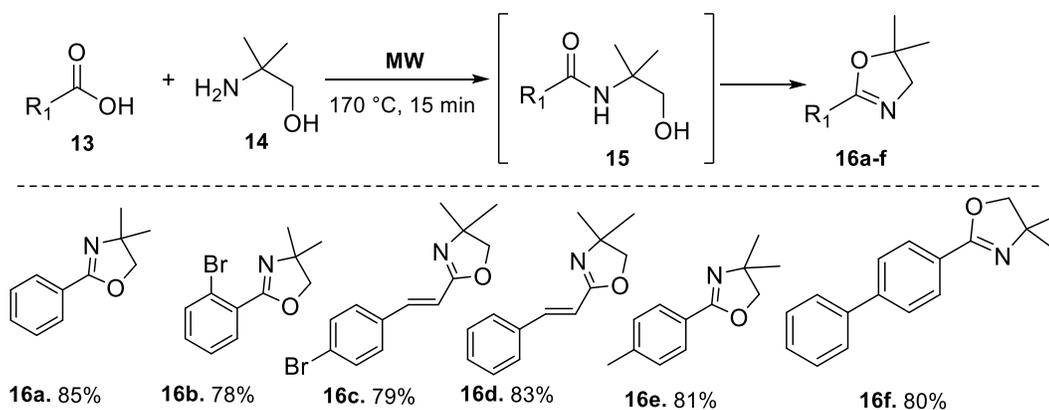
Esquema 3. Síntesis de 2-oxazolinas en tres pasos.

En el 2014, nuestro grupo de investigación Avalos-Alanís *et al.*,¹⁶ reportó un método eficiente para la síntesis de 2,4-oxazolinas-disustituidas con rendimientos de 30 a 69%, utilizando la reacción Horner-Wadsworth-Emmons para la preparación de las hidroxiacetamidas insaturadas, seguido de la ciclación intramolecular utilizando cloruro de tionilo (SOCl₂), carbonato de potasio (K₂CO₃) y bromuro de sodio (NaBr) en presencia de acetonitrilo (MeCN) como disolvente (Esquema 4).



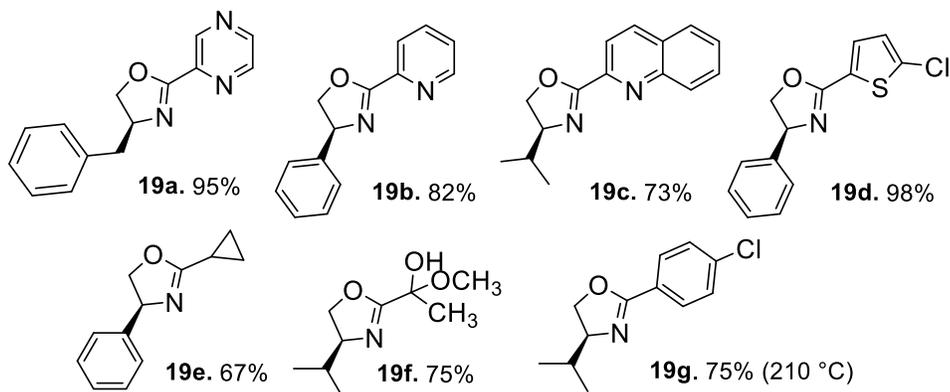
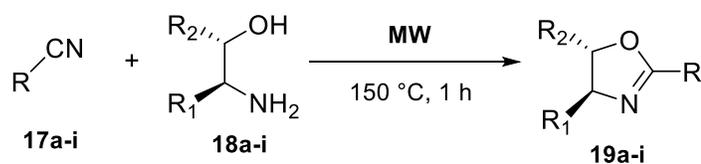
Esquema 4. Síntesis de 2-oxazolinas disustituidas.

Por otro lado, se han reportado varias rutas de síntesis utilizando irradiación de microondas para llegar a la formación de oxazolinas; tal es el caso de Sharma, R. *et al.*,¹⁷ quienes, en 2009, reportaron la síntesis asistida con irradiación de microondas de 2-oxazolinas a partir de ácidos carboxílicos empleando un sistema abierto (*Open Vessel*). Llevaron a cabo la condensación directa de los ácidos carboxílicos con un exceso de aminoalcohol bajo las condiciones descritas en el esquema 5, obteniéndose rendimientos favorables.



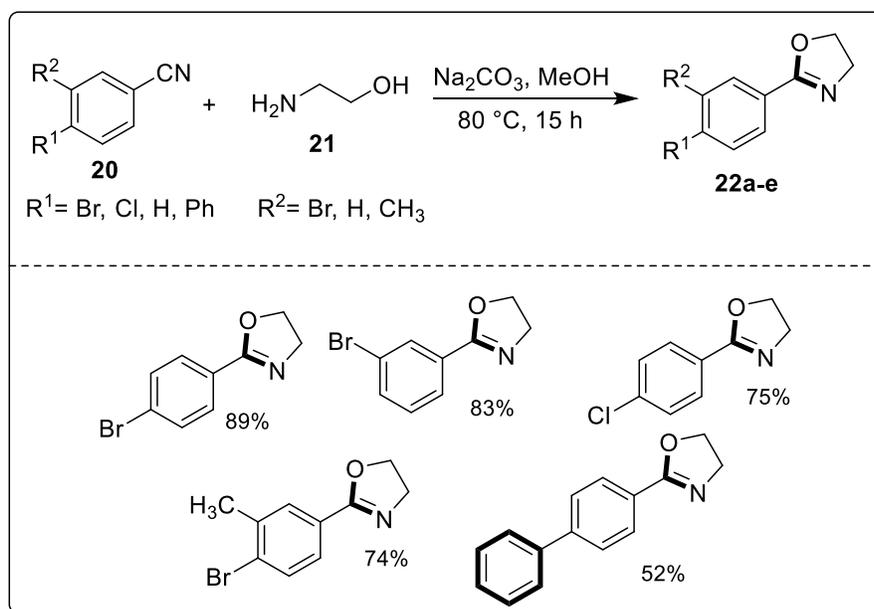
Esquema 5. Síntesis de 2-oxazolinas asistida por MW.

Otra ruta descrita para la formación de oxazolinas quirales a través del uso de las microondas la reportó Hassani *et al.*,¹⁸ en 2014, presentando una ruta de síntesis en condiciones libres de disolvente y de catalizadores metálicos. Llevaron a cabo la reacción entre distintos compuestos de nitrilos y varias amidas para obtener oxazolinas con rendimientos de hasta un 98% (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis de oxazolinas quirales asistida por MW.

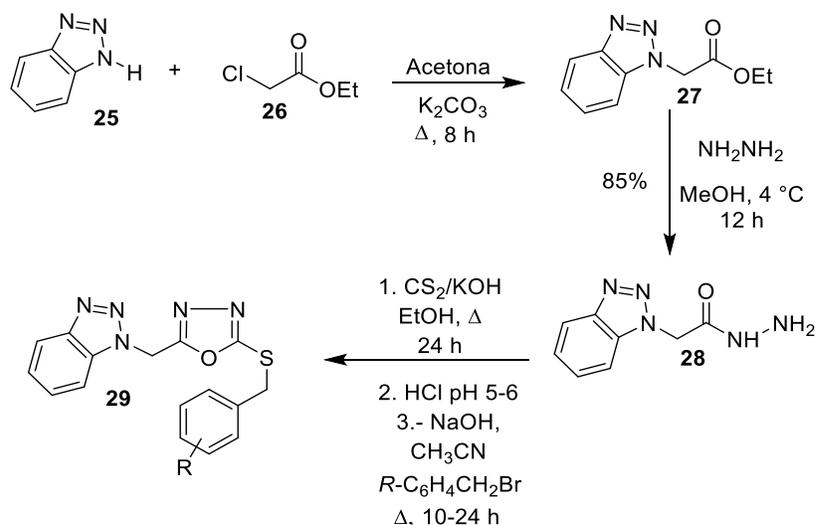
La preparación de oxazolinas a partir de nitrilos también fue reportada por Garg, P. *et al.*,¹⁹ en 2014, cuando llevaron a cabo la síntesis de oxazolinas a partir de nitrilos y etanolamina, utilizando como disolvente metanol y como base Na_2CO_3 (Esquema 7). La metodología reportada no requiere de catalizadores, teniendo rendimientos químicos que van del 44% al 74% en un tiempo de reacción de 15 h.



Esquema 7. Síntesis de 2-aryl-heteroaryl-oxazolinas.

2.1.2. Azoles y su actividad biológica

En 2013, Zhang *et al.*,²⁰ reportaron la síntesis de nuevos compuestos que incorporan en su estructura derivados de benzotriazol (Esquema 8) y evaluaron la actividad anti-cáncer utilizando dos líneas celulares cancerosas, MCF-7 (cáncer de mama) y HT29 (cáncer de colon) y como control positivo utilizaron Cisplatino. Los resultados obtenidos demostraron que el compuesto **29a** fue el más activo mostrando, valores de IC_{50} de $5.68\ \mu\text{g/mL}$ y $10.21\ \mu\text{g/mL}$ (Tabla 1).



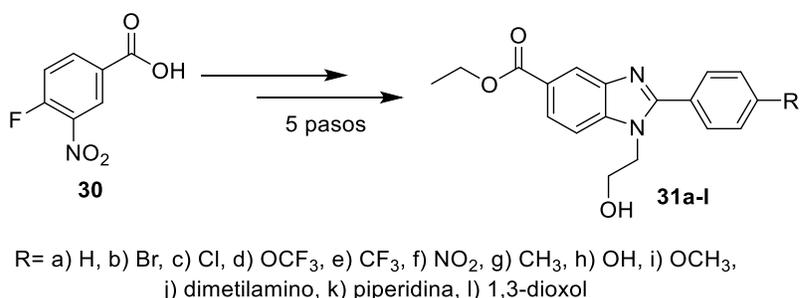
Esquema 8. Síntesis de derivados de benzotriazol.

Tabla 1. Actividad anti-cáncer de derivados de benzotriazol.

Compuestos	R	IC50 (µg/mL)		Compuestos	R	IC50 (µg/mL)	
		MCF-7	HT29			MCF-7	HT29
29a	2-F	5.68	10.21	29g	3-Br	16.3	31.2
29b	2-Cl	10.75	15.27	29h	3-OCH ₃	24.22	36.22
29c	2-CH ₃	18.89	26.81	29i	4-F	8.7	17.62
29d	2-NO ₂	15.6	19.35	29j	4-CH ₃	30.23	42.3
29e	3-F	8.25	15.47	29k	4-OCH ₃	25.82	37.62
29f	3-Cl	12.46	15.6	Cisplatino		11.2	15.83

La actividad de estos compuestos fue relacionada con el tipo de sustituyentes presentes en su estructura que, de acuerdo con los resultados, aquellos compuestos que tienen en su estructura un grupo aceptor de electrones presentan mayor actividad que aquellos que tienen un grupo electrodonador.

Yoon *et al.*,²¹ en 2014, reportaron la síntesis de nuevos derivados de benzimidazol en 5 pasos de reacción, utilizando el ácido 4-fluoro-3-nitrobenzico como material de partida, para generar los derivados de benzimidazol **31a-l** (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de derivados de benzimidazol.

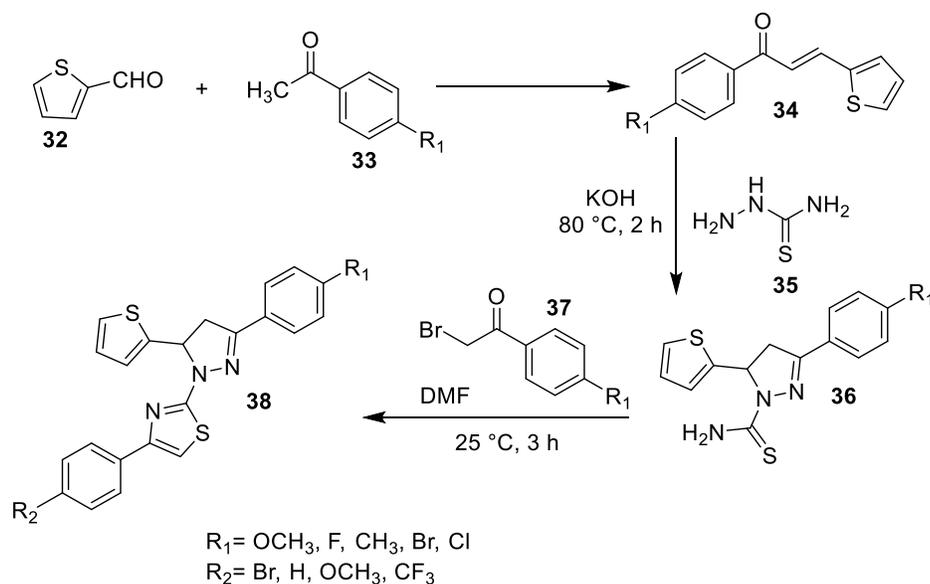
Se evaluó la actividad biológica de estos compuestos utilizando dos líneas celulares cancerosas MCF-7 y MDA-MB-468 (cáncer de mama) utilizando como control positivo cambinol (un inhibidor de la actividad desacetilasa dependiente de NAD de SIRT1 humano). Los resultados se reportaron en porcentaje (%) de inhibición celular a 50 μ M (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad anti-cáncer de derivados de benzimidazol.

Compuesto	R	Inhibición celular (%) a 50 μ M	
		MCF-7	MDA-MB-468
31j	Dimetilamino	49.63	46.33
31k	Piperidina	42.37	45.51
31l	1,3-dioxol	62.43	42.3
Cambinol		38.26	22.09

Los compuestos que mostraron mayor actividad antitumoral en ambas líneas celulares fueron el **31j**, **31k** y **31l**; estos compuestos presentan en su estructura un grupo donador de electrones (amino, metil, y grupos metoxilo), el cual posiblemente sea parte importante de la actividad antitumoral.

Zhao *et al.*,²² en 2015, reportaron la síntesis y evaluación anti-cáncer de derivados de 1*H*-pirazol. Los compuestos obtenidos **38a-38h** fueron sintetizados a partir de tiofencarbaldehído con diferentes cetonas como materiales de partida. Esta metodología involucra 3 pasos de reacción para generar los derivados de interés (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis de derivados de 1*H*-pirazol.

Para la evaluación *in vitro* de los compuestos obtenidos se utilizaron dos líneas celulares, WM266.4 (células de melanoma humano) y MCF-7 (cáncer de mama), como control positivo se utilizó el Sorafenib (fármaco antineoplásico,

inhibidor de la tirosin quinasa). Los resultados mostraron actividad inhibitoria sobre la tirosin quinasa (BRAF^{V600E}), para el compuesto **38j** con un IC₅₀= 0.05μM y mostró un alto potencial antiproliferativo con un IC₅₀= 0.12μM en células WM266.4 y 0.16μM en células MCF-7. Los autores proponen que dicha actividad biológica está relacionada con los diferentes grupos R unidos a los grupos fenilo presentes en la molécula (Tabla 3).

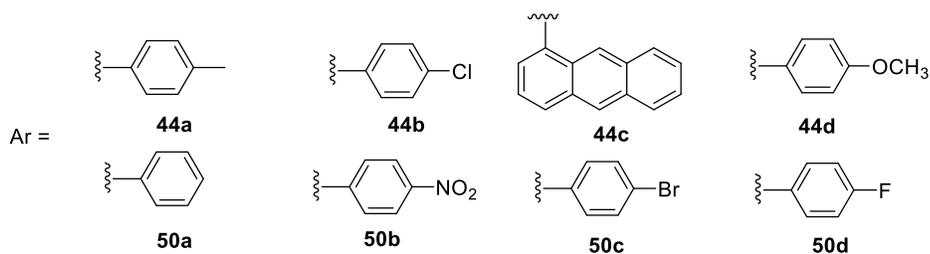
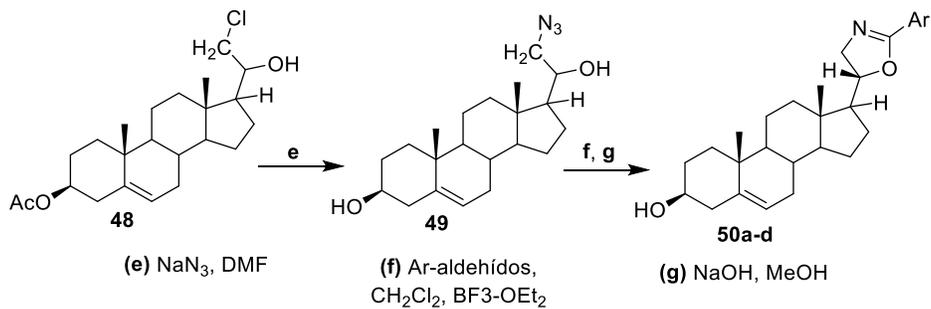
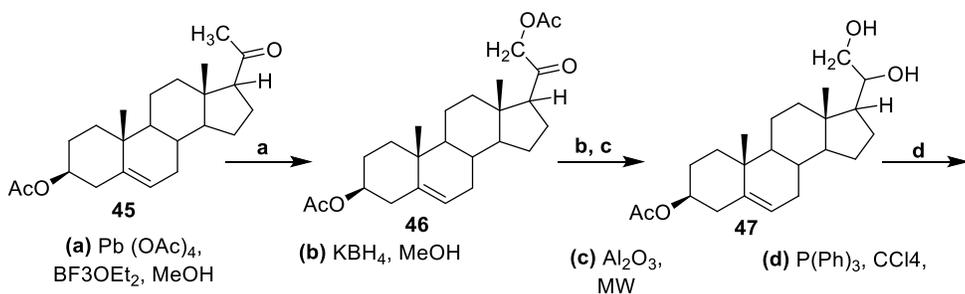
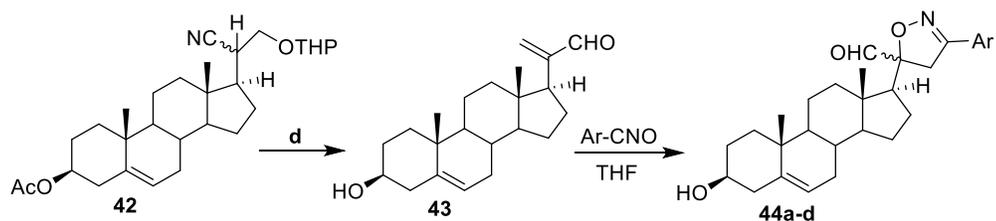
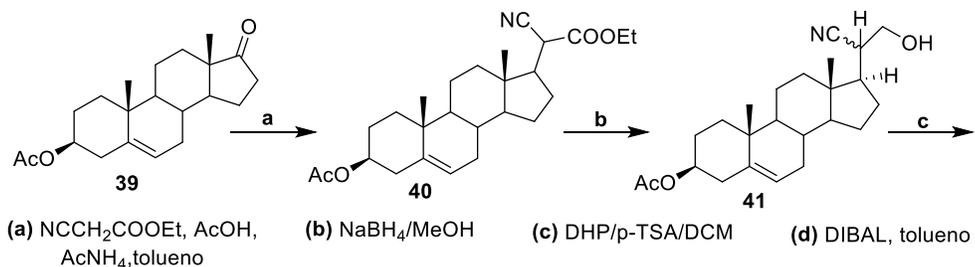
La sustitución de R1 y R2 conduce a un cambio en la actividad sobre las células cancerosas empleadas, así como la quinasa BRAF^{V600E}. Los compuestos que contienen R1=Cl y R2=CF₃ demostraron ser los más activos contra BRAF^{V600E} quinasa y las líneas celulares de cáncer WM266.4 y MCF-7. Por otro lado, los compuestos que poseen grupos liberadores de electrones como OCH₃ y CH₃ en la posición R1 mostraron actividad para BRAF^{V600E} quinasa sin embargo, cuando estos sustituyentes se reemplazaron por un grupo de atractor de electrones R1=F, Cl, Br la actividad de estos compuestos incrementó. La actividad para BRAF^{V600E} se considera en orden descendente para la sustitución de R1 (Cl> Br> F> CH₃> OCH₃) y para la sustitución de R2 es CF₃> H> OCH₃> Br, mientras que para las líneas celulares cancerosas WM266.4 y MCF-7 la actividad está en orden creciente para la sustitución de R1 es OCH₃ <CH₃ <Br <F <Cl y para la sustitución de R2 es OCH₃ <H <Br <CF₃.

Tabla 3. Actividad anti-cáncer en MCF-7 y WM266.4 e inhibición de BRAF^{V600E}.

Compuesto	R1	R2	IC ₅₀ μM		
			BRAF ^{V600E}	WM266.4	MCF-7
38a	OCH ₃	CF ₃	10.9	8.11	45.67
38b	F	Br	1.86	0.22	8.28
38c	F	CF ₃	1.01	5.12	1.33
38d	CH ₃	Br	0.56	18.36	2.01
38e	CH ₃	CF ₃	6.18	2.11	31.48
38f	Br	Br	8.87	12.98	28.29
38g	Br	CF ₃	2.09	27.38	7.81
38h	Cl	CF ₃	0.05	0.12	0.16
Sorafenib	---	---	0.03	0.06	0.19

2.1.3. Oxazolinas y su actividad biológica

Banday *et al.*,²³ diseñaron dos nuevas series de isoxazolinas y oxazolinas esteroidales a partir del acetato de hidroepiandrosterona y acetato de pregnenolona utilizando una síntesis de multipasos donde el paso clave es la cicloadición de óxidos de nitrilo aromáticos a través de olefinas α,β -insaturadas, generando los compuestos **44a-d** y **50a-d**. Los compuestos sintetizados de ambas series fueron etiquetados como **44a-d** y **50a-d** para isoxazolinas y oxazolinas respectivamente (Esquema 11).

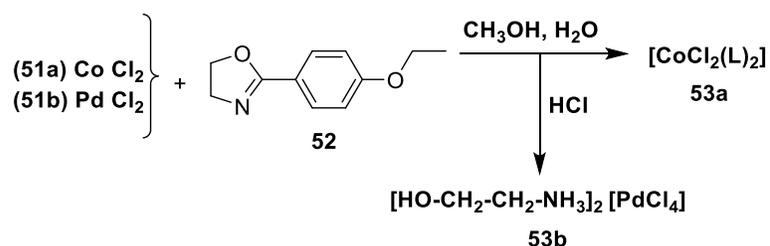


Esquema 11. Derivados de isoxazolininas y oxazolininas.

Se realizaron pruebas de citotoxicidad a cada uno de los compuestos para evaluar su actividad anti-cáncer, usando tres líneas celulares LNCaP, PC-3 y DU-145 correspondientes a cáncer de próstata.

Al término de la evaluación, se reportó que los compuestos **44a**, **44e** y **50a** mostraron una alta actividad citotóxica, especialmente contra las líneas celulares LNCaP y DU-145; esto puede ser atribuido a la naturaleza del sustituyente (Me, OMe) presente en el anillo aromático, ya que dichos sustituyentes son grupos electrodonadores.

En 2013, M.G. Alexandru *et al.*,²⁴ reportaron la formación de complejos de Co (II) y Pd (II) utilizando la fenil oxazolina **52** (Esquema 12).



Esquema 12. Formación de complejos Co (II) y Pd (II).

Los complejos resultantes se sometieron a pruebas de citotoxicidad en células PBMC (células normales) y HeLa (cáncer de cérvix) para evaluar su potencial efecto antitumoral. La prueba de citotoxicidad fue evaluada por el método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y los resultados fueron expresados como IC₅₀ de concentración de compuesto en μM.

Los resultados indicaron que el complejo **53b** presentó una mayor actividad citotóxica con un IC₅₀ de 0.44 μM contra las células HeLa y también presentó una mayor selectividad en PBMC, en comparación con el compuesto **53a**.

2.2.4. Benzotriazolil-nitrilos

La investigación de nuevas moléculas que sean selectivas hacia células cancerosas sigue siendo un reto en la actualidad. En los últimos años, numerosas investigaciones han centrado su atención en los compuestos heterocíclicos incorporando nitrógeno en su estructura; ya que se consideran como posibles isómeros de componentes estructurales de los nucleótidos.^{25, 26}

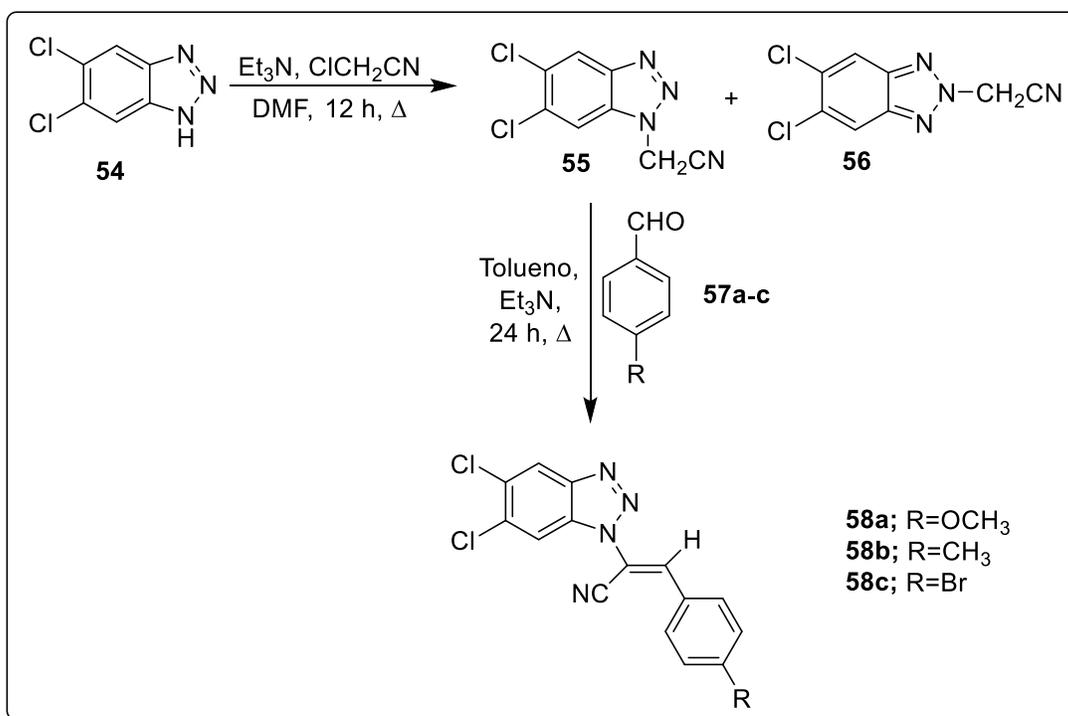
El benzotriazol ha sido ampliamente estudiado dentro de la química heterocíclica y su incorporación en moléculas más elaboradas ha demostrado poseer actividad antiinflamatoria, antimicrobiana y sobre todo antitumoral.^{27, 51} Algunas investigaciones han reportado que los derivados de benzotriazol actúan durante la fase G2/M del ciclo celular debido a la interacción que surge entre el anillo de benzotriazol y la tubulina; a través de fuerzas de Van der Waals y que el resto del triazol se inserta en el sitio de unión a la colchicina.^{28, 29, 30}

Por otro lado, es bien conocido que los nitrilos forman parte de las estructuras de numerosos fármacos debido a la capacidad que presentan para formar puentes de hidrógeno entre el nitrógeno del nitrilo y algunos aminoácidos como la serina o la arginina. En otros casos, el dipolo que se presenta en este grupo

origina interacciones polares en las que el nitrilo puede actuar como isómero del hidroxilo o el carboxilo de los aminoácidos.

En la actualidad se encuentran en el mercado más de 30 productos farmacéuticos para distintas indicaciones terapéuticas que contienen nitrilo, y continúa el desarrollo de nuevos fármacos que incluyen en su estructura este grupo gracias a los estudios de cristalografía de rayos X que revelan la interacción molécula-proteína que se genera en el sitio activo.³¹

Dentro de la literatura se han encontrado reportes de algunas moléculas que involucran en su estructura grupos nitrilo y que han sido evaluadas como agentes antibacteriales y antitumorales. Un ejemplo de esto es el trabajo de A. Carta *et al.*,³² en 2011, cuando reportaron una ruta de síntesis para la preparación de compuestos aril-acrilonitrilos con potencial actividad antitumoral (Esquema 13).



Esquema 13. Ruta de síntesis para la preparación de aril-acrilonitrilos.

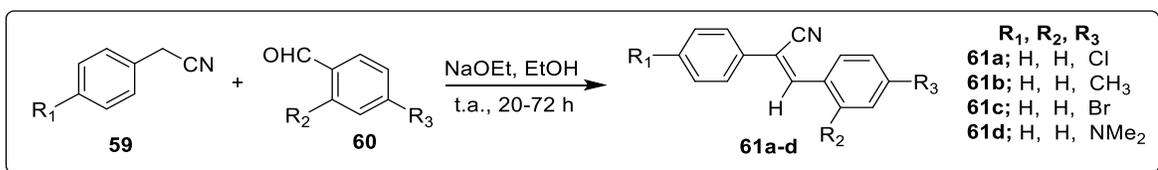
La ruta de síntesis reportada por los autores involucró varios pasos de reacción bajo condiciones de reflujo y tiempos largos de reacción para obtener una serie de acrilonitrilos con distintos sustituyentes empleando diferentes aldehídos. Cada uno de los compuestos obtenidos fue probado como potencial agente antitumoral en distintas líneas celulares cancerosas. En la Tabla 4 se describen los resultados obtenidos para el ensayo de actividad citotóxica en tres líneas celulares cancerosas de estos compuestos.

Tabla 4. Actividad anti-cáncer de aril-acrilonitrilos.

Compuesto	R	CC ₅₀ (μM)		
		CCRF CEM	CCR FSB	DU145
58a	OCH ₃	>100	>100	>100
58b	CH ₃	2.8	2.8	17
58c	Br	5.3	12	7
Etopósido	-	0.09	0.1	0.4

Los resultados indicaron que el compuesto **58b** mostró la mejor actividad antitumoral en las líneas celulares de leucemia (CCRF CEM y CCR FSB) en comparación con los compuestos **58a** y **58c**; no obstante, para la línea celular de cáncer de próstata (DU145) el compuesto que presentó la mejor actividad fue el compuesto **58c**. Es importante mencionar que la actividad antitumoral de los compuestos preparados no superó la actividad del etopósido, el cual fue utilizado como control positivo.

Por otro lado, en 2013, M.S. Alam *et al.*,³³ reportaron la síntesis de análogos de (Z)-2,3-difenilacrilonitrilos con el objetivo de evaluar su actividad como agentes antimicrobianos y antitumorales. La ruta de síntesis que llevaron a cabo involucró un paso de reacción; sin embargo, el tiempo de reacción reportado para la preparación de algunos compuestos alcanzó las 72 h (Esquema 14).



Esquema 14. Ruta de síntesis para la preparación de difenil-acrilonitrilos.

La preparación de este tipo de acrilonitrilos involucró la reacción entre el arilacetónitrilo **59** con diferentes aldehídos aromáticos **60** para generar los compuestos **61a-d**. El análisis de citotoxicidad se llevó a cabo en cuatro líneas celulares A549 (cáncer de pulmón), SK-OV-3 (cáncer de ovario), SK-MEL-2 (cáncer de piel) y HCT15 (cáncer de colon). En la tabla 5 se muestran los resultados de IC₅₀ para los compuestos que presentaron una mayor actividad antitumoral.

Tabla 5. Actividad anti-cáncer de difenilacrilonitrilos.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)			
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	HCT15
61a	1.81	0.20	1.53	1.22
61b	1.82	0.58	1.63	1.51
61c	18.19	5.57	14.46	13.98
61d	0.57	0.14	0.65	0.34
Doxorrubicina	0.011	0.092	0.009	0.814

Como se puede observar, los compuestos que presentaron una mejor actividad antitumoral fueron **61a**, **61b** y **61d**, siendo este último el que presentó una

actividad más cercana a la reportada para el control positivo doxorubicina y el más activo en todas las líneas celulares.

Con base a los reportes anteriormente analizados y en vista de que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, surge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con mejores características a los ya existentes. Por lo tanto, en el presente proyecto se propuso una síntesis rápida y eficiente para la preparación de benzotriazolil-acrilonitrilos con una producción de ocho nuevos compuestos finales y evaluación de su actividad citotóxica sobre dos líneas celulares cancerosas, esplenocitos murinos y células mononucleares de sangre periférica. De esta forma, se establece la siguiente hipótesis.

CAPÍTULO III

3.1. HIPÓTESIS

La actividad anti-cáncer de los benzotriazolil-acrilonitrilos es mejor que la actividad mostrada por el fármaco de referencia Doxorubicina.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nuevos derivados de benzotriazolil-acrilonitrilos y evaluar su actividad citotóxica *in vitro*.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Sintetizar dos derivados de azolil-aceto de etilo asistido por ultrasonido.
- ✚ Sintetizar ocho nuevos benzotriazolil-acrilonitrilos mediante la reacción del benzotriazolil-acetonitrilo correspondiente con 4 diferentes aldehídos (4-dimetilamino-benzaldehído, 4-dietiletanolamina, 4-piperidin-1-il-benzaldehído, 4-difenilamino-benzaldehído) mediante condiciones convencionales.
- ✚ Caracterizar estructuralmente cada uno de los compuestos obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y ^{13}C), Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).

- ✚ Evaluar la actividad anti-cáncer *in vitro*, de los compuestos sintetizados en dos líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y 4T1 (cáncer de mama)

- ✚ Evaluar la toxicidad de las moléculas con mayor actividad anticancerosa sobre esplenocitos murinos y células mononucleares de sangre periférica.

- ✚ Evaluar la genotoxicidad de los compuestos que no presenten citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el ensayo cometa.

CAPÍTULO IV

4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este apartado se describe de forma general la metodología experimental llevada a cabo para la preparación de cada uno de los compuestos sintetizados, así como la técnica de purificación empleada tanto para los productos como para los intermediarios, el proceso de caracterización, la metodología empleada para la evaluación de actividad anti-cáncer, citotoxicidad y genotoxicidad al ADN.

4.1.1. Materiales y equipos

La síntesis orgánica se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Industrial ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para la síntesis asistida por ultrasonido se utilizó un equipo de la marca Branson 5510 y para la metodología de microondas se trabajó con un equipo de la marca CEM modelo Discover System, ambos ubicados en este edificio.

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice TLC con un espesor de 0.2 mm sobre soporte de aluminio y se revelaron utilizando luz ultravioleta y vapores de yodo. Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice Merck 60 (230-400 mm) como fase estacionaria. Las proporciones del disolvente empleadas como fase móvil se indican en cada caso.

Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos en un equipo Electrothermanl 1101D.

Para la síntesis de los compuestos se utilizaron los siguientes reactivos:

- ✚ SIGMA-ALDRICH: Pirazol, benzimidazol, 1*H*-benzotriazol, bromoacetato de etilo, etanolamina, (S)-fenilglicinol, (S)-valinol, (S)-leucinol, bromoacetonitrilo, carbonato de potasio (K₂CO₃), bromuro de sodio (NaBr), cloruro de tionilo (SOCl₂), gel de sílice Merck 60 (230-400 mm).
- ✚ Desarrollo de Especialidades Químicas: Acetato de etilo (GI), hexano (GI), metanol (GI) los cuales fueron destilados, acetonitrilo, EtOH, THF y DMF grado reactivo.

4.1.2. Evaluación biológica

La evaluación citotóxica se llevó a cabo en el Laboratorio 6 de Inmunología y Virología de la Unidad C de Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León; se realizó mediante el empleo de un lector de placas Synergy HTTM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

El ensayo de genotoxicidad se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León; dicho ensayo se realizó empleando una cámara de electroforesis Select BioProducts (modelo BioVolt 300V) y una cámara de fluorescencia ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO RAD).

- ✚ SIGMA-ALDRICH: Hidróxido de sodio (NaOH), EDTA, Tris-HCl, yoduro de propidio, PBS, agarosa de bajo punto de fusión, cloruro de sodio (NaCl), Tritón X-100, DMSO, Tris-base, fenol, sevag (cloroformo-alcohol isoamílico), etanol.
- ✚ ATCC: MCF7 (ATCC® HTB-22™), 4T1 (ATCC® CRL-2539™).

4.1.3. Manejo y disposición de los residuos generados

Para realizar cada una de las reacciones se utilizó el equipo personal de seguridad en el laboratorio (bata, lentes, mascarilla y guantes) debido al riesgo que presenta el manejo de reactivos altamente irritantes. Estas reacciones se llevaron a cabo en una campana de extracción.

La disposición de los residuos generados se realizó de acuerdo con el Reglamento Interno de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Químicas, Biología y Medicina, respectivamente (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Disposición de residuos químicos.

COLECTOR	SUSTANCIA	COLECTOR	SUSTANCIA
A	Soluciones salinas pH 6.8, sales, ácidos y bases inorgánicas.	E	Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
B	Sólidos inorgánicos y sales inorgánicas.	F	Sales de metales preciosos.
C	Tóxicos e inflamables, aminas, disolventes orgánicos halogenados.	G	Combinaciones orgánicas sólidas
D	Tóxicos e inflamables y disolventes no halogenados.	H	Oxidantes
E	Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.	Colector de residuos de cianuro.	

Tabla 7. Disposición de residuos biológicos.

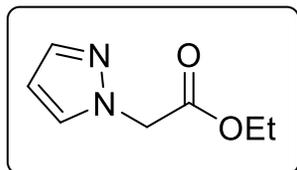
TIPO DE RESIDUO	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
Sangre	Líquido	Recipiente hermético	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólido	Bolsa de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólido	Bolsa de polietileno	Amarillo
	Líquido	Recipiente hermético	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólido	Bolsa de polietileno	Rojo
	Líquido	Recipiente hermético	Rojo

4.2. Métodos sintéticos

4.2.1. Procedimiento general para la preparación de azolil-ésteres 3a-b

De manera general se colocó en un matraz redondo de 250 mL el azol correspondiente (pirazol, imidazol o benzimidazol) (1 Eq), K_2CO_3 (2.1 Eq) y CH_3CN (30 mL), posteriormente se agregó gota a gota bromoacetato de etilo (1.3 Eq), se tapó y se colocó en el baño de ultrasonido durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se agregaron 15 mL de agua y se realizaron extracciones con AcOEt (3 x 30 mL); se combinaron los extractos orgánicos y el volumen resultante se secó utilizando Na_2SO_4 anhidro y posteriormente se evaporó a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando diversas mezclas de disolventes (Hex, AcOEt, MeOH).

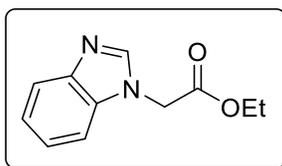
4.2.1.1. Preparación del compuesto 1H-pirazolil-acetato de etilo 3a



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 5.0 g (1 Eq) de pirazol; 21.31 g (2.1 Eq) de K_2CO_3 , en 30 mL de CH_3CN ; y 15.94 g, 13.17 mL (1.3 Eq) de bromoacetato de etilo. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina evaluando diferentes sistemas cromatográficos para elegir el que presentara una eficiente separación. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil un sistema de disolventes AcOEt:Hex (7:3).

Aceite amarillo (78%); **IR** (cm^{-1}): 3123 ν (C-H, Pirazol); 2985, 2909 ν (C-H, alifático); 1747 ν (C=O); 1203 ν (C-O-C); 1519, 1451, 1395, 1376, 974 ν (Pirazol); 918, 696 δ (Pirazol); 654 τ (Pirazol); **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3CH_2O), 4.23 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 4.92 (s, 2H, $CH_2C=O$), 6.33 (t, $J=2.1$ Hz, 1H, $H_{pirazol}$), 7.48 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, $H_{pirazol}$), 7.56 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, $H_{pirazol}$); **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$): δ 14.1 (CH_3CH_2O), 53.1 ($CH_2C=O$), 61.8 (CH_3CH_2O), 106.5 ($CH=CH-N$), 130.6 ($CH-N$), 140.1 ($CH=N$), 168.0 (C=O); **EMAR** (FAB $^+$): calculado para $C_7H_{11}N_2O_2$ $[M+H]^+$, m/z 155.0821; encontrado $[M+H]^+$, m/z 155.0815.

4.2.1.2. Preparación del compuesto benzimidazolil-acetato de etilo 3b

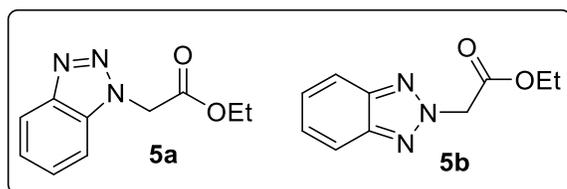


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 5.0 g (1 Eq) de benzimidazol; 12.28 g (2.1 Eq) de K_2CO_3 ; en 30 mL de CH_3CN ; y 8.33 g, 7.06 mL (1.3 Eq) de

bromoacetato de etilo. El avance de la reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina empleando un sistema de disolventes AcOEt:Hexano. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase móvil un sistema de disolventes AcOEt:Hex (9:1).

Sólido beige (80%), p.f. 63-65 °C; **IR** (cm^{-1}): 3250 ν (C-H, benzimidazol); 2981, 2937 ν (C-H, alifático); 1750 ν (C=O); 1202 ν (C-O-C); 1559, 1498, 1478, 1464, 978 ν (benzimidazol); 937, 713 δ (benzimidazol); 681 τ (benzimidazol); **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ 1.23 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.20 (c, $J=7.1\text{Hz}$, 2H, OCH_2CH_3), 4.83 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 7.26 - 7.33 (m, 3H, H_{arom}), 7.78 – 7.83 (m, 1H, H_{arom}), 7.88 (s, 1H, $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3): δ 14.1 (CH_3), 46.1 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 62.2 (OCH_2CH_3), 109.3, 120.5, 122.5, 123.4, 143.5, 167.3 (C=O); **EMAR** (FAB^+): calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 205.0977; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 205.0977.

4.2.2. Procedimiento general para la preparación de azolil-ésteres 5a y 5b



En un matraz redondo de 250 mL se colocó el benzotriazol 2.0 g (1 Eq), 4.87 g de K_2CO_3 (2.1 Eq) y DMF (30

mL), posteriormente se agregó gota a gota bromoacetato de etilo 3.36 g, 2.78 mL (1.3 Eq), se tapó y se colocó en el baño de ultrasonido durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, a la mezcla de reacción se le agregaron 100 mL de agua fría y al sólido formado se filtró a vacío. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina empleando un sistema de disolventes adecuado para una

separación eficiente. El producto obtenido se purificó por columna cromatográfica, empleando un sistema cromatográfico Hex:AcOEt (2:1).

2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3] triazol-1-il) acetato de etilo

Sólido blanco (81%), p.f. 77-79 °C. **IR** (cm⁻¹): 3061 ν (C-H, 1*H*-benzotriazol); 2984, 2932 ν (C-H, alifático); 1738 ν (C=O); 1203 ν (C-O-C); 1594, 1456, 1427, 1380, 999 ν (1*H*-benzotriazol); 915, 714 δ (1*H*-benzotriazol); 662 τ (1*H*-benzotriazol); **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (t, *J*=7.1Hz, 3H, CH₃CH₂) 4.25 (c, *J*=7.1Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.42 (s, 2H, CH₂C=O), 7.36 – 7.44 (m, 1H, H_{arom}), 7.44 – 7.56 (m, 2H, H_{arom}), 8.09 (d, *J*=8.4Hz, 1H, H_{arom}); **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ 14.06 (CH₃), 49.09 (CH₂C=O), 62.33 (OCH₂-CH₃), 109.24, 120.19, 124.12, 127.91, 133.38, 146.03, 166.37 (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₀H₁₂N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 206.0930; encontrado [M+H]⁺, *m/z*.

2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3] triazol-1-il) acetato de etilo

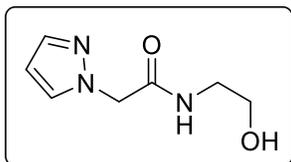
Sólido blanco (12%), p.f. 116-119 °C; **IR** (cm⁻¹): 3055 ν (C-H, 2*H*-benzotriazol); 2986, 2959 ν (C-H, alifático); 1745 ν (C=O); 1177 ν (C-O-C); 1566, 1474, 1450, 1412, 1011 ν (2*H*-benzotriazol); 941, 700 δ (2*H*-benzotriazol); 658 τ (2*H*-benzotriazol); **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, *J*=7.1Hz, 3H, CH₃CH₂), 4.28 (c, *J*=7.1Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.54 (s, 2H, CH₂C=O), 7.37 – 7.45 (m, 2H, H_{arom}), 7.85–7.94 (m, 2H, H_{arom}); **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ 13.92 (CH₃), 56.98 (CH₂C=O), 61.69 (OCH₂-CH₃), 117.95, 126.84, 144.05, 166.70 (C=O); **EMAR**

(FAB⁺): calculado para C₁₀H₁₂N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 206.0930; encontrado [M+H]⁺, *m/z*.

4.2.3. Procedimiento general para la preparación de hidroxacetamidas

En un vial para microondas de 10 mL provisto de agitador magnético se agregó el éster correspondiente **3a-b** y **5a-b** (1 Eq), seguido de un exceso del correspondiente 1,2-aminoalcohol [etanolamina, (S)-fenilalaninol, (S)-valinol, (S)-leucinol y (S)-fenilglicinol] (2 Eq) en condiciones libre disolvente. Se llevaron las reacciones al microondas y se ajustaron los parámetros de agitación (600 rpm), temperatura (170 °C) y el tiempo (15 min) para obtener el mayor porcentaje de rendimiento en cada uno de los compuestos. Para comprobar la formación del producto se utilizó cromatografía en capa fina empleando como sistema una mezcla de disolventes. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con acetonitrilo frío y el licor madre se concentró por evaporación a presión reducida y fue filtrado y lavado con acetonitrilo frío una vez más. El crudo de reacción se obtuvo totalmente puro después de los lavados y se obtuvieron así las correspondientes hidroxacetamidas.

4.2.3.1. Preparación de *N*-(2-hidroxietil)-2-(1*H*-pirazol-1-il)acetamida **7a**

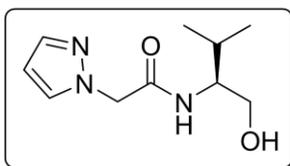


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.8 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo y 1.90 g (2 Eq) de etanolamina. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y

tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (62%), p.f. 108-110 °C; **IR** (cm⁻¹): 3282 ν (N-H), 3119 ν (C-H, pirazol); 2912 ν (C-H, alifático); 1650 ν (C=O); 1553 δ (N-H); 1466, 1442, 1401, 1373, 985 ν (pirazol); 918, 757 δ (pirazol); 675 τ (pirazol); **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.35 (t, *J*=5.6Hz, 2H, CH₂-NH), 3.61 (t, *J*=5.6Hz, 2H, CH₂-OH), 4.89 (s, 2H, CH₂C=O), 6.63 (t, *J*=2.2Hz, 1H, CH=CH-N), 7.56 (d, *J*=1.8Hz, 1H, CH=N), 7.70 (d, *J*=2.2Hz, 1H, CH-N); **RMN** ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 41.70 (CH₂-NH), 53.6 (CH₂C=O), 59.9 (CH₂-OH), 105.7, 131.7, 139.9, 168.4 (C_{arom}) (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₇H₁₂N₃O₂ [M+H]⁺, m/z 170.0930; encontrado [M+H]⁺, m/z 170.0927.

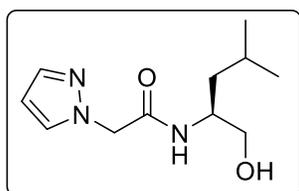
4.2.3.2. Preparación de (S)-N-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il) acetamida 7b



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.6 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo; 0.8 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-metilbutan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (97%), p.f. 124-126 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, CD₃OD): δ 0.89 (d, *J*=6 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 0.93 (d, *J*=6.8 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 1.86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.54 (dd, *J*=11.6, 5.2 Hz, 1H, CH₂OH), 3.59 (dd, *J*=11.2, 4.4 Hz, 1H, CH₂OH), 3.68 (m, 1H, CHN), 4.88 (sistema AB, *J*=13.2 Hz, 2H, CH₂C=O), 6.34 (2d, 1H, CH=CH-N), 7.53 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, CH=N), 7.68 (d, *J*=2.0 Hz, 1H, CH-N); **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃OD): δ 18.8 (CH₃), 20.1 (CH₃), 30.1 (CH(CH₃)₂), 55.2 (CH/Pr), 58.4 (CH₂C=O), 63.1 (CH₂OH), 107.2 (CH-CH=N), 133.2 (CH-N), 139.9 (CH=N), 169.7 (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₀H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 212.1399; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 212.1406.

4.2.3.3. Preparación de (S)-N-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il) acetamida 7c

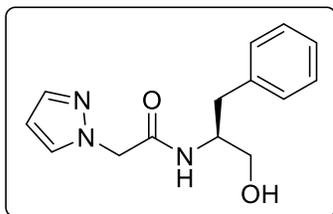


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.7 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo y 1.0 g, (2 Eq) de (S)-2-amino-4-metilpentan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (81%), p.f. 85-88 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (dd, *J*=6.5, 1.9 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 1.24-1.33 (m, 2H, CH₂CH), 1.43-1.55 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.45 (dd, *J*=11.2, 3.5 Hz, 1H, CH₂OH), 3.62 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H, CH₂OH), 4.00 (a, 1H, CHCH₂), 4.83 (sistema AB, *J*=16.9 Hz, 2H, CH₂C=O), 6.33 (t, *J*=1.9

Hz, 1H, CH=CH), 6.49 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, NH), 7.50 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, CH=N), 7.58 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, CH=N); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 22.11 (CH_3), 22.96 (CH_3), 24.78 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 39.89 (CH_2CH), 50.23 (CHCH_2), 54.90 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 65.06 (CH_2OH), 106.66 ($\text{CH}=\text{N}$), 131.31 ($\text{CH}-\text{N}$), 140.97 ($\text{CH}=\text{N}$), 167.66 ($\text{C}=\text{O}$). **EMAR** (ESI^+): calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 226.1556; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 226.1564.

4.2.3.4. Preparación de (S)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il) acetamida 7d

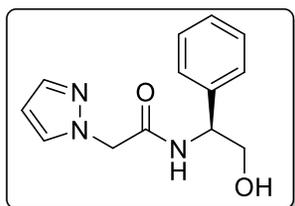


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.8 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo y 1.6 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (91%), p.f. 113-114°C; **RMN ^1H** (400 MHz, CD_3OD): δ 2.73 (dd, $J=13.6$, $J=8.4$ Hz, 1H, CH_2Ph), 2.89 (dd, $J=13.6$, 6.4 Hz, 1H, CH_2Ph), 3.49 (dd, $J=11.2$, $J=5.6$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.54 (dd, $J=11.2$, $J=4.8$ Hz, 1H, CH_2OH), 4.11 (m, 1H, CHBn), 4.79 (sistema AB, $J=13.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 6.31 (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH}=\text{N}$), 7.18-7.27 (m, 5H, H_{arom}), 7.52 (d, $J=1.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 7.56 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, $\text{CH}-\text{N}$); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 38.0 (CH_2Ph), 54.60 (CHBn), 55.1 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 63.9 (CH_2OH), 107.2 ($\text{CH}-\text{CH}=\text{N}$), 127.6, 129.6 (2C), 130.5 (2C),

139.7 (C_{arom}), 133.1 (CH-N), 141.2 (CH=N), 169.2 (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para $C_{14}H_{18}N_3O_2$ [M+H]⁺, m/z 260.1399; encontrado [M+H]⁺, m/z 260.1398.

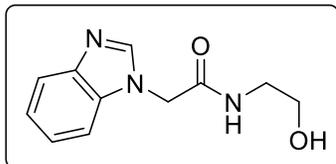
4.2.3.5. Preparación de (S)-N-(1-hidroxi-3-feniletíl)-2-(1H-pirazol-1-il)acetamida 7e



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.7 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo y 1.24 g (2 Eq) de (S)-2-amino-2-feniletan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido beige (98%), p.f. 57-60 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, CD₃SOCD₃): δ 3.58 (q, $J=6.8, 6.1$ Hz, 2H, CH₂OH), 4.84 (m, 1H, CHCH₂), 4.87 (t, $J=1.3$ Hz, 1H, CH₂C=O), 4.94 (d, $J=5.4$ Hz, 1H, CH₂C=O), 6.23 (t, $J=2.1$ Hz, 1H, H_{pirazol}) 7.19-7.27 (m, 2H, H_{pirazol} y NH), 7.30-7.36 (2m, 5H, CH-arom), 7.69 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, H_{pirazol}); **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃SOCD₃): δ 53.85 (CH₂C=O), 55.08 (NHCHCH₂) 64.52 (CH₂OH), 105.15 (C_{pirazol}), 126.86, 127.87, 128.09 (C_{arom}), 131.37 (C_{pirazol}), 138.84 (C_{pirazol}), 140.77 (C_{arom}), 166.33 (C=O).

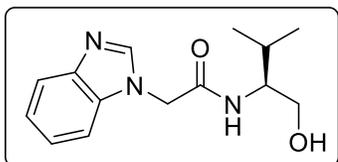
4.2.3.6. Preparación de 2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-(2-hidroxi-etil) acetamida 8a



Seguendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.8 g (1 Eq) de benzimidazolil acetato de etilo y 1.2 g, (2 Eq) de etanolamina. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (68%), p.f. 208-210 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.18 (c, *J*=5.8 Hz, 2H, CH₂NH), 3.38 (a, 1H, OH), 3.44 (m, 2H, CH₂OH), 4.93 (s, 2H, CH₂C=O), 7.18–7.26 (m, 2H, H_{arom}), 7.44–7.46 (m, 1H, H_{arom}), 7.64–7.66 (m, 1H, H_{arom}), 8.17 (s, 1H, N=CH-N), 8.40 (t, *J*=5.4 Hz, 1H, NH); **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 42.2 (CH₂NH), 47.3 (CH₂C=O), 60.1 (CH₂-OH), 110.6, 119.8, 121.9, 122.8, 134.8, 143.7, 145.3, 167.1 (N=CH) (C=O); **EMAR** (Cl⁺): calculado para C₁₁H₁₄N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 220.1086; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 220.1085.

4.2.3.7. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 8b

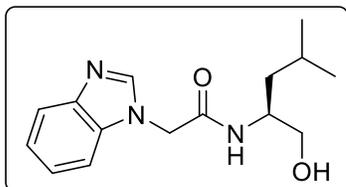


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.6 g (1 Eq) de benzimidazolil acetato de etilo y 0.66 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-metilbutan-1-ol.

Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (39%), p.f. 214-217 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.85 (d, *J*=6.8 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 1.76-1.92 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.52-3.65 (m, 2H, CH₂OH), 4.73 (a, 1H, NH), 4.96 (sistema AB, *J*= 16.1, 2H, CH₂C=O), 7.16 – 7.29 (m, 2H, H_{arom}), 7.46 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H_{arom}), 7.66 (dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H, H_{arom}), 8.17 (s, 1H, N=CHN); **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18.13 (CH₃), 19.60 (CH₃), 28.20 (CH(CH₃)₂), 46.95 (CH₂C=O), 56.11 (CHNH), 61.21 (CH₂OH), 110.16, 119.32, 121.47, 122.26, 134.19, 143.22. 144.90 (N=CH-N), 166.38 (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₄H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 262.1556; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 262.1562

4.2.3.8. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 8c

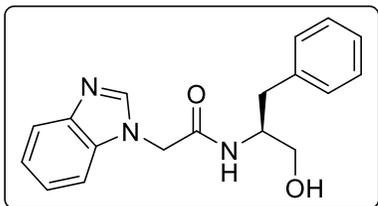


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.7 g (1 Eq) de benzimidazolil acetato de etilo y 0.8 g (2 Eq) de (S)-2-amino-4-metilpentan-1-ol.

Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (68%), p.f. 185-187 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, CD₃OD): δ 0.90 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 0.95 (d, *J*=6.7 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 1.32-1.50 (m, 2H, CH₂CH), 1.59-1.70 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.52 (dc, *J*=11.1, 5.4 Hz, 2H, CH₂OH), 4.03 (dc, *J*=10.1, 5.1 Hz, CH-NH), 5.02 (sistema AB, *J*=16.4 Hz, 2H, CH₂C=O), 7.26-7.36 (m, 2H, H_{arom}), 7.46-7.51 (m, 1H, H_{arom}), 7.67 (m, 1H, H_{arom}), 8.18 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃OD): δ 20.82 ((CH₃)₂CH), 22.30 (CH(CH₃)₂), 24.57 (CH₂CH), 39.67 (CHCH₂), 49.79 (CH₂C=O), 64.00 (CH₂OH), 109.84, 118.75, 122.29, 123.02, 133.91, 142.49, 144.32 (N=CH), 167.40 (C=O). **EMAR** (EI⁺): calculado para C₁₅H₂₂N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 276.1712; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 276.1696.

4.2.3.9. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-yl) acetamida 8d

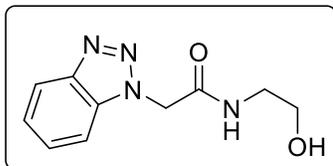


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (1 Eq) de benzimidazolil acetato de etilo y 0.7 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-fenilpropan-

1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (78%), p.f. 225-226 °C; **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.67 (dt, *J*=15.1 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.88 (dt, *J*=12.1 Hz, 1H, CH₂Ph), 3.19 (dd, *J*=10.4, 6.5 Hz, 1H, CH₂OH), 3.29 (dd, *J*=10.4, 4.8 Hz, 1H, CH₂OH), 3.88–4.01 (m, 1H, CH-NH), 4.90 (sistema AB, *J*=16.2 Hz, 2H, CH₂C=O), 7.15–7.24 (m, 5H, H_{arom}), 7.23–7.32 (m, 2H, H_{arom}), 7.57–7.67 (m, 2H, H_{arom}), 8.09 (s, 1H, N=CH-N), 8.37 (d, *J*=8.5 Hz, 1H, NH); **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃OD): δ 36.59 (CH₂Ph), 46.88 (CH₂C=O), 54.44 (CH-NH), 65.60 (CH₂OH), 110.18, 119.23, 121.41, 122.25, 125.79, 125.98, 129.10, 134.10, 138.92, 139.72, 143.17, 144.79 (N=CH), 165.96 (C=O); **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₈H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺, *m/z* 310.1556; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 310.1544.

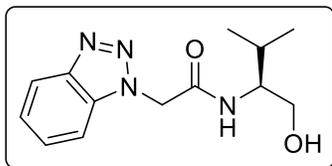
4.2.3.10. Preparación de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-*N*-(2-hidroxietyl) acetamida 9a



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.8 g (1 Eq) de 1*H*-benzotriazolil acetato de etilo y 1.1 g (2 Eq) de etanolamina. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (91%), p.f. 187-190 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.20 (m, 2H, CH₂-NH), 3.47 (m, 2H, CH₂-OH), 4.81 (t, *J*=5.3 Hz, 1H, OH), 5.46 (s, 2H, CH₂C=O), 7.38-7.42 (m, 1H, H_{arom}), 7.52-7.56. (m, 1H, H_{arom}), 7.77 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H_{arom}), 8.04 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H_{arom}), 8.52 (a, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 41.76 (CH₂-NH), 49.94 (CH₂-OH) 59.64 (CH₂-CO), 110.98, 119.01, 123.85, 127.27, 133.75, 145.09, 165.65 (C=O). **EMAR** (EI⁺): calculado para C₁₀H₁₃N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 221.1039; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 221.1046.

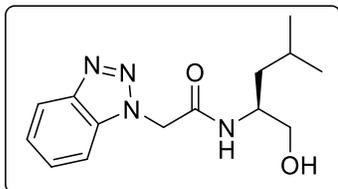
4.2.3.11. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 9b



Seguindo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.6 g (1 Eq) de 1H-benzotriazolil acetato de etilo y 0.6 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-metilbutan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (93%), p.f. 226-228 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.87 (d, *J*=6.8 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 1.75-1.96 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 3.45 (t, *J*=5.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 3.53-3.66 (m, 1H, CH-CH₂), 5.48 (AB, *J*=16.3 Hz, 2H, CH₂-CO), 7.40 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, H_{arom}), 7.54 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, H_{arom}), 7.76 (t, *J*=9.0 Hz, 1H, H_{arom}), 8.04 (t, *J*=9.0 Hz, 1H, H_{arom}), 7.76 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 8.04 (dd, *J*=8.3, 8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 8.22 (d, *J*=9.0 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18.60 (CH₃), 20.06 (CH₃), 28.73 (CH-(CH₃)₂), 50.50 (CH₂-CO), 56.66 (CH-NH), 61.64 (CH₂-OH), 111.36, 119.45, 124.26, 127.65, 134.12, 145.56, 165.88 (C=O). **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₃H₂₀N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 264.1586; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 264.1597.

4.2.3.12. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 9c

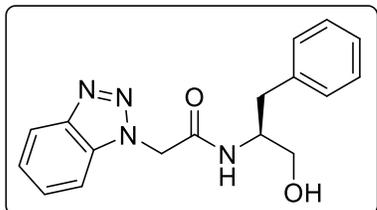


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.8 g (1 Eq) de 1H-benzotriazolil acetato de etilo y 0.91 g (2 Eq) de (S)-2-amino-4-metilpentan-1-ol.

Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (94%), p.f. 150-154 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.82 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, (CH₃)₂-CH), 0.89 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, (CH₃)₂-CH), 1.34 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, CH₂-CH), 1.55-1.71 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 3.28-3.44 (m, 2H, CH₂-OH), 3.76-3.87 (m, 1H, CH-NH), 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 1H, OH), 5.44 (sistema AB, *J*=16.3 Hz, 2H, CH₂-CO), 7.34-7.45 (m, 1H, H_{arom}), 7.50-7.58 (m, 1H, H_{arom}), 7.74 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 8.04 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, H_{arom}), 8.25 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.85 (CH₃), 23.32 (CH₃), 24.26 (CH-(CH₃)₂), 39.97, (CH₂-CH), 49.26 (CH-NH), 50.06 (CH₂C=O), 63.63 (CH₂-OH), 110.91, 119.01, 123.83, 127.20, 133.68, 145.10, 165.10 (C=O). **EMAR** (ESI⁺): calculado para C₁₄H₂₁N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 277.1665; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 277.1675.

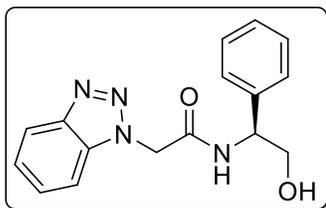
4.2.3.13. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida 9d



Seguendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (1 Eq) de 1H-benzotriazolil acetato de etilo y 0.7 g (2 Eq) de (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (60%), p.f. 208-209 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, CD₃OD): δ 2.68 (dd, *J*=13.3, 8.7 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.89 (dd, *J*=13.4, 5.1 Hz, 1H, CH₂Ph), 3.42 (m, 2H, CH₂OH), 3.96 (m, 1H, CHNH), 4.94 (a, 1H, OH), 5.38 (sistema AB, *J*=16.3, 2H, CH₂C=O), 7.23-7.47 (m, 8H, H_{arom}), 8.03 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, H_{arom}), 8.47 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃OD): δ 36.6 (CH₂Ph), 50.0 (CHBn), 52.9 (CH₂C=O), 62.5 (CH₂OH), 110.8, 119.0, 123.8, 126.0, 127.2, 128.2, 129.2, 133.5, 139.0, 145.1, 165.0 (C=O). **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₇H₂₀N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 312.1586; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 312.1587.

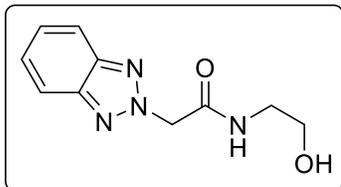
4.2.3.14. Preparación de (S)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-N-(2-hidroxi-1-feniletíl) acetamida 9e



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.7 g (1 Eq) de 1H-benzotriazolil acetato de etilo y 0.93 g (2 Eq) de (S)-2-amino-2-feniletan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (80%), p.f. 208-209 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-d₆): 3.59-3.68 (m, 2H, CH₂OH), 4.85-4.90 (m, 1H, CHPh), 5.07 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, OH), 5.56 (s, 2H, CH₂C=O), 7.23-7.27 (m, 1H, H_{arom}), 7.31-7.35 (m, 4H, H_{arom}), 7.37-7.41 (m, 1H, H_{arom}), 7.52 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 0.8 Hz, 1H, H_{arom}), 7.74-7.77 (m, 1H, H_{arom}), 8.02-8.04 (m, 1H, H_{arom}), 9.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-d₆): 50.4 (CH₂C=O), 55.9 (CHPh), 65.0 (CH₂OH), 111.4, 119.4, 124.3, 127.3, 127.4, 127.7, 128.6, 134.1, 141.0, 145.5, 165.7 (C=O). **EMAR** (FAB⁺): calculado para C₁₆H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 297.1352; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 297.1344.

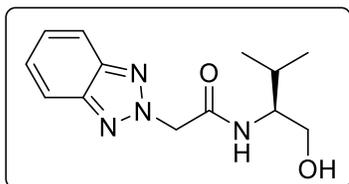
4.2.3.15. Preparación de 2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-(2-hidroxi-etil) acetamida 10a



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (1 Eq) de 2-(2*H*-benzotriazolil) acetato de etilo y 0.7 g (2 Eq) de etanolamina. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (58%), p.f. 149-150 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.21 (q, *J*=5.8 Hz, 2H, CH₂NH), 3.47 (q, *J*=5.7 Hz, 2H, CH₂OH), 4.80 (t, *J*=5.3 Hz, 1H, OH), 5.48 (s, 1H, CH₂C=O), 7.40-7.50 (m, 2H, H_{arom}), 7.87-7.98 (m, 2H, H_{arom}), 8.47 (t, *J*=5.1 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 41.79 (CH₂NH), 58.35 (CH₂C=O), 59.58 (CH₂OH), 117.87, 126.49, 143.95, 164.95 (C=O). **EMAR** (EI⁺): calculado para C₁₀H₁₃N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 221.1039; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 221.0884.

4.2.3.16. Preparación de (*S*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-(1-hidroxi-3-metilbutan-2-il) acetamida 10b

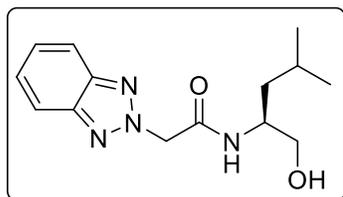


Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.6 g (1 Eq) de 2-(2*H*-benzotriazolil) acetato de etilo y 0.6 g (2 Eq) de (*S*)-2-amino-3-

metilbutan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (47%), p.f. 166-169 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.88 (d, *J*=6.8 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 1.78-1.94 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.44 (t, *J*=5.5 Hz, 2H, CH₂OH), 3.54-3.65 (m, 1H, CH-NH), 4.70 (t, *J*=5.4 Hz, 1H, OH), 5.51 (sistema AB, *J*=15.5 Hz, 2H, CH₂C=O), 7.42-7.50 (m, 2H, H_{arom}), 7.89-7.98 (m, 2H, H_{arom}), 8.16 (d, *J*=8.9 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 19.57 (CH₃)₂CH), 28.29 (CH₃)₂CH), 56.21 (CH₂C=O), 58.38 (CH-NH), 61.12 (CH₂OH), 117.85, 126.43, 143.91, 164.73 (C=O). **EMAR** (ESI⁺): calculado para C₁₃H₁₉N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 263.15080; encontrado [M+H]⁺, *m/z* 263.15170.

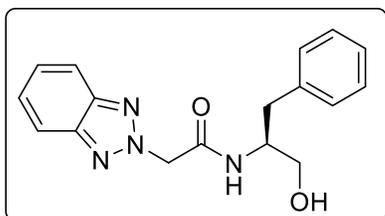
4.2.3.17. Preparación de (S)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) acetamida 10c



Seguendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (1 Eq) de 2-(2*H*-benzotriazolil) acetato de etilo y 0.57 g (2 Eq) de (S)-2-amino-4-metilpentan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (99 %), p.f. 140-142 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.86 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 0.89 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, (CH₃)₂CH), 1.29-1.38 (m, 2H, CH₂-*i*Pr), 1.56-1.72 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.24-3.43 (m, 2H, CH₂OH), 3.75-3.87 (m, 1H, CH-NH), 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 3H, OH), 5.46 (sistema AB, *J*=15.5 Hz, 2H, CH₂C=O), 7.41-7.48 (m, 2H, H_{arom}), 7.88-7.97 (m, 2H, H_{arom}), 8.18 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.89 ((CH₃)₂CH), 23.29 ((CH₃)₂CH), 24.22 (CH(CH₃)₂), 39.98 (CH-*i*Pr), 49.30 (CH-NH), 58.35 (CH₂C=O), 63.55 (CH₂OH), 117.85, 126.44, 143.92, 164.42 (C=O). **EMAR** (ESI⁺): calculado para C₁₄H₂₁N₄O₂ [M+H]⁺, *m/z* 277.1665; found [M+H]⁺, *m/z* 277.1673.

4.2.3.18. Preparación de (S)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-*N*-(1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il) acetamida 10d



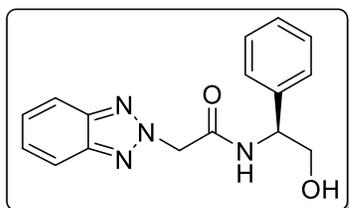
Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.5 g (1 Eq) de 2-(2*H*-benzotriazolil) acetato de etilo y 0.7 g (2Eq) de (S)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del

microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

Sólido blanco (22%), p.f. 110-112 °C. **RMN ¹H** (400 MHz, CD₃OD): δ 2.80 (dd, *J*=13.7, 7.9 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.94 (dd, *J*=13.7, 7.6 Hz, 1H, CH₂Ph), 3.58 (dc, *J*=11.2, 5.2 Hz, 2H, CH₂OH), 4.09-4.20 (m, 1H, CHBn), 5.43 (sistema AB, *J*=15.6 Hz, 2H, CH₂C=O), 7.14-7.28 (m, 5H, H_{arom}), 7.46 (dd, *J*=6.6, 3.1 Hz, 2H, H_{arom}),

7.88 (dd, $J=6.6, 3.1$ Hz, 2H, H_{arom}). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 36.38 (CH_2Ph), 53.28 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 58.01 (CHBn), 62.30 (CH_2OH), 117.58, 126.00, 127.99, 128.90, 138.00, 144.53, 165.85 ($\text{C}=\text{O}$). **EMAR** (EI^+): calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 311.1508; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 311.1334.

4.2.3.19. Preparación de (S)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il)-N-(2-hidroxi-1-feniletíl) acetamida 10e



Siguiendo el procedimiento general, se hicieron reaccionar 0.46 g (1 Eq) de 2-(2H-benzotriazolil) acetato de etilo y 0.61 g (2 Eq) de (S)-2-amino-2-feniletan-1-ol. Se ajustaron los parámetros del microondas de agitación (600 rpm), potencia (100 watts), temperatura (170 °C) y tiempo (15 min). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el crudo se purificó mediante lavados con acetonitrilo.

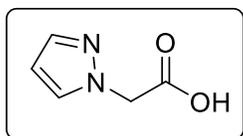
Sólido blanco (94%), p.f. 71-74 °C; **RMN ^1H** (400 MHz, CD_3SOCD_3): δ 3.16 (m, 1H, CH_2OH), 3.50 (m, 1H, CH_2OH), 3.44 (dd, $J=8.1, 4.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{quiral}}$), 5.55 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 7.2 (m, 6H, CH_{arom} , NH), 7.4 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{benzotriazol}}$), 7.9 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{benzotriazol}}$); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3SOCD_3): δ 40 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 57 (C-quiral), 69 (CH_2OH), 125-130 (C_{arom}), 165 ($\text{C}=\text{O}$).

4.2.4. Procedimiento general para la preparación de ácidos carboxílicos

En un tubo G10 para microondas provisto de un agitador magnético se llevó a cabo la reacción entre el azolil-éster (1.0 Eq), K_2CO_3 (2.1 Eq) y NaBr (1.0 Eq)

empleando como medio de reacción 3 mL de etanol. Ajustando los parámetros de temperatura (140 °C), potencia (50 watts) y tiempo (40 min), la hidrólisis se realizó bajo irradiación por microondas en un sistema cerrado. La formación del producto de interés se confirmó mediante cromatografía en capa fina empleando un sistema de disolventes. Posteriormente la mezcla de reacción se filtró a vacío y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna empleando como fase móvil un sistema cromatográfico 1:1 AcOEt:MeOH.

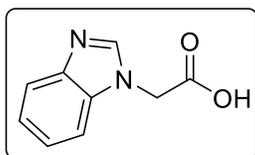
4.2.4.1. Preparación de 2-(1*H*-pirazol-1-il) ácido acético 15a



Siguiendo el procedimiento general, bajo irradiación por microondas, se hicieron reaccionar 0.2 g (1 Eq) de pirazolil acetato de etilo en presencia de 0.37 g (2.1 Eq) de K₂CO₃ y 0.13 g (1 Eq) de NaBr empleando 3 mL de etanol como medio de reacción.

Sólido blanco (35%), **RMN 1H** (400 MHz, CD₃OD): δ 4.6 (s, 2H, CH₂C=O), 6.17 (t, $J=2.1$ Hz, 1H, CH=CH-N), 7.34 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, CH-N), 7.48 (d, $J=2.2$ Hz, 1H, CH=N); **RMN 13C** (100 MHz, CD₃OD): δ 54.9 (CH₂C=O), 105.1, 130.9, 138.4, 173.5 (C=O).

4.2.4.2. Preparación de 2-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il) ácido acético 15b

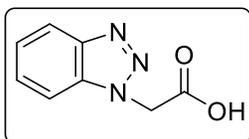


Siguiendo el procedimiento general, bajo irradiación por microondas, se hicieron reaccionar 0.2 g (1 Eq) de benzimidazolil acetato de etilo en presencia de 0.3 g (2.1 Eq)

de K_2CO_3 y 0.107 g (1 Eq) de NaBr empleando 3 mL de etanol como medio de reacción.

Sólido blanco (81%), p.f. 266-269 °C, **RMN 1H** (400 MHz, CD_3OD): δ 4.78 (s, 2H, $CH_2C=O$), 7.22-7.30 (m, 2H, H_{arom}), 7.44-7.46 (m, 1H, H_{arom}), 7.65-7.67 (m, 1H, H_{arom}), 8.10 (s, 1H, $CH=N$); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 49.7 ($CH_2C=O$), 111.7, 120.1, 123.5, 124.4, 135.9, 144.0, 145.9, 174.8 (C=O). **EMAR (FAB $^+$)**: calculado para $C_9H_8N_2O_2$ $[M+H]^+$, m/z 176.06; encontrado $[M+H]^+$, m/z 176.10.

4.2.4.3. Preparación de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il) ácido acético 15c

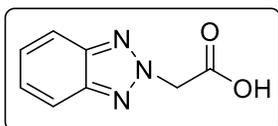


Siguiendo el procedimiento general, bajo irradiación por microondas, se hicieron reaccionar 0.2 g (1 Eq) de 1*H*-benzotriazolil acetato de etilo en presencia de 0.28 g (2.1 Eq)

de K_2CO_3 y 0.1 g (1 Eq) de NaBr empleando 3 mL de etanol como medio de reacción.

Sólido blanco (55%), p.f. 345-348 °C, **RMN 1H** (400 MHz, $CD_3OD/CDCl_3$): δ 5.25 (s, 2H, $CH_2C=O$), 7.38-7.42 (m, 1H, H_{arom}), 7.50-7.54 (m, 1H, H_{arom}), 7.66-7.68 (m, 1H, H_{arom}), 7.94-7.96 (m, 1H, H_{arom}); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 52.8 ($CH_2C=O$), 112.2, 119.9, 125.6, 128.7, 135.3, 146.9, 173.2 (C=O).

4.2.4.4. Preparación de 2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il) ácido acético 15d

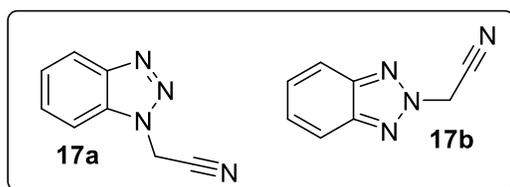


Siguiendo el procedimiento general, bajo irradiación por microondas, se hicieron reaccionar 0.2 g (1 Eq) de 2*H*-

benzotriazolil acetato de etilo en presencia de 0.28 g (2.1 Eq) de K_2CO_3 y 0.1 g (1 Eq) de NaBr empleando 3 mL de etanol como medio de reacción.

Sólido blanco (56%), p.f. 343-346 °C, **RMN 1H** (400 MHz, $CD_3OD/CDCl_3$): δ 5.36 (s, 2H, $CH_2C=O$), 7.42-7.45 (m, 2H, H_{arom}), 7.88-7.90 (m, 2H, H_{arom}), **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 60.8 ($CH_2C=O$), 118.9, 127.4, 145.6, 172.5, (C=O).

4.2.5. Preparación de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il) acetonitrilo y 2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il) acetonitrilo 17a-b



Se colocaron 4.0 g (1 Eq) de 1*H*-benzotriazol, 10.18 g (2.2 Eq) de K_2CO_3 y THF (30 mL), en un matraz redondo de

250 mL, posteriormente se agregaron 2.81 mL (1.2 Eq) de bromoacetonitrilo. La mezcla de reacción se colocó en un baño de ultrasonido durante 2 h, transcurrido ese tiempo se agregaron 50 mL de agua y se realizaron extracciones con AcOEt (3 x 30 mL); se combinaron los extractos orgánicos y el volumen resultante se secó utilizando Na_2SO_4 anhidro y posteriormente se evaporó a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando como fase móvil un sistema de disolventes 2:1 Hex:AcOEt para obtener los dos compuestos de interés **17a** y **17b**.

2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo 17a

Sólido beige (75%), p.f. 86-87 °C; **RMN 1H** (400 MHz, CD_3OD): δ 5.96 (s, 2H, CH_2CN), 7.44-7.48 (m, 1H, H_{arom}), 7.59-7.63 (m, 1H, H_{arom}), 7.82 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_{arom}), 8.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_{arom}); **RMN ^{13}C** (100 MHz, CD_3OD): δ 36.4, 110.7,

114.9, 120.5, 126.1, 129.8, 133.9, 146.8; **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₈H₇N₄ [M+H]⁺ 159.06707, encontrado 159.06712.

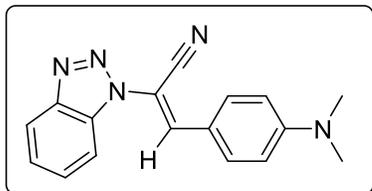
2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)acetonitrilo 17b

Sólido beige (25%), p.f. 78-80 °C; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5.68 (s, 2H, CH₂), 7.44-7.46 (m, 2H, H_{arom}), 7.87-7.89 (m, 2H, H_{arom}); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 43.6 (CH₂), 112.3, 118.2, 127.7, 145.1. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₈H₇N₄ [M+H]⁺ 159.06707, encontrado 159.06716.

4.2.6. Procedimiento general para la preparación de 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d

En un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético se colocó el benzotriazolil-acetonitrilo correspondiente (1.0 Eq) y 30 mL de etanol, posteriormente se adicionó piperidina (2.0 Eq) dejándose en agitación por 10 min a temperatura ambiente. Transcurridos los 10 min se adicionó el aldehído correspondiente (1.0 Eq) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante y reflujo por una hora. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina empleando como sistema de elución una mezcla de disolventes. Una vez identificado el producto de interés, para algunos casos la mezcla de reacción se sometió a filtración al vacío y lavados con etanol para obtener el producto puro y en otros casos la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna.

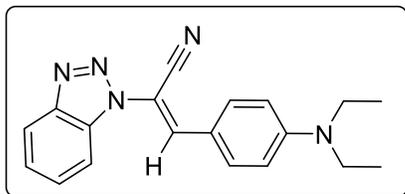
4.2.6.1. Preparación de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetil amino)fenil)acrilonitrilo 20a



De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.5 g (1.0 Eq) de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.71 mL (2.0 Eq) de piperidina. Posteriormente se agregaron 0.54 g (1.0 Eq) de 4-(dimetilamino)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1 h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido naranja (45%), p.f. 186-188 °C, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.10 (s, 6H, (CH₃)₂), 6.74 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42-7.47 (m, 1H, H_{arom}), 7.56-7.61 (m, 1H, H_{arom}), 7.66 (s, 1H, H_{vinilico}), 7.84 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H, H_{arom}), 7.86 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 8.12 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 40.1, 99.5, 110.4, 111.8, 115.6, 117.7, 120.5, 124.8, 128.7, 132.1, 132.3, 143.0, 146.2, 152.8. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₇H₁₆N₅ [M+H]⁺ 290.14057, encontrado 290.14083.

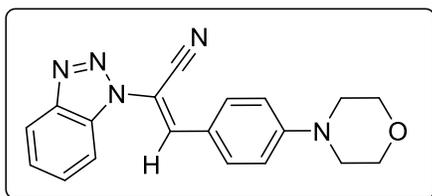
4.2.6.2. Preparación de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo 20b



De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.5 g (1.0 Eq) de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.714 mL (2.0 Eq) de piperidina. Posteriormente se agregaron 0.64 g (1.0 Eq) de 4-(dietilamino)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1 h y el producto se purificó a través de cromatografía en columna empleando como fase móvil un sistema de disolventes 9:1 Hex:AcOEt.

Aceite amarillo (42%), **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, *J*=7.1 Hz, 6H, (CH₂CH₃)₂), 3.45 (q, *J*=7.1 Hz, 4H, (CH₂CH₃)₂), 6.72 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42-7.47 (m, 1H, H_{arom}), 7.55-7.61 (m, 1H, H_{arom}), 7.62 (s, 1H, H_{vinilico}), 7.83 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 7.84 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 8.11 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}); **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₉H₂₀N₅ [M+H]⁺ 318.17187, encontrado 318.17058.

4.2.6.3. Preparación de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolino fenil)acrilonitrilo 20c

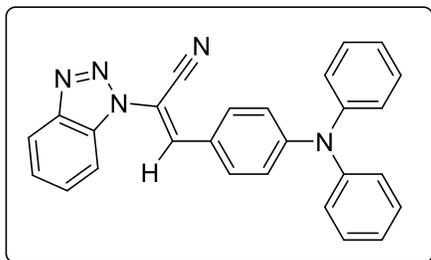


De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.4 g (1.0 Eq) de 2-

(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.71 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.56 g (1.0 Eq) de 4-(piperidin-1-il)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1 h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido Amarillo, (60%), p.f. 207-208 °C, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.35 (t, *J*=4.4 Hz, 4H, (CH₂)₂N), 3.90 (t, *J*=4.6 Hz, 4H, (CH₂)₂O), 6.94 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.46 (m, 2H, H_{arom}), 7.72 (s, 1H, H_{vinílico}), 7.85-7.89 (m, 3H, H_{arom}), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{arom}); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 47.4, 66.6, 101.8, 110.3, 114.2, 114.9, 118.2, 120.6, 125.0, 127.8, 128.9, 131.9, 141.8, 146.3, 153.5; **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₉H₁₈N₅O [M+H]⁺ 332.15114, encontrado 332.14883.

4.2.6.4. Preparación de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenil amino)fenil)acrilonitrilo 20d

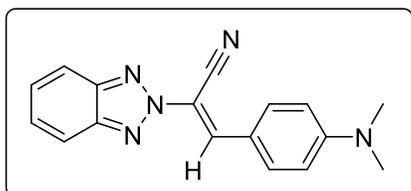


De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.5 g (1.0 Eq) de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.71 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.98 g (1.0 Eq) de 4-(difenilamino)benzaldehído y la reacción se

mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1 h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Aceite naranja (44%), **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.10 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.21–7.24 (m, 6H, H_{arom}), 7.36-7.41 (m, 4H, H_{arom}), 7.47-7.53 (m, 1H, H_{arom}), 7.62-7.67 (m, 1H, H_{arom}), 7.78 (s, 1H, H_{vinílico}), 7.82 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.91 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}), 8.16 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H_{arom}); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 102.4, 110.4, 114.8, 120.2, 120.6, 122.4, 125.0, 125.2, 126.3, 126.3, 128.9, 129.8, 129.9, 131.4, 141.4, 146.2, 151.5; **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₂₇H₂₀N₅ [M+H]⁺ 414.17187, encontrado 414.17294.

4.2.6.5. Preparación de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetil amino)fenil)acrilonitrilo 21a

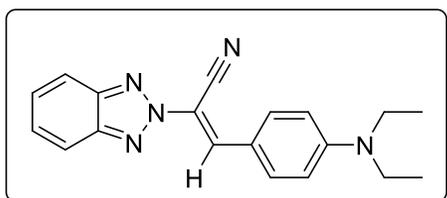


De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.5 g (1.0 Eq) de 2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.71 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.54 g (1.0 Eq) de 4-(dimetilamino)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 2 h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido naranja (78%), p.f. 254-256 °C, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.09 (s, 6H, (CH₃)₂), 6.73 (d, *J*=9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.40-7.43 (m, 2H, H_{arom}), 7.88-7.93 (m, 2H,

H_{arom}), 8.36 (s, 1H, H_{vinílico}); **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 40.2, 106.4, 111.9, 114.9, 117.6, 118.1, 127.5, 132.5, 138.1, 144.8, 152.7. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₇H₁₆N₅ [M+H]⁺ 290.14057, encontrado 290.13784.

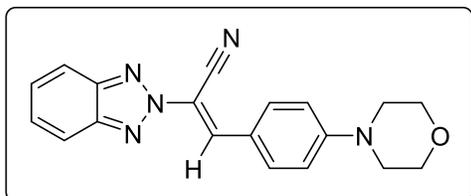
4.2.6.6. Preparación de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietil amino)fenil)acrilonitrilo 21b



De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.13 g (1.0 Eq) de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.19 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.17 g (1.0 Eq) de 4-(dietilamino)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 2 h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido naranja (34%), p.f. 190-191 °C, **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, *J*=7.1 Hz, 6H, (CH₂CH₃)₂), 3.45 (t, *J*=7.1 Hz, 4H, (CH₂CH₃)₂), 6.71 (d, *J*=9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.40-7.43 (m, 2H, H_{arom}), 7.88-7.91 (m, 2H, H_{arom}), 8.35 (s, 1H, H_{vinílico}); **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 12.7, 44.8, 105.9, 111.5, 115.1, 116.9, 118.0, 127.4, 132.9, 138.1, 144.8, 150.6. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₉H₂₀N₅ [M+H]⁺ 318.17187, encontrado 318.16926.

4.2.6.7. Preparación de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolino fenil)acrilonitrilo 21c

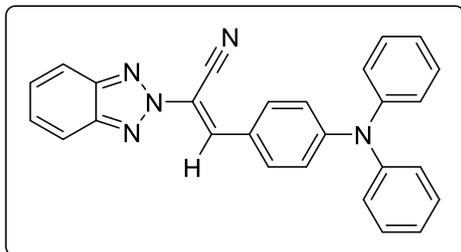


De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.26 g (1.0 Eq) de

2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en 30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.37 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.36 g (1.0 Eq) de 4-(piperidin-1-il)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido amarillo (67%), p.f. 241-243 °C, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.33 (t, *J*=4.6 Hz, 4H, (CH₂)₂N), 3.86 (t, *J*=4.5 Hz, 4H, (CH₂)₂O), 6.92 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.41-7.44 (m, 2H, H_{arom}), 7.88-7.94 (m, 4H, H_{arom}), 8.37 (s, 1H, H_{vinílico}); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 47.3, 66.6, 108.2, 114.2, 114.3, 118.2, 120.4, 127.8, 132.2, 137.4, 144.9, 153.4. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₁₉H₁₈N₅O [M+H]⁺ 332.15114, encontrado 332.14907.

4.2.6.8. Preparación de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenílamino)fenil)acrilonitrilo 21d



De acuerdo con el procedimiento general, en un matraz de 50 mL provisto de un agitador magnético, se colocaron 0.26 g (1.0 Eq) de 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetonitrilo en

30 mL de etanol como medio de reacción y se adicionaron 0.37 mL (2.0 Eq) de piperidina, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.51 g (1.0 Eq) de 4-(difenílamino)benzaldehído y la reacción se mantuvo en agitación constante bajo condiciones de reflujo por 1h y el producto se purificó mediante lavados con EtOH y filtración al vacío.

Sólido naranja (43%), p.f. 180-181 °C, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.05 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.15-7.21 (m, 6H, H_{arom}), 7.33-7.45 (m, 6H, H_{arom}), 7.82-7.92 (m, 6H, H_{arom}), 8.39 (s, 1H, H_{vinílico}); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 108.8, 114.2, 118.2, 120.2, 122.2, 125.2, 126.3, 127.9, 129.9, 131.8, 137.1, 145.0, 146.2, 151.4. **EMAR** (ESI⁺) calculado para C₂₇H₂₀N₅ [M+H]⁺ 414.1787, encontrado 414.16978.

4.3. Métodos biológicos

4.3.1. Actividad anti-cáncer *in vitro* de los derivados 1H y 2H-benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en las líneas celulares MCF-7 y 4T1 por el método de resazurina

Para determinar la actividad anticancerígena *in vitro* se realizó el ensayo empleando una placa de 96 pozos, donde se sembraron células de MCF-7 y 4T1, según el estudio, a una concentración de 5×10^3 células por pozo en medio de cultivo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSC). La placa se incubó 37 °C/24 h en CO₂ al 5%. Posteriormente, se aspiró el medio de cultivo y se trató a las células con nuevo medio el cual contenía las concentraciones seriadas del compuesto a analizar (0, 10, 50, 500 y 1000 µg/mL). Como control se utilizaron las células correspondientes en medio de cultivo sin tratamiento adicional.

Después de 24 h de exposición de los compuestos sobre las células, se aspiró el medio de cultivo con el tratamiento y, posteriormente se adicionó a cada pozo 100 µL de medio DMEM sin suplementar y resazurina al 10% (v/v). La placa se incubó durante 4 horas en condiciones estándar y una vez cumplido el tiempo de incubación, las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm en un lector de placas Synergy HTTM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.3.2. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados 1H y 2H-benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en esplenocitos murinos por el método de resazurina.

El ensayo para determinar la actividad citotóxica *in vitro* se realizó en una placa de 96 pozos, donde se sembraron células de esplenocitos murinos a una confluencia de 5×10^4 células por pozo en medio DMEM suplementado con 10% de FSC; y se incubó 37 °C/24 h en CO₂ al 5%. Enseguida, se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco, el cual contenía las concentraciones seriadas del compuesto a analizar (0, 10, 50, 500 y 1000 µg/mL) y se utilizó como control las células en medio de cultivo.

Transcurridas las 24 h de tratamiento sobre las células, se aspiró el medio de cultivo con el tratamiento y, posteriormente se adicionó a cada pozo 100 µL de medio DMEM sin suplementar y resazurina al 10% (v/v). La placa se incubó durante 4 horas en condiciones estándar y una vez cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm en un lector de placas Synergy HTTM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.3.3. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados 1H y 2H-benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en células mononucleares de sangre periférica por el método de resazurina

El ensayo para determinar la actividad citotóxica *in vitro* se realizó en una placa de 96 pozos, donde se sembraron células mononucleares a una confluencia de 5×10^4 células por pozo en medio DMEM suplementado con 10% de FSC; y se incubó a 37 °C/24 h en CO₂ al 5%. Enseguida, se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco, el cual contenía las concentraciones seriadas del compuesto a analizar (0, 10, 50, 500 y 1000 µg/mL) y se utilizó como control las células en medio de cultivo.

Transcurridas las 24 h de tratamiento sobre las células, se decantó el medio de cultivo con el tratamiento y, posteriormente se adicionó a cada pozo 100 µL de medio DMEM sin suplementar y resazurina al 10% (v/v). La placa se incubó durante 4 horas en condiciones estándar y una vez cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm en un lector de placas Synergy HTTM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.3.4. Ensayo de genotoxicidad *in vitro* de los derivados 1H y 2H-benzotrizolil acrilonitrilo 20a-d y 21a-d en células mononucleares de sangre periférica

A) Extracción del ADN de células sanguíneas

Reactivos:

- + Buffer de lisis de TSNT (NaCl 0,23 M, EDTA 9 mM; Tris base 0.9 mM; 1% de Tritón X-100; 10% de DMSO; pH: 10.0)
- + Buffer TE 1x pH (Tris 0.001 M, EDTA 0.001 M)
- + Fenol saturado con Tris-HCl pH 8
- + Sevag (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1)
- + Etanol 100% y 70%

Se tomó una muestra de 3 a 5 mL de sangre en un tubo vacutainer lila, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm/5 min. Se recuperó el paquete de leucocitos de la interfase, aproximadamente 1 mL y en un tubo de 2 mL se colocaron 500 µL. Enseguida se llevó a cabo la lisis celular agregando 200 µL de buffer de lisis TSNT y se mezcló durante 30 s empleando un agitador vortex. Inmediatamente después de este tiempo se agregaron 500 µL de fenol saturado y nuevamente se mezcló durante 30 s; posteriormente se adicionaron 100 µL de Sevag y se agitó por 5 min utilizando el agitador vortex. Pasado el tiempo, la mezcla se llevó a centrifugar durante 8 min a 14000 rpm, posterior a esto, la fase acuosa fue transferida a un microtubo de 1.5 µL y se precipitó el ADN empleando dos volúmenes de etanol al 100% y mezclando por inversión. Enseguida el ADN se llevó a centrifugación por 8 min a 14000 rpm, después de este tiempo el sobrenadante fue decantado y la pastilla de ADN se lavó con EtOH frío al 70% y

se centrifugó una vez más bajo los mismos parámetros. Finalmente, después de centrifugar se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente.

B) Ensayo cometa

Reactivos:

- + Buffer de corrimiento (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH>13)
- + Solución de neutralización (Tris-HCl 0.4 mM, pH 7.4)
- + Yoduro de propidio
- + PBS
- + Agarosa de bajo punto de fusión
- + Agarosa de punto de fusión normal

Una vez que se obtuvieron las pastillas de ADN, se adicionó a cada una 200 μ L de los distintos compuestos a evaluar, así como los respectivos controles positivo (H_2O_2) y negativo (DMSO). Las muestras fueron incubadas por 24 h a 4 °C, posteriormente fueron llevadas a centrifugación por 10 min a 6000 rpm y pasado el tiempo se decantó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 100 μ L de PBS. Enseguida, se agregaron 100 μ L de agarosa de punto de fusión normal al 0.5% y se depositó la muestra en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% disuelta en PBS. El gel se mantuvo en refrigeración con el buffer de corrimiento durante 20 min y posterior a esto se llevó a cabo una electroforesis en frío a 25 Voltios, 300 mA durante 40 min.

Al finalizar la electroforesis, se realizaron lavados empleando la solución de neutralización (3 x 5 min) agitando en el rotador. Posteriormente se llevó a cabo la tinción del gel con el yoduro de propidio diluido al 10% en agua destilada y se dejó reposar durante 20 min en la oscuridad. Finalmente, se retiró el exceso de colorante con lavados de agua destilada y se reveló el gel en una cámara de fluorescencia.

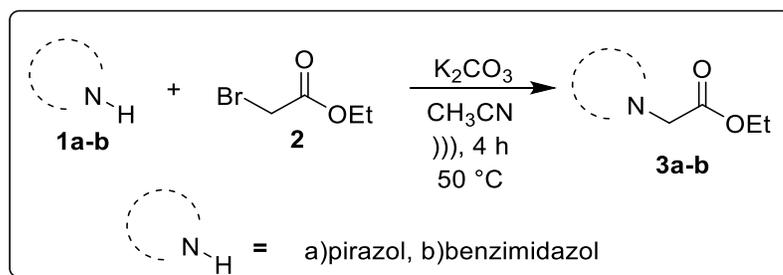
CAPÍTULO V

5.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, SÍNTESIS ORGÁNICA

5.1.1. AZOLIL ACETATOS DE ETILO 3a-b, 5a-b

5.1.1.1. Síntesis de los compuestos 3a-b

Para la preparación de los ésteres se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica S_N2 entre el bromoacetato de etilo con diferentes azoles (pirazol y benzimidazol), empleando carbonato de potasio (K_2CO_3) como base, acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente y ultrasonido como fuente de activación a 50 °C por 4 h; obteniendo así los compuestos **3a-b** (Esquema 15).



Esquema 15. Síntesis de azolil-ésteres **3a-b**.

Tanto para la reacción con pirazol como para la de benzimidazol, la mezcla de reacción inicialmente mostró un color blanco y con el paso del tiempo el color cambió a un amarillo suave. El avance de la reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina con un sistema cromatográfico AcOEt-Hex 9:1 para el éster de benzimidazol y 7:3 AcOEt-Hex para el éster de pirazol. Una vez que se formó el producto de interés, ambas reacciones se trabajaron de manera similar para obtener el crudo de reacción. Se adicionaron 50 mL de agua

destilada para disolver por completo el K_2CO_3 y la mezcla de reacción mostró un color amarillo transparente, posteriormente se realizaron tres extracciones (3 x 30 mL) con acetato de etilo; con ayuda de Na_2SO_4 (anhidro) se eliminaron las trazas de agua y finalmente, el crudo de reacción se obtuvo después de evaporar la fase orgánica.

5.1.1.2. Purificación de los compuestos 3a-b

Una vez obtenido el crudo de reacción de cada éster, éstos fueron purificados mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla de disolventes. Para el éster de pirazol inicialmente se probó un sistema cromatográfico 7:3 AcOEt:Hex y 7:3 Hex:AcOEt en placa fina, sin embargo, estos sistemas de disolventes fueron poco eficientes para la separación del producto y de la materia prima que quedó sin reaccionar, por lo que se modificó la polaridad de la mezcla utilizando un sistema cromatográfico 6:4 AcOEt:Hex logrando así una separación eficiente; dicho sistema fue utilizado como fase móvil en la columna cromatográfica para obtener el producto deseado.

Para la purificación del éster de benzimidazol inicialmente se probó un sistema cromatográfico 7:3 AcOEt:Hex en cromatografía en capa fina, el cual resultó poco eficiente. Se incrementó la polaridad del sistema cromatográfico empleando una mezcla de disolventes 9:1 AcOEt:Hex, este sistema proporcionó una separación adecuada de la materia prima y el producto, por lo tanto, este sistema de disolventes fue empleado en columna cromatográfica como fase móvil.

La columna empleada para la purificación y obtención de los compuestos **3a-b** fue una columna de vidrio de 3 cm de diámetro empacada a una altura promedio de 45 cm y el crudo de reacción fue impregnado en sílica gel para poder ser empacado en la columna. La purificación se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) empleando vapores de yodo y luz UV para revelar los productos de éster de pirazol y benzimidazol respectivamente, utilizando como referencia para ambos productos la materia prima, la cual presenta un Rf inferior al de los productos formados.

5.1.1.3. Rendimiento de los compuestos 3a-b

Al finalizar la purificación se obtuvieron 8.86 g de éster de pirazol el cual tiene una masa molecular de 154.17 g/mol, lo que equivale a obtener un rendimiento del 78%. Para el caso del benzimidazol, que tiene una masa molecular de 204.23 g/mol, se obtuvieron 6.89 g de producto puro logrando así un rendimiento del 80%, ambos productos muestran una apariencia líquida al inicio y de color amarillo tal como se describe en la Tabla 8, sin embargo, para el caso del compuesto **3b**, después de cierto tiempo adquiere una consistencia sólida.

Tabla 8. Resultados de la síntesis de los compuestos **3a** y **3b**.

Compuesto	Azol	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (° C)
3a	Pirazol	78	Líquido amarillo	---
3b	Benzimidazol	80	Sólido amarillo	63 – 65

5.1.1.4. Caracterización de los compuestos 3a-b

Una vez que los azolil-ésteres **3a-b** fueron purificados, éstos se caracterizaron estructuralmente mediante el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas.

En la Figura 3, se muestra como ejemplo el espectro de RMN ^1H para el 2-(1*H*-pirazol-il)acetato de etilo, donde se observaron señales características de la estructura del mismo. Alrededor de 1.28 ppm se observó una señal con multiplicidad de triplete (t), con una constante de acoplamiento (J) de 7.2 Hz, esta señal integra para tres protones correspondientes al único metilo presente en la estructura (OCH_2CH_3). En 4.23 ppm se observó un cuarteto (q) con una $J=7.1$ Hz y en 4.92 ppm se observó un singulete (s), ambas señales integran para dos protones correspondientes a los grupos metileno (OCH_2CH_3 y $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$). Finalmente, en 6.33, 7.48 y 7.56 ppm, se observaron tres grupos de señales (t, $J=2.1$ Hz), (d, $J=2.4$ Hz) y (d, $J=1.9$ Hz) que integran cada una para un protón correspondientes a los tres hidrógenos presentes en el anillo de pirazol.

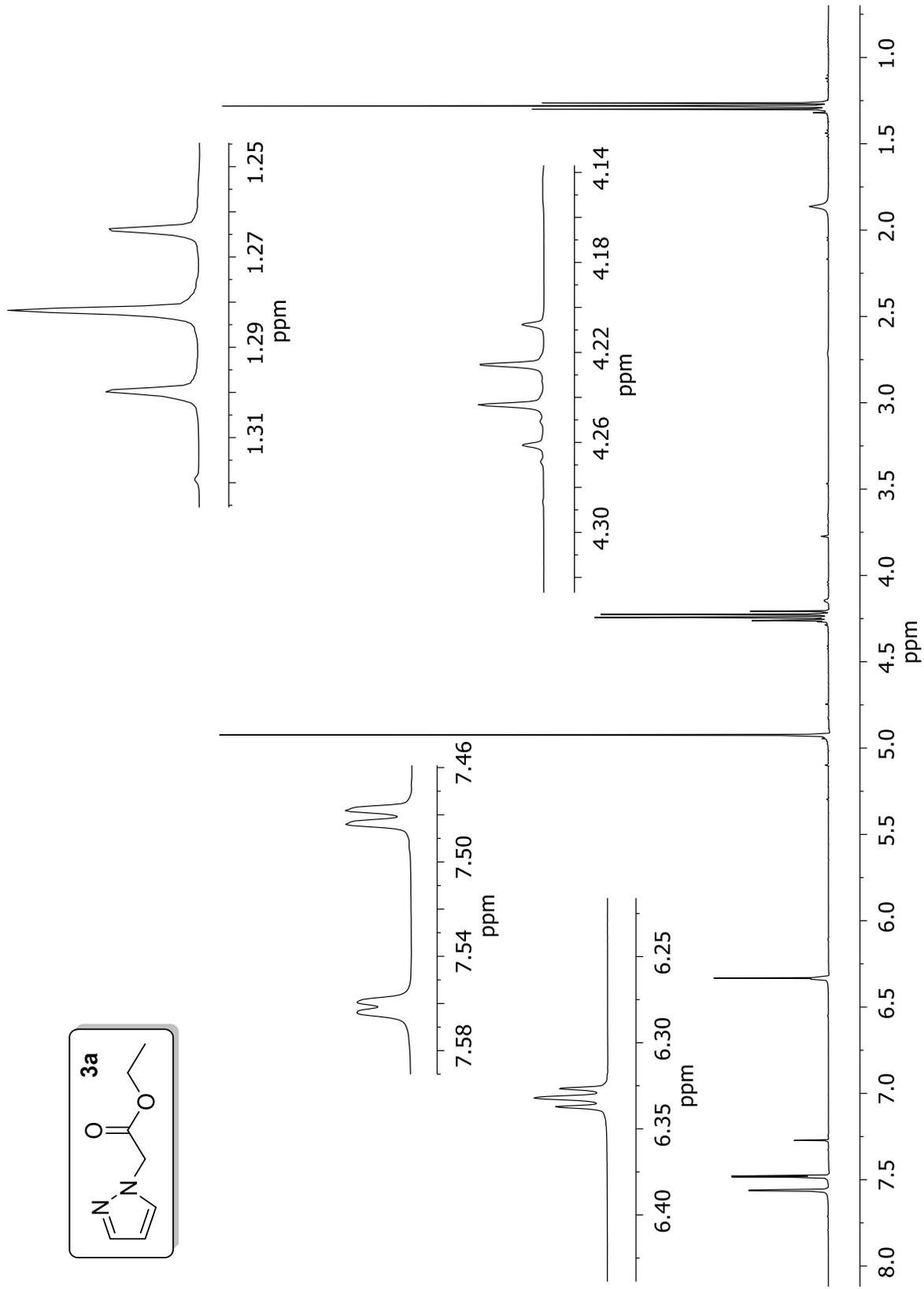
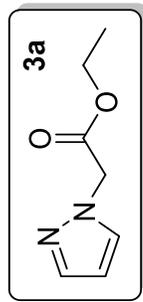


Figura 3. Espectro de RMN ^1H para **3a**.

Por otro lado, también se muestra como ejemplo del mismo compuesto **3a** el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4), donde se observaron las señales correspondientes a los siete carbonos; una señal que aparece en 14.1 ppm correspondiente al carbono del grupo metilo (OCH_2CH_3). Las dos señales que aparecen en 53.1 y 61.8 ppm que corresponden a los carbonos de los metilenos ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ y OCH_2CH_3). Arriba de 100 ppm (106.5, 130.6 y 140.1 ppm) se encontraron tres señales que corresponden a los carbonos del anillo de pirazol. Finalmente, en 167.9 ppm se observa la señal característica del carbono del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$).

Siguiendo con la caracterización para el compuesto **3a** se describe la información obtenida del espectro de **IR** (cm^{-1}) donde se observan las siguientes bandas correspondientes a los distintos grupos funcionales presentes en la estructura: 3123 $\nu(\text{C-H, Pirazol})$; 2985, 2909 $\nu(\text{C-H, alifático})$; 1747 $\nu(\text{C=O, éster})$; 1203 $\nu(\text{C-O-C})$; 1519, 1451, 1395, 1376, 974 $\nu(\text{Pirazol})$; 918, 696 $\delta(\text{Pirazol})$; 654 $\tau(\text{Pirazol})$. En la Tabla 9 se muestran de manera detallada las bandas, así como las asignaciones del compuesto **3a**.

Tabla 9. Asignación de bandas para el espectro IR del compuesto **3b**.

Asignación	Asignación con comentarios	Numero de onda (cm⁻¹)
$\nu(\text{C-H})$	Estiramiento C-H del anillo de pirazol	3123
$\nu(\text{C-H})$	Estiramiento C-H del grupo metilo	2985
$\nu(\text{C-H})$	Estiramiento C-H del grupo metileno	2909
$\nu(\text{C=O})$	Estiramiento C=O del grupo carbonilo del éster	1747
$\nu(\text{C-O-C})$	Estiramiento enlace C-O-C del éster	1203
$\nu(\text{Pirazol})$	Tensión del anillo de pirazol	1519 1451 1395 1376 974
$\delta(\text{Pirazol})$	Deformación en el plano del anillo de pirazol	918 696
$\tau(\text{Pirazol})$	Deformación fuera del plano del anillo de pirazol	654

Finalmente, el espectro de masas de alta resolución (FAB⁺) mostró la relación masa/carga (m/z) del ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ 155.0822, siendo la masa molecular teórica del compuesto **3a** $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 155.0821, obteniéndose un porcentaje de error del 0.12%. Por todo lo anterior se establece que el compuesto sintetizado corresponde al compuesto **3a**.

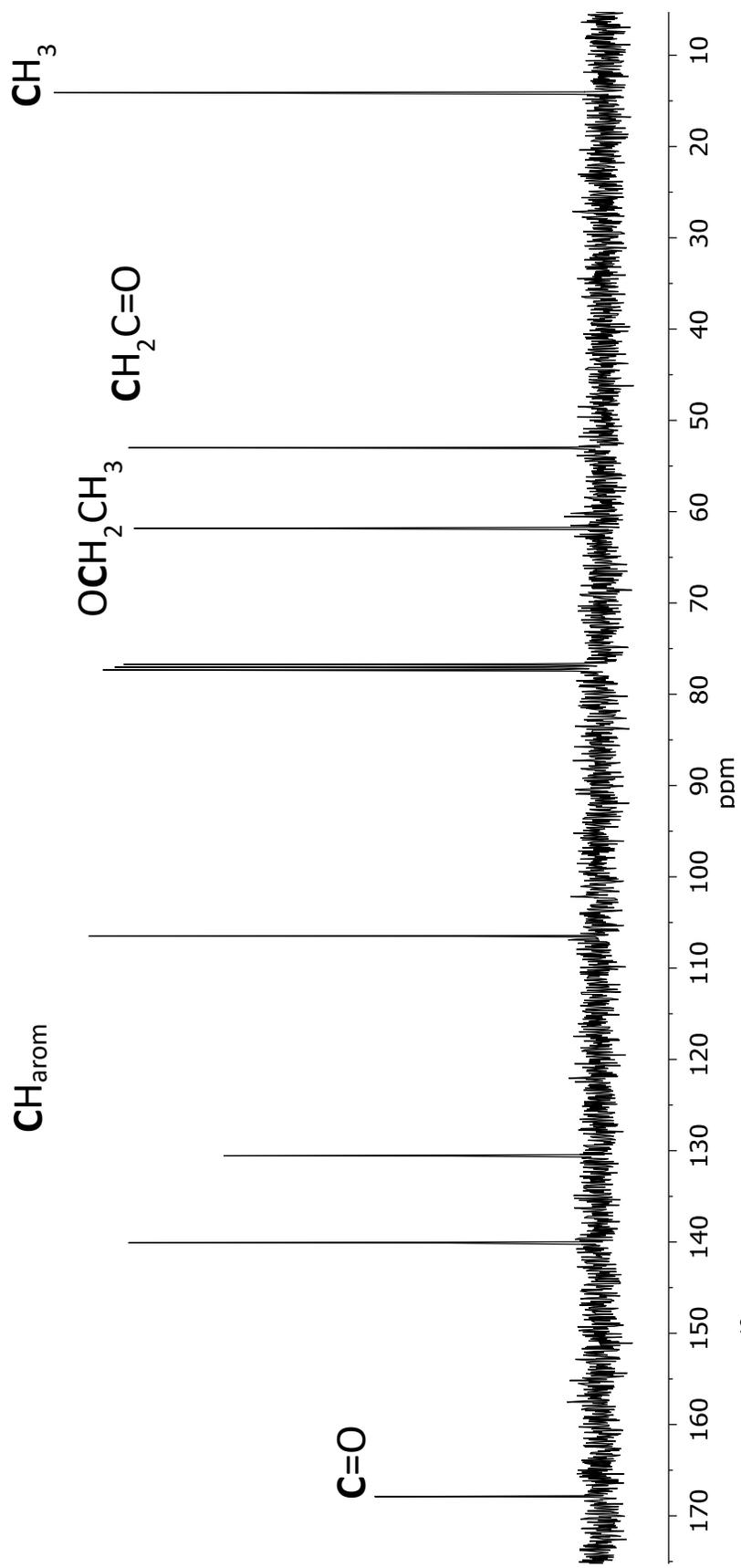
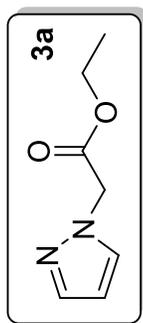
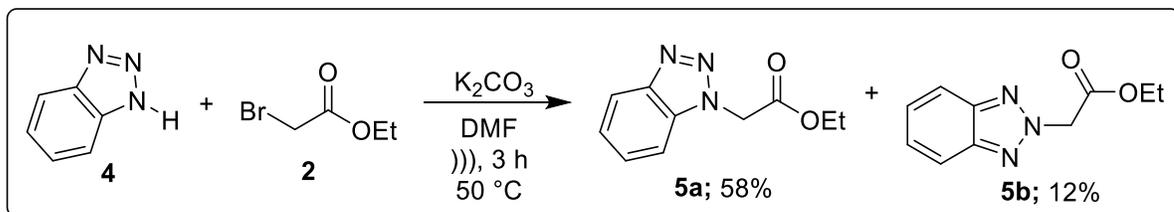


Figura 4. Espectro de ¹³C para el compuesto **3a**.

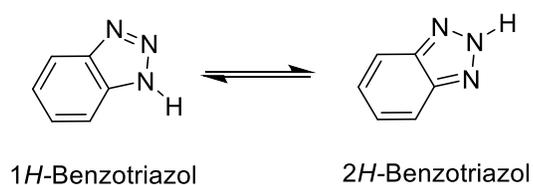
5.1.1.5. Síntesis de los compuestos 5a-b

Para la síntesis de los ésteres derivados de benzotriazol se modificó el tiempo (3 h) y el disolvente (Dimetilformamida, DMF); obteniendo así el éster correspondiente (Esquema 16).



Esquema 16. Síntesis de azolil-ésteres 5a-b.

La preparación de los ésteres derivados de benzotriazol se llevó a cabo mediante un ataque nucleofílico del benzotriazol sobre el bromoacetato de etilo, dicha reacción dio origen a la formación de dos isómeros estructurales debido al equilibrio tautomérico que presenta el benzotriazol (Esquema 17) pues el ataque podría propiciarse en el nitrógeno en posición 1 o en el nitrógeno en posición 2, dando origen a una mezcla de isómeros, favoreciendo la formación del isómero 1H-benzotriazolil acetato de etilo.



Esquema 17. Formas tautoméricas del benzotriazol.

De manera general la reacción se llevó a cabo entre el 1*H*-benzotriazol y el bromoacetato de etilo, utilizando tres disolventes distintos acetonitrilo, DMF y THF, dicha reacción fue asistida por ultrasonido. Al concluir el tiempo de reacción se presentó una coloración rosa pálido en la mezcla, mientras que en cromatografía en placa fina se pudo observar con luz UV la formación de los dos productos esperados **5a-b**. El tratamiento realizado a la mezcla para obtener el crudo de reacción dependió del disolvente utilizado; cuando se utilizó acetonitrilo y THF, a la mezcla de reacción se le adicionaron 50 mL de agua destilada y posteriormente se le realizaron extracciones (3 x 30 mL) con acetato de etilo. Finalmente, la fase orgánica fue evaporada a presión reducida utilizando un evaporador rotativo.

Cuando se utilizó DMF como disolvente, el tratamiento consistió en preparar 50 mL de agua destilada fría para posteriormente adicionarlos a la mezcla de reacción, esto con la finalidad de hacer precipitar el producto de reacción y al mismo tiempo disolver el K₂CO₃ remanente. Una vez precipitado el producto, se llevó a cabo una filtración al vacío para obtener la mezcla de los productos.

5.1.1.6. Purificación de los compuestos 5a-b

Para la purificación y separación de los productos se llevó a cabo una cromatografía en columna, para ello se utilizó una columna de vidrio de 4 cm de diámetro y fue empacada con gel de sílice como fase estacionaria a una altura promedio de 45 cm. Como fase móvil inicialmente se probaron distintos sistemas de disolventes en proporciones 7:3, 6:4, 2:1, 3:1 Hex:AcOEt y viceversa;

finalmente, el sistema cromatográfico empleado fue 2:1 Hex:AcOEt. La purificación de los productos fue monitoreada por cromatografía en capa fina (CCF) con ayuda de luz UV, donde se observó un $R_f = 0.60$ para el 2*H*-benzotriazolil acetato de etilo y un $R_f = 0.31$ para el 1*H*-benzotriazolil acetato de etilo mientras que la materia prima la cual fue utilizada como referencia aparece por debajo del derivado de 1*H*-benzotriazolil.

Las fracciones colectadas para el compuesto **5a** fueron 30, mientras que para el compuesto **5b** rebasó las 50. Es importante mencionar que 10 fracciones se obtuvieron como mezcla de los dos isómeros y estas no fueron utilizadas para determinar los porcentajes de rendimiento.

5.1.1.7. Rendimiento de los compuestos 5a-b

Al finalizar la purificación de ambos ésteres se pudo observar que el rendimiento químico de los isómeros estuvo influenciado por el equilibrio tautomérico del benzotriazol y del disolvente utilizado, presentando rendimientos de un 58% para el isómero en posición 1 (**5a**) y un 12% para el isómero en posición 2 (**5b**) cuando fue empleado DMF; ambos productos sólidos y de color blanco. En la Tabla 10 se muestra la influencia del disolvente utilizado sobre el rendimiento de la reacción y de forma general se muestra como la polaridad (constante dieléctrica) del disolvente utilizado favorece aún más la formación de un isómero con respecto a otro; ya que se pudo identificar que cuando se emplea un disolvente menos polar se favorece la formación del isómero en posición uno.

Tabla 10. Resultados de la síntesis de **5a-b**.

Compuesto	Disolvente	Índice de polaridad	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (°C)
5a	DMF	6.4	58	Sólido blanco	83
	THF	4.2	86		
	MeCN	6.2	60		
5b	DMF	6.4	12	Sólido blanco	87
	THF	4.2	14		
	MeCN	6.2	18		

5.1.1.8. Caracterización de los compuestos 5a-b

Cada uno de los isómeros del benzotriazolil acetato de etilo fue caracterizado mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , IR y Espectrometría de Masas de baja y alta Resolución. Como ejemplo, en la Figura 5 se muestra el espectro de RMN de ^1H para ambos isómeros con la finalidad de discutir acerca de las similitudes que presentan en las señales. Alrededor de 1.26 ppm se presenta una señal triple (t) que tiene una constante de acoplamiento (J) de 7.1 Hz indicando la distancia que hay entre los picos, estando magnéticamente acoplados, este triplete integra para tres protones que corresponden al metilo del grupo etilo (Et). En 4.25 ppm se puede apreciar un cuarteto (c), el cual presenta una $J=7.2$ Hz e integra para dos protones correspondientes al metileno del grupo etilo. Alrededor de 5.42 ppm se presenta una señal sencilla (s) que integra para dos protones correspondientes al metileno unido al nitrógeno del benzotriazol, es importante indicar que las tres señales descritas anteriormente, son señales que

se comparten para los dos isómeros. Sin embargo, debido a la simetría que presenta el grupo benzotriazolil en el isómero *2H*-benzotriazolil acetato de etilo, en la región aromática los espectros difieren en las señales que presentan. Por ejemplo, para el isómero en posición 1 (**5a**), alrededor de 7.36-7.56 ppm se observan dos señales múltiples, que integran para uno y dos protones respectivamente, correspondientes a los hidrógenos del anillo aromático, y finalmente en 8.09 ppm aparece una señal doble con una constante de acoplamiento de 8.04 Hz que corresponde a un protón más del anillo aromático. Por otro lado, como puede observarse en el espectro para el isómero en posición dos, en la región de los aromáticos aparecen únicamente dos señales múltiples simétricas alrededor de 7.37 y 7.85 ppm que integran para dos protones cada una, esto es debido a la simetría que presenta el grupo benzotriazolil para este isómero, lo que da origen a que en el anillo sólo se encuentren dos tipos de protones en base al entorno químico que los rodea.

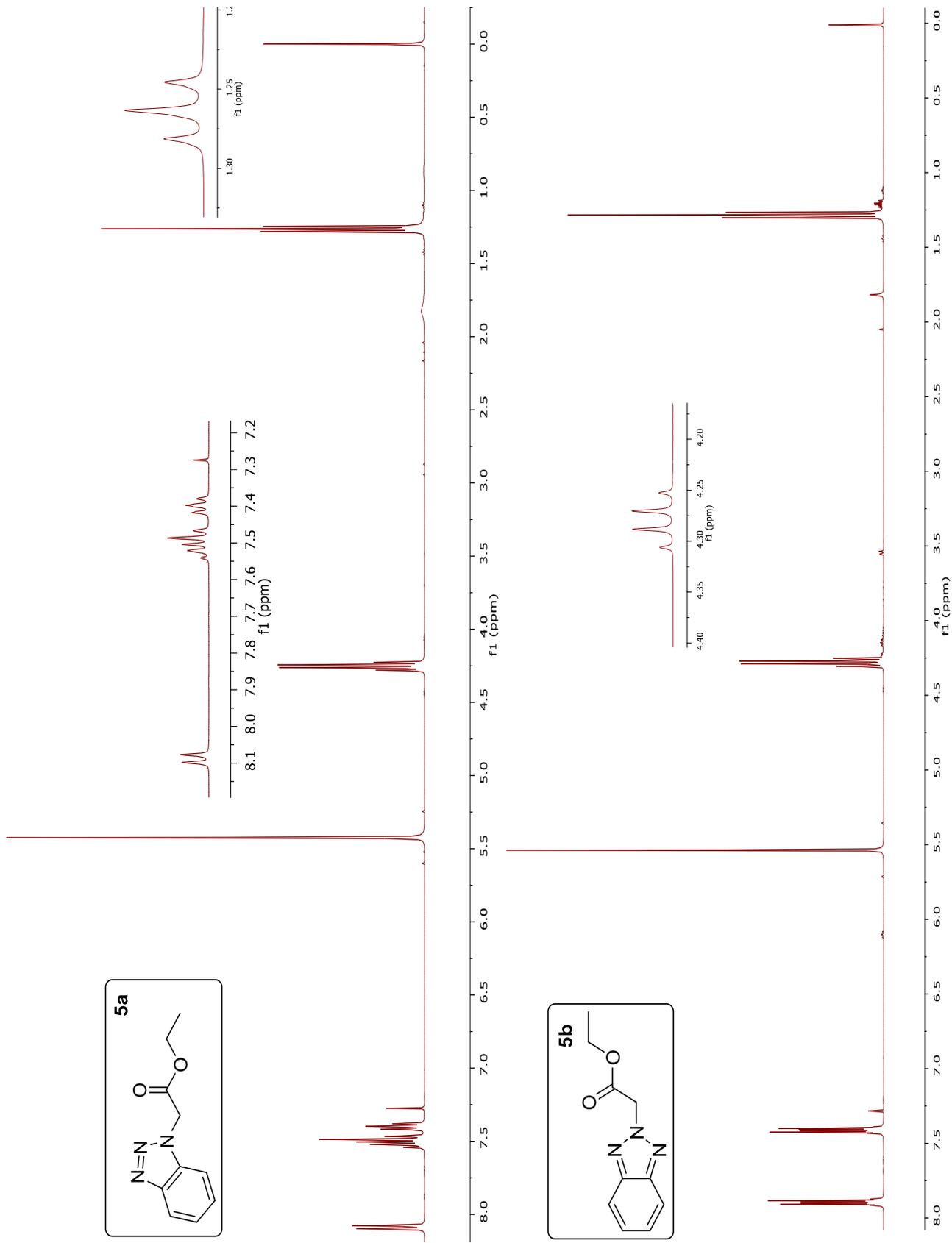
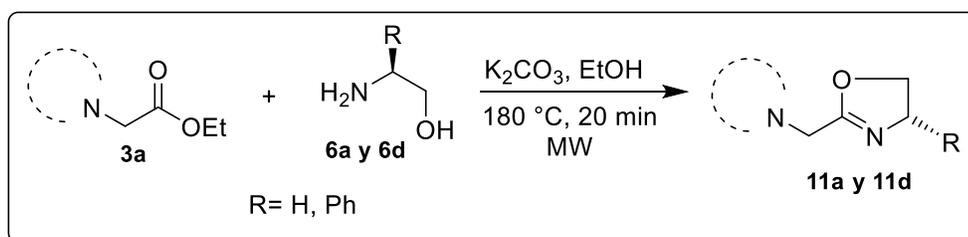


Figura 5. Espectros de RMN ¹H para 5a y 5b.

5.1.2. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 1

Para llevar a cabo la preparación de las azolil-oxazolininas, inicialmente se propuso la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 18. La cual consistió en hacer reaccionar bajo irradiación de microondas el azolil-acetato de etilo correspondiente con los aminoalcoholes [etanolamina y (S)-fenilalaninol] empleando etanol como disolvente y K_2CO_3 como base.



Esquema 18. Síntesis de azolil-oxazolininas, **ruta 1**.

De manera general en la mezcla de reacción se observó un precipitado blanco correspondiente a la formación de un subproducto identificado como carboxilato, mientras que en el sobrenadante se encontró el producto de interés. Dicha mezcla fue filtrada y el líquido resultante fue evaporado a presión reducida, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil un sistema de elución en proporción 1:1 AcOEt:MeOH para ambas reacciones. Finalmente, los productos obtenidos fueron analizados por RMN 1H y ^{13}C ; donde se determinó que la muestra obtenida después de su purificación por cromatografía corresponde a una mezcla del carboxilato y aminoalcohol, ya que ambos compuestos presentaron el mismo factor de retención (Rf). Como ejemplo se muestra el

espectro de RMN ^1H (Figura 6), donde se observa que aparecen señales características del compuesto deseado; alrededor de 2.8, 3.3 y 3.5 ppm aparecen 3 señales bien definidas como doble de dobles (dd), multiplete (m) y una señal más como doble de dobles (dd), cada una integra perfectamente para los protones correspondientes al aminoalcohol. Por lo que se comprobó que la muestra aislada es una mezcla de carboxilato y aminoalcohol debido a que, para la oxazolina, en esta región esperaríamos observar las mismas 3 señales. Una razón más para establecer esta idea es la señal que aparece en el espectro a un desplazamiento químico de 4.75 ppm como un singulete (s) el cual integra para dos protones correspondientes al metileno adyacente a un carbonilo y no a un enlace C=N del anillo de oxazolina.

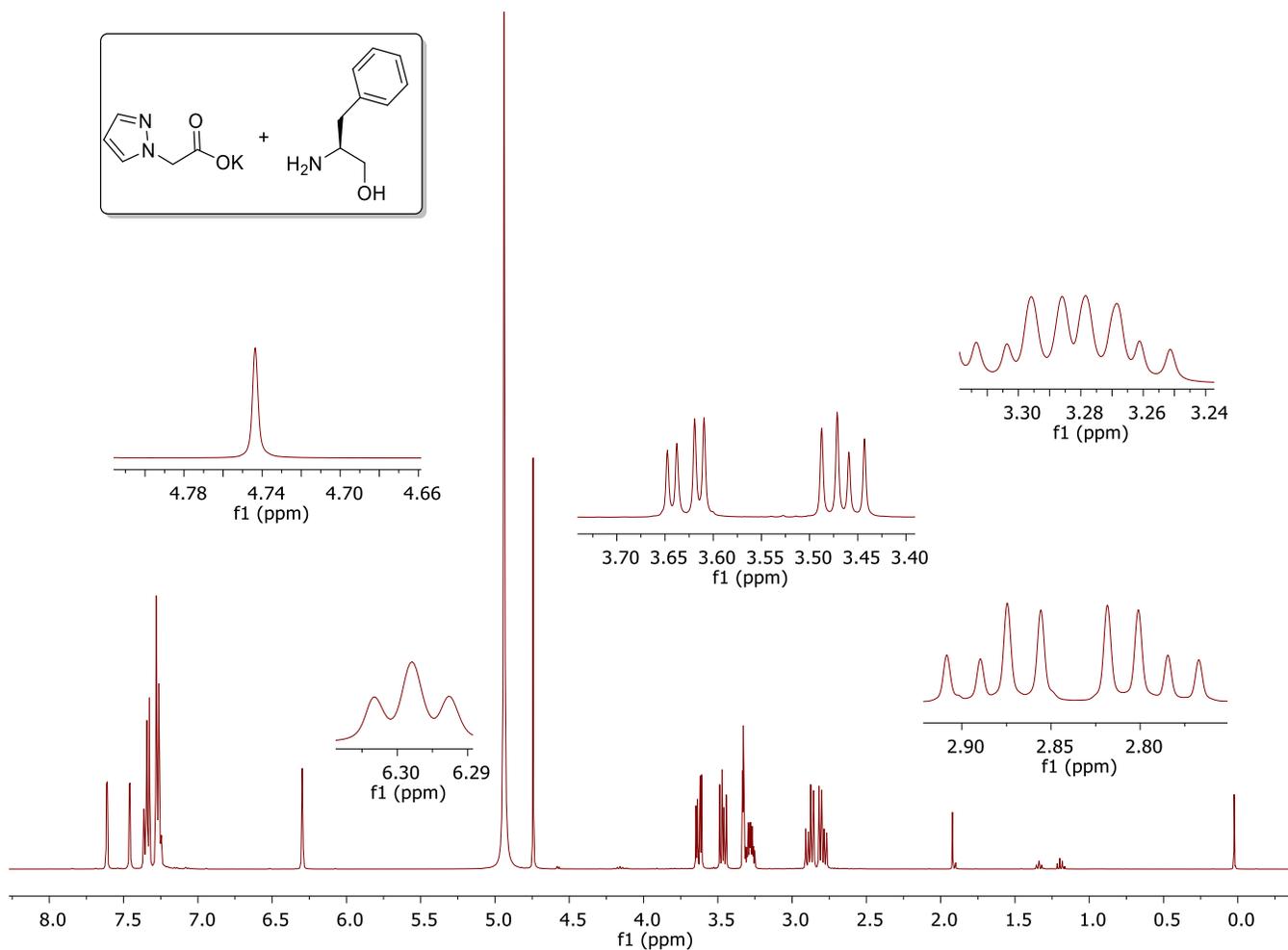
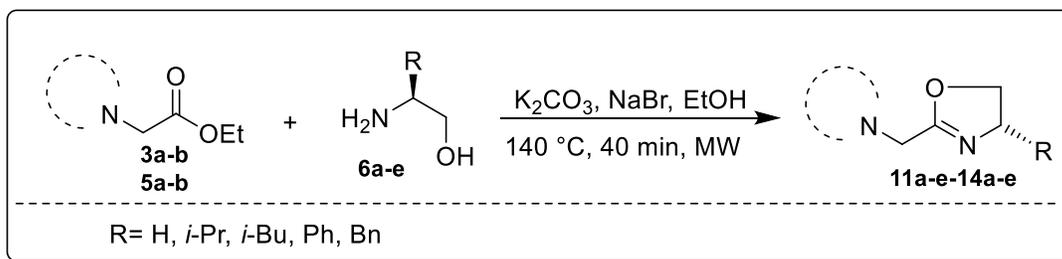


Figura 6. Espectro de RMN ^1H , ruta 1.

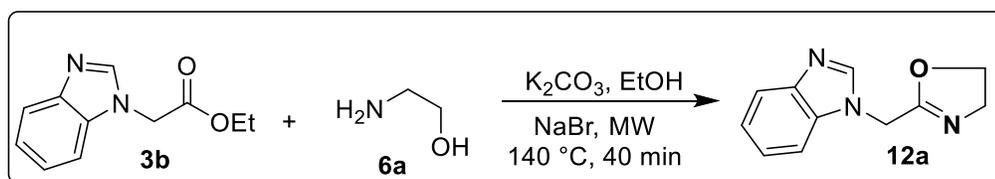
5.1.3. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 2

Debido a que no fue posible obtener el producto deseado bajo las condiciones de reacción anteriormente mencionadas, se decidió modificar algunos parámetros como la temperatura y tiempo de reacción, además de incorporar NaBr en la reacción con la finalidad de favorecer la ciclación, por lo tanto, se propusieron las siguientes condiciones de reacción (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis de azolil-oxazolinas, **ruta 2**.

Bajo las condiciones establecidas, se llevaron a cabo las diferentes reacciones entre cada uno de los azolil-ésteres con los diferentes aminoalcoholes etanolamina, (*S*)-valinol, (*S*)-leucinol, (*S*)-fenilalaninol y (*S*)-fenilglicinol. El avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina y como ejemplo, en la Figura 7 se muestra una placa cromatográfica realizada a la reacción descrita en el Esquema 20.



Esquema 20. Síntesis del compuesto **12a**.

En dicha placa cromatográfica se muestran cuatro carriles etiquetados como **a)** crudo de reacción, **b)** etanolamina, **c)** benzimidazolil acetato de etilo y **d)** benzimidazolil hidroxiacetamida. En el carril **a)** se pudo observar la aparición de una mancha que presentó un R_f similar al de la etanolamina, otra mancha ligera que corrió un poco arriba del aminoalcohol y finalmente una tercera mancha que se etiquetó como producto de reacción.

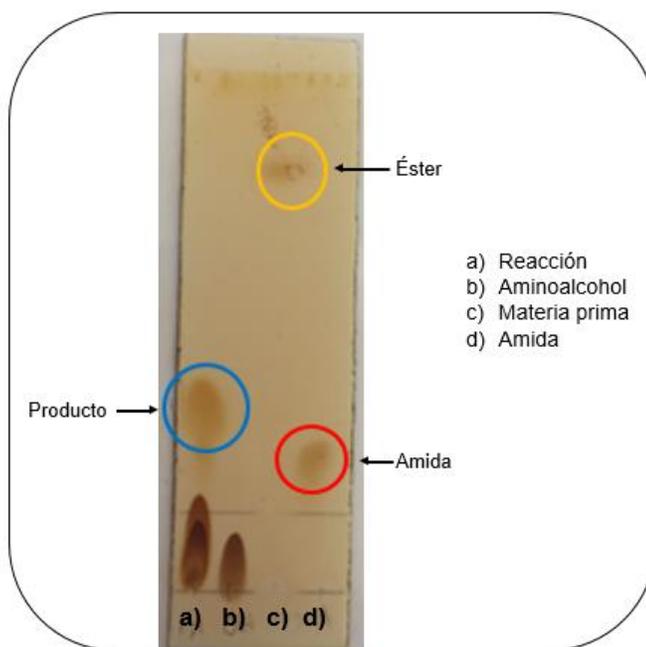


Figura 7. Placa cromatográfica para el compuesto **12a**.

De manera general, el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna con la finalidad de aislar el compuesto de interés. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla de AcOEt:MeOH en proporción 1:1 v/v para cada reacción.

Una vez aislado el producto, éste fue caracterizado por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas. Como ejemplo se muestra el espectro de RMN de ^1H (Figura 8) donde se observan dos señales múltiples a un desplazamiento químico de 2.97 y 3.72 ppm, las cuales indican que no se lleva a cabo la reacción, tal como ocurre en la ruta 1; pues estos multipletes corresponden a los protones de los metilenos del aminoalcohol (debido a los acoplamientos con los protones del OH y NH_2) y no al ciclo, ya que para indicar la formación de la oxazolina, se esperarían dos señales bien definidas como

señales tripletes a un desplazamiento químico alrededor de 1.50 y 3.60 ppm con una integración para dos protones cada una. Otra razón para considerar que se tiene una mezcla de aminoalcohol y ácido carboxílico es la presencia de una señal simple que aparece en un desplazamiento químico de 4.82 ppm la cual integra para dos protones correspondientes al metileno unido al carbonilo de un ácido carboxílico y no a los protones del metileno unido al ciclo, ya que para estos se esperaría observar la señal simple a un desplazamiento químico alrededor de 4.5 ppm.

Todo lo anterior, fue confirmado con el resultado de la espectrometría de masas de baja resolución, en donde se identificó el ion molecular con m/z 176.06 que corresponde a la masa molecular del ácido benzimidazolil acético.

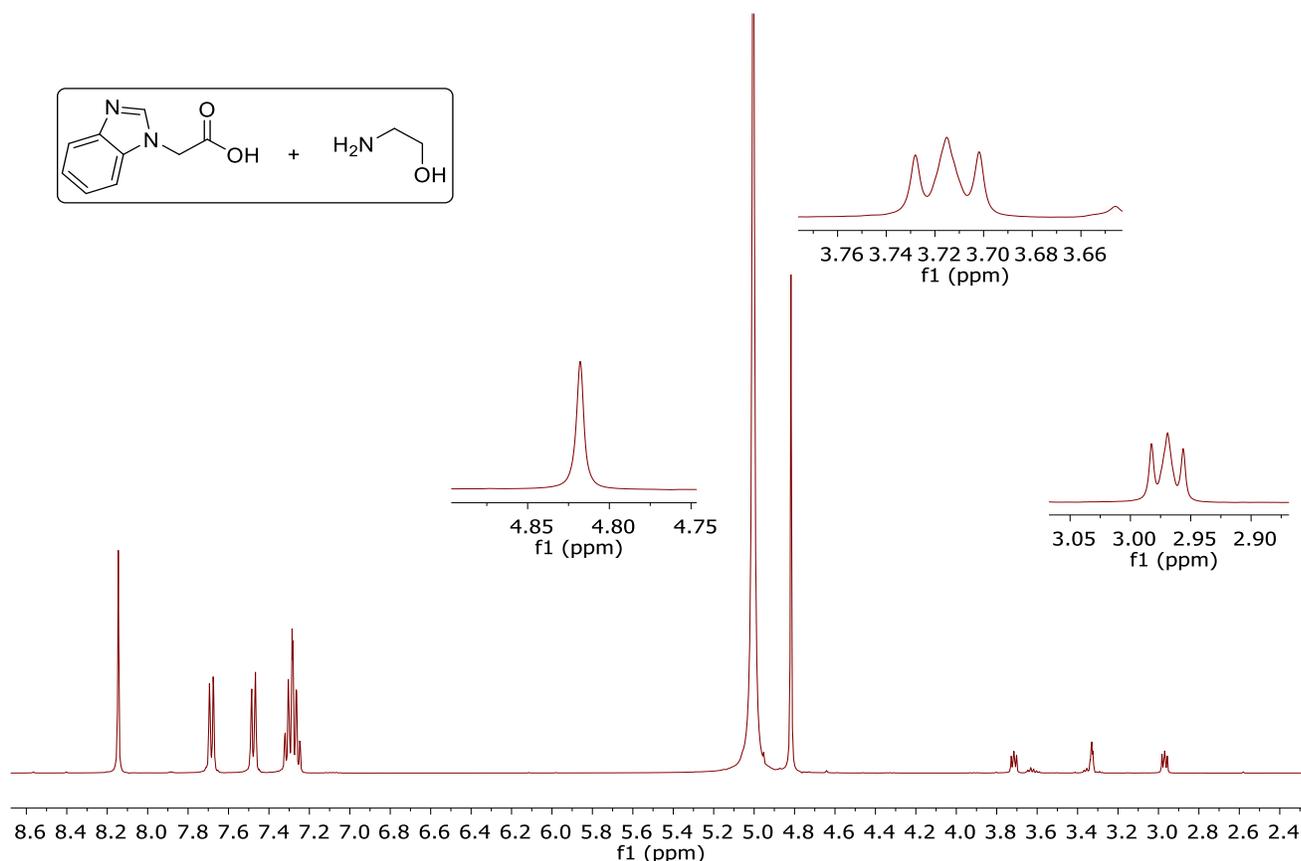
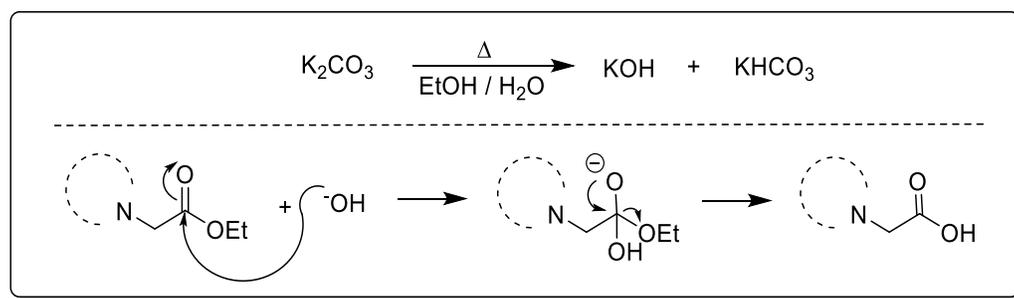


Figura 8. Espectro de RMN ^1H , ruta 2.

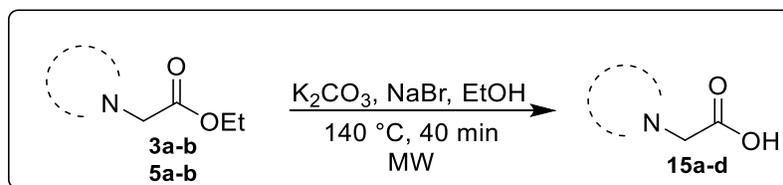
A partir de esto, se pudo inferir que la formación de ácidos carboxílicos se estaba llevando a cabo muy posiblemente por una reacción de hidrólisis del azolil-éster por las trazas de agua presentes en el etanol, y que, bajo las condiciones de temperatura, presión y tiempo, dichas trazas de agua reaccionaban en un principio con el K_2CO_3 dando lugar a la formación de hidróxido de potasio (KOH) y carbonato ácido de potasio ($KHCO_3$). Posteriormente, el KOH formado realiza un ataque nucleofílico en el grupo acilo del éster para llevar a cabo la hidrólisis (Esquema 21) antes de que el grupo amino del aminoalcohol reaccionara con él; razón por la cual se asume que en algunas de las reacciones llevadas a cabo se tenía la presencia del ácido carboxílico en combinación con el aminoalcohol y en otras solo aparecía el ácido carboxílico.



Esquema 21. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de ésteres.

5.1.4. ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Para comprobar que la formación de ácidos carboxílicos podía llevarse a cabo bajo las condiciones antes mencionadas, se decidió realizar la hidrólisis de cada uno de los azolil-ésteres bajo el siguiente esquema de síntesis en ausencia del aminoalcohol (Esquema 22).



Esquema 22. Síntesis de ácidos carboxílicos **15a-d**.

Por lo tanto, el correspondiente azolil-éster se hizo reaccionar con NaBr, K₂CO₃ en presencia de 3 mL de etanol, empleando un sistema cerrado y ajustando los parámetros indicados. Cada uno de los productos fue identificado por cromatografía en capa fina empleando un sistema de elución 1:1 AcOEt:MeOH. Posteriormente, cada uno de los compuestos fueron purificados mediante cromatografía en columna y los ácidos carboxílicos **15a-d** obtenidos fueron caracterizados mediante RMN de ¹H y ¹³C y algunos de ellos por espectrometría de masas e infrarrojo. Como ejemplo se muestra el espectro de masas de baja resolución para el compuesto **15b** (Figura 9) donde se observa el pico del ion molecular con una relación *m/z* de 176.10 que corresponde a la masa molecular del compuesto **15b**. Además, se observa el pico base con una relación *m/z* de 131.10 que corresponde al fragmento con una pérdida de masa de 45 unidades, atribuido al grupo carboxílico, donde el carbocatión formado es estabilizado por resonancia.

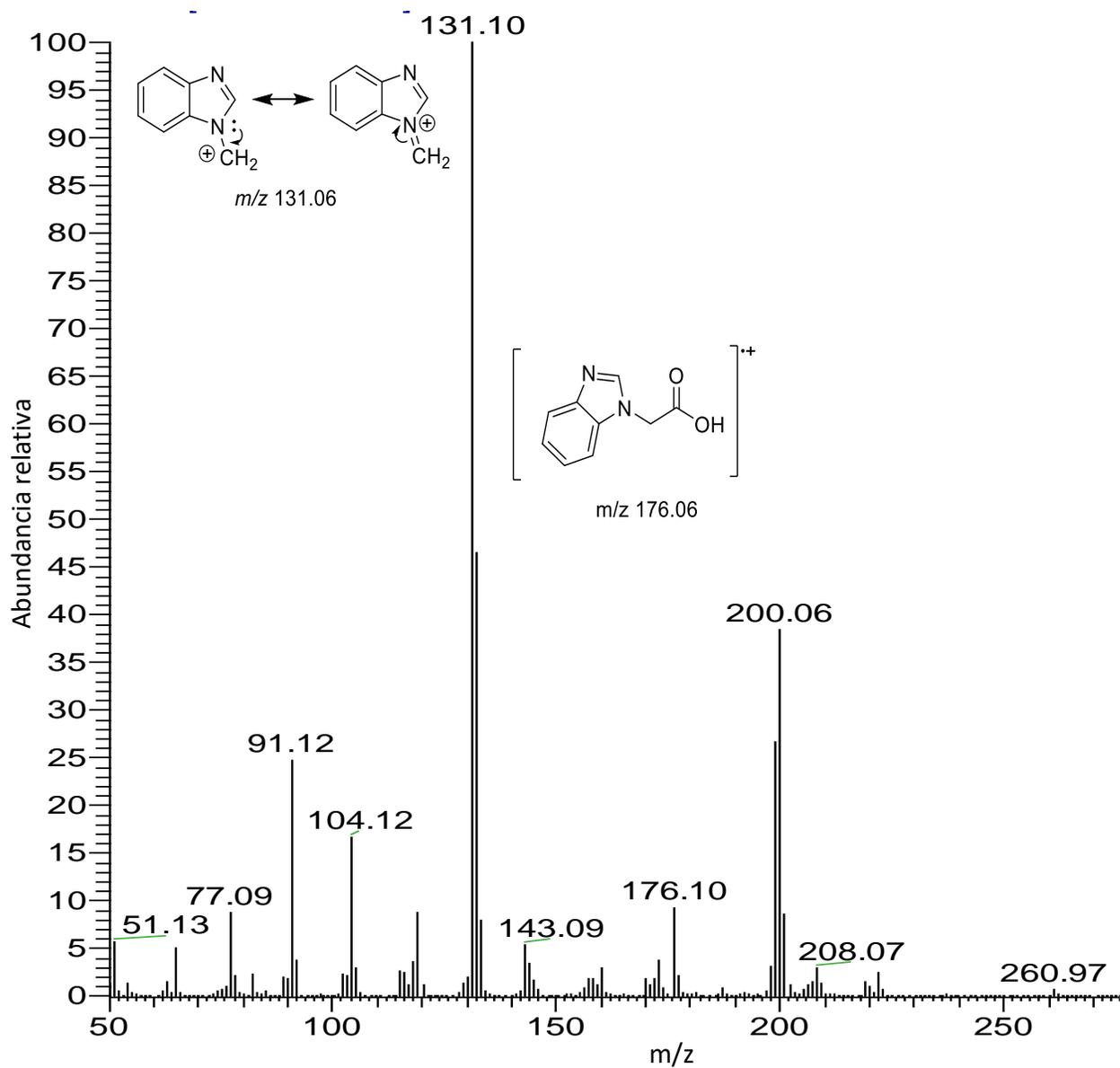


Figura 9. Espectro de masas para **15b**.

De esta forma se pudo establecer una metodología nueva para la preparación de ácidos carboxílicos con rendimientos que van desde el 35% hasta 81%, aun cuando no se contemplaba dentro de los objetivos del presente proyecto (Figura 10).

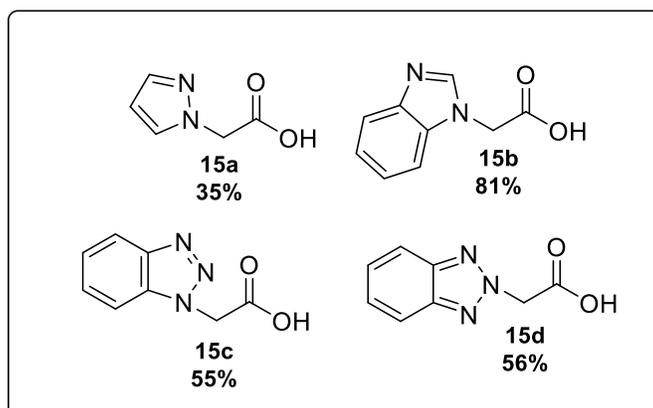
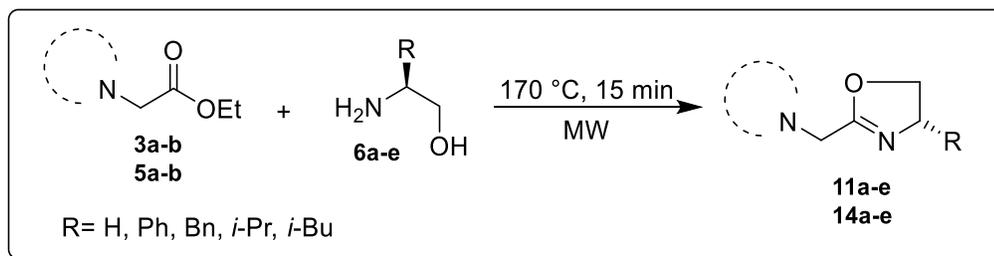


Figura 10. Ácidos carboxílicos.

5.1.5. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 3

Debido a que se consideró que las trazas de agua en el etanol y el K_2CO_3 son los responsables de la hidrólisis, se decidió proponer una ruta libre de disolvente y K_2CO_3 esperando obtener las azolil-oxazolininas (Esquema 23).



Esquema 23. Síntesis de azolil-oxazolininas, ruta 3.

Empleando la irradiación de microondas en un sistema cerrado, se hizo reaccionar un exceso de etanolamina (6 Eq) con 1 Eq de pirazolil acetato de etilo a 170 °C. Para la identificación del producto, se empleó cromatografía en capa fina utilizando un sistema de elución 1:1 AcOEt:MeOH y como referencias se

emplearon el éster de pirazol y la correspondiente hidroxiamida que había sido preparada anteriormente en el grupo de investigación.

Una vez que la placa fue revelada empleando una solución de *p*-anisaldehído como agente revelador, se pudo observar que el producto obtenido bajo esta ruta de síntesis fue la hidroxiamida; debido a que el R_f obtenido para el producto principal fue igual al R_f de la referencia de *N*-(2-hidroxi-etil)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida. La Figura 11 muestra sólo una representación visual de la cromatografía en capa fina.

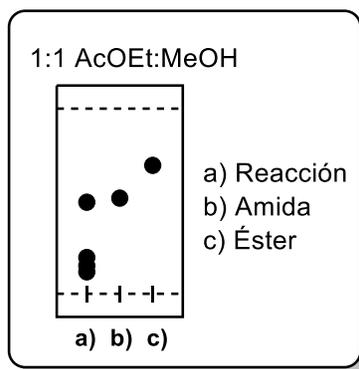
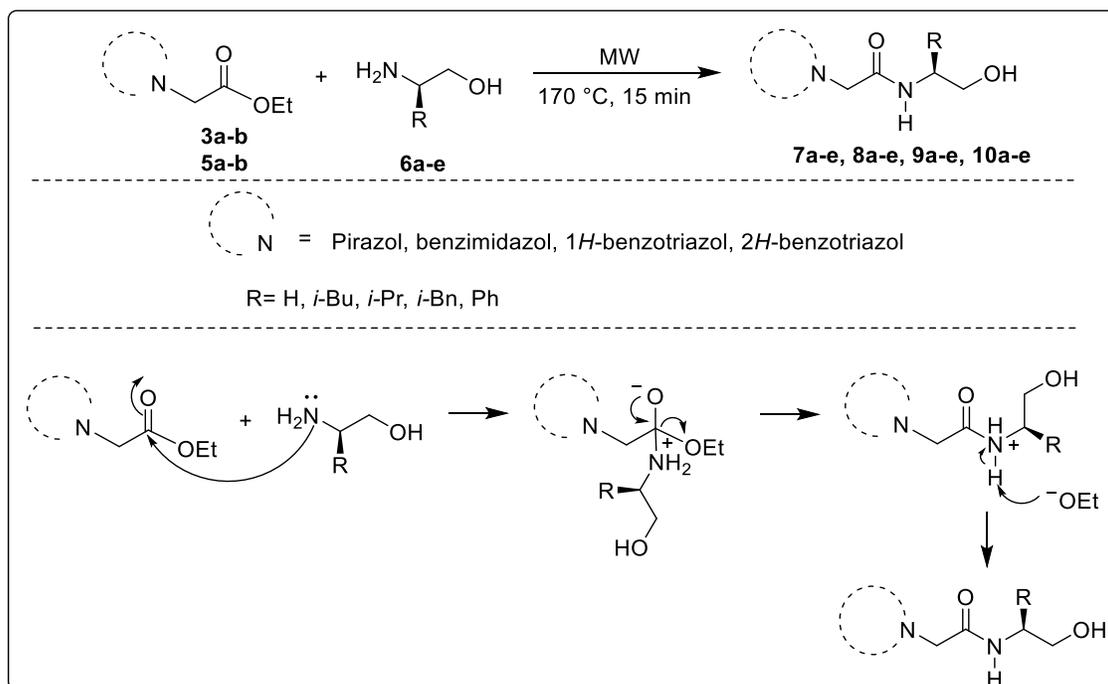


Figura 11. Placa cromatográfica, ruta 3.

El compuesto preparado bajo estas condiciones fue aislado y purificado mediante una serie de lavados con etanol frío; presentando un punto de fusión de 114-117 °C, similar a la hidroxiamida reportada previamente en nuestro grupo de investigación (117-119 °C). Finalmente, dicho compuesto fue caracterizado por RMN de ¹H y ¹³C y se pudo confirmar que el producto que se formaba a través de esta ruta corresponde a la *N*-(2-hidroxi-etil)-2-(1*H*-pirazol-1-il) acetamida **7a**.

Para este caso, la formación de la hidroxiacetamida se ve favorecida debido al ataque nucleofílico del grupo amino del aminoalcohol sobre el carbonilo del éster etílico (Esquema 24).³⁴



Esquema 24. Mecanismo de reacción para la formación de hidroxiacetamidas.

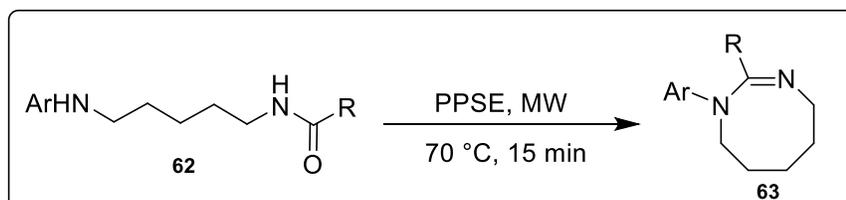
Como se puede observar en el esquema anterior, bajo estas condiciones no fue posible obtener el producto de ciclación intramolecular (oxazolina), a pesar de que la literatura ha demostrado la preparación de oxazolinas a través de amidas utilizando condiciones similares a las descritas en este trabajo.^{13, 14}

No obstante, estos resultados permitieron generar un método fácil para la preparación de hidroxiacetamidas en un solo paso de reacción, en condiciones libre de disolvente y en tiempos cortos de reacción; además de que las hidroxiacetamidas podían ser purificadas realizando lavados con etanol frío y sin

necesidad de emplear cromatografía en columna, a diferencia de las rutas empleadas anteriormente por el grupo de investigación para la preparación de este tipo de amidas. Las cuales involucraban el empleo de disolvente, un tiempo de reacción de 20-40 min y purificación de producto mediante cromatografía en columna.

5.1.6. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 4

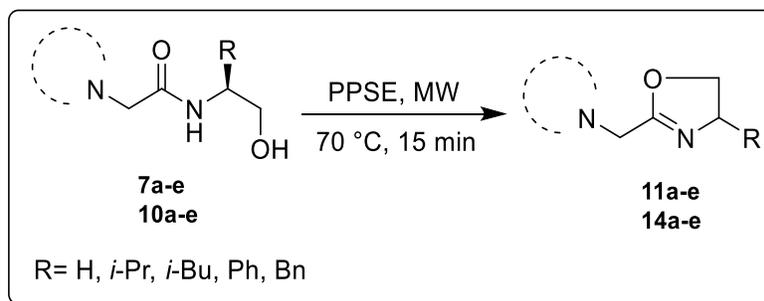
De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento y basándose en lo descrito por Díaz *et al.*,³⁵ quienes reportaron la síntesis de amidinas cíclicas bajo irradiación de microondas, empleando un éster de polifosfato (PPSE, *Polyphosphoric acid trimethylsilyl ester*) como agente de ciclación de las *N*-acil-*N'*-arilpentametilendiaminas en condiciones libre de disolvente (Esquema 25).



*Numeración de acuerdo con el apartado II

Esquema 25. Ruta de síntesis propuesta por Díaz *et al.*

Con base a lo anterior, se decidió utilizar estas condiciones de síntesis para la generación de la oxazolina. Para ello, inicialmente se llevó a cabo la preparación de las azolil-hidroxiacetamidas a través de la ruta encontrada, seguido de su reacción con el éster de polifosfato (Esquema 26).

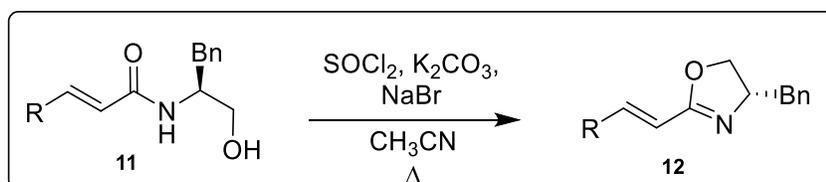


Esquema 26. Síntesis de azolil-oxazolinas, **ruta 4.**

La reacción inicialmente se llevó a cabo utilizando irradiación de microondas en un sistema cerrado, inmediatamente después de haber formado la hidroxiacetamida se agregó a la reacción 1 Eq de PPSE y se asignó un tiempo de 15 min, sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables. Así que se decidió probar la ruta de síntesis en un sistema abierto incrementando la temperatura a 170 °C, a una potencia de 100 watts y aumentando el tiempo de reacción a 45 min. Se realizó cromatografía en capa fina para verificar la formación de producto y se pudo observar que la reacción no había procedido, ya que sólo aparecía una mancha que indicaba la presencia de la hidroxiacetamida en la mezcla de reacción. Finalmente se decidió incrementar los equivalentes de PPSE (2.0 Eq) llevando a cabo la reacción por 40 min, a 90 °C y 50 watts de potencia. Desafortunadamente, una vez más la reacción no procedió, observándose en cromatografía en capa fina sólo la presencia de la hidroxiacetamida.

5.1.7. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 5

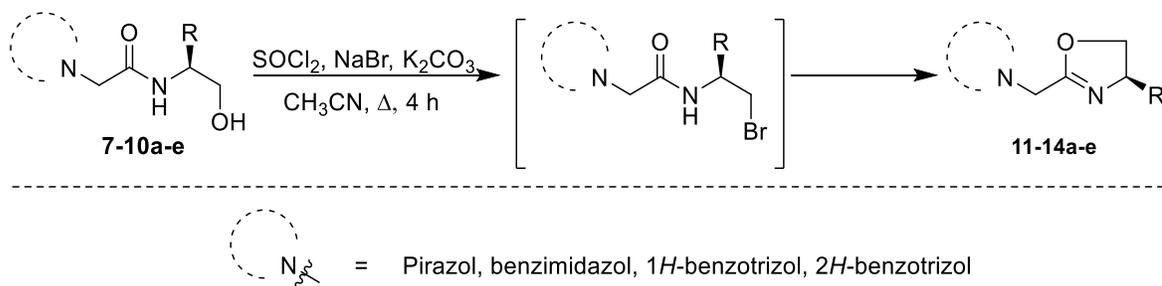
Dentro del grupo de investigación anteriormente se había llevado a cabo la preparación de 2-oxazolininas de manera convencional, según lo reportado por Ávalos-Alanís en 2017,¹⁶ partiendo de una amida α,β -insaturada, mediante condiciones de reflujo (Esquema 27).



*Numeración de acuerdo con el apartado II

Esquema 27. Ruta propuesta por Ávalos-Alanís.

Con base a lo anterior, se decidió utilizar esta metodología la cual consistía en hacer reaccionar bajo reflujo las correspondientes hidroxiamida, cloruro de tionilo, bromuro de sodio y carbonato de potasio, empleando como medio de reacción acetonitrilo (Esquema 28).

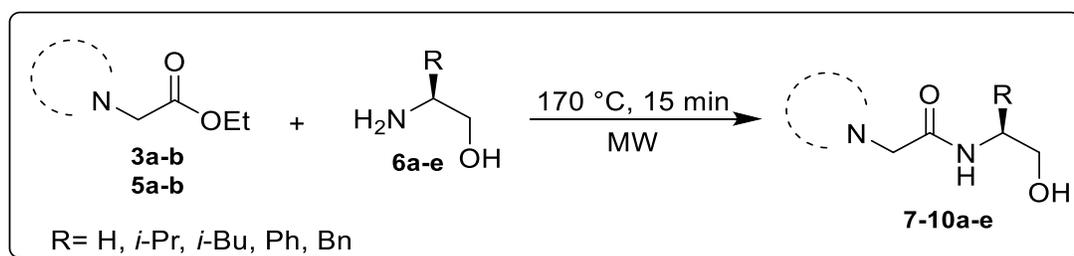


Esquema 28. Síntesis de azolil-oxazolininas, ruta 5.

Para cumplir con este objetivo, inicialmente fue necesario llevar a cabo la preparación de las hidroxiacetamidas **7-10a-e**.

5.1.8. HIDROXIACETAMIDAS

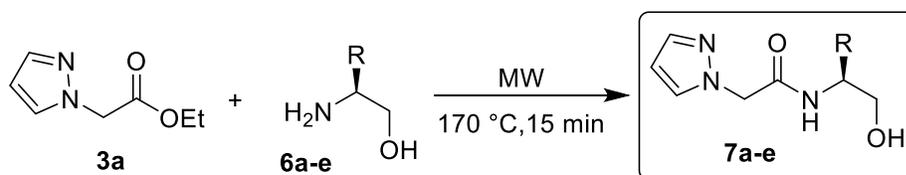
Para la preparación de las hidroxiacetamidas **7-10a-e** se utilizó la metodología que evita el uso de disolventes bajo irradiación de microondas a 170 °C por 15 min (Esquema 29).



Esquema 29. Síntesis de hidroxiacetamidas **7-10a-e**.

5.1.8.1. Síntesis de pirazolil-hidroxiacetamidas **7a-e**

Una vez que se obtuvo el éster de pirazol puro, éste se hizo reaccionar con distintos aminoalcoholes [etanolamina, (*S*)-valinol, (*S*)-leucinol, (*S*)-fenilalaninol y (*S*)-fenilglicinol] bajo el siguiente esquema de reacción (Esquema 30) ajustando los parámetros del microondas a una potencia de 100 watts en un sistema cerrado.



R= H, *i*-Pr, *i*-Bu, Ph

Esquema 30. Síntesis de pirazolil-hidroxiacetamidas **7a-e**.

El tiempo de reacción para la formación de los compuestos **7a-e** fue determinado empleando cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como referencia el azolil-éster y utilizando un sistema cromatográfico 1:1 AcOEt:MeOH para aquellas amidas formadas con etanolamina, (*S*)-valinol, (*S*)-leucinol, y (*S*)-fenilglicinol, mientras que para la hidroxiacetamida formada con (*S*)-fenilalaninol se empleó un sistema de disolventes 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH.

5.1.8.2. Purificación de los compuestos 7a-e

A la mezcla de cada una de las reacciones se le adicionaron 3 mL de etanol frío y éstos fueron enfriados a 0 °C por 20 min. Transcurrido el tiempo, el análisis por cromatografía en capa fina del crudo de reacción reveló la presencia del producto deseado además de la presencia de restos de aminoalcohol correspondiente utilizado en la reacción. Es importante mencionar que cada uno de los productos se obtuvo como sólido una vez que estos fueron retirados del reactor de microondas y alcanzaron la temperatura ambiente, razón por la cual fueron purificados mediante filtración y lavados con acetato de etilo frío hasta eliminar el aminoalcohol remanente y obtener como producto final un sólido blanco.

Cabe resaltar que para los compuestos **7a-c** y **7e** fue suficiente realizar lavados con acetato de etilo para obtener las hidroxiacetamidas puras, mientras que el compuesto **7d** fue sometido a purificación por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice a una altura de 25 cm y como fase móvil un sistema cromatográfico 5:4:1 acetato-hexano-metanol.

5.1.8.3. Rendimiento de los compuestos 7a-e

Cada una de las hidroxiacetamidas se obtuvo como sólido de color beige y blanco, los rendimientos y puntos de fusión de cada compuesto **7a-e** se resumen en la Tabla 11, cabe resaltar que dichos rendimientos fueron obtenidos empleando 2 Eq del correspondiente aminoalcohol.

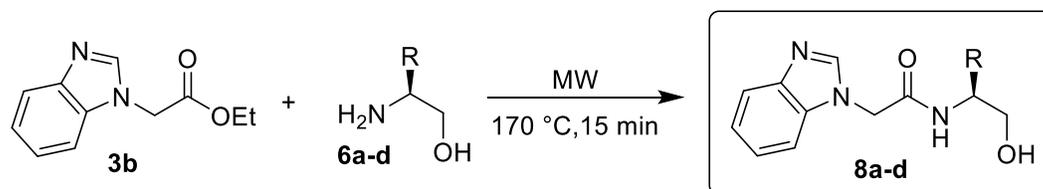
Tabla 11. Resultados obtenidos para los compuestos **7a-e**.

Compuesto	R	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (° C)
7a	H	62	Sólido blanco	108-110
7b	<i>i</i> -Pr	65	Sólido blanco	124-126
7c	<i>i</i> -Bu	52	Sólido blanco	85-88
7d	Ph	58	Sólido blanco	113-114
7e	Bn	98	Sólido beige	57-60

5.1.8.4. Síntesis de benzimidazolil-hidroxiacetamidas 8a-d

El éster de benzimidazol se hizo reaccionar con los diferentes aminoalcoholes [etanolamina, (*S*)-valinol, (*S*)-leucinol y (*S*)-fenilalaninol] en relación equivalente

1:2 con el objetivo de formar las hidroxiacetamidas **8a-d** bajo el siguiente esquema de reacción (Esquema 31).



R= H, *i*-Pr, *i*-Bu, Ph

Esquema 31. Síntesis de benzimidazolil-hidroxiacetamidas **8a-d**.

Aun cuando de manera general la ruta de síntesis original se llevó a cabo en condiciones libre de disolvente, la preparación de algunas hidroxiacetamidas **8b-d** requirió de una cantidad mínima de etanol; esto con el objetivo de evitar una reacción desfavorable en el microondas debido a que tanto el éster de benzimidazol como los aminoalcoholes, a excepción de la etanolamina, se encuentran en estado sólido. Los parámetros del microondas fueron ajustados a 100 watts en sistema cerrado, 170 °C y 15 minutos de reacción. Finalizado el tiempo, se identificó la formación del producto mediante cromatografía en capa fina empleando un sistema de disolventes 1:1 AcOEt:MeOH para la hidroxiacetamida **8b** mientras que para el resto de las amidas, el sistema cromatográfico empleado fue una mezcla 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH.

5.1.8.5. Purificación de los compuestos **8a-d**

El análisis por cromatografía en capa fina del crudo de reacción reveló la presencia del producto deseado además de la presencia de restos de

aminoalcohol correspondiente utilizado en la reacción. Es importante mencionar que cada uno de los productos se obtuvo como sólido una vez que estos fueron retirados del reactor de microondas y alcanzaron la temperatura ambiente, razón por la cual fueron purificados mediante filtración y lavados con acetato de etilo frío hasta eliminar el aminoalcohol remanente y obtener como producto final un sólido blanco.

5.1.8.6. Rendimiento de los compuestos 8a-d

En la Tabla 12 se muestran los rendimientos correspondientes a las hidroxiamidas, se puede observar que los rendimientos van desde un 70% hasta un 82%. Es importante resaltar que los rendimientos obtenidos para las amidas **8a-d** resultaron ser mejores que las correspondientes amidas **7a-d**.

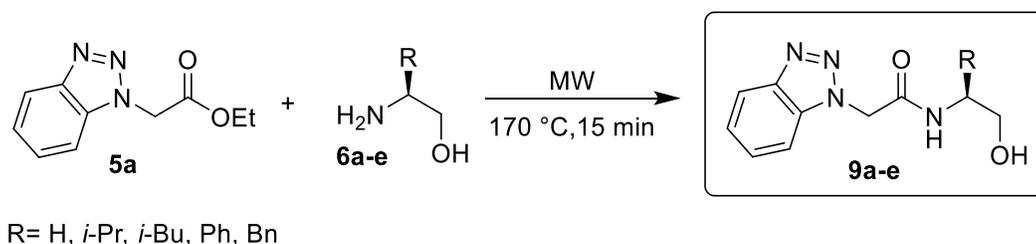
Tabla 12. Resultados obtenidos para los compuestos **8a-d**.

Compuesto	R	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (° C)
8a	H	70	Sólido blanco	208-210
8b	<i>i</i> -Pr	76	Sólido blanco	214-217
8c	<i>i</i> -Bu	82	Sólido blanco	185-187
8d	Ph	76	Sólido blanco	225-226

5.1.8.7. Síntesis de 1*H*-benzotrizolil-hidroxiamidas 9a-e

La reacción del 1*H*-benzotrizolil acetato de etilo con los distintos aminoalcoholes [etanamina, (*S*)-valinol, (*S*)-leucinol, (*S*)-fenilalaninol y (*S*)-fenilglicinol] se llevó a cabo bajo irradiación de microondas, ajustando los parámetros de potencia de

100 watts en un sistema cerrado, 170 °C y 15 minutos de reacción, empleando 1 mL de etanol como disolvente para que la reacción se llevara a cabo de manera eficiente debido a que la mayoría de las materias primas resultaron ser compuestos sólidos.



Esquema 32. Síntesis de 1*H*-benzotriazolil-hidroxiacetamidas **9a-e**.

El avance de la reacción fue monitoreada empleando cromatografía en capa fina, utilizando un sistema cromatográfico en proporción 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH y utilizando la materia prima (azolil-éster) como referencia. Es importante mencionar que cada uno de los productos se obtuvo como sólido blanco una vez que estos fueron retirados del reactor de microondas y alcanzaron la temperatura ambiente.

5.1.8.8. Purificación de los compuestos **9a-e**

El análisis por cromatografía en capa fina del crudo de reacción reveló la presencia del producto deseado además de la presencia de restos de aminoalcohol correspondiente utilizado en la reacción. Es importante mencionar que cada uno de los productos se obtuvo como sólido una vez que estos fueron retirados del reactor de microondas y alcanzaron la temperatura ambiente, razón

por la cual fueron purificados mediante filtración y lavados con acetato de etilo frío hasta eliminar el aminoalcohol remanente y obtener como producto final un sólido blanco.

5.1.8.9. Rendimiento de los compuestos 9a-e

Cada uno de los compuestos **9a-e** se obtuvieron con rendimientos químicos favorables que van desde un 75% para la hidroxiacetamida **9e** hasta un 93% para el compuesto **9a**, logrando así obtener los mejores rendimientos de las cuatro series de hidroxiacetamidas, tal como se puede observar en la Tabla 13, dónde además se muestran los puntos de fusión, los cuales fueron determinados para cada uno de los compuestos.

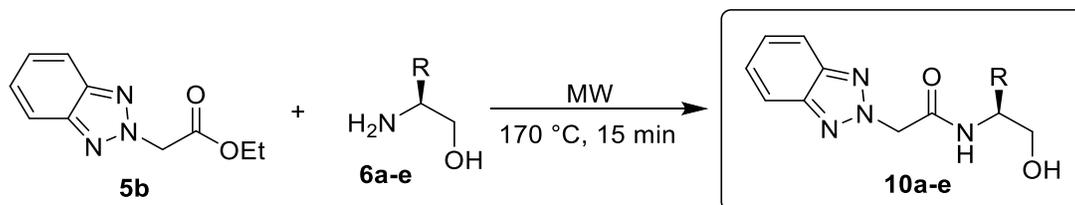
Tabla 13. Resultados obtenidos para los compuestos **9a-e**.

Compuesto	R	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (°C)
9a	H	93	Sólido blanco	187-190
9b	<i>i</i> -Pr	88	Sólido blanco	226-228
9c	<i>i</i> -Bu	92	Sólido blanco	150-154
9d	Ph	80	Sólido blanco	208-209
9e	Bn	75	Sólido blanco	221-224

5.1.8.10. Síntesis de 2*H*-benzotriazolil-hidroxiacetamidas 10a-e

La preparación de las hidroxiacetamidas **10a-e** se llevó a cabo mediante la reacción del 2*H*-benzotriazolil acetato de etilo con los diferentes aminoalcoholes

[etanolamina, (S)-valinol, (S)-leucinol, (S)-fenilalaninol y (S)-fenilglicinol], utilizando 1 mL de etanol como medio de reacción. Las condiciones de reacción se muestran en el Esquema 33, ajustándose los parámetros de potencia 100 watts en sistema cerrado, 170 °C y 15 min de reacción.



R= H, Ph, Bn, *i*-Pr, *i*-Bu

Esquema 33. Síntesis de 2H-benzotriazolil-hidroxiacetamidas **10a-e**.

Una vez pasado el tiempo de reacción, se comprobó la formación de producto mediante cromatografía en capa fina empleando un sistema de elución en proporción 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH.

5.1.8.11. Purificación de los compuestos **10a-e**

El análisis por cromatografía en capa fina del crudo de reacción reveló la presencia del producto deseado además de la presencia de restos de aminoalcohol correspondiente utilizado en la reacción. Es importante mencionar que cada uno de los productos se obtuvo como sólido, una vez que estos fueron retirados del reactor de microondas y alcanzaron la temperatura ambiente, razón por la cual fueron purificados mediante filtración y lavados con acetato de etilo

frío hasta eliminar el aminoalcohol remanente y obtener como producto final un sólido blanco.

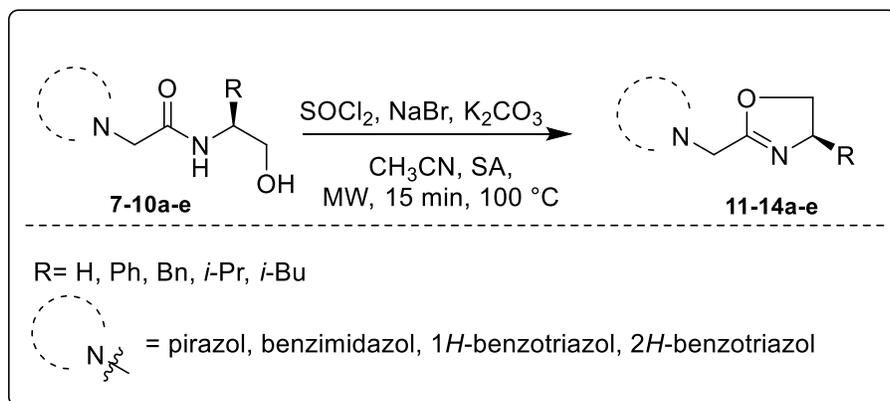
5.1.8.12. Rendimiento de los compuestos 10a-e

En la Tabla 14 se resumen los rendimientos químicos obtenidos para los compuestos **10a-e**, los cuales van de regulares a buenos con un 50% para el compuesto **10c** y un 94% para la hidroxiamida **10e**. Cada uno de los productos fue obtenido como sólido blanco, por lo que se presentan los respectivos puntos de fusión.

Tabla 14. Resultados obtenidos para los compuestos **10a-e**.

Compuesto	R	Rendimiento (%)	Apariencia	P.f. (°C)
10a	H	93	Sólido blanco	149-150
10b	<i>i</i> -Pr	75	Sólido blanco	166-169
10c	<i>i</i> -Bu	50	Sólido blanco	140-142
10d	Ph	66	Sólido blanco	110-112
10e	Bn	94	Sólido blanco	71-74

Una vez obtenida cada una de las hidroxiamidas, el siguiente paso consistió en encontrar las condiciones para preparar las azolil-oxazolinas, para lo cual se propuso un método de síntesis utilizando irradiación de microondas empleando un sistema abierto, esperando obtener las azolil-oxazolinas **11-14a-e** (Esquema 34).



Esquema 34. Síntesis de azolil-oxazolinas, **ruta 5.**

La reacción de cada una de las hidroxiacetamidas **7-10a-e** se llevó a cabo utilizando SOCl_2 , NaBr y K_2CO_3 , empleando acetonitrilo como disolvente. El tiempo de reacción fue definido realizando experimentos con intervalos de 3 min de reacción, hasta llegar a 15 min y mediante cromatografía en capa fina se observaron los cambios en la reacción; en el minuto 15 se había consumido la mayor cantidad de materia prima y no se observó incremento en la formación del producto de interés.

El sistema abierto empleado para la reacción en MW se estableció por la necesidad de liberar los vapores de ácido clorhídrico que se forma en cada una de las reacciones.

5.1.8.13. Síntesis de compuestos 11a-e

La reacción de la pirazolil-hidroxiacetamida **7a-e** bajo las condiciones anteriormente mencionadas, empleando microondas en un sistema abierto y ajustando los parámetros a una potencia de 50 watts y $100 \text{ }^\circ\text{C}$, se llevó a cabo. La reacción fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina utilizando

como referencia la hidroxiamida; se evaluaron diferentes sistemas de elución, para el compuesto **11a** se probó 9:1 AcOEt:Hex, 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH, 2:1, 8:2 y 3:1 AcOEt:MeOH siendo este último el que mostró una separación más eficiente, para los compuestos **11b** y **11c** se probó un sistema cromatográfico 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH y un sistema de disolventes en proporción 1:1 AcOEt:MeOH, este último de mayor eficiencia para el compuesto **11c**; sin embargo, para el compuesto **11b** ninguno de estos resultó eficiente, así que se modificó la polaridad y se preparó un sistema de elución 6:4 Hex:AcOEt mostrando una mayor eficiencia en la separación. Finalmente para los compuestos **11d** y **11e** se emplearon sistemas cromatográficos eficientes como 6:4:2 Hex:AcOEt:MeOH y 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH respectivamente (Figura 12).

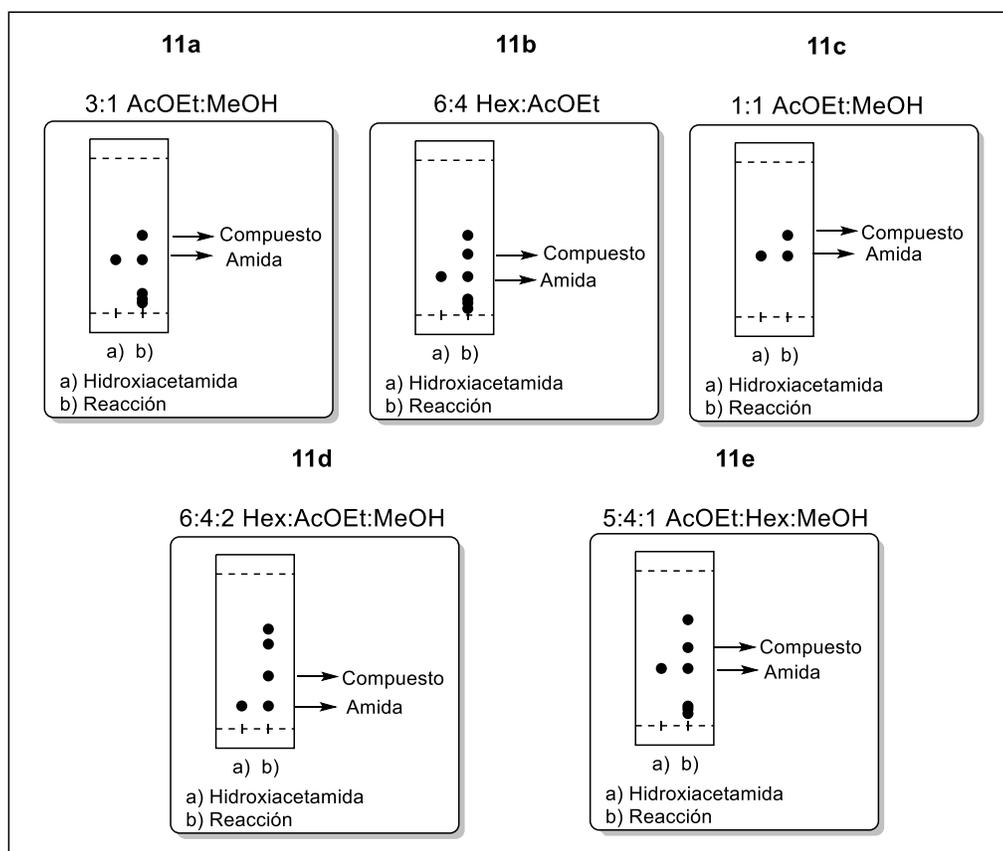


Figura 12. Cromatografía en capa fina para los compuestos **11a-e**.

5.1.8.14. Purificación de los compuestos 11a-e

El crudo de reacción de cada una de las reacciones fue purificado por cromatografía en columna. Como fase móvil se emplearon los sistemas descritos en la Figura 19 y de manera general se colectaron de 30-40 fracciones pequeñas, obteniéndose de 30-50 mg del compuesto de cada una de las reacciones, los cuales serían utilizados para su análisis y confirmar la obtención del producto deseado.

5.1.8.15. Síntesis de los compuestos 12a-d

La reacción de la benzimidazolil-hidroxiacetamidas **8a-e** bajo las condiciones anteriormente mencionadas, empleando un sistema abierto ajustando los parámetros de potencia de 50 watts y una temperatura de 100 °C se llevó a cabo.

La formación de un nuevo producto fue verificada mediante cromatografía en capa fina utilizando como referencia la benzimidazolil-hidroxiacetamida correspondiente, empleando un sistema de elución 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH para los distintos compuestos **12a-d**. La representación de las cromatografías en placa se puede observar en la Figura 13.

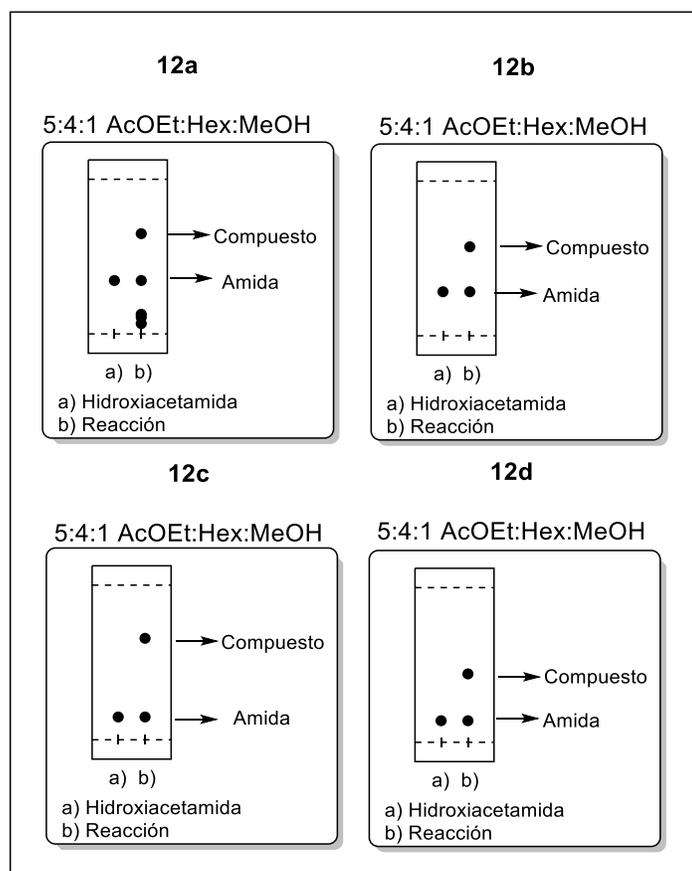


Figura 13. Cromatografía en capa fina para **12a**, **12b**, **12c** y **12d**.

5.1.8.16. Purificación de los compuestos 12a-d

El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna empleando un sistema 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH para todos los casos y se obtuvieron de 20 a 30 fracciones pequeñas, obteniéndose de 30-50 mg del compuesto de cada una de las reacciones, los cuales serían utilizados para su análisis y confirmar la obtención del producto deseado.

5.1.8.17. Síntesis de los compuestos 13a-e

La reacción de la 1*H*-benzotriazolil-hidroxiacetamida **9a-e** bajo las condiciones anteriormente mencionadas, empleando un sistema abierto ajustando los parámetros de potencia de 50 watts y una temperatura de 100 °C se llevó a cabo.

La formación de un nuevo producto fue verificada mediante cromatografía en capa fina utilizando como referencia la 1*H*-benzotriazolil-hidroxiacetamida correspondiente, empleando un sistema de elución 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH para la mayoría de los compuestos (**13a,b,d,e**) a excepción del compuesto **13c** donde el sistema cromatográfico más eficiente fue 6:4 AcOEt:Hex. La representación de las cromatografías en placa se puede observar en la Figura 14.

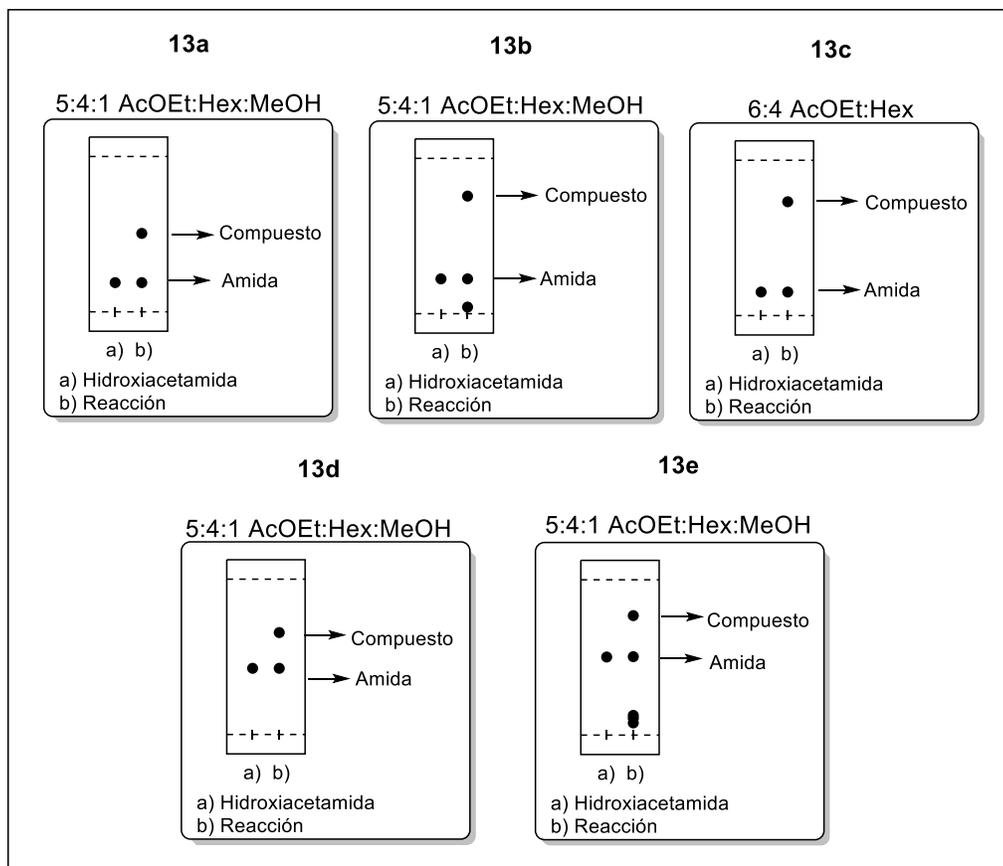


Figura 14. Cromatografía en capa fina para 13a, 13b, 13c, 13d y 13e.

5.1.8.18. Purificación de los compuestos 13a-e

El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna. Como fase móvil se emplearon diferentes sistemas de disolventes (Figura 14) y de manera general se obtuvieron de 30 a 35 fracciones pequeñas, obteniéndose de 30-50 mg del compuesto de cada una de las reacciones, los cuales serían utilizados para su análisis y confirmar la obtención del producto deseado.

5.1.8.19. Síntesis de los compuestos 14a-e

La reacción de la 2H-benzotriazolil-hidroxiacetamida 10a-e bajo las condiciones anteriormente mencionadas, empleando un sistema abierto

ajustando los parámetros de potencia de 50 watts y una temperatura de 100 °C se llevó a cabo.

La formación de un nuevo producto fue verificada mediante cromatografía en capa fina utilizando como referencia la 2-*H*-benzotriazolil-hidroxiacetamida correspondiente, empleando un sistema de elución 5:4:1 AcOEt:Hex:MeOH para la mayoría de los compuestos (**14a,b,d,e**) a excepción del compuesto **14c** donde el sistema de disolventes más eficiente fue 6:4 AcOEt:Hex. La representación de las cromatografías en placa se puede observar en la Figura 15.

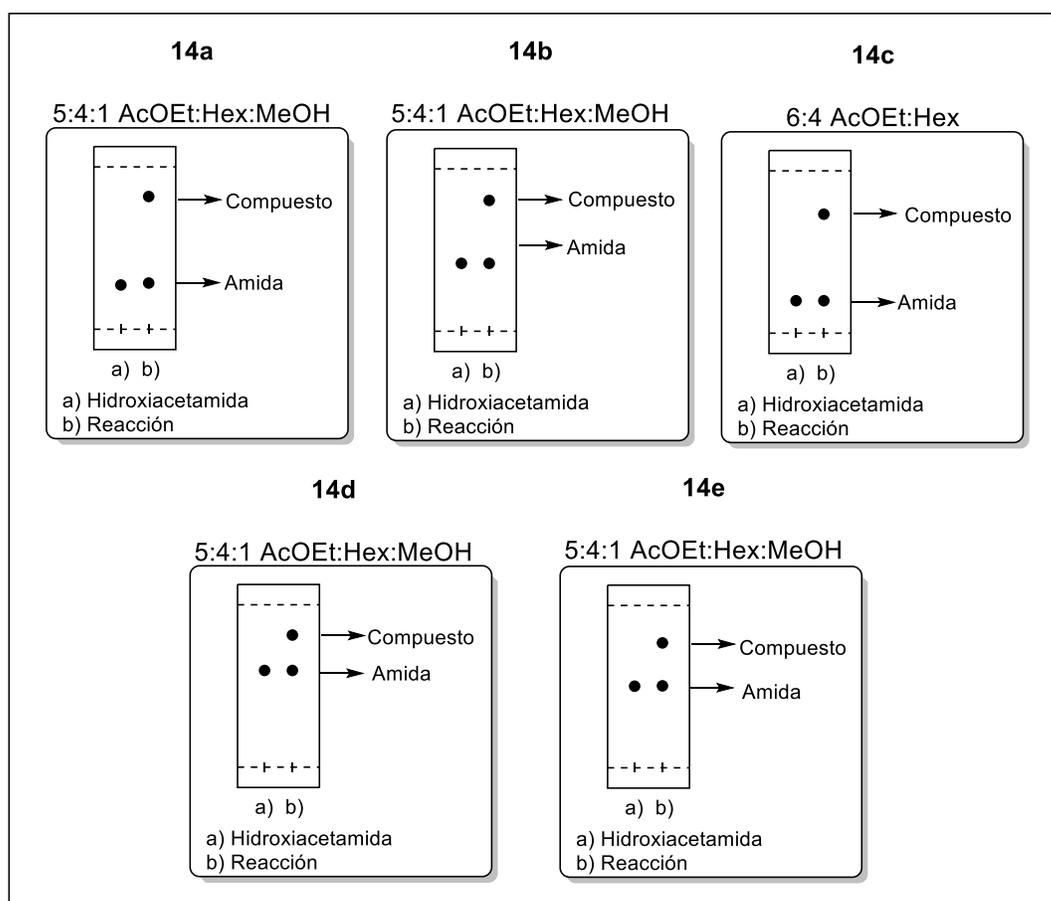


Figura 15. Cromatografía en capa fina para **14a**, **14b**, **14c**, **14d** y **14e**.

5.1.8.20. Purificación de los compuestos 14a-e

El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna empleando distintos sistemas de elución (Figura 15) y se obtuvieron de 35-40 fracciones pequeñas, obteniéndose de 30-50 mg de cada uno de los compuestos, los cuales serían utilizados para su análisis y confirmar la obtención del producto deseado.

5.1.8.21. Caracterización de los compuestos 11-14a-e

Se llevó a cabo el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Protón para cada uno de los compuestos y en la Figura 16 se muestra como ejemplo el espectro que se obtuvo para el compuesto **14a**.

La primera señal observada corresponde a dos multipletes que aparecen en un desplazamiento químico de 3.50 y 3.68 ppm (*A* y *B*), esta señal integra para dos protones correspondientes al metileno unido al N y al metileno unido al oxígeno. Alrededor de 5.5 ppm (*C*) aparece un singulete que integra para dos protones correspondientes al metileno que se encuentra entre el ciclo de oxazolina y el azol. Finalmente en la región de los aromáticos, en un desplazamiento de 7.45 y 7.95 ppm aparecen dos señales múltiples simétricas correspondientes a los protones presentes en el anillo aromático; sin embargo, en este espectro se pudo observar una señal adicional, un singulete ancho en un desplazamiento químico de 8.75 ppm el cual integra para un protón, lo que nos indica la presencia de un grupo NH en la estructura y por lo tanto la posible formación de un compuesto halogenado y no de una azolil-oxazolina.

Con la ayuda del software MestReNova³⁶ se realizó la simulación del espectro de RMN ¹H para un compuesto halogenado, donde se pudo identificar el singulete correspondiente al protón del NH, así como también los desplazamientos químicos para los multipletes que aparecen alrededor de 3.5 ppm, ya que para la oxazolina estos multipletes deberían aparecer uno en 1.5 ppm y el otro en 3.5 ppm, de acuerdo a la simulación realizada con este mismo software para la azolil-oxazolina, es de esperarse que el multiplete que integra para los protones del metileno unido al oxígeno aparezca desplazado a campos bajos en comparación con los protones del metileno unido al nitrógeno.

Para comprobar que se estaba llevando a cabo la formación de un compuesto halogenado se realizó un análisis por Espectrometría de Masas de baja resolución (Figura 17). El espectro de masas mostró la relación m/z del ion M en m/z 238, la cual fue comparada con la masa molecular calculada con el software ChemDraw Professional 15.0³⁷ para el compuesto halogenado con Cl (m/z 238.06). Además, los patrones de fragmentación observados en el cromatograma permiten proponer que el producto obtenido bajo esta metodología corresponde al compuesto halogenado.

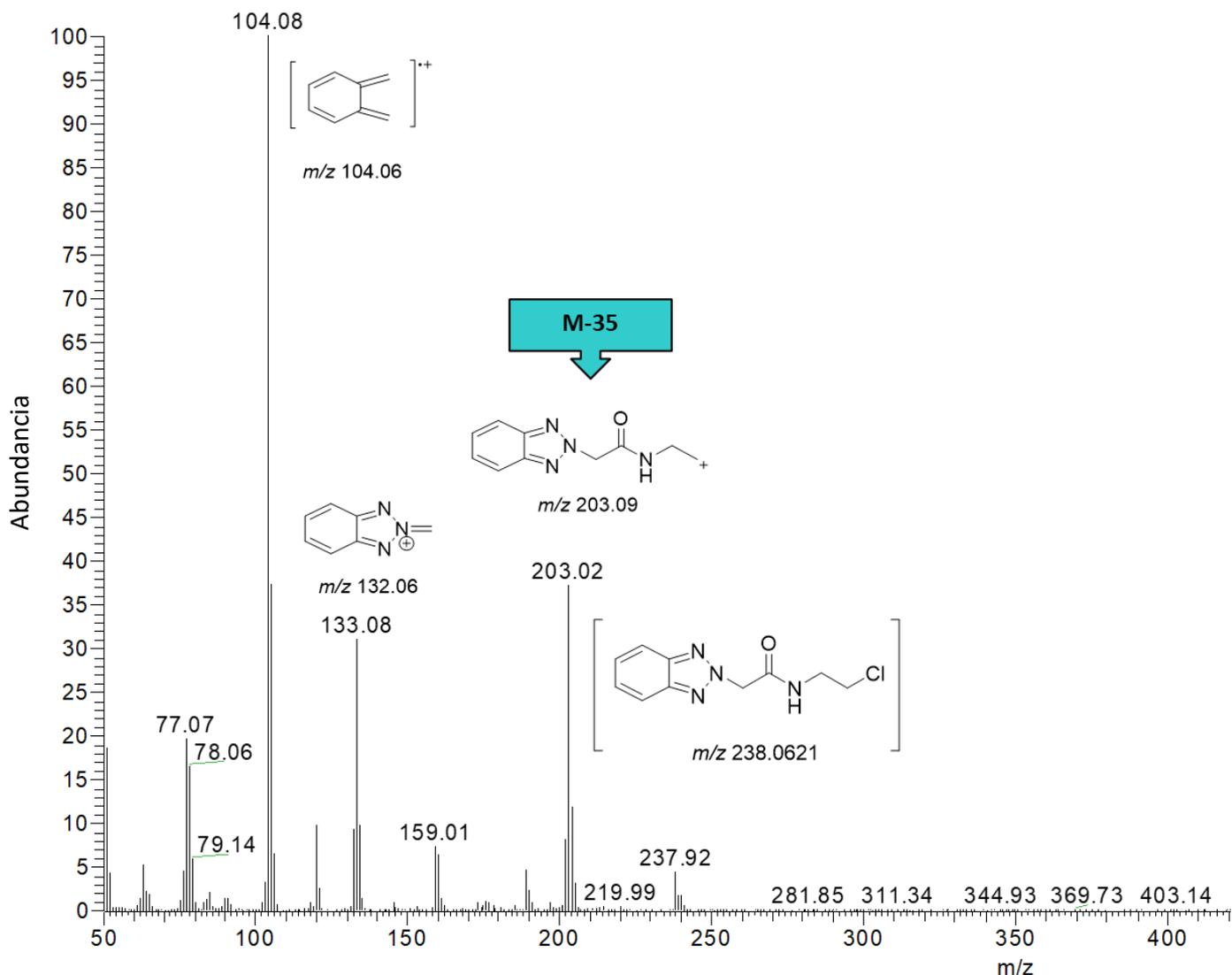


Figura 17. Espectro de masas de baja resolución para **14a**.

En un inicio se consideró la posibilidad de tener una mezcla del compuesto halogenado y la correspondiente azolil-oxazolinina debido a los patrones de fragmentación y relación m/z observados en el espectro de masas de baja resolución (Figura 17 y Figura 18). En el cromatograma se observa la relación masa carga (m/z) de 203.02 la cual puede ser atribuida al ion molecular $[M+H]$ de la correspondiente azolil-oxazolinina. No obstante, al analizar los patrones de

fragmentación de compuesto halogenado, se encontró un patrón que tiene la misma masa molecular que el correspondiente ion molecular de la azolil-oxazolina. Por lo tanto, los análisis de estos compuestos por RMN ^1H y espectrometría de masas pudieron demostrar que bajo estas condiciones de reacción no fue posible obtener las oxazolinas de interés.

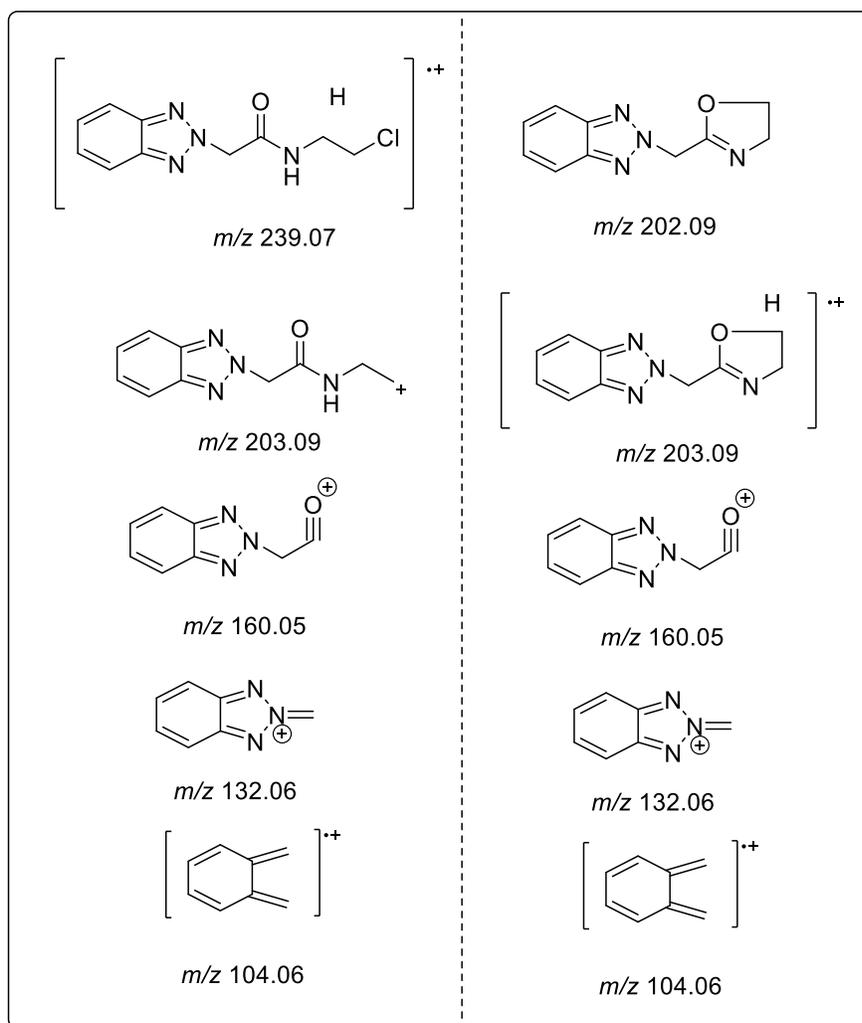
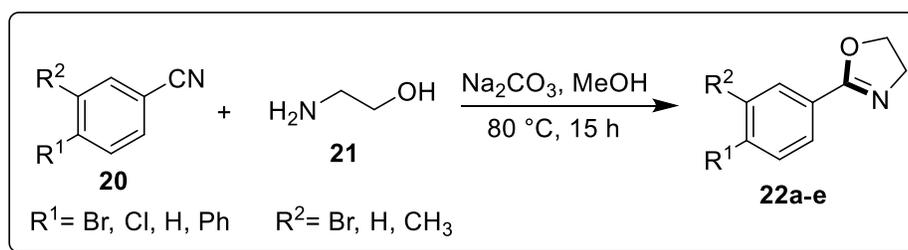


Figura 18. Patrones de fragmentación para **14a**.

5.1.9. AZOLIL-OXAZOLINAS RUTA 6

Debido a los resultados insatisfactorios obtenidos bajo la ruta 5 (Esquema 34), donde sólo se llegó a la formación del compuesto halogenado, se consultó en la literatura otra alternativa para llegar a la formación de oxazolininas y se encontró con lo reportado por Garg, P. *et al.*,¹⁹ en el 2014, (Esquema 35) donde proponen una ruta de síntesis para la preparación de heteroariloxazolininas a partir de nitrilos y aminoalcoholes.



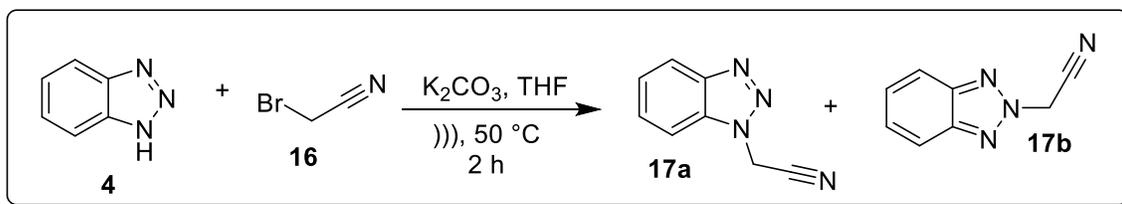
*Numeración de acuerdo con el apartado II

Esquema 35. Ruta de síntesis propuesta por Garg, P. *et al.*

Con base a lo reportado, se propuso una nueva ruta de síntesis que involucró primeramente la preparación de un benzotriazolilnitrilo y posteriormente la preparación de las oxazolininas.

5.1.10. AZOLIL-ACETONITRILOS 17a, 17a

La síntesis de los nitrilos se llevó a cabo de manera similar a la preparación de azolil-ésteres mediante la reacción de sustitución nucleofílica de orden dos entre el bromoacetnitrilo y el benzotriazol empleando carbonato de potasio (K_2CO_3) como base, THF como medio de reacción y ultrasonido como fuente de activación (Esquema 36).



Esquema 36. Síntesis de 1H- y 2H-benzotriazolil-acetonitrilos **17a** y **17b**

El avance de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina empleando un sistema de elución en proporción 2:1 Hex:AcOEt y se observó la formación de 2 productos esperados, 1H-benzotriazolil- y 2H-benzotriazolilacetonitrilo (Figura 19).

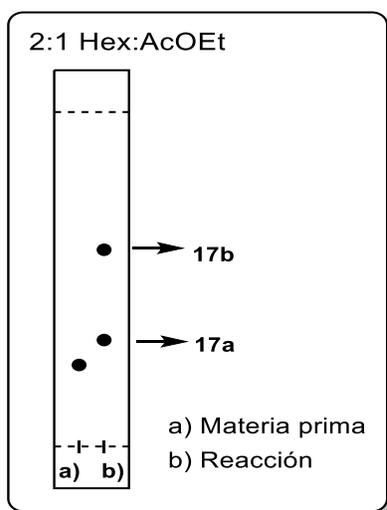


Figura 19. Cromatografía en capa fina para los compuestos **17a** y **17b**.

5.1.10.1. Purificación de los compuestos 17a-b

En el crudo de reacción se pudo identificar la formación de los dos isómeros el 1H y el 2H-benzotriazolil acetónitrilo como resultado del equilibrio tautomérico que presenta el benzotriazol.

Para llevar a cabo la separación de estos isómeros, el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice, una columna con un diámetro de 3 cm, la cual fue empacada a una altura de 50 cm y como fase móvil se utilizó un sistema de elución en proporción 2:1 Hex:AcOEt.

5.1.10.2. Rendimiento de los compuestos 17a-b

Después de la purificación se obtuvieron 3.97 g del 1*H*-benzotriazolil acetonitrilo y 1.38 g del 2*H*-benzotriazolil acetonitrilo, lo que equivale a tener rendimientos de 75 y 25% respectivamente. Cada uno de los productos presentó una apariencia sólida por lo que se obtuvieron los puntos de fusión para el compuesto **17a** (85-88 °C) y para el compuesto **17b** (78-80 °C).

5.1.10.3. Caracterización de los compuestos 17a-b

Una vez que los isómeros se encontraron separados y puros, se llevó a cabo el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C para los dos compuestos. El análisis de resonancia se llevó a cabo en un equipo de 400 MHz empleando como disolvente CD_3OD .

Como ejemplo se muestra el espectro de ^1H (Figura 20) para el compuesto **17a**, donde se presentan señales características del producto. La primera señal que aparece en el espectro es un singulete que se encuentra alrededor de 5.98 ppm, el cual integra para dos protones que corresponden al metileno presente en la estructura. En la región de los aromáticos, en 7.49 y 7.64 ppm se observan dos señales múltiples, las cuales integran para un protón cada una de ellas. En la

región de 7.85 y 8.04 ppm se observan dos señales más, con multiplicidad de doble, ambas con una constante de acoplamiento (J) de 8.2 Hz y que integran para los dos protones restantes del anillo aromático.

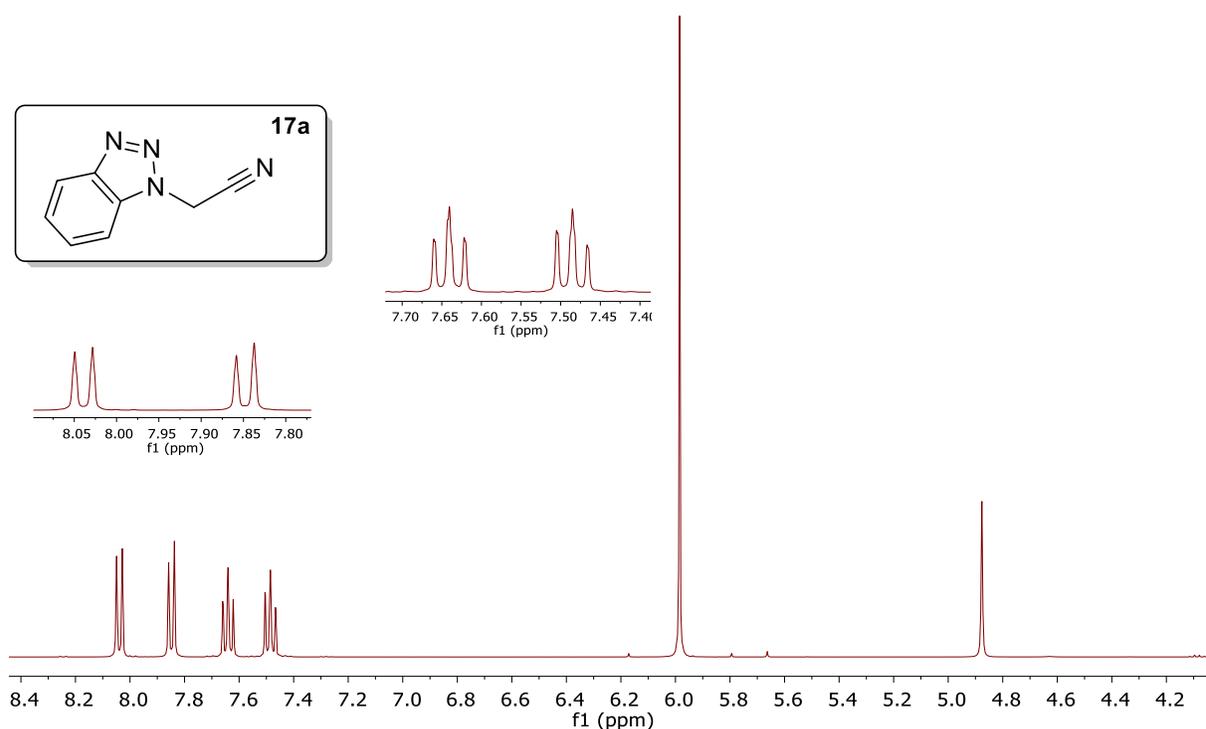


Figura 20. Espectro de RMN ^1H para **17a**.

Por otro lado, el espectro de ^{13}C (Figura 21) para este mismo compuesto, presenta las señales esperadas para los carbonos presentes en la estructura. Alrededor de 35 ppm se observa una señal correspondiente al metileno del único carbono alifático presente, por arriba de las 100 ppm se encuentran cuatro señales intensas correspondientes a los carbonos del anillo aromático, mientras

que en 113.5 ppm se encuentra la señal característica del carbono unido al nitrógeno y de 132-145 ppm se muestran las señales correspondientes a los carbonos ipso del anillo aromático.

En base a estos resultados se propone que el producto que se obtiene bajo esta ruta de síntesis es el esperado.

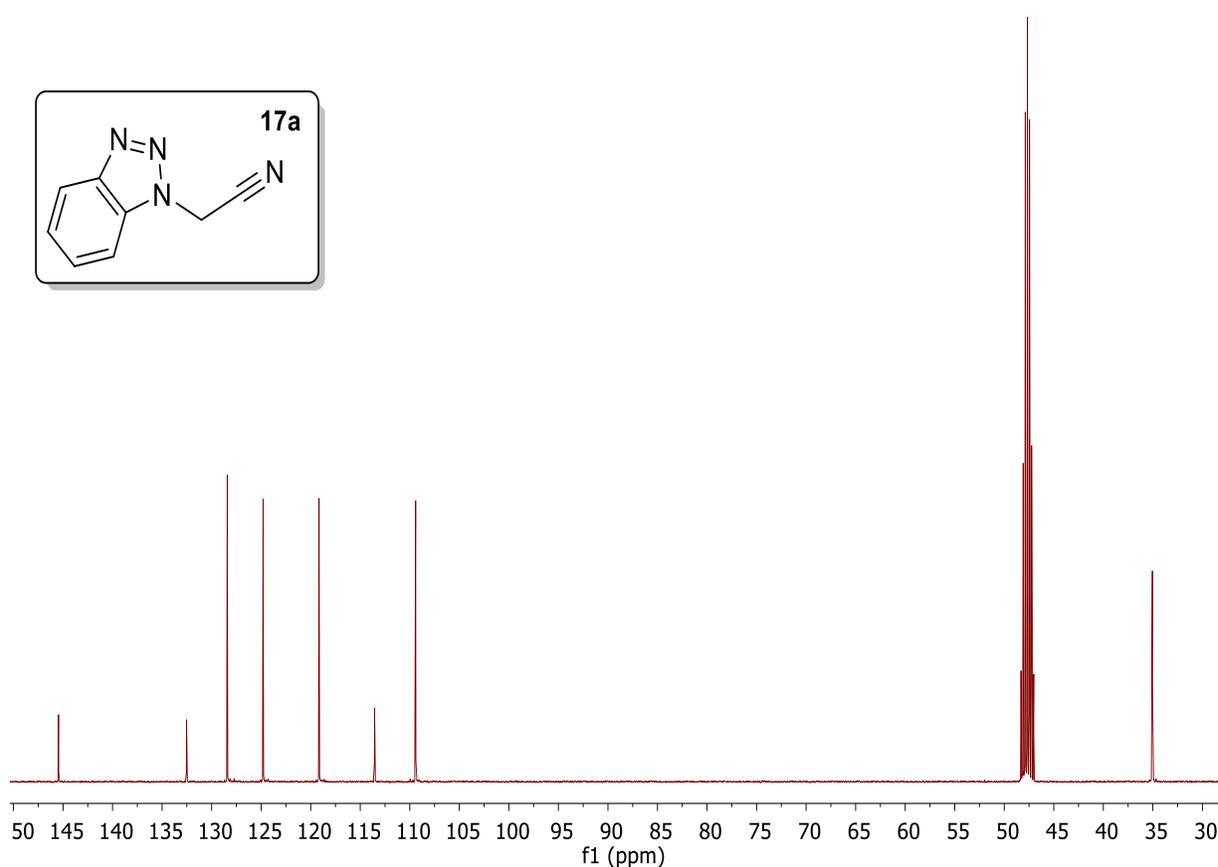
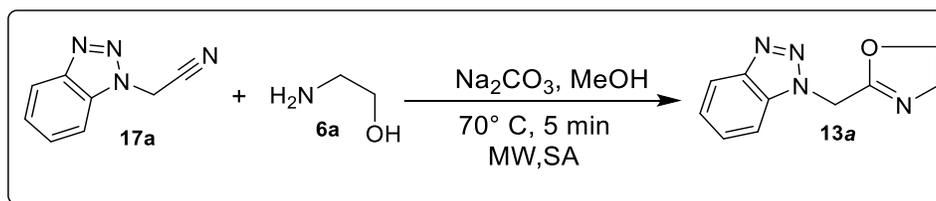


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C para **17a**.

Una vez que se obtuvieron los compuestos **17a** y **17b**, se propuso un método de síntesis (Esquema 37) con la finalidad de obtener azolil-oxazolininas de acuerdo con lo reportado por Garg, P. *et al.*¹⁹



Esquema 37. Síntesis del compuesto **13a**, ruta 6.

La reacción del 1H-benzotriazolil acetonitrilo con etanolamina, utilizando Na_2CO_3 y MeOH como medio de reacción, se llevó a cabo utilizando irradiación por microondas en un sistema abierto, empleando una potencia de 50 watts, una temperatura de 70°C y un tiempo de reacción de 5 min. El avance de la reacción se llevó a cabo por cromatografía en capa fina empleando un sistema de elución en proporción 2:1 AcOEt:Hex, utilizando como referencia la materia prima y la correspondiente hidroxiacetamida (Figura 22).

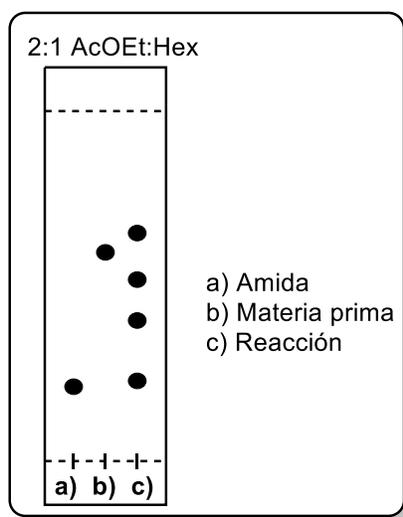


Figura 22. Cromatografía en capa fina para el compuesto **13a**.

En la cromatografía en capa fina se pudo observar la aparición de cuatro manchas, lo que indicó la formación de varios productos, incluyendo el producto correspondiente a la hidroxiacetamida. Finalmente el crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla de disolventes en proporción 2:1 AcOEt:Hex. De la purificación se obtuvieron 40 fracciones, lográndose aislar uno de los productos. El análisis de este compuesto por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H permitió proponer que el producto obtenido bajo estas condiciones corresponde a una acetamida (Figura 23) y no una azolil-oxazolina, ya que en aproximadamente 5.9 ppm aparece un singulete el cual integra para dos protones correspondientes al único metileno presente en la estructura de la 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)acetamida **13a**, mientras que para indicar la formación de la oxazolina se esperarían dos señales multipletes adicionales alrededor de 1.5 y 3.5 ppm. Por otro

lado, por arriba de las 7 ppm se muestran las señales múltiples correspondientes a los hidrógenos del grupo amida y del anillo aromático.

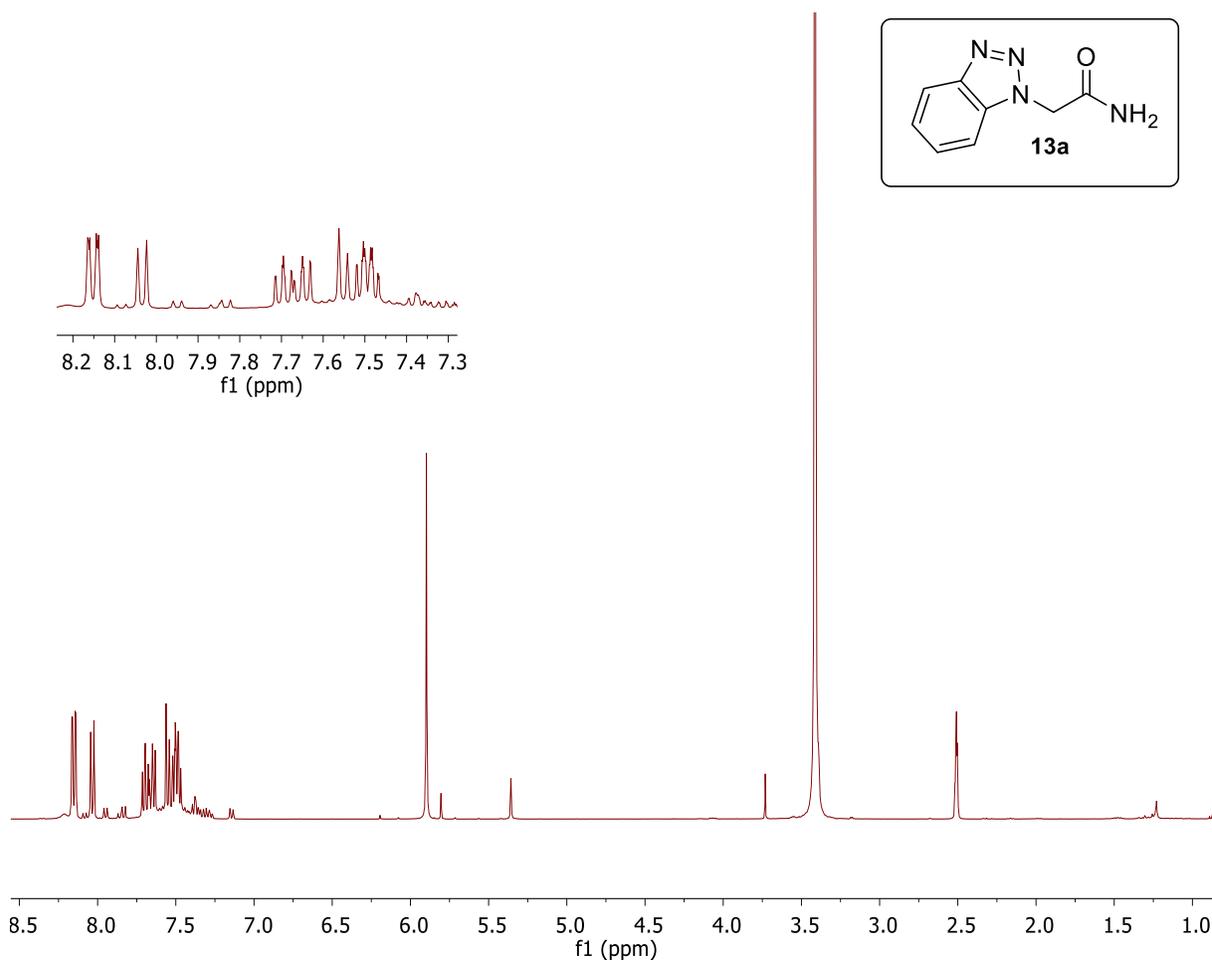
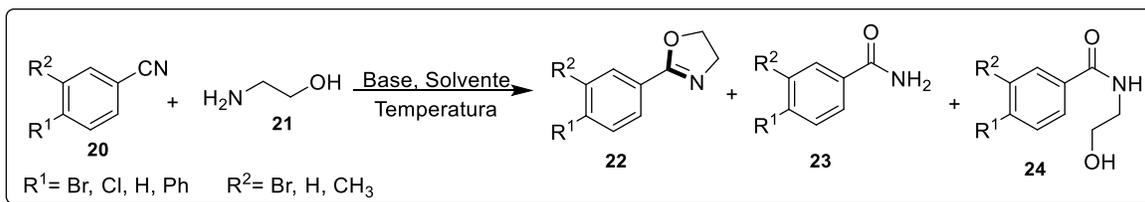


Figura 23. Espectro de RMN ^1H para **13a**.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos en este análisis y a lo descrito por Garg, P. *et al.*,¹⁹ quienes describieron que llevar a cabo esta ruta de síntesis bajo condiciones normales y sin emplear una atmósfera de nitrógeno propicia la formación de intermediarios como los que se muestran en el Esquema 38. Por lo tanto, se concluye que los compuestos obtenidos bajo la ruta propuesta fueron la

hidroxiacetamida **9a** y la acetamida **13a**, además de otros productos que no fueron identificados, y en consecuencia no lográndose la preparación de las oxazolinas por este método.



Esquema 38. Ruta descrita para preparación de oxazolinas, hidroxiacetamidas y acetamidas.

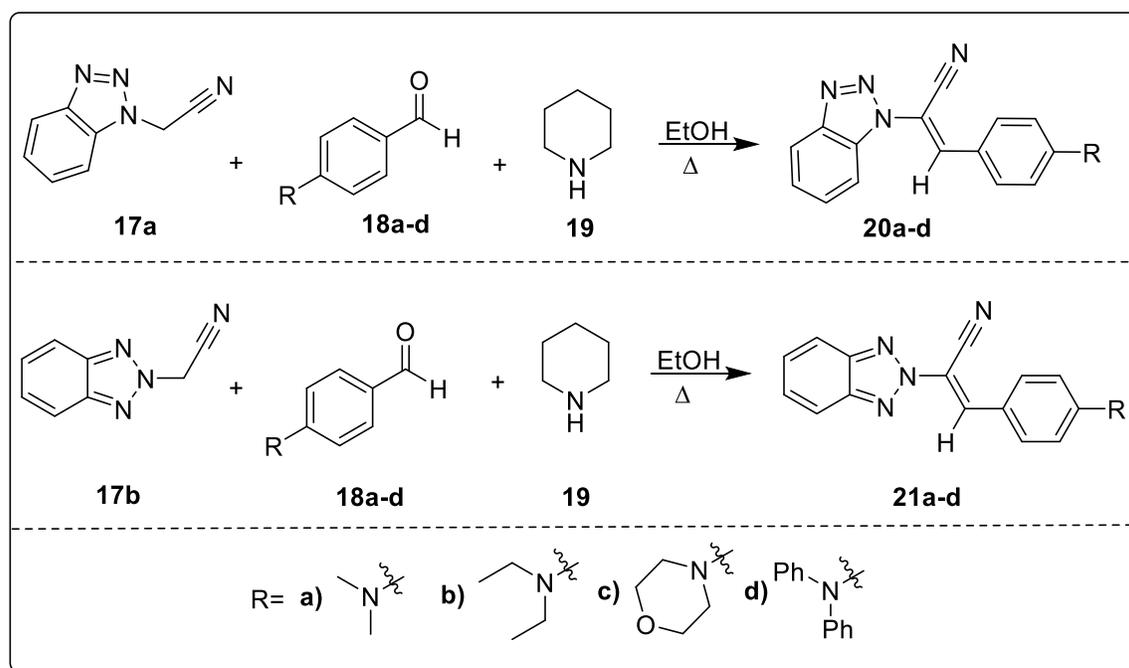
Después de haber llevado a cabo las diferentes rutas de síntesis con el objetivo de llegar a la formación de azolil-oxazolinas y no haber obtenido resultados favorables, se realizó una revisión bibliográfica para encontrar algún reporte acerca de otro tipo de compuestos que incorporen en su estructura el anillo de benzotriazol y que estos presenten actividad anti-cáncer.

5.1.11. ARIL-ACRILONITRILOS

Con base en lo descrito en los antecedentes por A. Carta *et al.*,³² en el 2011 y por M.S. Alam *et al.*,³³ en el 2013 acerca de la actividad biológica que presentan aquellos compuestos que involucran en su estructura grupos nitrilo α,β -insaturados y anillos de benzotriazol, surge el interés por llevar a cabo la preparación de benzotriazolil-acrilonitrilos de una manera más rápida y eficiente.

Con el objetivo de preparar ocho nuevos benzotriazolil-acrilonitrilos, se propuso una ruta de síntesis bajo condiciones convencionales (agitación y calentamiento),

con tiempos de reacción de 1-2 h. Por lo tanto, se llevó a cabo la reacción de los isómeros del benzotriazolil acetonitrilo **17a** y **17b** (preparados anteriormente) con los diferentes aldehídos [4-(dimetilamino)benzaldehído, 4-(dietilamino)benzaldehído, 4-(piperidin-1-il)benzaldehído y 4-(difenilamino)benzaldehído], en presencia de piperidina y empleando EtOH como disolvente (Esquema 39).



Esquema 39. Ruta de síntesis para la preparación de benzotriazolil-acrilonitrilos **20-21a-d**.

5.1.11.1. Síntesis de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil) acrilonitrilo **20a**

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17a** con 4-(dimetilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min, proporcionó el compuesto **20a**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al

vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.65 g, 45%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

5.1.11.2. Síntesis de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dietilamino)fenil) acrilonitrilo 20b

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17a** con 4-(dietilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min, proporcionó el compuesto **20b**. El producto obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna empleando como fase móvil un sistema cromatográfico 9:1 Hex:AcOEt obteniéndose como un líquido naranja (0.46 g, 42%).

5.1.11.3. Síntesis de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 20c

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17a** con 4-(piperidin-1-il)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min, proporcionó el compuesto **20c**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.37 g, 60%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

5.1.11.4. Síntesis de (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo 20d

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17a** con 4-(difenilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min,

proporcionó el compuesto **20d**. El producto formado fue purificado mediante cromatografía en columna empleando como fase móvil un sistema de disolventes 9:1 Hex:AcOEt obteniéndose como un sólido amarillo (0.66 g, 44%).

5.1.11.5. Síntesis de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil) acrilonitrilo 21a

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17b** con 4-(dimetilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 120 min, proporcionó el compuesto **21a**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.85 g, 78%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

5.1.11.6. Síntesis de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil) acrilonitrilo 21b

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17b** con 4-(dietilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 120 min, proporcionó el compuesto **21b**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.10 g, 34%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

5.1.11.7. Síntesis de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil) acrilonitrilo 21c

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17b** con 4-(piperidin-1-il)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min,

proporcionó el compuesto **21c**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.42 g, 67%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

5.1.11.8. Síntesis de (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo **21d**

La reacción del benzotriazolil-acetonitrilo **17b** con 4-(difenilamino)benzaldehído bajo las condiciones establecidas, agitación constante y reflujo por 60 min, proporcionó el compuesto **21d**. El sólido formado al finalizar la reacción se filtró al vacío y se lavó con EtOH, obteniéndose un sólido naranja (0.33 g, 43%) totalmente puro sin la necesidad de emplear la cromatografía en columna.

Finalmente, la caracterización estructural de los compuestos **20a-d** y **21a-d** se llevó a cabo utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas de alta resolución. A manera de ejemplo se describe la caracterización estructural únicamente para los compuestos **20a** y **21a**.

5.1.11.9. Caracterización del compuesto **20a**

En el espectro de RMN ^1H (Figura 24), se observan las señales características de la estructura esperada, en 3.10 ppm aparece un singulete intenso (s) que integra para seis protones que corresponden a los protones químicamente equivalentes de los dos metilos presentes en la estructura; alrededor de 6.74 aparece un doblete con una $J=9.0$ Hz e integra para dos de los protones aromáticos, en 7.42-7.47 ppm aparece un multiplete que integra para un protón del anillo aromático. En un

desplazamiento químico de 7.56-7.61 ppm se aprecian un multiplete que integra para uno de los protones del anillo aromático del benzotriazol; en 7.66 ppm se aprecia una señal simple que integra para el protón vinílico, finalmente, a un desplazamiento químico de 7.84, 7.86 y 8.12 ppm aparecen tres señales dobles (d) con una constante de acoplamiento $J=8.3, 9.0, 8.4$ Hz respectivamente que integran para cuatro protones aromáticos.

Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 25), en 40.1 ppm se observa la señal correspondiente a los dos carbonos de los metilos, en 99.5 ppm aparece una señal que pertenece al carbono del nitrilo. A un desplazamiento químico de 111.8 y 132.1 ppm aparecen dos señales que corresponden a cuatro carbonos del anillo aromático *p*-sustituido. En la misma región de los aromáticos se observan cuatro señales en 110.4, 124.8, 128.7, 143.0 ppm que corresponden a cuatro carbonos del anillo aromático del benzotriazol. Alrededor de 117.7 y 120.5 ppm aparecen dos señales que corresponden a los carbonos de la insaturación $\text{C}=\text{C}$; en 132.3 y 146.2 ppm se aprecian dos señales correspondientes a los carbonos ipso del anillo aromático de benzotriazol. Finalmente, en 115.6 y 152.8 ppm se observan dos señales que pertenecen a los carbonos en posición *para* del anillo aromático.

Para confirmar la estructura del compuesto **20a**, se llevó a cabo el análisis por espectrometría de masas de alta resolución donde se obtuvieron los siguientes datos. Se observó el ion cuya relación masa carga (m/z) fue de 291.14083 correspondiente a la masa exacta ($M+H$) del compuesto deseado ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_5$). En base a esto se establece que el compuesto preparado bajo esta metodología es el (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil) acrilonitrilo.

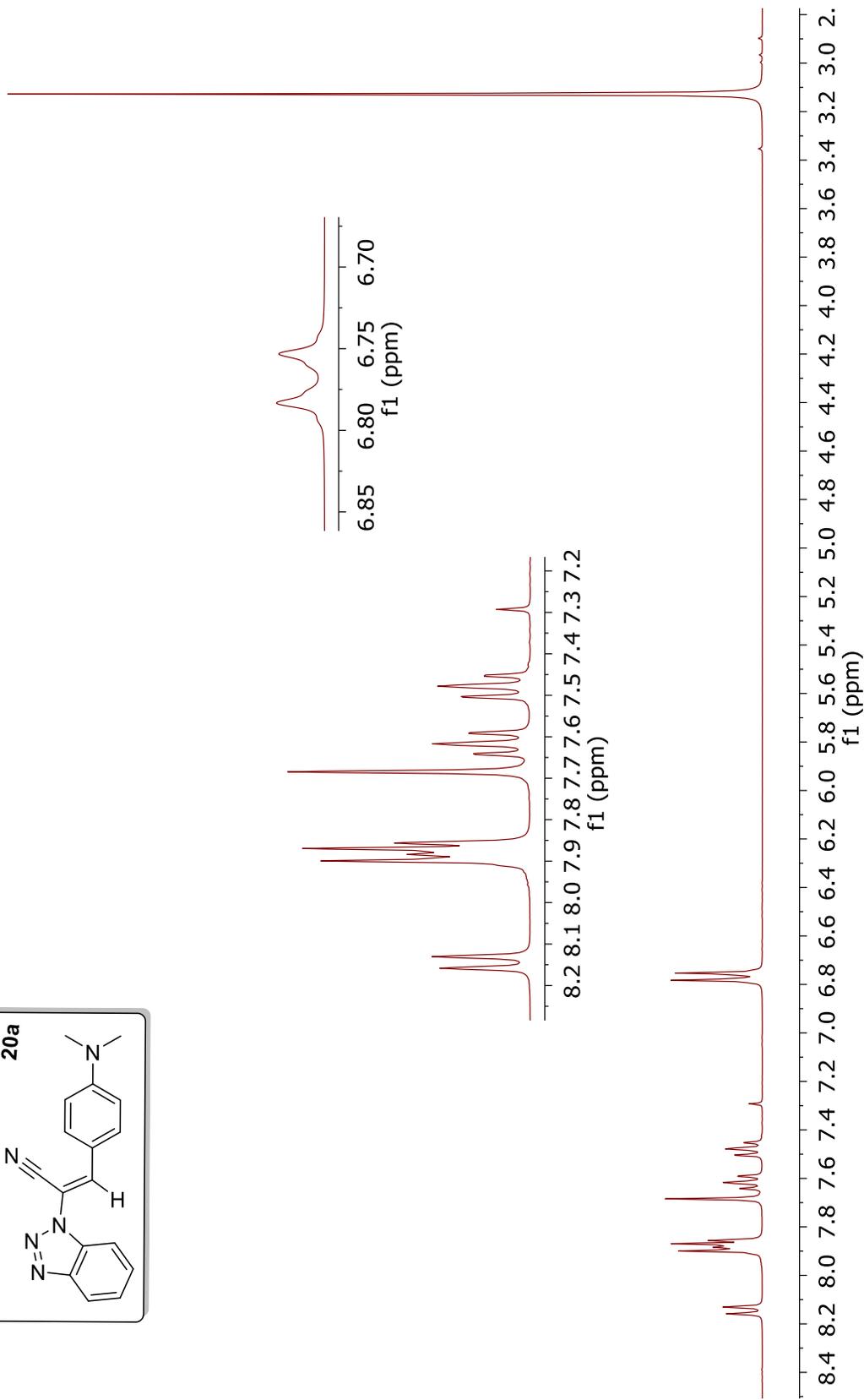
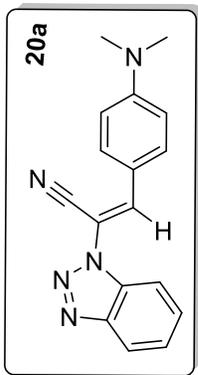


Figura 24. Espectro de RMN ^1H para **20a**.

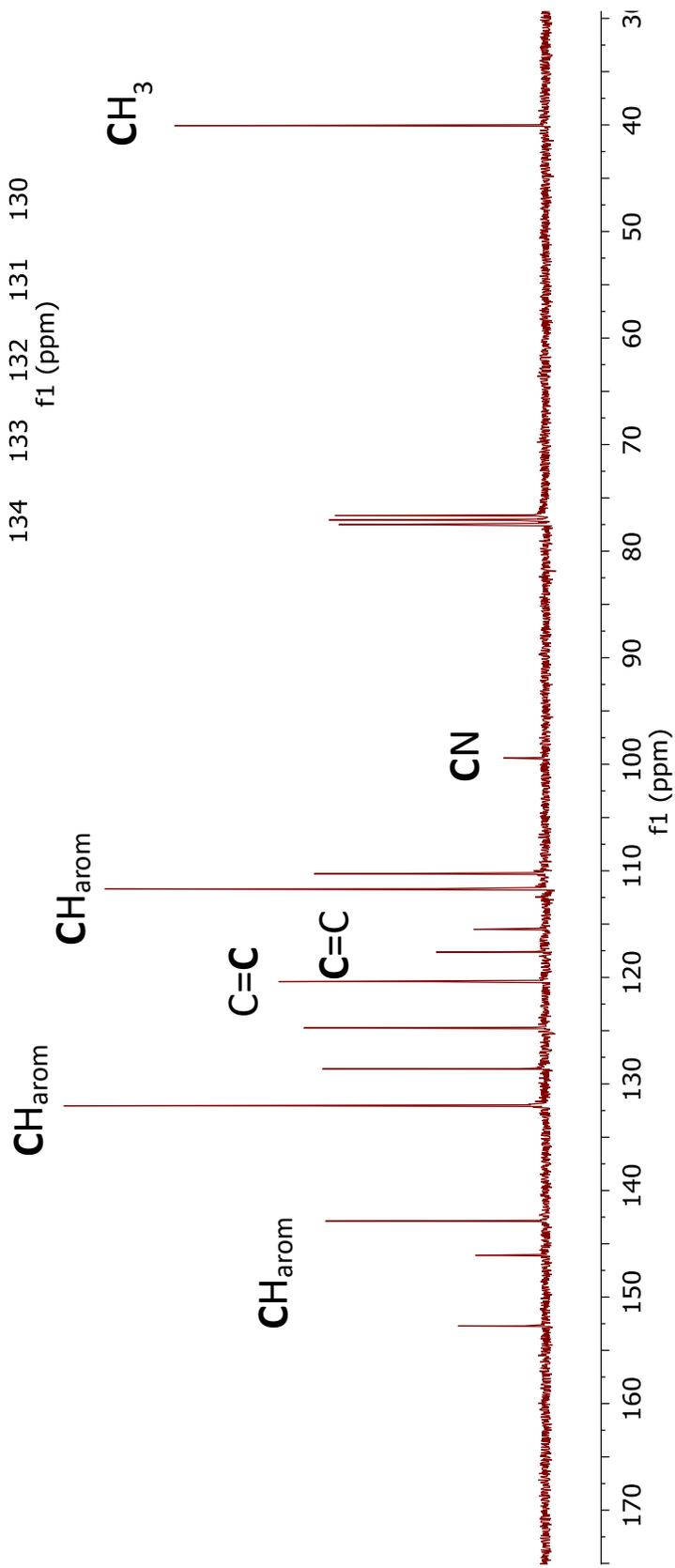
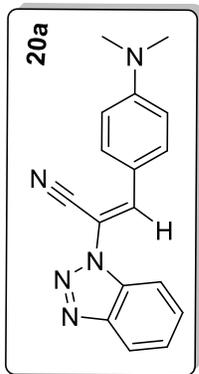


Figura 25. Espectro de RMN ¹³C para **20a**.

5.1.11.10. Caracterización del compuesto 21a

En el espectro de RMN ^1H (Figura 26), se observan las señales características de la estructura esperada, en 3.09 ppm aparece un singulete (s) que integra para seis protones que corresponden a los protones químicamente equivalentes de los dos metilos presentes en la estructura; alrededor de 6.73 ppm aparece una señal doble con una $J=9.1$ Hz que integra para dos protones pertenecientes a los protones del anillo aromático *p*-sustituido. En un desplazamiento químico de 7.40-7.43 ppm se aprecia un multiplete que integra para dos protones presentes en el anillo de benzotriazol. Por otro lado, en un desplazamiento de 7.88-7.93 ppm aparecen dos señales múltiples empalmadas las cuales integran para cuatro protones cada una, dos corresponden a protones del anillo aromático *p*-sustituido y otros dos a los protones que pertenecen al anillo de benzotriazol. Finalmente, en un desplazamiento químico de 8.36 ppm se observa una señal simple que integra para un protón que corresponde al metino de la insaturación $\text{C}=\text{CH}$.

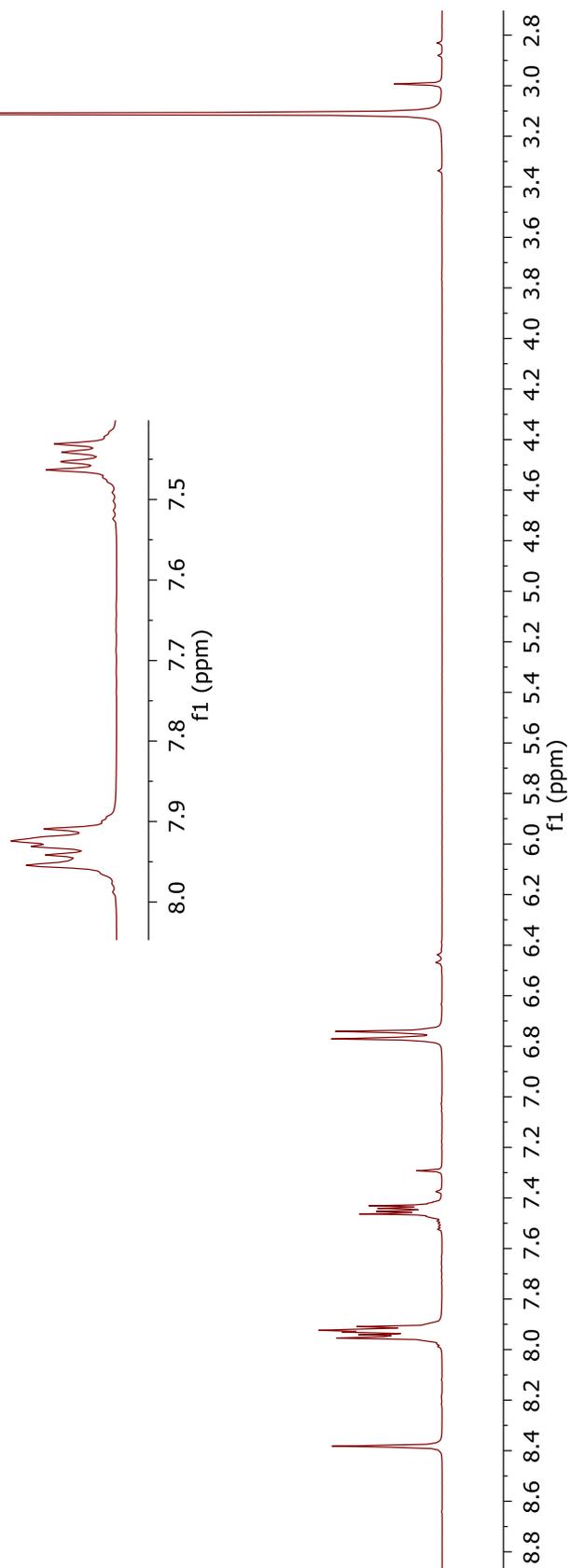
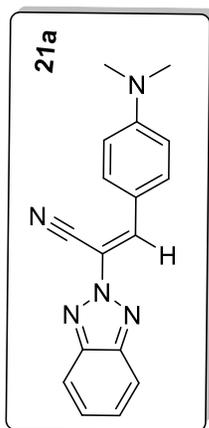


Figura 26. Espectro de RMN ^1H para **21a**.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 27), la primera señal se observó en 40.2 ppm y corresponde a los dos carbonos de los metilos, en 106.4 ppm aparece una señal que pertenece al carbono del nitrilo, mientras que a un desplazamiento químico de 114.9 ppm se observa una señal correspondiente a los carbonos de la insaturación C=C. Alrededor de 111.9 y 132.5 ppm aparecen dos señales que corresponden a cuatro carbonos del anillo aromático. En la misma región de los aromáticos se observan dos señales en 118.1 y 127.5 ppm que corresponden a cuatro carbonos del anillo aromático del benzotriazol. En 138.1 y 144.8 ppm se aprecian dos señales que corresponden a los carbonos ipso del anillo aromático de benzotriazol. Finalmente, en 117.6 y 152.7 ppm se observan dos señales que pertenecen a los carbonos en posición *para* del anillo aromático.

Los resultados del análisis de espectrometría de masas de alta resolución confirmaron la formación del (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **21a**, ya que se identificó la relación masa carga (m/z) del ion M+H en 290.13784 correspondiente a la masa exacta (M⁺H) de este compuesto (C₁₇H₁₆N₅).

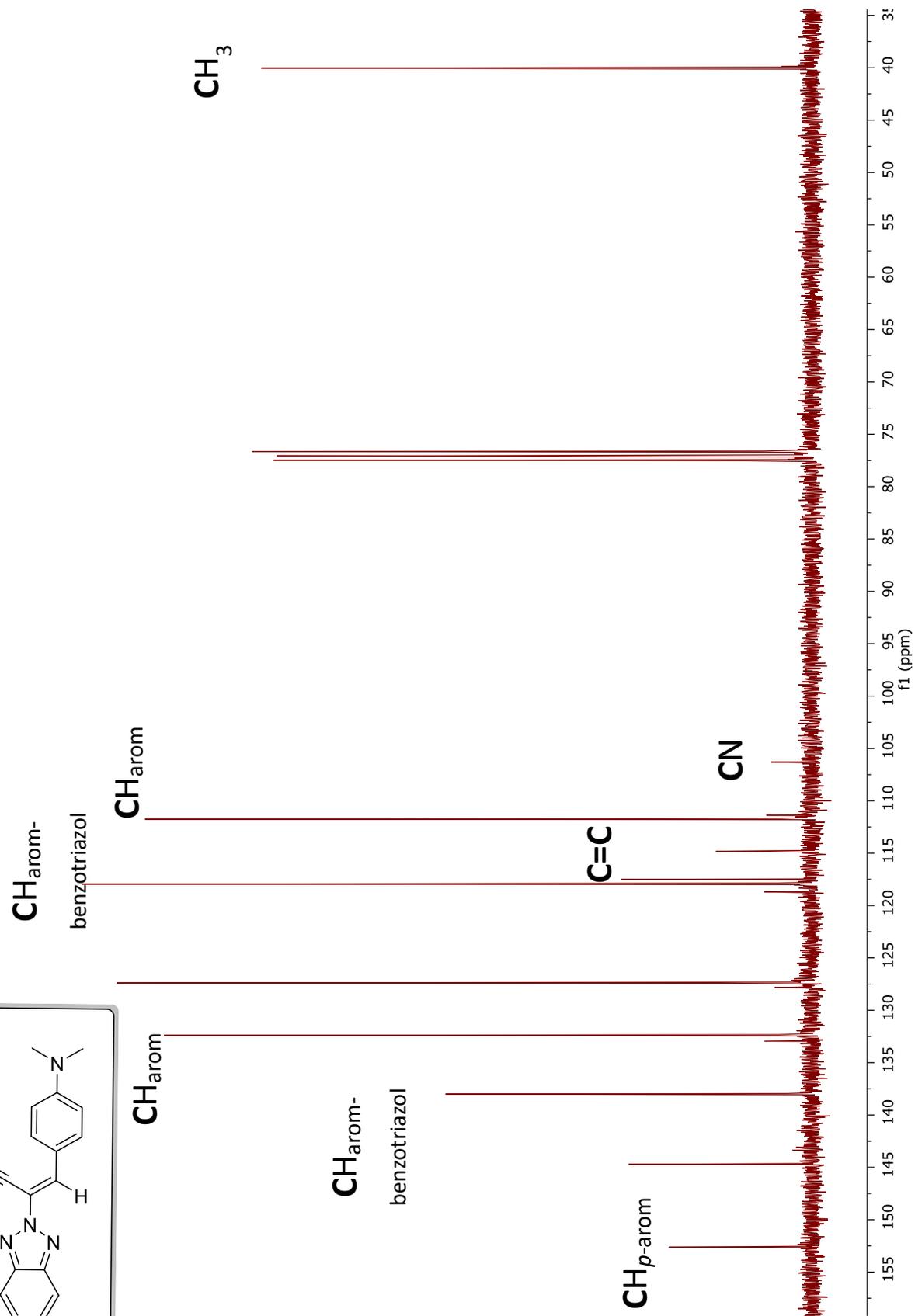
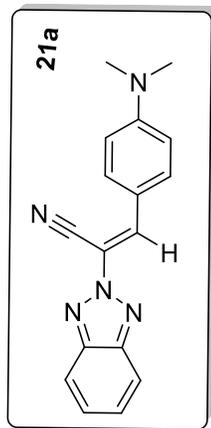


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C para 21a.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Con base en los resultados de síntesis obtenidos, (19 hidroxiacetamidas, cuatro ácidos carboxílicos, una amida primaria y ocho aril-acrilonitrilos) el siguiente paso consistió en evaluar cuál de todos estos compuestos podrían ser los candidatos más óptimos para estudiar su actividad anti-cáncer con base a lo descrito en la literatura.

De acuerdo con lo reportado por Karthikeyan *et. al.*,³⁸ en el 2013 al evaluar una serie de ácidos carboxílicos derivados del benzimidazol en líneas celulares de cáncer de mama, encontraron que estos compuestos presentaron poca actividad biológica en comparación con el cisplatino; en esta investigación se resalta que el bajo perfil anti-cáncer de este tipo de ácidos puede deberse a la ionización del ácido carboxílico libre a un anión carboxilato, que le impide la permeabilidad celular en condiciones acuosas. Este fenómeno también fue reportado por Gowda *et. al.*,³⁹ en el 2009; sin embargo, este último autor sugirió que para erradicar este problema es necesario llevar a cabo la transformación del ácido carboxílico a un éster.

En la investigación llevada a cabo por Karthikeyan *et. al.*,³⁸ también se realizó la esterificación de los ácidos carboxílicos sintetizados y al ser evaluados en las mismas líneas celulares, se reportaron mejores resultados que para la mayoría de los ácidos carboxílicos inicialmente expuestos a las líneas cancerosas.

Por otro lado, dentro del grupo de investigación, en el 2016 se llevó a cabo la síntesis y evaluación citotóxica y anti-cáncer de β -hidroxiacetamidas por Cruz *et. al.*,⁴⁰ las hidroxiacetamidas integraban en su estructura anillos de distintos azoles (imidazol, pirazol, benzimidazol y benzotriazol) y al mismo tiempo distintos

sustituyentes y fueron evaluadas sobre las líneas celulares cancerosas SiHa y HT-29; sin embargo, para la línea celular SiHa estos compuestos no presentaron actividad biológica relevante dado que los porcentajes de viabilidad reportados fueron superiores al 83% y para la línea celular HT-29 solo tres compuestos presentaron actividad anticancerígena, no obstante, no redujeron la viabilidad celular al 50%. Esto sugiere que este tipo de compuestos no se consideran potencialmente activos.

En base a los resultados obtenidos de la síntesis y a lo reportado en la literatura, los compuestos seleccionados para ser evaluados biológicamente fueron los aril-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** debido a la potencial actividad biológica que se reporta en antecedentes.

5.2.1. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DE LOS DERIVADOS DEL 1*H* Y 2*H*-BENZOTRIAZOLIL ACRILONITRILOS 20a-d Y 21a-d EN LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7 Y 4T1

La evaluación de la actividad anticancerígena de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** se llevó a cabo mediante el ensayo de rezasurina utilizando diluciones seriadas (0, 10, 50, 500 y 1000 µg/mL) de cada compuesto, las cuales fueron colocadas en las líneas celulares MCF-7 y 4T1, para posteriormente evaluar el porcentaje de viabilidad celular de los compuestos a las diferentes concentraciones.

Una vez obtenido el porcentaje de viabilidad, se realizó la curva de porcentaje de viabilidad-concentración y mediante una interpolación se determinó el valor de

IC₅₀ para los compuestos más activos; cabe destacar, que se consideró como compuestos más activos aquellos que presentaron un porcentaje de viabilidad relativa inferior al 80%.

5.2.1.1. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **20a**

Los porcentajes de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 28, corresponden al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **20a** expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además un análisis más detallado se presenta en la Tabla 15.

Tabla 15. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **20a**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	89.10 \pm 12.98	100.00 \pm 3.56
50	84.49 \pm 7.37	100.00 \pm 8.48
500	43.51 \pm 6.54	97.22 \pm 5.73
1000	36.36 \pm 6.82	94.47 \pm 4.80

En la Figura 28 se puede observar que el compuesto **20a** presenta el menor porcentaje en la viabilidad relativa en la línea celular MCF-7 bajo las concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$ alcanzando valores de 43.51 \pm 6.54 y 36.36 \pm 6.82% respectivamente, mientras que para la línea celular 4T1 no se

observó efecto importante sobre la viabilidad relativa y los porcentajes superan el $94.47 \pm 4.80\%$ para cualquier concentración.

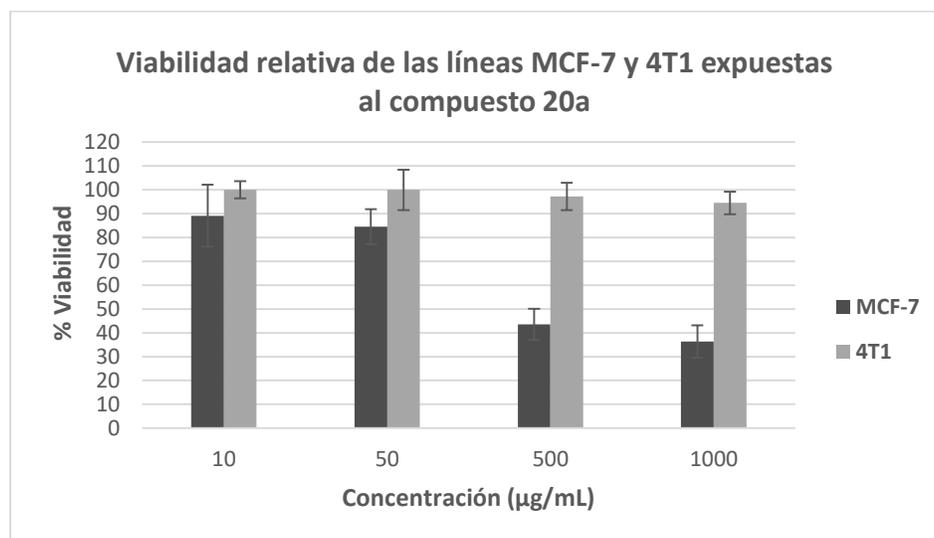


Figura 28. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **20a**.

5.2.1.2. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **20b**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 29, corresponden al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **20b**, expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-*il*)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **20b**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	100.00 \pm 11.66	100.36 \pm 15.80
50	56.03 \pm 7.05	96.68 \pm 12.22
500	90.9 \pm 11.58	63.53 \pm 1.94
1000	46.06 \pm 14.56	64.58 \pm 9.25

De acuerdo con la Figura 29, se puede observar que el compuesto **20b** muestra un efecto importante en la viabilidad relativa para ambas líneas celulares, destacando un valor de 46.06 \pm 14.56% de viabilidad celular para la línea MCF-7 bajo una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, por otro lado, en la línea celular 4T1 el menor porcentaje de viabilidad relativa se observó en las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un valor de 63.53 \pm 1.94 y 64.58 \pm 9.25% respectivamente.

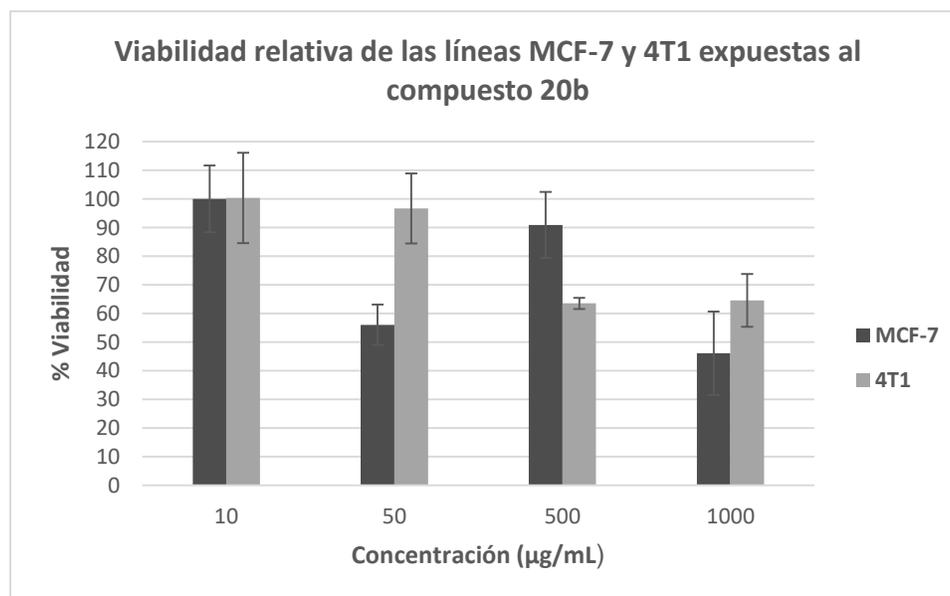


Figura 29. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-*il*)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **20b**.

5.2.1.3. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (E)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo 20c

En la Figura 30 se muestran los porcentajes de viabilidad relativa correspondientes al (E)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **20c**, expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 17.

Tabla 17. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (E)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **20c**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	100.00 \pm 13.20	93.32 \pm 5.2
50	89.30 \pm 11.69	93.80 \pm 10.56
500	100.00 \pm 4.43	100.00 \pm 2.12
1000	100.00 \pm 11.49	94.68 \pm 9.25

De acuerdo con la Figura 30 se puede observar que el compuesto **20c** no presenta ningún efecto significativo sobre la viabilidad relativa en ninguna de las líneas celulares evaluadas, aun al emplear la concentración más alta, por lo tanto, el compuesto **20c** no tiene potencial actividad anti-cáncer.

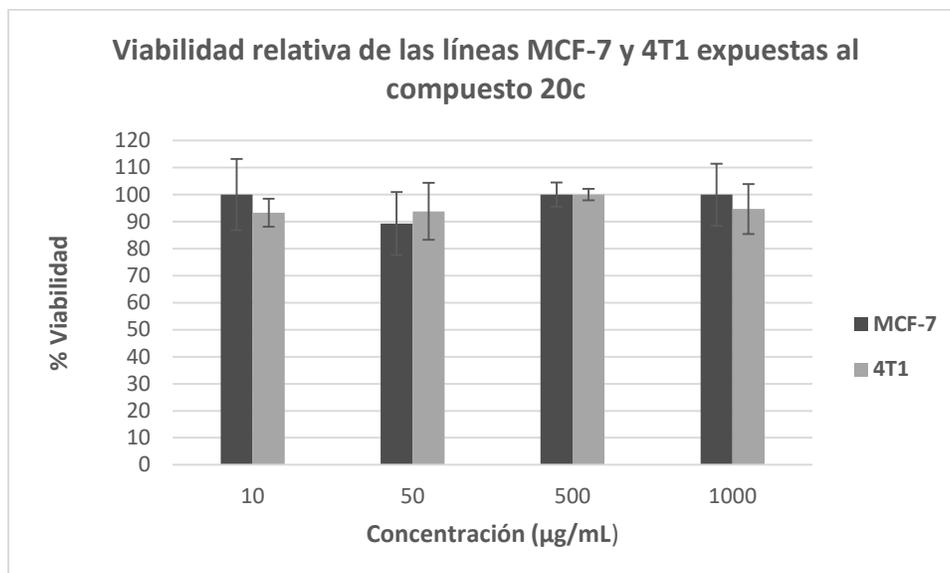


Figura 30. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **20c**.

5.2.1.4. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo **20d**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 31, corresponde al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo **20d**, expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 18.

Tabla 18. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)-3-(-4-(difenilamino)fenil)acrilonitrilo **20d**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	74.99 \pm 9.79	100.00 \pm 7.47
50	100.00 \pm 8.15	100.00 \pm 4.27
500	80.51 \pm 10.4	100.00 \pm 3.07
1000	100.00 \pm 14.09	89.93 \pm 9.79

En base a los datos mostrados en la Tabla 18 el compuesto **20d** no presenta actividad anti-cáncer, ya que en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas se muestra un efecto significativo en la viabilidad relativa, por ejemplo, aun cuando en la línea celular MCF-7 el porcentaje de viabilidad se reduce al 74.99 \pm 9.79% bajo una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, al incrementar la concentración del compuesto la viabilidad relativa alcanza el 100.00 \pm 14.09%, por otro lado, en la línea celular 4T1, la viabilidad celular disminuye solo hasta un 89.93 \pm 9.79% al emplear la concentración más alta.

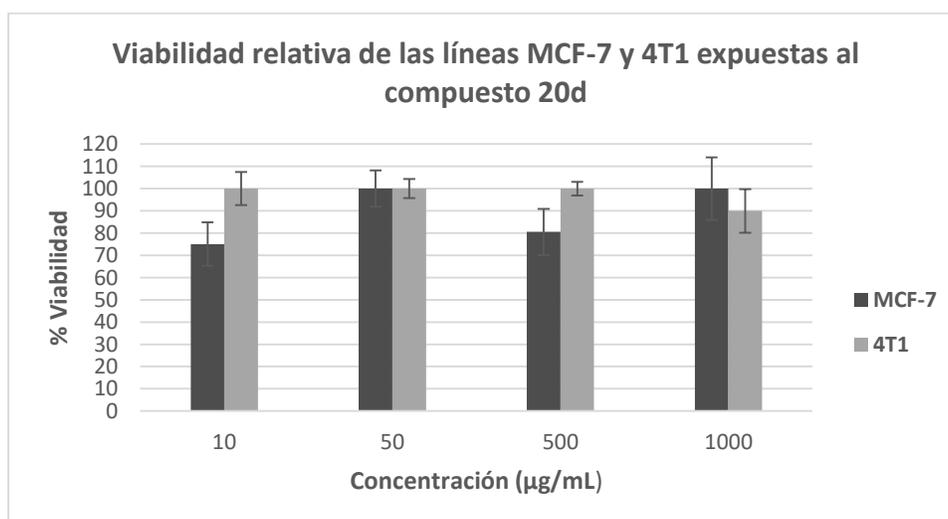


Figura 31. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3] triazol-1-il)-3-(-4-(difenilamino) fenil) acrilonitrilo **20d**.

5.2.1.5. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **21a**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 32, corresponde al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **21**, expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 19.

Tabla 19. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **21a**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	100.00 \pm 11.28	100.00 \pm 0.38
50	100.00 \pm 4.30	100.00 \pm 0.30
500	100.00 \pm 10.23	100.00 \pm 9.53
1000	100.00 \pm 9.45	92.92 \pm 13.02

En la Figura 32 se muestran los valores de porcentaje de viabilidad relativa y se observa que el compuesto **21a** no presenta una potencial actividad anti-cáncer para ninguna de las líneas celulares evaluadas, aun al emplear la concentración más alta. Los porcentajes de viabilidad relativa en ambas líneas celulares y bajo todas las concentraciones empleadas, son superiores al 90%.

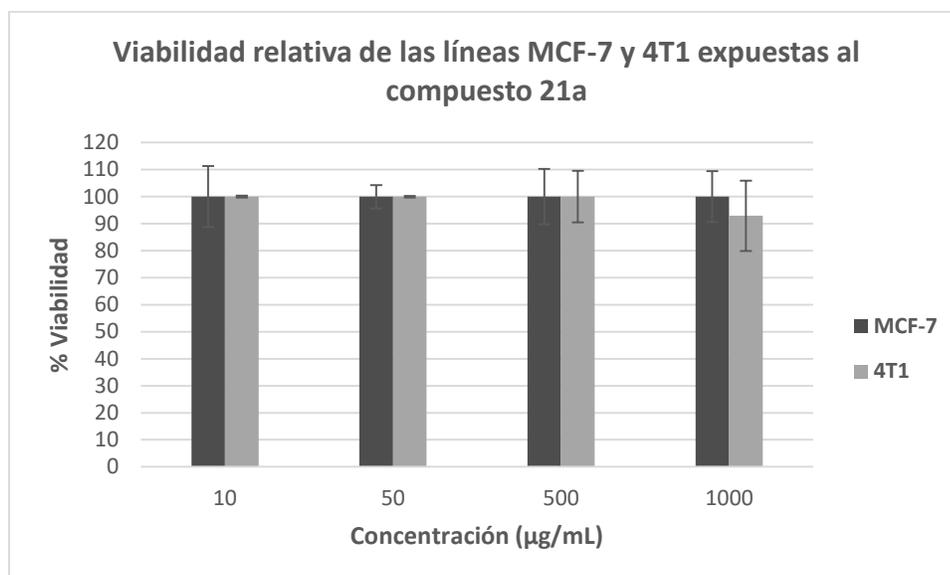


Figura 32. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilonitrilo **21a**.

5.2.1.6. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **21b**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 33, corresponden al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **21b** expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 20.

Tabla 20. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **21b**.

Concentración (µg/ml)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (%Viabilidad)
10	100.00 ± 8.69	100.00 ± 8.92
50	100.00 ± 13.21	100.00 ± 5.83
500	100.00 ± 14.58	100.00 ± 4.32
1000	100.00 ± 7.10	87.71 ± 11.93

De acuerdo con la Figura 33 se observa que el compuesto **21b** no presenta actividad anti-cáncer en ninguna de las líneas celulares, debido a que los porcentajes de viabilidad relativa se mantienen cerca al 100% para ambas líneas, a excepción de la línea celular 4T1 para la cual se observa una disminución en el porcentaje de viabilidad relativa con un valor de $87.71 \pm 11.93\%$ al emplear la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, este compuesto no se considera potencialmente activo ya que se esperarían valores en la viabilidad relativa menores al 80%.

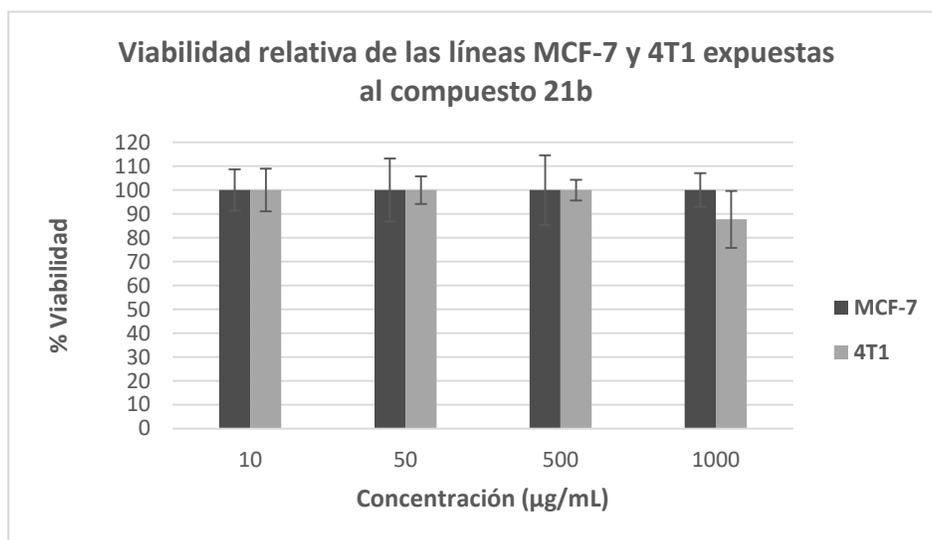


Figura 33. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilonitrilo **21b**.

5.2.1.7. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **21c**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 34, corresponde al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo

21c expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **21c**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	100.00 \pm 12.35	96.87 \pm 6.79
50	98.67 \pm 8.25	100.00 \pm 1.75
500	89.93 \pm 11.37	100.00 \pm 2.54
1000	85.46 \pm 13.29	100.00 \pm 7.38

En la Figura 34 se puede observar que de acuerdo con los porcentajes de viabilidad relativa el compuesto **21c** no muestra potencial actividad anti-cáncer para la línea celular 4T1, pues el porcentaje es superior al 95% aún en la concentración más alta. Por otro lado, en la línea celular MCF-7 se presentan valores de porcentajes de viabilidad relativa que disminuyen conforme la concentración del compuesto se incrementa 100.00 \pm 12.35, 98.67 \pm 8.25, 89.93 \pm 11.37 y 85.46 \pm 13.29% para las concentraciones 10, 50, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$.

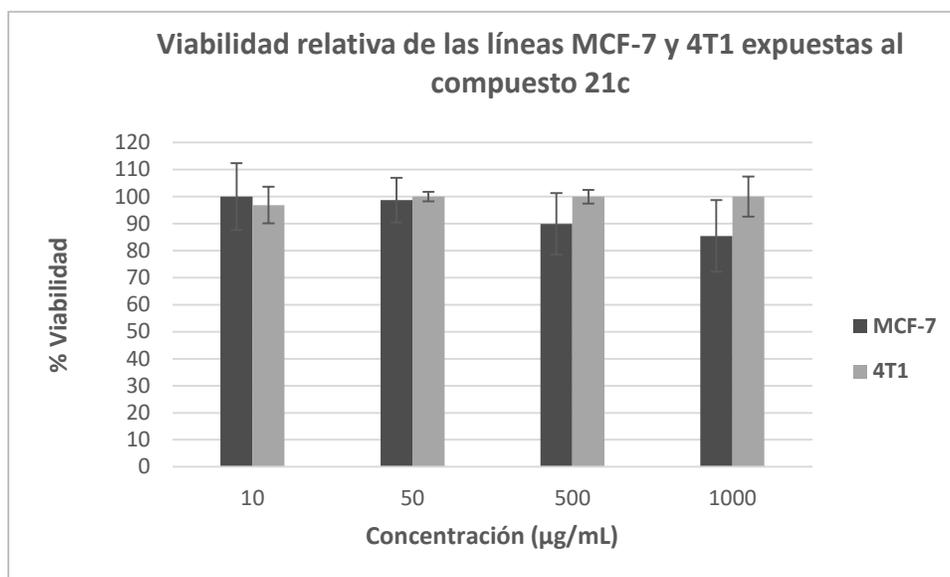


Figura 34. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-morfolinofenil)acrilonitrilo **21c**.

5.2.1.8. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo **21d**

Los valores del porcentaje de viabilidad relativa que se muestran en la Figura 35, corresponden al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo **21d** expuesto en las líneas celulares MCF-7 y 4T1; además, un análisis más detallado se presenta en la Tabla 22.

Tabla 22. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo **21d**.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MCF-7 (% Viabilidad)	4T1 (% Viabilidad)
10	93.38 \pm 13.66	100.00 \pm 7.77
50	100.00 \pm 7.08	100.00 \pm 2.80
500	97.47 \pm 7.11	100.00 \pm 13.25
1000	43.51 \pm 6.54	100.00 \pm 4.58

De acuerdo con los porcentajes de viabilidad relativa mostrados en la Tabla 22, el compuesto **21d** muestra una potencial actividad anticancerígena para la línea celular MCF-7 presentando un valor de viabilidad relativa del 43.51 \pm 6.54% al emplear la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Cabe resaltar que este compuesto y el compuesto **20a**, mostraron los menores porcentajes de viabilidad celular del grupo de compuestos evaluados, por lo que se considera que tienen la mayor actividad anticancerígena para esta línea celular. Por otro lado, el porcentaje de viabilidad relativa en la línea 4T1, se mantuvo cercano al 100% aun al emplear la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, es decir, el compuesto **21d** no tiene potencial actividad anti-cáncer para esta línea celular.

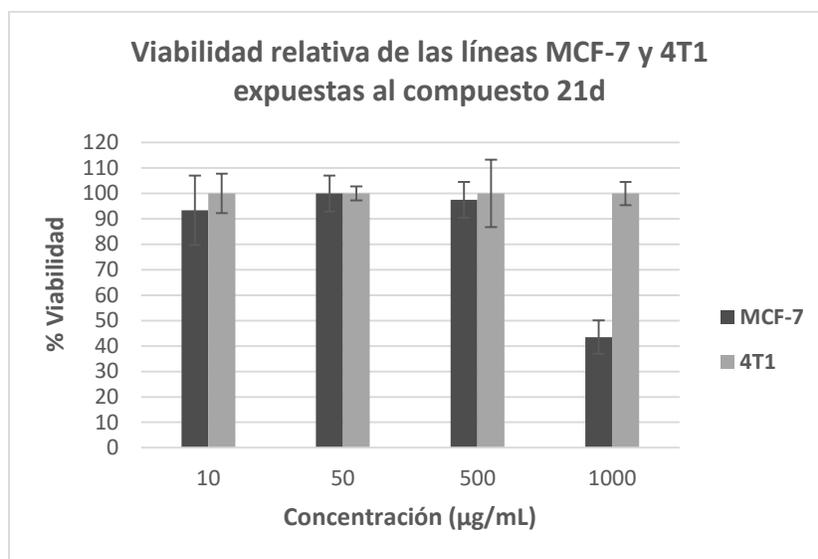


Figura 35. Viabilidad relativa de las líneas MCF-7 y 4T1 expuestas al (*E*)-2-(2*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il)-3-(4-(difenilamino)fenil) acrilonitrilo **21d**.

5.2.1.9. Comparación de la viabilidad de la línea MCF-7 expuestas a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d**

La actividad anti-cáncer que presentan los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** sobre la línea celular MCF-7, se presenta en la Figura 36; donde se puede observar que los compuestos que presentan una mayor actividad anticancerígena son el **20a**, **20b** y **21d**, en comparación con los acrilonitrilos **20c**, **20d**, **21a**, **21b**, y **21c** los cuales no presentan una tendencia clara o en la mayoría de los casos no presentan actividad. Es importante resaltar que el compuesto **20a** es el que presentó la mayor actividad anticancerígena con un $36.36 \pm 6.82\%$ de viabilidad a una concentración 1000 µg/mL.

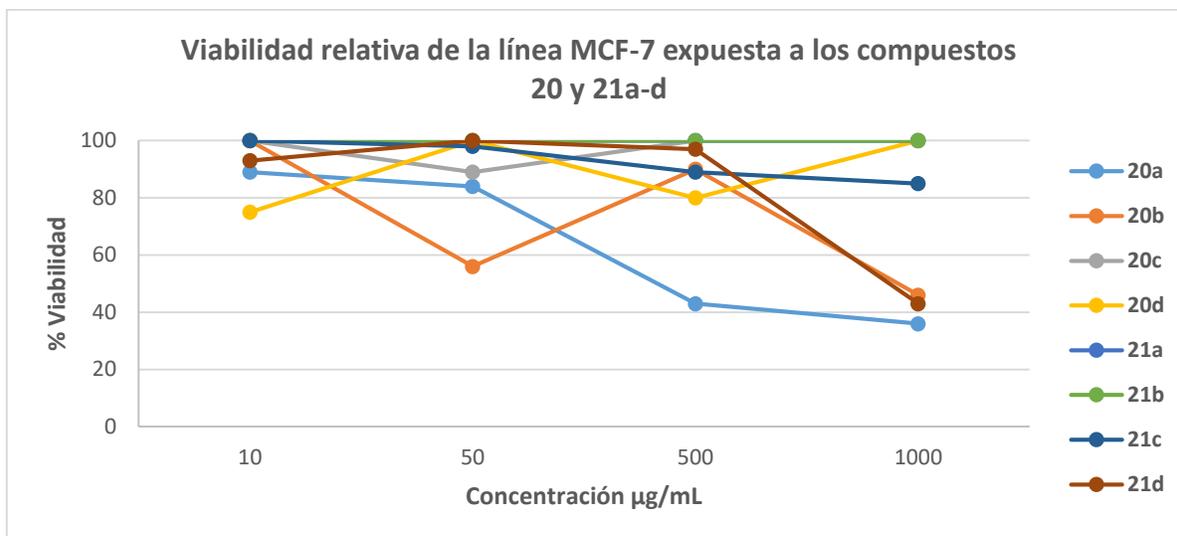


Figura 36. Viabilidad relativa de la línea MCF-7 expuesta a los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20** y **21a-d**.

5.2.1.10. Comparación de la viabilidad de la línea 4T1 expuesta a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d**

En la Figura 37 se presenta la actividad anticancerosa de los derivados de 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** al ser expuestos sobre la línea celular 4T1; se puede observar que únicamente el compuesto **20b** presenta actividad anti-cáncer al emplear las concentraciones de 500 y 1000 µg/mL en comparación con el resto de los compuestos evaluados (**20a**, **20c**, **20d**, **21a**, **21b**, **21c** y **21d**), cabe resaltar que este compuesto presentó también una potencial actividad para la línea celular MCF-7.

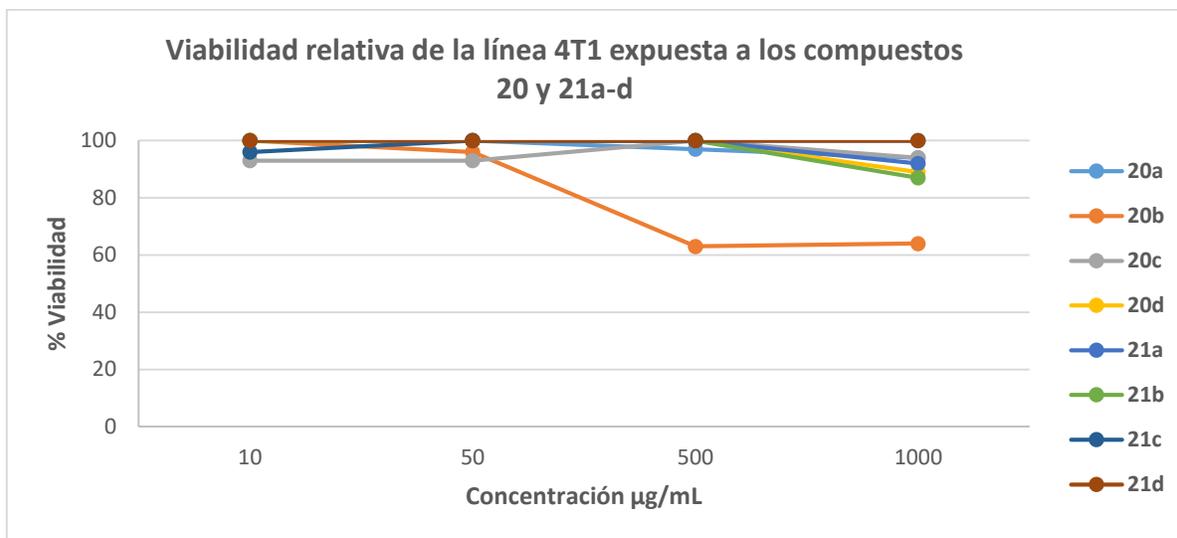


Figura 37. Viabilidad relativa de la línea 4T1 expuesta a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d**.

5.2.1.11. Comparación de la viabilidad de las líneas celulares MCF-7 y 4T1 expuesta a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a-d** y **21a-d**

Los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a-d** y **21a-d** que destacan por su actividad anti-cáncer al ser expuestos en las líneas celulares MCF-7 y 4T1, son los compuestos **20a**, **20b**, y **21d** (Figura 38), a los cuales fue posible determinar el IC₅₀, y los resultados se muestran en la Tabla 23.

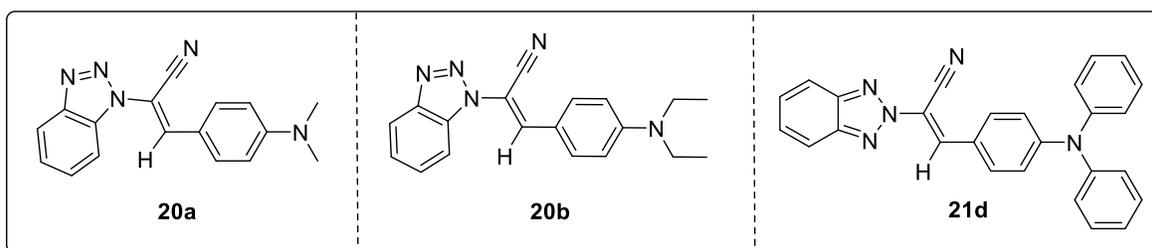


Figura 38. Derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo con mayor actividad anti-cáncer.

Tabla 23. Valores de IC₅₀ de los compuestos más activos en las líneas MCF-7 y 4T1.

Compuesto	MCF-7	4T1
	IC₅₀ (µg/mL)	IC₅₀ (µg/mL)
20a	423	-
20b	954	-
21d	935	-
Doxorrubicina	0.0053	0.707

En la línea celular MCF-7, se observa que los derivados del *1H*-benzotrizolil acrilonitrilo que integran en su estructura grupos electrodonadores como el di-metilo y el di-etilo **20a** y **20b** presentan una potencial actividad anticáncer. De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 23, el derivado que presenta un IC₅₀ menor (423 µg/mL), integra en su estructura un sustituyente di-metilo, mientras que el compuesto que presenta un IC₅₀ mayor (954 µg/mL), está constituido por el sustituyente di-etilo, lo cual indica que de acuerdo con el número de carbonos que conformen los sustituyentes puede verse afectada la actividad anticancerígena de estos compuestos. Por otro lado, se encuentran el derivado del *2H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **21d** que integra en su estructura un grupo voluminoso y electrodonador como es el di-fenilo y presenta un IC₅₀ de 935 µg/mL. De manera general, todos los derivados de *1H* y *2H*-benzotrizolil-acrilonitrilo que integran como sustituyente un anillo de morfolina en su estructura, no aparecen en la tabla dado que no presentaron potencial actividad anti-cáncer en ninguna de las líneas celulares.

En la línea celular 4T1, el único compuesto que presentó una considerable actividad anti-cáncer fue el **20b**; sin embargo, fue imposible determinar el IC₅₀ dado que el menor porcentaje de viabilidad relativa que se observó fue del 63.53 ±1.94%.

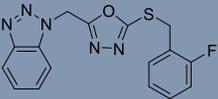
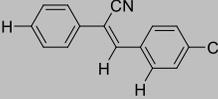
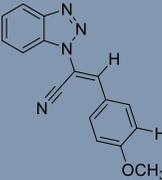
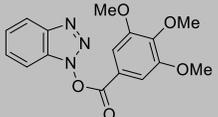
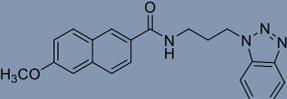
Es importante resaltar, que la mayoría de los compuestos presentaron actividad anti-cáncer para la línea celular MCF-7 pero no para la línea 4T1, esto es porque existen diferencias significativas entre ambas a pesar de ser líneas celulares de cáncer de mama. Por ejemplo, la línea celular 4T1, se clasifica como cáncer de mama triple negativo (TNBC) puesto que imita un cáncer de mama humano en estadio IV; al carecer de la expresión del receptor de estrógeno, progesterona y la falta de expresión génica para el receptor HER-2, el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica de las células 4T1 reducen las opciones de tratamiento específico para los tumores. Por otro lado, la línea celular MCF-7 es una de las pocas que expresa niveles sustanciales del receptor de estrógeno alfa (ER- α); además de expresar receptores de andrógenos, de progesterona y glucocorticoides.⁴¹

Estudios científicos han demostrado que el tratamiento quimioterapéutico con estrógenos tiene un efecto antiapoptótico, mientras que el tratamiento con antiestrógenos, puede reducir el crecimiento de los cultivos al inhibir la proliferación e inducir apoptosis, por ejemplo el tamoxifeno, el cual se encuentra clasificado dentro de los MRSE (Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógeno) que bloquean los efectos del estrógeno en el tejido mamario uniéndose a los ER en las células mamarias. Otro tipo de tratamiento empleado para el cáncer de mama son los inhibidores de la aromatasa, los cuales bloquean la enzima aromatasa, que convierte el andrógeno en pequeñas concentraciones de estrógeno en el cuerpo; es decir, reduce la cantidad de estrógeno disponible para estimular el crecimiento de las células de cáncer de mama con receptores de hormonas positivos.^{41, 42, 43,44}

Por todo lo anterior y en base a los resultados obtenidos y a la relación estructural que presentan los compuestos **20a**, **20b** y **21d** con algunos moduladores hormonales, es posible que la actividad biológica que se deriva sea del tipo regulación hormonal y en consecuencia esto resulta en una potencial actividad anti-cáncer en la línea celular MCF-7.

Por otro lado, los compuestos que integran en su estructura grupos nitrilo y azoles como el *1H* y *2H*-benzotriazol han demostrado poseer un amplio rango de aplicaciones medicinales; recientemente se ha reportado que los derivados de benzotriazol presentan propiedades farmacológicas especialmente en los tratamientos quimioterapéuticos.^{43, 52} En la Tabla 24, se presenta una recopilación de estudios realizados acerca de este tipo de moléculas evaluadas en distintas líneas celulares, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en la presente investigación con lo reportado en la literatura.

Tabla 24. Compuestos con actividad anticancerígena en distintas líneas celulares.

Autor Año	Molécula	Línea celular	IC ₅₀ (µg/mL)	Mecanismo
Zhang, S; et al. 2013 ²⁰		MCF-7	5.68	Actividad inhibitoria de FAK (Kinasa de adhesión focal)
M.S. Alam et al., 2013 ³³		SK-OV-3	0.20	**
A. Carta et al., 2011 ³²		MCF-7	0.27	Actividad inhibitoria de la polimerización de la tubulina
Ren Y., et al, 2014 ⁴³		H460 MKN45	1.7	Actividad inhibitoria de HDAC (Histona deacetilasa)
Ren Y., et al, 2014 ⁴³		P388	80*	Actividad quimiosensibilizante (para combatir la resistencia a los fármacos)

**No reportado. *Concentración necesaria para inhibir el crecimiento celular 29.9%

5.2.2. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d en esplenocitos murinos

La actividad citotóxica que presentan los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d al ser expuestos sobre esplenocitos murinos, se presenta en la Figura 39; además, se presenta un análisis más detallado en la Tabla 25.

Tabla 25. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a-d** y **21a-d** a una concentración de 1000 µg/mL.

Compuesto	% Viabilidad	Compuesto	% Viabilidad
20a	37.88 ± 10.90	21a	66.18 ± 10.05
20b	91.80 ± 3.93	21b	11.44 ± 6.09
20c	16.72 ± 0.71	21c	55.25 ± 14.86
20d	33.61 ± 4.46	21d	27.57 ± 17.25

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 25 el compuesto **20b** presenta el mayor porcentaje de viabilidad relativa ($91.80 \pm 3.93\%$) en esplenocitos murinos, es decir es menos citotóxico, seguido de los compuestos **21a** y **21c** con un 66.18 ± 10.05 y $55.25 \pm 14.86\%$ respectivamente, es importante resaltar que el compuesto **20b** integra en su estructura como sustituyente un grupo di-etilo y se encuentra dentro de los compuestos con mejor actividad anti-cáncer en la línea celular MCF-7, aun cuando este presenta un IC_{50} superior al del fármaco de referencia y que además para la línea celular 4T1 también presentó una buena actividad anti-cáncer.

Por otro lado, los compuestos **20a** y **21d**, los cuales también poseen potencial actividad anti-cáncer, presentaron porcentajes de viabilidad relativa en esplenocitos murinos de 37.88 ± 10.9 y $27.57 \pm 17.25\%$ respectivamente, lo cual indica que son altamente citotóxicos.

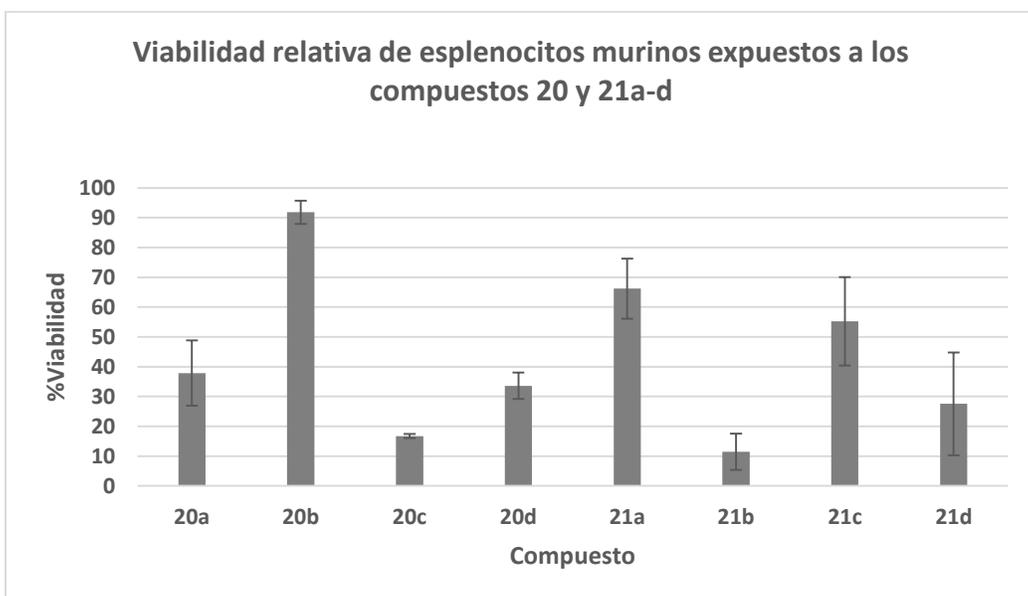


Figura 39. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los compuestos derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a-d** y **21a-d** a una concentración de 1000 µg/mL.

Debido a que los compuestos **20a** y **21d** presentaron potencial actividad anticancerígena pero una alta citotoxicidad a la concentración de 1000 µg/mL se decidió realizar la evaluación de la viabilidad relativa en esplenocitos murinos a concentraciones de 10, 50, 500 y 1000 µg/mL para presentar un estudio más detallado (Tabla 26).

Tabla 26. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a** y **21d**.

Concentración (µg/mL)	% Viabilidad	
	20a	21d
10	31.31 ± 19.68	53.70 ± 3.25
50	44.95 ± 11.99	32.92 ± 11.49
500	47.28 ± 10.17	40.66 ± 7.07
1000	37.88 ± 10.90	27.57 ± 17.25

En la Figura 40 se puede observar que el compuesto **20a** presenta una alta citotoxicidad en esplenocitos murinos al emplear incluso la concentración menor. Por otro lado, el compuesto **21d** presenta el mayor porcentaje de viabilidad ($53.70 \pm 3.25\%$) en esplenocitos murinos al emplear una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$; sin embargo, bajo esta concentración dicho compuesto presenta poca actividad anticancerígena al ser evaluado en la línea celular MCF-7.

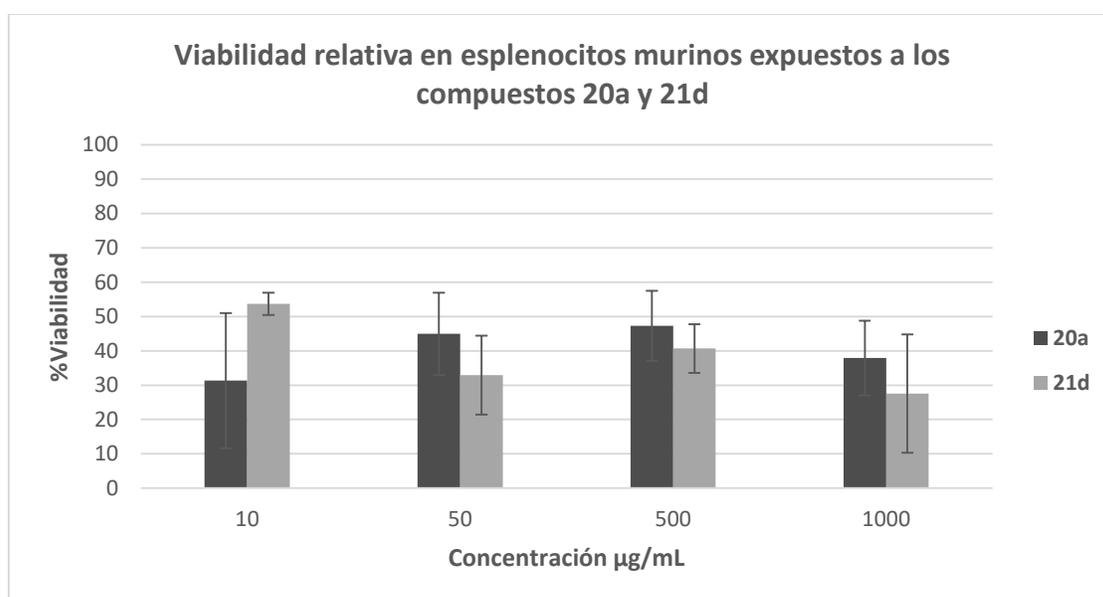


Figura 40. Viabilidad relativa de esplenocitos murinos expuestos a los compuestos derivados del 1H y 2H-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a** y **21d**.

Después de analizar esta información, el compuesto **20b** se perfila como el único posible candidato para ser evaluado en un modelo animal debido a que presenta el mayor porcentaje de viabilidad relativa en esplenocitos murinos (poco citotóxico) y al mismo tiempo presentó una potencial actividad anticancerígena en la línea celular MCF-7.

5.2.3. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** en células mononucleares de sangre periférica de humano

La citotoxicidad que presentan los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** a una concentración de 1000 µg/mL al ser expuestos sobre sangre periférica de humano, se presenta en la Figura 41; además, se presenta un análisis más detallado en la Tabla 27.

Tabla 27. Viabilidad relativa de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** sobre sangre periférica de humano a una concentración de 1000 µg/mL.

Compuesto	%Viabilidad	Compuesto	%Viabilidad
20a	100.00 ± 13.56	21a	75.75 ± 10.74
20b	60.70 ± 6.81	21b	91.64 ± 11.80
20c	83.43 ± 5.51	21c	100.00 ± 8.11
20d	94.13 ± 8.64	21d	100.00 ± 13.89

De acuerdo con la Figura 41 se observa que los compuestos **20a**, **21c** y **21d** a una concentración de 1000 µg/mL presentan una viabilidad relativa cercana al 100% sobre células de sangre periférica, lo cual resulta interesante ya que los compuestos **20a** y **21d** poseen una potencial actividad anticancerígena para la línea celular MCF-7. Por otro lado, aunque el compuesto **21c** presentó poca actividad anticancerígena

en esta línea celular, podría ser un buen candidato para emplearse como marcador tumoral, dado que su citotoxicidad en células de sangre periférica humana es nula.

Los compuestos **20c**, **20d**, **21a**, y **21b** presentan porcentajes de viabilidad relativa de 83.43 ± 5.51 , 94.13 ± 8.64 , 75.75 ± 10.74 y $91.64 \pm 11.80\%$ respectivamente; sin embargo, ninguno de estos compuestos presentó potencial actividad anticancerígena para ninguna de las líneas celulares empleadas. El compuesto **20b** presenta el valor de viabilidad relativa más bajo ($60.70 \pm 6.81\%$), es decir, es el más citotóxico para las células de sangre periférica humana, aun cuando fue el que presentó la mejor actividad anticancerígena al ser evaluado en la línea celular MCF-7.

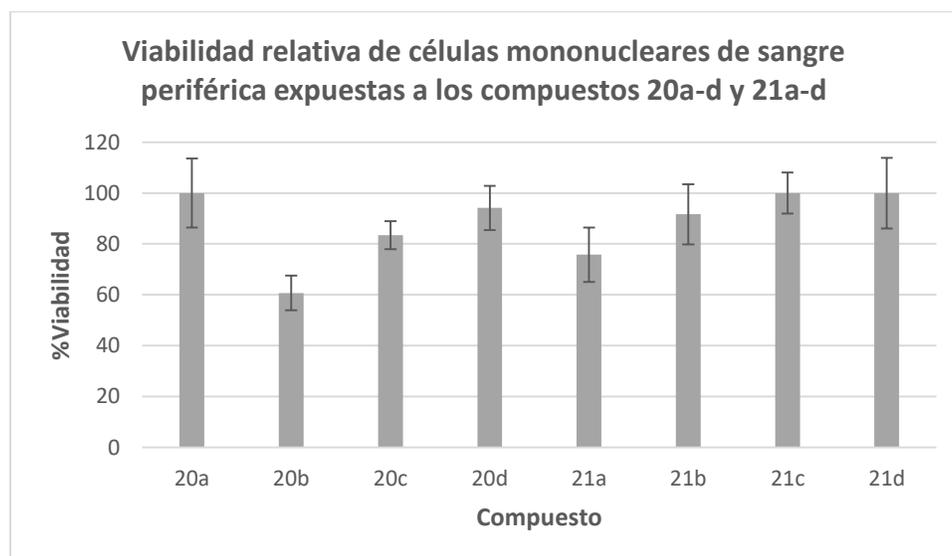


Figura 41. Viabilidad relativa de los compuestos derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilo **20a-d** y **21a-d** sobre sangre periférica de humano a una concentración de 1000 µg/mL.

Debido a que el compuesto **20b** presentó potencial actividad anticancerígena en la línea celular MCF-7 pero una alta citotoxicidad a la concentración de 1000 µg/mL se decidió realizar la evaluación de la viabilidad relativa en células mononucleares a concentraciones de 10, 50, 500 y 1000 µg/mL para presentar un estudio más detallado (Tabla 28).

Tabla 28. Viabilidad relativa del compuesto **20b** sobre células mononucleares de sangre periférica.

Concentración (µg/ml)	% Viabilidad relativa
10	94.40 ± 5.72
50	87.47 ± 10.02
500	75.91 ± 13.83
1000	60.70 ± 6.81

En base a los resultados que se muestran en la Figura 42, se observa que el compuesto **20b**, presenta un alto valor de viabilidad relativa en células de sangre periférica (94.40 ± 5.72%) al emplear la concentración de 10 µg/mL, lo que significa que bajo esta concentración este compuesto es poco citotóxico.

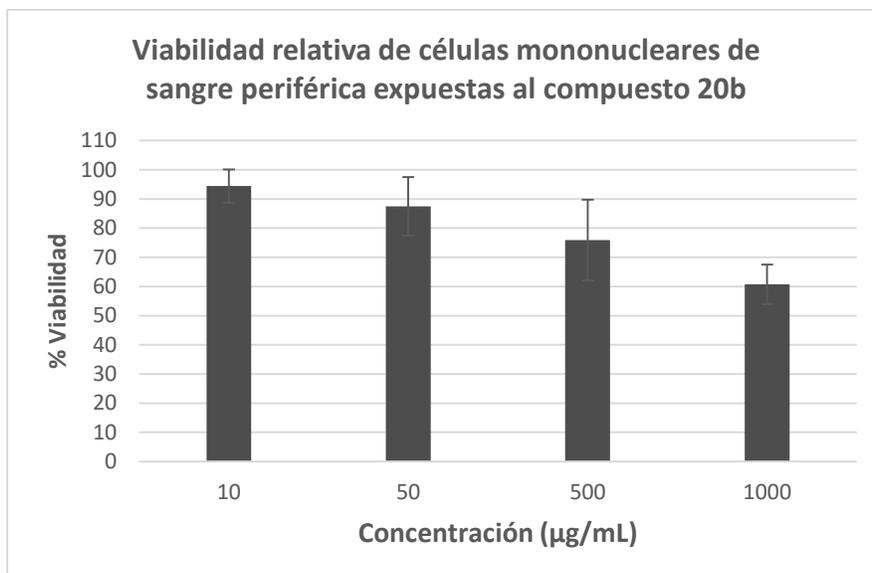


Figura 42. Viabilidad relativa del compuesto **20b** sobre sangre periférica de humano.

Por otro lado, el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos que provoquen menos efectos adversos sigue siendo un reto en la actualidad. Como se ha reportado en la literatura, el tratamiento con doxorubicina desencadena una cantidad de efectos adversos tales como mielosupresión, alopecia, náusea, vómitos, miocardiopatía, es vesicante y puede causar ulceración cutánea.⁴⁴ Aun cuando la doxorubicina se considera un potencial fármaco para el tratamiento quimioterapéutico, sigue teniendo como limitación la citotoxicidad que genera durante la terapia.

En el 2014, Gumulec *et al.*,⁴⁶ reportaron la citotoxicidad de la doxorubicina sobre tres líneas celulares prostáticas, dos de ellas cancerosas y la línea celular PNT1A que fue empleada como representación de tejido prostático sano. La citotoxicidad que presenta la doxorubicina sobre la línea celular PNT1A de acuerdo con Gumulec *et al.*, se muestra en la Figura 43. Donde se observa que el valor de viabilidad celular

más bajo se presenta al exponer las células a una concentración de 5.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fármaco, es decir, bajo esta concentración la doxorubicina es altamente citotóxica.

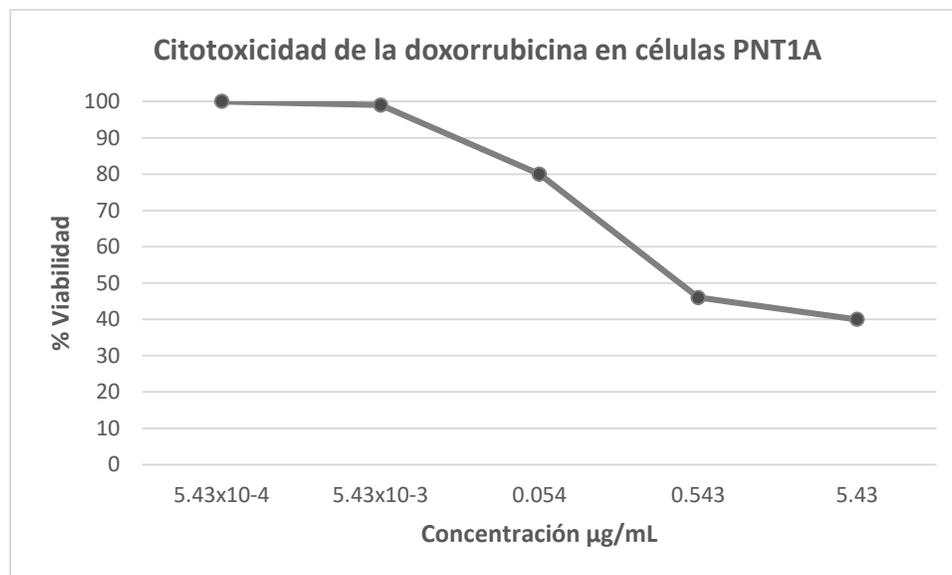


Figura 43. Citotoxicidad de la doxorubicina sobre células PNT1A de tejido prostático sano.

Al comparar las cifras reportadas con los datos obtenidos en esta investigación se sugiere que los compuestos **20a** y **21d** sean sometidos a estudios más precisos dado que mostraron potencial actividad anticancerígena y no presentaron citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica al emplear una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe destacar que esta concentración es mucho mayor que la concentración de doxorubicina empleada en el estudio de Gumulec y col., lo cual da indicio de que los compuestos **20a** y **21d** desencadenen menos efectos adversos que la propia doxorubicina.

Con la finalidad de presentar un estudio más detallado sobre la citotoxicidad de los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d**, se decidió llevar

a cabo el ensayo cometa para evaluar el daño genético en células de sangre periférica al ser expuestas a los compuestos **20a-d** y **21a-d** a concentraciones más bajas (0.1, 1.0 y 10 µg/mL), dado que la mayoría de los compuestos presentan poca citotoxicidad al emplear la concentración de 10 µg/mL.

5.2.4. Actividad genotóxica *in vitro* de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos 20a-d y 21a-d en células mononucleares de sangre periférica mediante el ensayo cometa

Una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos es el ensayo cometa o también conocido como electroforesis alcalina.^{47, 48} A través de esta técnica es posible identificar el daño al ADN mediante la migración de este en dirección al ánodo, dando lugar a la aparición de un cometa (de ahí el nombre). De esta forma se puede cuantificar la relación dosis/respuesta midiéndose la intensidad de la fluorescencia desde la cabeza del cometa hacia la cola.⁴⁹

La genotoxicidad que presentan los derivados del 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** a una concentración de 0.1, 1.0 y 10 µg/mL, al ser expuestos sobre sangre periférica de humano, se presenta en la Figura 44; además, se presenta un análisis más detallado en la Tabla 29.

Tabla 29. Porcentaje de genotoxicidad de los derivados del 1*H*- y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** sobre sangre periférica.

% Genotoxicidad								
Concentración	20a	20b	20c	20d	21a	21b	21c	21d
H₂O₂ (+)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
DMSO 5% (-)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
10 µg/mL	3%	0%	5%	0%	0%	5%	0%	0%
1 µg/mL	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0.1 µg/mL	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

De acuerdo con la Figura 44, se puede observar que solo los compuestos **20a**, **20c** y **21b** provocan ligero daño al ADN mostrando un valor de genotoxicidad bajo de 3 y 5% en las células evaluadas en comparación con el control positivo peróxido de hidrógeno (H₂O₂), lo cual indica que a una concentración de 10 µg/mL, es posible que estos compuestos causen ligeras rupturas en la cadena, debido a la morfología que presentan los núcleos y la migración del ADN que se observa en la Figura 45.²⁷ Por otro lado, los compuestos **20b**, **20d**, **21a**, **21c** y **21d**, no presentan genotoxicidad en comparación con el control positivo bajo ninguna concentración.

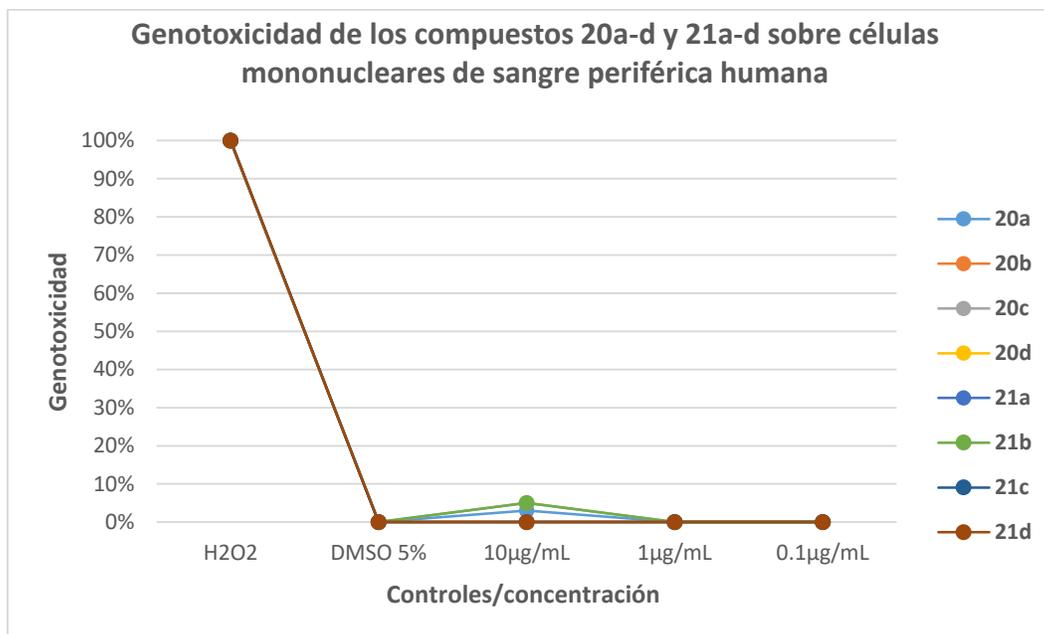


Figura 44. Genotoxicidad de los compuestos **20a-d** y **21a-d** sobre sangre periférica humana.

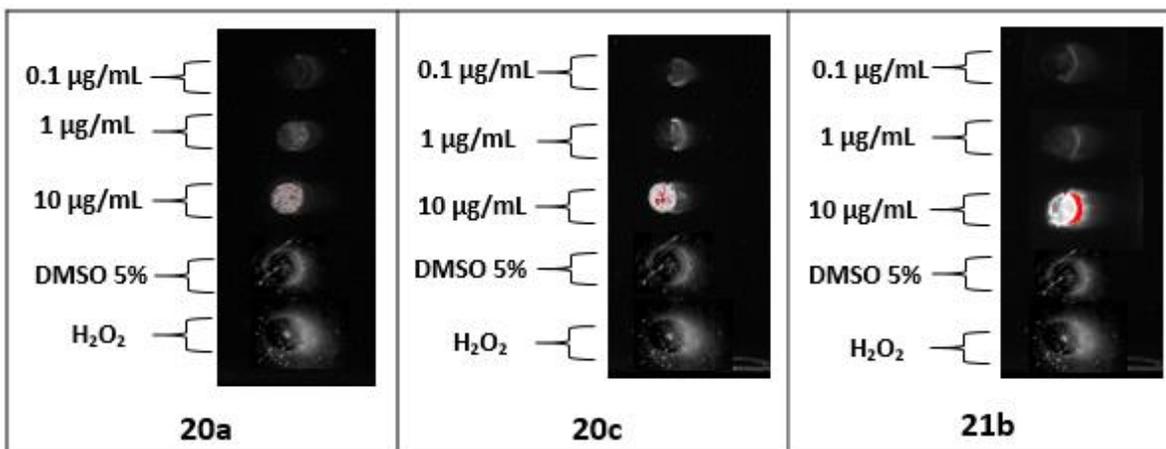


Figura 45. Morfología de los núcleos expuestos a los compuestos **20a**, **20c** y **21b** en el ensayo cometa.

Finalmente, en la Figura 46 se presentan las imágenes correspondientes al ensayo cometa de los compuestos con mayor actividad anticancerígena **20a**, **20b** y **21d** para la línea celular MCF-7 con la finalidad de discutir algunos aspectos

importantes. El compuesto **20a** presentó actividad en la línea celular MCF-7 empleando la concentración más alta, 1000 µg/mL, al evaluar la citotoxicidad de este compuesto en células mononucleares bajo la misma concentración, se obtuvo viabilidad celular del $100.00 \pm 13.56\%$, es decir el compuesto resultó no ser citotóxico. Por otro lado, al evaluar la genotoxicidad en células de sangre periférica a una concentración menor (10 µg/mL), se obtiene como resultado un valor de 3% de genotoxicidad; sin embargo, esto no indica que exista muerte celular bajo esta concentración dado que puede tratarse de mutaciones o modificaciones al ADN pero no necesariamente inducir muerte celular. La viabilidad relativa del compuesto **20b**, fue de $46.06 \pm 14.56\%$ al emplear una concentración de 1000 µg/mL en esta misma línea celular, desafortunadamente bajo esta concentración dicho compuesto resulta altamente citotóxico presentando un $60.70 \pm 6.81\%$ de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica; al evaluarse nuevamente la citotoxicidad de este compuesto a una concentración de 10 µg/mL, la viabilidad relativa resultó de $94.40 \pm 5.72\%$, lo que indica que bajo esta concentración no presenta una alta citotoxicidad, por otro lado, tampoco presentó genotoxicidad al ser expuesto a la misma concentración sobre sangre periférica; sin embargo, a una concentración de 10 µg/mL el compuesto **20b** no presenta actividad anti-cáncer en la línea celular MCF-7 por lo que se perfila como candidato a ser evaluado como marcador celular a esta concentración.

La viabilidad relativa que presentó el compuesto **21d** para esta línea celular al emplear la concentración de 1000 µg/mL fue $43.51 \pm 6.54\%$ y bajo esta misma concentración no presentó citotoxicidad permitiendo una viabilidad celular cercana

al 100% en células de sangre periférica y al emplear una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, dicho compuesto no presentó genotoxicidad en sangre; es de esperarse que el compuesto **21d** tampoco presente genotoxicidad a una concentración mayor dados los resultados al evaluarla la citotoxicidad, por lo tanto, los compuestos **20a** y **21d** se proponen como posibles candidatos a ser evaluados en otras líneas celulares cancerígenas de importancia clínica u otras aplicaciones biológicas.

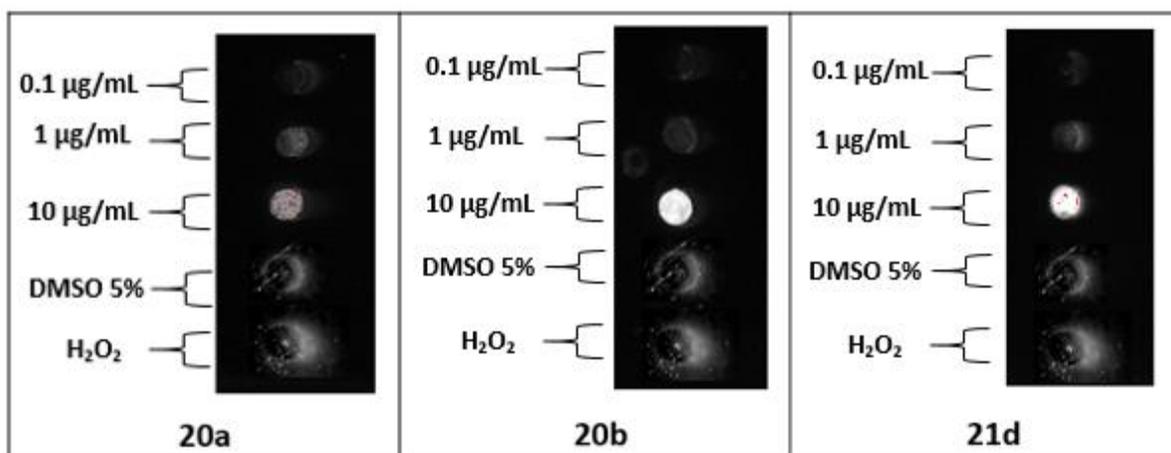


Figura 46. Morfología de los núcleos expuestos a los compuestos **20a**, **20b** y **21d** en el ensayo cometa.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron comparados con lo reportado en el 2017 por Lu Yanxin *et al.*,⁵⁰ cuando evaluaron el daño al ADN que causa la doxorubicina sobre células de glioma U251 mediante el ensayo cometa. Las células U251 fueron expuestas a la doxorubicina a una concentración de 0.543 $\mu\text{g/mL}$ durante 20 h, empleando como control negativo al DMSO; los resultados se muestran en la Figura 47.

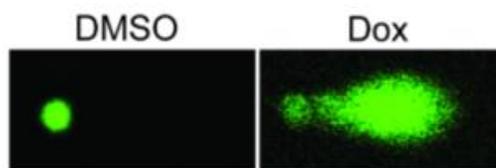


Figura 47. Imágenes representativas del ensayo cometa alcalino en células U251.

Aun cuando los resultados reportados por Lu Yanxin *et al.*,⁵⁰ se tratan sobre células cancerosas, se puede establecer lo siguiente; el daño al ADN en células de sangre periférica al ser expuestas a los compuestos **20a-d** y **21a-d**, se presentó únicamente al emplear la concentración de 10 µg/mL de los compuestos **20a**, **20c** y **21b**, mientras que a concentraciones menores (1.0 y 0.1 µg/mL), no se muestra genotoxicidad al evaluar ninguno de los compuestos. De acuerdo con lo reportado, la concentración necesaria de la doxorubicina para causar daño al ADN en células cancerosas es mucho más pequeña en comparación con la concentración necesaria de los compuestos evaluados en este estudio, lo cual resultaría favorable si la doxorubicina fuera altamente selectiva para causar genotoxicidad únicamente a células cancerosas; sin embargo, también en la literatura se ha reportado el daño que causa a los glóbulos rojos provocando la hemólisis en los eritrocitos.

En la Figura 48, se presenta la hemólisis de eritrocitos provocada por la exposición de estas células a diferentes concentraciones de doxorubicina de acuerdo con lo reportado por Khan *et al.*,⁵¹ en el 2015, donde se establece que este fármaco causa lisis de eritrocitos de manera dependiente a la dosis.

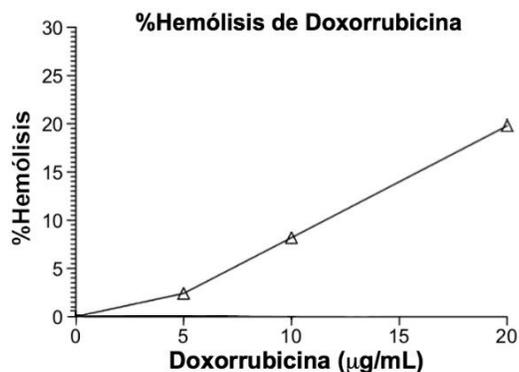


Figura 48. Actividad hemolítica de la doxorubicina sobre eritrocitos.

Con base en los resultados obtenidos y a la información reportada en la literatura, los compuestos sintetizados y evaluados en este proyecto, presentan ciertas ventajas sobre el fármaco de referencia utilizado.

Otro aspecto que es importante resaltar acerca de los derivados de 1*H* y 2*H*-benzotriazolil-acrilonitrilos es que presentan cierta fluorescencia gracias al tipo de enlaces que integran en su estructura, lo que nos sugiere que aquellos compuestos que no presentaron potencial actividad anticancerígena para ninguna de las líneas celulares pero fueron poco citotóxicos hacia células normales pueden ser utilizados como marcadores tumorales; tal es el caso de los compuestos **21a** y **21c** (Figura 49), los cuales no presentan actividad anticancerígena; sin embargo, al evaluar la citotoxicidad en células mononucleares a una concentración de 1000 µg/mL permiten una viabilidad cercana al 100%, de igual forma que al evaluar la citotoxicidad en esplenocitos murinos con la concentración de 10 µg/mL; bajo esta última concentración tampoco presentan daño al ADN en células de sangre

periférica, por lo tanto se sugieren posteriores estudios a dichos compuestos con la finalidad elucidar su correcta aplicación.

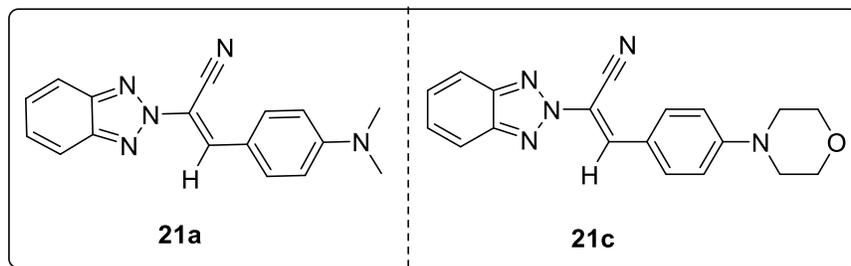


Figura 49. Compuestos propuestos para evaluarlos como marcadores fluorescentes.

CAPITULO VI

6.1 CONCLUSIONES

- ✚ Se sintetizaron cuatro ésteres derivados de pirazol, benzimidazol y benzotriazol (**3a**, **3b**, **5a** y **5b**), vía ultrasonido con rendimientos que van desde el 12 al 86% de rendimiento.
- ✚ Se obtuvieron dos ésteres derivados de benzotriazol **5a** y **5b**, debido al equilibrio tautomérico que presenta el benzotriazol, dando lugar a una mezcla de dos isómeros, favoreciendo al isómero de la posición 1H de acuerdo con la polaridad del disolvente empleado en la reacción (DMF, THF o CH₃CN).
- ✚ Se reportó una nueva ruta de síntesis mediante irradiación de microondas para la preparación de cuatro ácidos carboxílicos (**15a**, **15b**, **15c** y **15d**) empleando como precursores los azolil-ésteres (**3a**, **3b**, **5a** y **5b**), obteniendo rendimientos que van del 35 al 81%.
- ✚ Se sintetizaron 19 hidroxiamidas (**7-10a-e**) a través de una metodología de síntesis utilizando irradiación de microondas, empleando como precursores los ésteres **3a**, **3b**, **5a** y **5b**; con diferentes aminoalcoholes, tales como etanolamina, (S)-valinol, (S)-leucinol, (S)-fenilalaninol y (S)-fenilglicinol, obteniendo rendimientos favorables que van del 50 al 98%.

- ✚ Se sintetizaron dos azolil-acetonitrilos **17a** y **17b** a través de un método de síntesis asistido por ultrasonido, empleando como precursor el benzotriazol, dando origen a dos isómeros debido al equilibrio tautomérico que presenta el benzotriazol, favoreciendo la formación del isómero en posición 1H con un 75% de rendimiento.
- ✚ Se sintetizaron ocho aril-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** bajo condiciones de reflujo empleando como como precursores los azolil-acetonitrilos **17a** y **17b** respectivamente obteniendo rendimientos que van desde el 34 al 78%.
- ✚ Se llevó acabo la caracterización de cada uno de los compuestos sintetizados utilizando Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno y carbono trece (RMN ^1H y ^{13}C) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución, lo que permitió confirmar la estructura propuesta de cada uno de los compuestos.
- ✚ Por otro lado, se seleccionaron ocho aril-acrilonitrilos **20a-d** y **21a-d** para llevar a cabo la evaluación de la actividad anti-cáncer utilizando las líneas celulares MCF-7 y 4T1.
- ✚ Tres de los ocho compuestos evaluados (**20a**, **20b** y **21d**) mostraron potencial actividad anti-cáncer sobre la línea celular MCF-7, presentando porcentajes de viabilidad celular inferiores al 40% empleando la

concentración de 1000 µg/mL. No obstante, ninguno de los compuestos evaluados mostró potencial actividad anti-cáncer sobre la línea celular 4T1.

- ✚ Se comparó el IC₅₀ de los compuestos más activos (**20a**, **20b** y **21d**) sobre la línea MCF-7 con el IC₅₀ de la doxorubicina; sin embargo, ninguno resultó ser más activo que la doxorubicina.
- ✚ El compuesto **20b** resultó ser el menos citotóxico al ser evaluado sobre esplenocitos murinos a una concentración de 1000 µg/mL.
- ✚ Los compuestos **20a** y **21d** no presentaron citotoxicidad en células de sangre periférica mostrando mejores resultados que la doxorubicina, de acuerdo con lo reportado en la literatura.
- ✚ Ninguno de los compuestos potencialmente activos (**20a**, **20b** y **21d**) mostraron daño al ADN al evaluar la genotoxicidad a una concentración de 10 µg/mL.

6.2 PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la preparación de una serie más grande de ácidos carboxílicos bajo la ruta encontrada en este proyecto, con la finalidad de evaluar su actividad biológica.
- Evaluar la actividad anticáncer de los compuestos **20** y **21a-d** sobre otras líneas celulares cancerosas.
- Realizar un estudio detallado de la relación estructura química-actividad para los compuestos **20a** y **21d**.
- Evaluar la actividad anticancerosa *in vivo* de los compuestos **20a**, **20b** y **21d**.
- Llevar a cabo un estudio para evaluar los compuestos **21a** y **21c** como posibles marcadores celulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Día Mundial del Cáncer 2020: el cáncer en cifras y retos. <https://okdiario.com/curiosidades/dia-mundial-del-cancer-2020-cancer-cifras-retos-5124313> (consultado el 10 de febrero de 2020).
2. OMS, Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, IARC. https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2018/pdfs/pr263_E.pdf (consultado el 30 de octubre de 2019).
3. OMS, Cáncer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (consultado el 11 de febrero de 2020).
4. Día Mundial contra el Cáncer 2020. <https://www.infobae.com/america/mexico/2020/02/04/dia-mundial-contra-el-cancer-2020-aumento-20-mortandad-en-mexico-desde-el-ano-2000/> (consultado el 10 de febrero de 2020).
5. OMS, Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (consultado el 28 de marzo de 2019).
6. OMS, Cancer Today 2018, IARC. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id= (consultado el 30 de octubre de 2019).
7. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer; Comunicado de prensa N. 61/18: México, 2018; pp.1. y pp. 1-13. (consultado el 10 de febrero de 2020).
8. Benedí, J.; Gómez del Río, M.A. Farm. Prof. **2006**, 20(1), 60-65. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13084621> (consultado el 20 de abril de 2020).

9. INC (Instituto Nacional del Cáncer), Tipos de tratamiento 2017. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (consultado el 28 de marzo de 2018).
10. American Cancer Society, Cómo funcionan los medicamentos en quimioterapia, noviembre 2019. https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html#escrito_por (consultado el 21 de abril de 2020).
11. Bansal, S.; Halve, A.K. *Int. J. Pharm.* **2014**, 5(11), 4601-4616
12. FQUNAM, Azoles. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/AZOLES_11346.pdf (recuperado el 20 de febrero de 2020).
13. Cwik, A.; Hell, Z.; Hegedus; Finta, Z.; Horváth, Z. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3985-3987.
14. Xu, Q.; Li, Z. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 6838-6840.
15. Ilkgul, B.; Gunes, D.; Sirkecioglu, O.; Bicak, N. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5313-5315.
16. Avalos-Alanís, F.G.; Hernández-Fernández, E.; Hernández-Romero, R.; López-Cortina S.; Ordoñez, M.; García-Barradas O.; Lagunas-Rivera, S. *Tetrahedron Asymmetry.* **2014**, 25, 156-162.
17. Sharma, R.; Vadivel, S. K.; Duclos R. I.; Makriyannis, A. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 5780–5782.
18. Hassani, R.; Requet, A.; Marque, S.; Gaucher, A.; Prim, D.; Kacem, Y.; Hassine, B.B. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2014**, 25, 1275-1279.
19. Garg, P.; Chaudhary, S.; Milton, M. D. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8668 - 8677.
20. Zhang, S.; Luo, Y.; Liang-Qiang, H.; Zhi-Jun, L.; Ai-Qin, J.; Yong-Hua, Y.; Hai-Liang, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 3723-3729.
21. Yoon, Y.K.; Ali, M.A.; Wei, A.C.; Choon, T.S.; Osman, H.; Parang, K.; Shirazi, A.N. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 703-710.
22. Meng-Yue, Z.; Young, Y.; Xiao-Wei, Y.; Chetan, B.S.; Shu-Fu, W.; Ai-Min, L.; Li-Fang, Y.; Peng-Cheng, L.; Ming-Guo, J.; Hai-Liang, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 46-54.

23. Banday, A. B.; Giri, A. K.; Parveen, R.; Bashir, N.; *Steroids* **2014**, 87, 93-98.
24. Alexandru, M. G.; Velickovic, T. C.; Krstic, M.; Hrubaru, M. M. *J. of Molecular. Structure* **2013**, 1041, 55-60.
25. T. Zhan; H. Lou. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 865-869.
26. Y.A. Al-Soud; N.A. Al-Masoudi; R. Ferwanah Ael. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 1701-1708.
27. Lu, Yu.; Liu, Y.; Yang, C. *J. Vis. Exp.* **2017**, 128, 1-6.
28. B.R. Hearn; S.J. Shaw; D.C. Myles. *Comprehensive Med. Chem.* **2007**, 2, 81-110.
29. N. Mahindroo; J.P. Liou; J.Y. Chang; H.P. Hsieh. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, 16, 647-691.
30. S.K. Thair; P. Kovar; S.H. Rosenberg; S.C. Ng. *BioTechniques.* **2000**, 29, 156-160.
31. Fleming, F.F.; Yao, L.; Ravikumar, P.C.; Funk, L.; Shook, B.C. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7902-7917.
32. Carta, A; Briguglio, I.; Boatto, G.; La Colla, P.; Loddo, R.; Tolomeo, M.; Grimaudo, S.; Di Cristina, A.; Pipitone, R.M.; Laurini, E.; Paneni, M.S.; Posocco, P.; Femeglia, M.; Prici, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4151-4167
33. Hernández-Fernández, E.; Sánchez-Lara, P.P.; Ordoñez, M.; Ramírez-Marroquín, O.A.; Avalos-Alanís, F.G.; López-Cortina, S.; Jiménez-Pérez, V.M.; Ibarra-Rivera, T.R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, 26, 73-78.
34. Alam, M.S.; Nam, Y.; Lee, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 69, 790-797.
35. Díaz, J. E.; Gruber, N.; Orelli, L. R.; *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 6443-6445.
36. MestReNova 9.0, Mestrelab Research (chemistry software solutions)
https://mestrelab.com/downloads/manuals/MestReNova-9.0.1_Manual.pdf

37. ChemDraw Professional 15.0 "C:\Program Files (x86)\CambridgeSoft\ChemOffice2015\ChemDraw\ChemDraw.exe"
38. Karthikeyan, C.; Solomon, V.R.; Lee, H.; Trivedi, P. *Arab. J. Chem.* **2013**, 1-7.
39. Gowda, N.R.; Kavitha, C.V.; Chiruvella, K.K.; Joy, O.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4594–4600.
40. Cruz, I.A. *Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad citotóxica y anticancerígena de β -Hidroxiacetamidas*. FCQ, UANL, **2016**, 5, 97-101.
41. Lee, A.V.; Oesterreich, S.; Davidson, N.E.; *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, 107, 1-4.
42. ECACC, Public Health England. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/130237/mcf7-cell-line-profile.pdf> (recuperado el 17 de octubre de 2019).
43. Ren, Y.; Zhang, L.; Zhou, CH.; Geng, RX. *Med. Chem.* **2014**, 4, 640-662.
44. Tratamientos para el cáncer de mama con receptores positivos. https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal/tratamientos_rhpositivos (recuperado el 17 de octubre del 2019).
45. Formulario Modelo de la OMS 2004. <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/12.2html#Js5422s.12.2> (recuperado el 27 de septiembre de 2019).
46. Gumulec, J.; Fotju, M.; Raudenska, M.; Sztalmachova, M.; Skotakova, A.; Vlachova, J.; Skalickova, S.; Nejdil, L.; Kopel, P.; Knopfova, L.; Adam, V.; Kizek, R.; Stiborova, M.; Babula, P.; Masarik, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 22960-22977).
47. Rodríguez-Rey, A.; Noris-García, E.; Torres-Fundora, M. *Rev. Cubana Invest Bioméd.* **2016**, 35, 184-194.
48. Ansoar-Rodríguez, Y.; Fontanetti, C. S.; Christofolletti, C. A.; Díaz-Llera, C.; *CENIC C. Biol.* **2015**, 46, 51-62.
49. Monroy, C.M.; Cortés, A. C.; Sicard, D. M. *Groot de R.H. Bioméd.* **2005**, 25, 335-345.

50. Yanxin, L.; Yang, L.; Chunzhang, Y. *J. Vis. Exp.* **2017**, 128, 1-6.
51. Khan-Masood, A.; Aljarbou-Ahmed, N.; Aldebasi-Yousef, H.; Alorainy-Mohammed, S.; Khan, A. *Int. J. Nanomedicine.* **2015**, 10, 6331-6338.
52. Briguglio; S. Piras, P; P. Corona; E. Gavini; M. Nieddu; G. Boatto; A. Carta. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2014**, 16-19.
53. Gaikwad, N.D.; Patil S.V.; Babade, V.D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3449-3454.