



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
QUÍMICA MEDICINAL

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DIHIDROPIRIMIDINTIONAS
QUIRALES DE INTERÉS TERAPÉUTICO ASISTIDA POR MICROONDAS”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q. Karen Rodríguez Villar

2132800421

COMITÉ TUTORIAL

Cotutor: M. en C. Olivia Soria Arteché

Cotutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Asesor: M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan

Enero, 2016

Síntesis y evaluación biológica de dihidropirimidintionas quirales de interés terapéutico asistida por microondas

Vo.Bo. del Comité tutorial

Cotutor: M. en C. Olivia Soria Arteché _____

Cotutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva _____

Asesora: M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan _____

Alumna

Karen Rodríguez Villar

Matrícula: 2132800421

Síntesis y evaluación biológica de dihidropirimidintionas quirales de interés terapéutico asistida por microondas

JURADO

Dr. José Ignacio Regla Contreras
Presidente

M. en C. Olivia Soria Arteché
Secretario

Dr. Eduardo González Zamora
Vocal

Resumen

El (*S*)-Monastrol es una dihidropirimidintiona identificada como potente anticancerígeno, inhibidor específico de la kinesina Eg5, por ello se utiliza como núcleo base para la síntesis de análogos que puedan mejorar dicha actividad.

En este trabajo se presenta la síntesis de seis enaminonas quirales empleando síntesis convencional y asistida por microondas. Además de la síntesis de diez dihidropirimidintionas por una reacción de multicomponentes tipo Biginelli, usando aldehídos aromáticos, tiourea y enaminonas como auxiliares quirales.

Las dihidropirimidintionas se obtuvieron como mezclas de enantiómeros, las cuales fueron evaluadas contra seis líneas celulares de cáncer humano, encontrando tres moléculas con mejor actividad biológica que el monastrol.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, a su programa de posgrado de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y al laboratorio de Síntesis y asilamiento de sustancias bioactivas (N-015) por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación para obtener el grado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACyT*) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto. Beca **538233**

Al Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirnos realizar los ensayos biológicos.

A Anton Paar Mexico por permitirnos utilizar sus instalaciones y equipos.

A mis asesores, la M. en C. Olivia Soria Arteche, el Dr. Jaime Pérez Villanueva y la M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan por su participación, orientación y el apoyo brindado para la culminación del proyecto.

*A la Dra. Ma. Concepción Lozada García[†]
y a todas las personas que me acompañaron
a lo largo de este camino.*

-

ÍNDICE GENERAL

Índice de compuestos sintetizados.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
3. Marco teórico.....	7
3.1. El cáncer.....	7
3.2. Tratamiento contra el cáncer.....	8
3.2.1. Cirugía.....	9
3.2.2. Radioterapia.....	9
3.2.3. Quimioterapia.....	9
3.3. Búsqueda y evaluación <i>in vitro</i> de nuevos fármacos con actividad antineoplásica.....	10
3.4. Importancia de la quiralidad.....	12
3.5. Síntesis asimétrica.....	13
3.5.1. Enaminonas como inductores quirales.....	14
4. Planteamiento del problema.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivos.....	18
6.1. Objetivo general.....	18
6.2. Objetivos específicos.....	18
7. Metodología.....	19
7.1. Síntesis de enaminonas quirales.....	19
7.1.1. Síntesis convencional.....	19
7.1.2. Síntesis asistida por microondas.....	19
7.2. Síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20).....	20
7.3. Síntesis general de dihidropirimidintionas quirales.....	20
7.3.1. Síntesis de dihidropirimidintionas 21-26.....	20
7.3.2. Síntesis de dihidropirimidintionas 27-29.....	21
7.4. Evaluación de la actividad citotóxica en líneas de cáncer humano por el método de Sulforrodamina B.....	21
7.5. Relaciones estructura-actividad y acoplamiento molecular.....	22
8. Resultados y discusión.....	23
8.1. Síntesis de enaminonas quirales.....	23
8.2. Elucidación estructural de enaminonas.....	25

8.2.1.	Enaminonas de L-prolina-OMe	25
8.2.2.	Enaminonas de L-treonina-OMe	30
8.2.3.	Enaminona (S,Z)-fenil-3-((1-feniletil)amino)but-2-en-1-ona (11)	32
8.2.4.	Enaminona (Z)-3-(metilamino)-1 fenilbut-2-en-1-ona (14)	35
8.3.	Síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20).....	36
8.3.1.	Elucidación estructural del compuesto 20	37
8.4.	Síntesis de dihidropirimidintionas (DHPT)	39
8.4.1.	Optimización de condiciones de reacción.....	39
8.4.2.	Síntesis de dihidropirimidintionas 21-26	41
8.4.2.1.	Elucidación estructural de dihidropirimidintionas 21-26.....	42
8.4.3.	Síntesis de dihidropirimidintionas 27–29.....	47
8.4.3.1.	Elucidación estructural de las dihidropirimidintionas 27–29	48
8.5.	Pureza óptica de las dihidropirimidintionas	51
8.6.	Derivatización de enantiómeros	55
8.7.	Actividad citotóxica, relaciones estructura-actividad y acoplamiento molecular.....	57
9.	Conclusiones	66
10.	Parte experimental.....	67
10.1.	Material y equipos	67
10.2.	Procedimiento general para la obtención de enaminonas	68
10.2.1.	Síntesis convencional	68
10.2.2.	Síntesis asistida por microondas.....	68
10.3.	Procedimiento general para la síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20)	71
10.4.	Procedimiento general para la síntesis de DHPT 21-26	71
10.5.	Procedimiento general para la síntesis de DHPT 27-29	74
10.6.	Evaluación de la actividad citotóxica.....	75
10.7.	Preparación de los ligandos y la proteína Eg5.....	76
10.8.	Acoplamiento molecular	77
11.	Referencias	78
	Anexos	81
I.	Espectros	81
II.	Trabajos presentados	100

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de Biginelli	2
Esquema 2. Metodologías propuestas para la síntesis estereoselectiva	4
Esquema 3. Mecanismo de formación de pirimidinonas catalizadas por (S)-L-prolina	5
Esquema 4. Síntesis de dihidropirimidintionas vía formación de tetrahidropirimidintionas	6
Esquema 5. Reacción general para la preparación de enaminonas	16
Esquema 6. Síntesis de enaminonas	19
Esquema 7. Síntesis del compuesto 20	20
Esquema 8. Síntesis de dihidropirimidintionas quirales 21–26	21
Esquema 9. Síntesis de dihidropirimidintionas 27–29	21
Esquema 10. Mecanismo de reacción para formación de enaminonas	24
Esquema 11. Síntesis de tetrahidropirimidintionas	36
Esquema 12. Mecanismo de reacción con TMSCl	40
Esquema 13. Formación de DHPM vía enaminonas	54
Esquema 14. Síntesis de diasterómeros de DHPT con (S)-ibuprofeno	55

INDICE DE FIGURAS

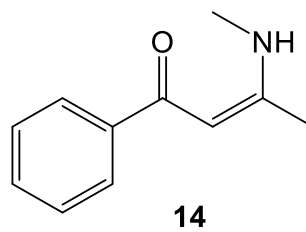
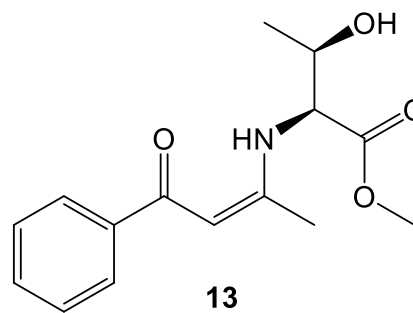
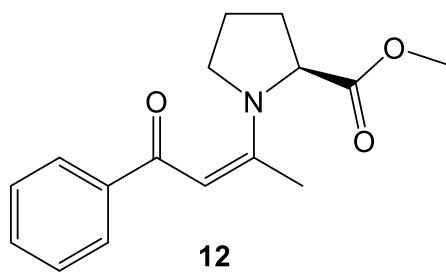
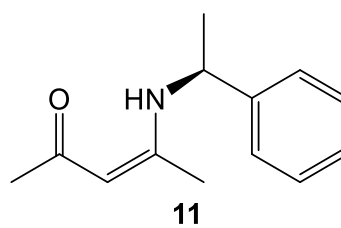
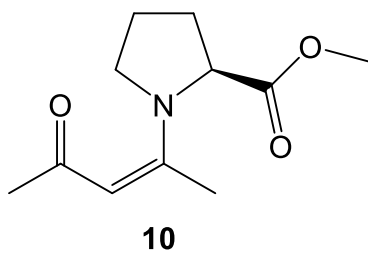
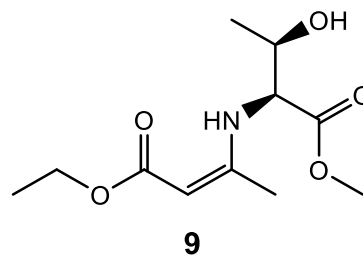
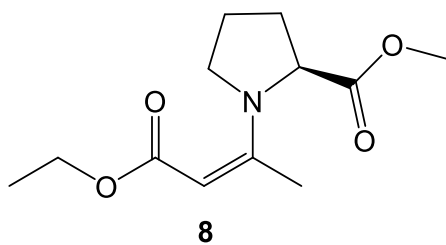
Figura 1. Enantiómeros de DHPMs con actividad biológica	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad para los diferentes tipos de cáncer en población mexicana masculina y femenina de todas las edades.....	8
Figura 3. Reactividad de la enaminona como nucleófilo y electrófilo.....	15
Figura 4. Proceso general para la evaluación citotóxica por el método de SRB	22
Figura 5. Valores experimentales de pKa para los hidrógenos α de los compuestos 1,3-dicarbonílicos.....	24
Figura 6. Espectro de infrarrojo del compuesto 8	26
Figura 7. Espectro de RMN ^1H de la enaminona 8	27
Figura 8. Espectro de RMN de carbona para la enaminona 8	29
Figura 9. Espectro de infrarrojo para la enaminona 9	30
Figura 10. Espectro de infrarrojo para la enaminona 11	33
Figura 11. A: Espectro de RMN ^1H de 11 , B: Espectro de RMN ^{13}C de 11	34
Figura 12. Espectro de RMN ^1H para la enaminona 14	35
Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C para la enaminona 14	36
Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 20	38
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H del producto 20	38
Figura 16. Espectro de infrarrojo del compuesto 22	42
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 21	45
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 21	47
Figura 19. Espectro de infrarrojo para el compuesto 29	49
Figura 20. Espectro de RMN ^1H del éster diastereoisómero 30	56
Figura 21. Estructura de las dihidropirimidintionas	58
Figura 22 Porcentaje de inhibición del crecimiento por la línea celular para DHPTs.	59
Figura 23. Estructura cristalográfica de monastrol unido a la proteína Eg5.	60
Figura 24. Interacciones por puente de hidrógeno en la estructura cristalográfica de monastrol unido a la proteína Eg5.	60
Figura 25. Estructura 2D del (R)-Mon-97 y acoplamiento molecular del (R)-Mon-97 y (S)-Monastrol en el sitio activo de Eg5. (Las imágenes fueron tomadas del artículo original de García-Saez y colaboradores).	61
Figura 26. Modos de unión encontrados por acoplamiento molecular para monastrol (21).	62
Figura 27. Modo de unión a Eg5 calculado por acoplamiento molecular para 22 , 24 y 25	63
Figura 28. Modo de unión a Eg5 calculado por acoplamiento molecular para 20 , 23 , 26 y 29	64

ÍNDICE DE TABLAS

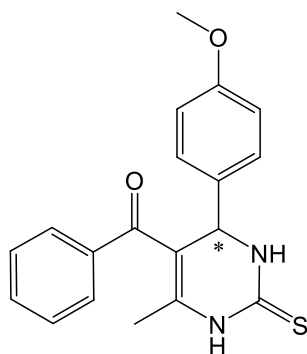
Tabla 1. Condiciones de reacción y propiedades fisicoquímicas de las enamionas 8-14	23
Tabla 2. Resumen de señales encontradas en IR y UV-vis para enamionas de L-prolina-OMe.....	26
Tabla 3. Propiedades espectroscópicas en RMN ¹ H para enamionas de L-prolina-OMe.....	28
Tabla 4. Propiedades espectroscópicas en RMN de ¹³ C para las enamionas de L-prolina-OMe.....	29
Tabla 5. Señales observadas en infrarrojo y UV-vis para enamionas de L-treonina-OMe.....	31
Tabla 6. Propiedades espectroscópicas en RMN ¹ H para enamionas de L-treonina-OMe.....	32
Tabla 7. Desplazamientos químicos en RMN de ¹³ C para las enamionas de L-treonina-OMe.....	32
Tabla 8. Señales en RMN ¹ H y RMN ¹³ C para la enamionona 11	34
Tabla 9. Rendimientos y condiciones de reacción para la síntesis de DHPT	39
Tabla 10. Rendimiento, tiempo de reacción y propiedades de las dihidropirimidintionas 21-26	41
Tabla 11. Bandas características para las DHPT 21-26 en espectroscopia de IR....	43
Tabla 12. Señales más importantes de RMN de ¹ H para los compuestos 21-26	44
Tabla 13. Señales representativas en RMN de ¹³ C para las DHPT 21-26	46
Tabla 14. Tiempo de reacción, rendimiento y punto de fusión de las dihidropirimidintionas 27-29	48
Tabla 15. Resumen de señales identificadas en infrarrojo para las DHPT 27-29	49
Tabla 16. Asignación de señales en RMN ¹ H para las DHPT 27-29	50
Tabla 17. Asignación de señales de RMN de ¹³ C para las DHPT 27-29	51
Tabla 18. Valores de rotación óptica específica para las DHPT	52
Tabla 19. Energía de unión derivada del acoplamiento molecular para 21, 22, 24 y 25	63
Tabla 20. Energía de unión derivada del acoplamiento molecular para 20, 23, 26 y 29	63
Tabla 21. Energía de unión calculada para los enantiómeros R y S de 20-26, 29	64
Tabla 22. Determinación de la concentración inhibitoria 50 para las líneas K562 y HCT-15.....	65
Tabla 23. Densidad de inóculo para las líneas celulares de cáncer humano	75

Índice de compuestos sintetizados

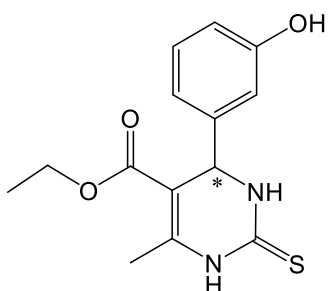
Enaminonas



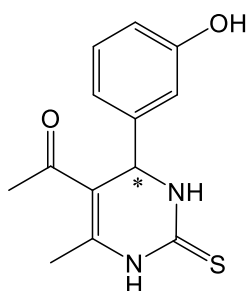
Dihidropirimidintionas



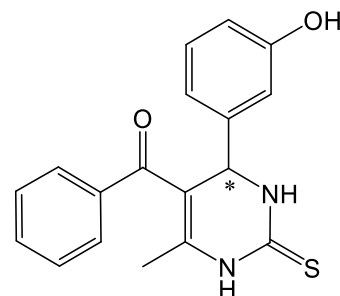
20



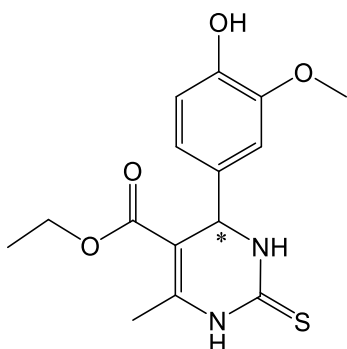
21



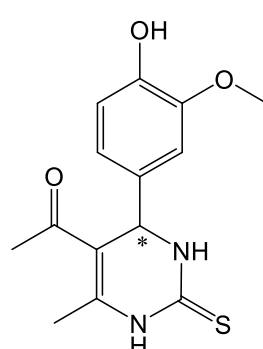
22



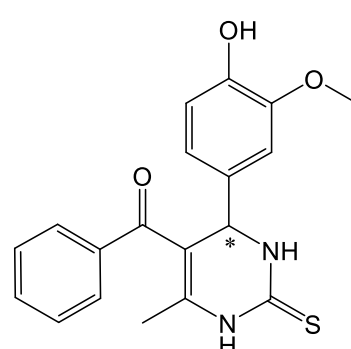
23



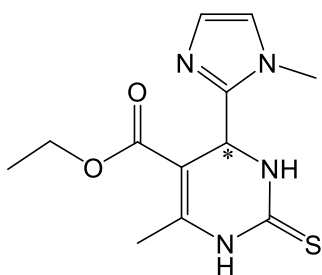
24



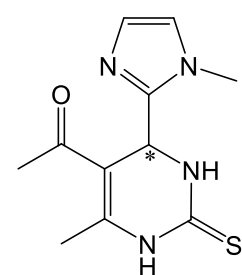
25



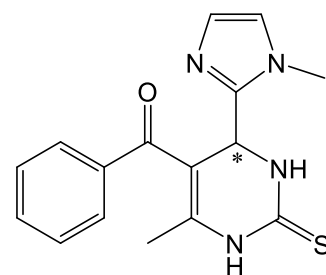
26



27



28



29

Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
ADT	<i>AutoDock Tools</i>
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
cm ⁻¹	Centímetros a la menos 1
L-prolina-OMe-HCl	Clorhidrato del éster metílico de L-prolina
TMSCI	Cloruro de tetrametilsilano
Cl ₅₀	Concentración Inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
DCM	Diclorometano
DHPM	Dihidropirimidinonas
DHPMs	Dihidropirimidinas
DHPT	Dihidropirimidintionas
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\Delta G_{\text{unión}}$	Energía mínima de unión
EtOH	Etanol
L-prolina-OMe	Éster metílico de L-prolina
L-treonina-OMe	Éster metílico de L-treonina
<i>e.e.</i>	Exceso enantiomérico
°C	Grados Celsius
h	Horas
IR	Infrarrojo
λ_{max}	Longitud de onda máxima
MHz	MegaHerz
MeOH	Metanol
MO	Microondas
μL	Microlitros
mL	Mililitros
min	Minutos

Índice

nm	Nanómetros
ppm	Partes por millon
%IC	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento
%R	Porcentaje de Rendimiento
PF.	Punto de Fusión
RMC	Reacción de Multicomponentes
rpm	Revoluciones por minuto
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación óptica específica a 25 °C y 589 nm
$[\alpha]$	Rotación óptica
SRB	Sulforrodamida B
T	Temperatura
T.A.	Temperatura ambiente (25°C)
THPT	Tetrahidropirimidintionas
t rxn	Tiempos de reacción
TEA	Trietilamina
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

1. Introducción

El cáncer constituye un grave problema de salud pública, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México y en el mundo,²² aunado a la falta de alternativas seguras en la quimioterapia, esta situación mantiene a la comunidad científica y la industria farmacéutica en una constante búsqueda de nuevos y mejores fármacos con menores efectos secundarios en comparación con los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado, por esta razón se desarrollan nuevas moléculas activas como es el caso del (S)-Monastrol, el cual pertenece a la familia de las dihidropirimidinas (DHPMs).¹

Las DHPMs se obtienen a partir de una reacción multicomponentes de tipo Biginelli, y actualmente se buscan nuevas metodologías en síntesis asimétrica que permitan obtener los enantiómeros puros con el fin de mejorar la actividad biológica.¹ Algunas de las alternativas propuestas son a través del uso de auxiliares quirales¹⁸ y catalizadores asimétricos¹², sumado al uso de irradiación de microondas para optimizar la preparación de estos compuestos.²¹

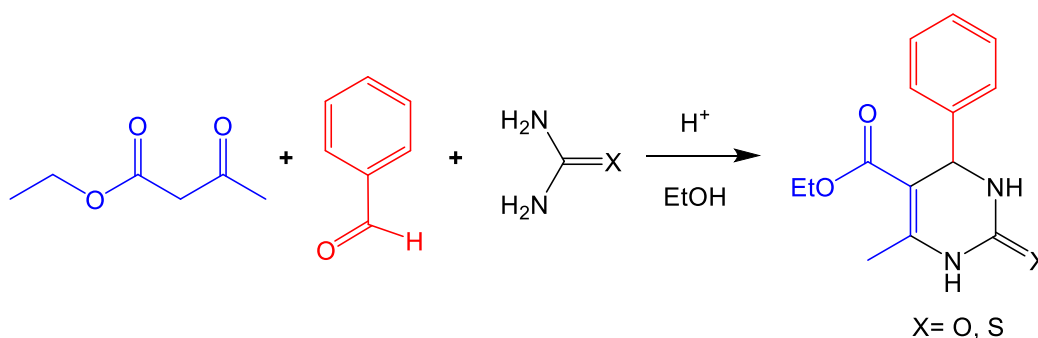
El objetivo de este trabajo es obtener dihidropirimidintionas (DHPT) mediante una reacción multicomponentes de tipo Biginelli; dado a que es importante obtener estos compuestos como enantiómeros puros, se emplearon enamionas quirales, aldehídos aromáticos y tiourea para su preparación, bajo la hipótesis de que las enamionas quirales permitirán obtener DHPT enantioméricamente puras o con altos excesos enantioméricos. Además se busca obtener estas moléculas para evaluar su actividad citotóxica sobre seis líneas celulares de cáncer humano: HCT-15 (colon), U251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), MCF-7 (mama) y SKLU (pulmón).

El presente trabajo busca aportar conocimiento básico sobre los métodos para obtener DHPT enantioméricamente puras y conocer más sobre los requerimientos estructurales que deben tener los análogos de monastrol para presentar una mejor actividad como compuestos anticancerígenos.

2. Antecedentes

Las reacciones multicomponentes (RMC) tienen una larga historia que inicio con la síntesis de aminoácidos desarrollada por Strecker en 1850, seguida de la síntesis de Hantzsch para obtener dihidropiridinas (1882), la síntesis de Biginelli para obtener dihidropirimidinas (1891), la reacción de Mannich (1912), las reacciones de Passerini (1921) y las reacciones de cuatro componentes de Ugi (1959), todas ellas con el objetivo de sintetizar moléculas complejas en un solo paso.² Por ello, una reacción de multicomponentes (RMC) se define como el proceso en que tres o más reactivos se combinan en un sólo paso para formar un producto más complejo que incorpora características estructurales de cada reactivo.^{1,2}

Las RMC cobraron mayor importancia a partir de la segunda mitad del siglo XX por su simplicidad y eficiencia para obtener nuevas moléculas con estructuras diversas y potencial biológico.² Una de las RMC más empleadas es la desarrollada por el químico italiano P. Biginelli en 1891,³ la cual emplea un compuesto β -dicarbonílico, (tio)urea y un aldehído para obtener un compuesto denominado 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona (DHPM) o su análogo 2-tiona (DHPT), también llamados compuestos de Biginelli (Esquema 1).⁴ Estos compuestos adquirieron gran importancia en la segunda mitad del siglo XX por el descubrimiento de su actividad biológica,⁵ entre las que se describen su acción como moduladores del canales de calcio, antihipertensivos,⁶ antibacterianos, antimicóticos,⁷ antiprotozoarios,⁸ antiinflamatorios,⁹ antioxidantes, anticancerígenos¹⁰ y antivirales.¹¹



Esquema 1. Reacción de Biginelli

En las últimas décadas han incrementado las investigaciones para el desarrollo de síntesis enantioselectivas, debido a las diferencias observadas en la actividad biológica de los enantiómeros, por ejemplo: el (*S*)-Monastrol es 15 veces más potente que (*R*)-Monastrol como anticancerígeno, y el isómero (*R*) del SQ32926 es 400 veces más potente como antihipertensivo que el isómero (*S*) (Figura 1). Con base a lo anterior es de gran importancia desarrollar métodos de síntesis enantioselectiva de derivados de DHPMs con la finalidad de mejorar la actividad farmacológica.^{1, 4, 12}

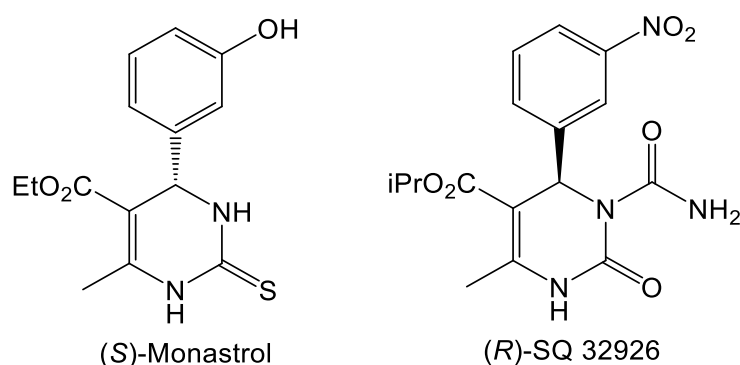
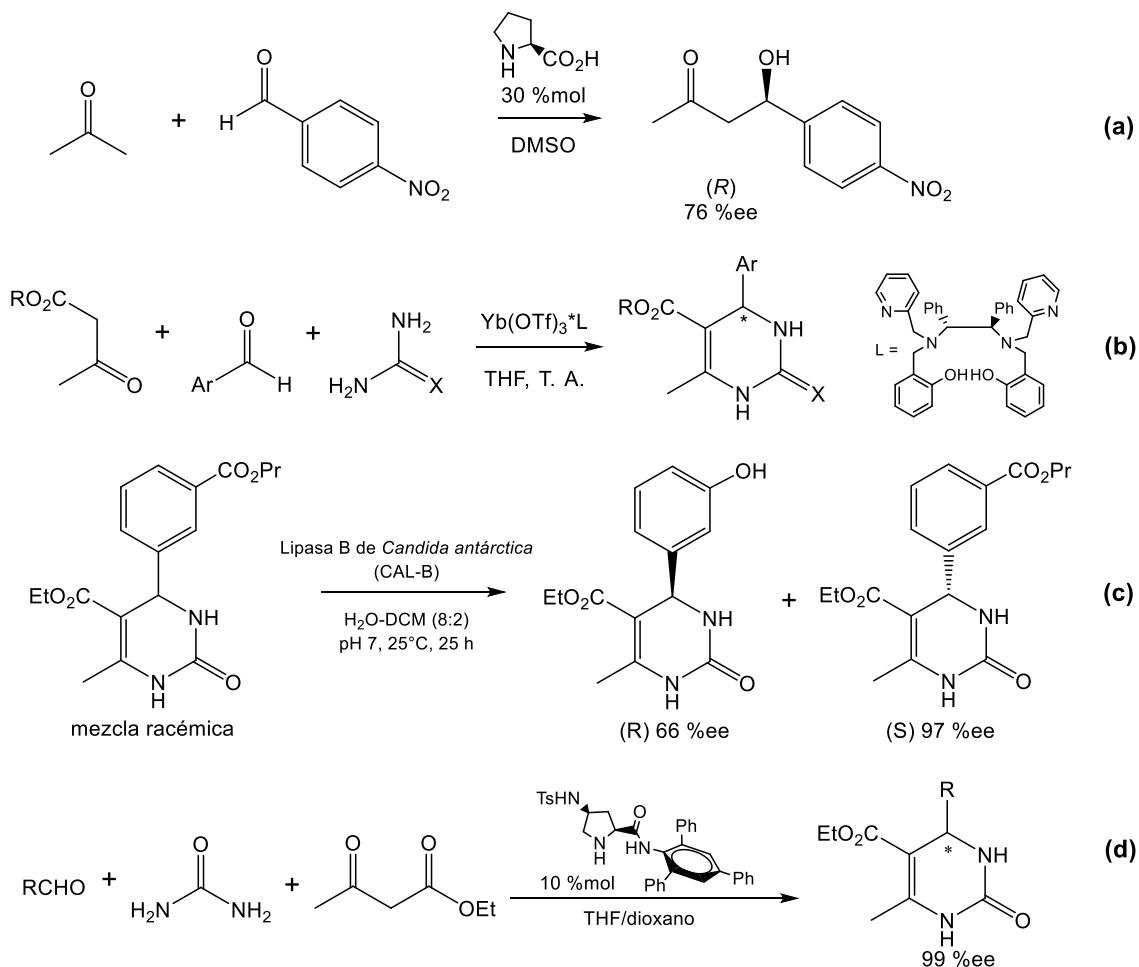


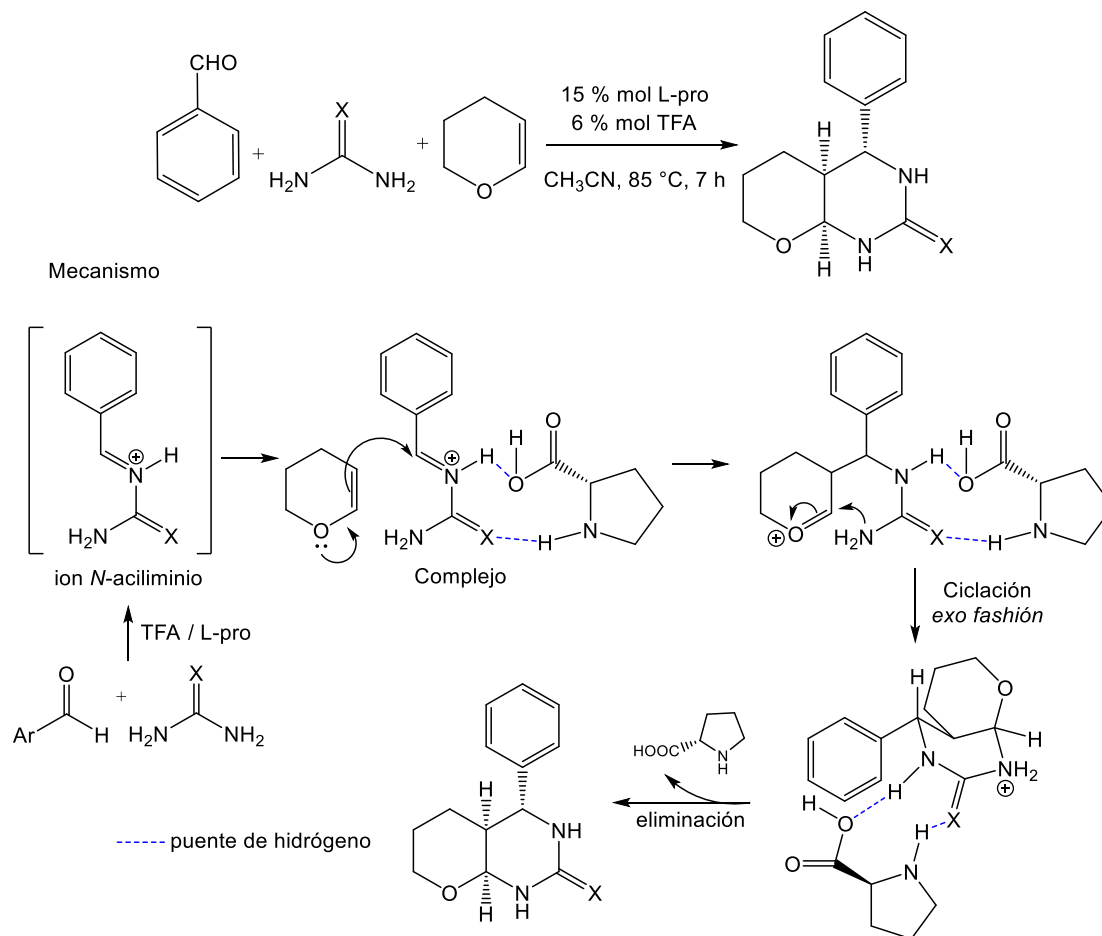
Figura 1. Enantiómeros de DHPMs con actividad biológica

Algunas de las metodologías propuestas para la síntesis estereoselectiva involucran el uso de catalizadores quirales (Esquema 2a),¹³ complejos metálicos quirales como el derivado de trifluorometilsulfonato de iterbio ($\text{Yb}(\text{OTf})_3 \cdot \text{L}$) (Esquema 2b),¹⁴ resolución enzimática de una mezcla racémica (Esquema 2c),¹⁵ y catalizadores asimétricos voluminosos que favorecen la enantioselectividad por impedimento estérico (Esquema 2d),¹⁶ entre otros.



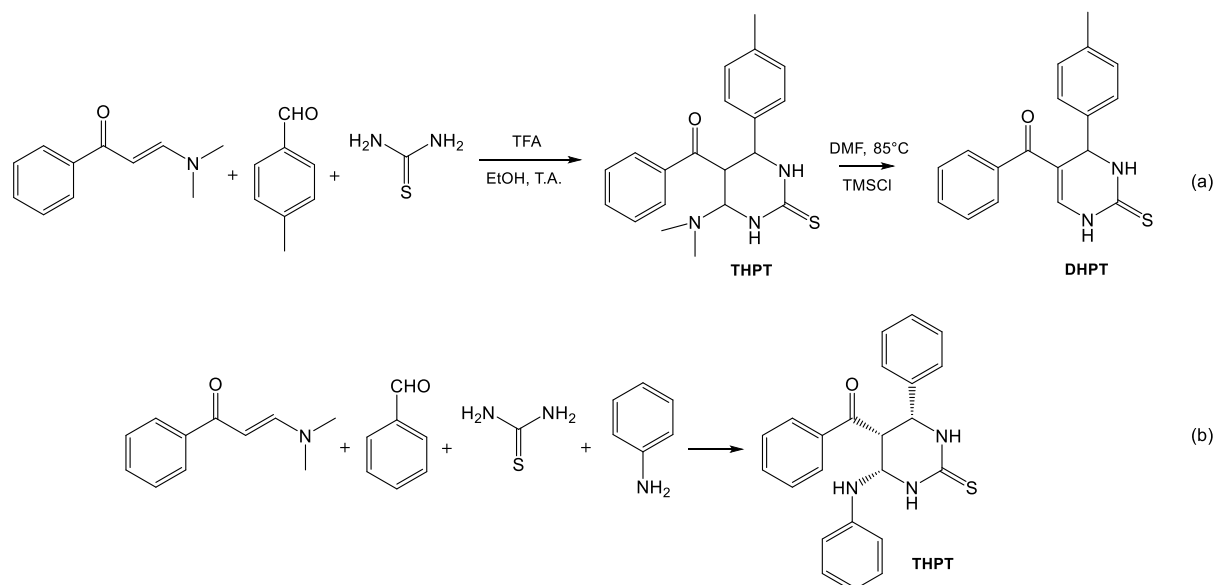
Esquema 2. Metodologías propuestas para la síntesis estereoselectiva

En los últimos años el uso de catalizadores quirales se ha intensificado por su capacidad para favorecer la formación de uno de los enantiómeros, tal es el caso de la (S)-L-prolina^{13,17} que ha dado buenos resultados para obtener productos ópticamente activos, mientras que el uso de su éster metílico (L-prolina-OMe-HCl) como catalizador reporta la obtención de mezcla racémicas vía formación *in situ* de enaminonas con un centro quiral.¹⁸ Por otro lado, Pandey J. y colaboradores¹⁹ reportaron la obtención de análogos de DHPMs enantioméricamente puros con buenos rendimientos empleando (S)-L-prolina como catalizador, justificando la enantioselectividad de la reacción por la formación de un complejo entre el ion *N*-aciliminio y (S)-L-prolina a través de puentes de hidrógeno (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo de formación de pirimidonas catalizadas por (*S*)-L-prolina

En años recientes Wan J. y colaboradores reportaron una variante de la reacción de Biginelli utilizando una enaminona, un aldehído y tiourea para obtener DHPT con buenos rendimientos, planteando la formación de tetrahidropirimidintionas (THPT) como intermediario clave para obtener las DHPT vía una eliminación de Hoffman. (Esquema 4a).²⁰ En un trabajo posterior presentaron la síntesis enantioselectiva de tetrahidropirimidintionas quirales, como precursoras de las DHPT a partir de una enaminona, un aldehído, anilina y tiourea, obteniendo sólo uno de los diastéromeros (Esquema 4b). Con esta aportación se abrió la posibilidad de obtener las DHPT enantioméricamente puras a partir de las THPT, mediante una eliminación de Hoffman, utilizando enaminonas como material de partida.²¹



Esquema 4. Síntesis de dihidropirimidintiones vía formación de tetrahidropirimidintiones

Por otro lado, en las últimas décadas la síntesis asistida por microondas ha cobrado gran importancia en la química combinatoria por las ventajas que ofrece en reacciones de cicloadición y síntesis de heterociclos, como son mejoras significativas en los rendimientos, menor número de subproductos y disminución en los tiempos de reacción. Es por ello, que el uso de microondas en la síntesis de heterociclos ha permitido la generación de bibliotecas de compuestos con potencial biológico.

Hoy en día la síntesis asistida por microondas ha permitido desarrollar metodologías alternativas donde se pueden llevar a cabo reacciones en ausencia de disolvente y catálisis por transferencia de fase para la síntesis de heterociclos como las DHPMs con excelentes resultados, ofreciendo una alternativa rápida, económica, eficaz y amigable al ambiente.^{22, 23}

3. Marco teórico

3.1. El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, tan solo en 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con este padecimiento y se prevé que en los próximos 20 años el número de nuevos casos aumente un 70%.²⁴

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se define como un grupo de enfermedades relacionadas que afectan a las células de cualquier parte del organismo, se caracteriza por la multiplicación descontrolada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales, invadiendo partes adyacentes del cuerpo o propagándose a otros órganos. Estas células anormales forman una masa de tejido que se denomina tumor, el cual puede ser benigno o maligno.^{24, 25}

Los tumores benignos no son cancerígenos por lo que pueden eliminarse y en la mayoría de los casos no reaparecen. Las células de este tipo de tumor no se diseminan a otras partes del cuerpo reduciendo considerablemente el riesgo de muerte, mientras que los tumores malignos son cancerígenos debido a que las células tienen anomalías que afectan la división celular favoreciendo la proliferación descontrolada hacia los tejidos adyacentes.²⁵

Hoy en día las causas de esta enfermedad no están definidas claramente, sin embargo se relacionan con factores genéticos del paciente y algunos agentes externos. Estos últimos pueden ser físicos como las radiaciones ultravioleta o ionizantes, químicos como los asbestos, aflatoxinas o el arsénico y biológicos como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos. Además de algunos factores de riesgo conductuales y dietéticos como son un elevado índice de masa corporal, el consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y el consumo de tabaco y alcohol.^{24, 26}

A nivel mundial, los tipos de cáncer que causan mayor número de defunciones son:

- Pulmonar (1.59 millones de defunciones)
- Hepático (745 000 defunciones)
- Gástrico (723 000 defunciones)
- Colorrectal (694 000 defunciones)
- Mamario (521 000 defunciones)
- Esofágico (400 000 defunciones)

El 70 % de estas defunciones se registraron en África, Asia, América Central y Sudamérica, siendo todas regiones de bajos y medianos ingresos.²⁴

Por otro lado, la incidencia y mortalidad para cada tipo de cáncer varía de acuerdo al sexo y edad, encontrando que en México los principales tipos de cáncer que afectan a la población masculina de todas las edades son de próstata y pulmonar, mientras que para las mujeres son el mamario y cervicouterino, seguido del cáncer colorrectal y gástrico para ambos sexos. (Figura 2) ²⁷

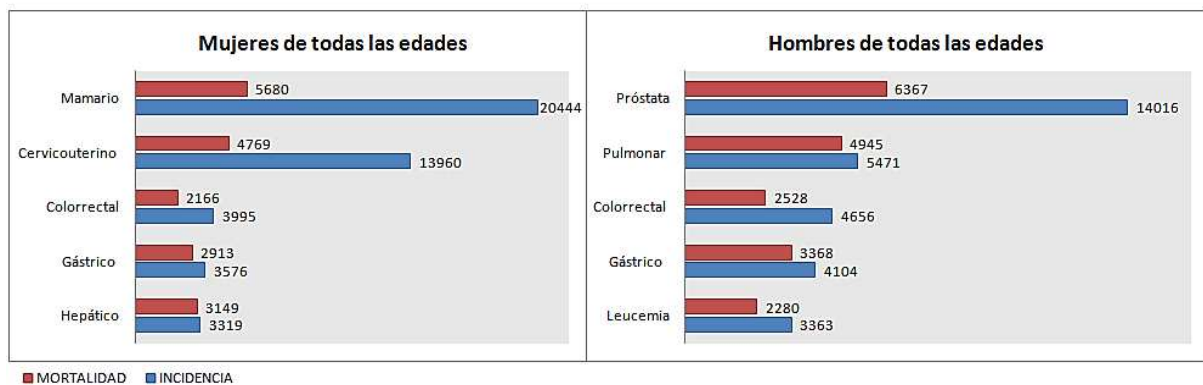


Figura 2. Incidencia y mortalidad para los diferentes tipos de cáncer en población mexicana masculina y femenina de todas las edades

3.2. Tratamiento contra el cáncer

Hoy en día existe una gran variedad de alternativas terapéuticas para el tratamiento de los distintos tipos de cáncer y la elección dependerá del tipo de tumor, la localización y el estadio clínico. En la mayoría de los casos se utiliza una combinación de tratamientos con el objetivo curar la enfermedad o prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente. Dentro de las terapias disponibles encontramos la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, trasplante de células madre, entre otras; siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia los tratamientos más usados en la práctica clínica por su alta tasa de éxito.^{28, 29, 30}

3.2.1. Cirugía

La cirugía es el tratamiento de primera línea para eliminar el cáncer en sus primeras etapas, cuando el tumor se encuentra localizado o con limitada diseminación. Esta condición restringe el tratamiento para cáncer de vejiga, mama, cervicouterino, testículo, pulmón, entre otros. En casos donde el cáncer haya avanzado localmente o presente metástasis, esta terapia tiene menos éxito y requiere ser complementada con radioterapia o quimioterapia.³¹

3.2.2. Radioterapia

El tratamiento utiliza partículas u ondas de alta energía como los rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones para eliminar o dañar las células cancerosas y reducir el tamaño del tumor. La radioterapia puede ser externa donde la radiación proviene de un acelerador lineal, o sistémica donde un material radiactivo se introduce en el torrente sanguíneo, como son los anticuerpos monoclonales radiomarcados que circulan en la sangre hasta los tejidos de todo el cuerpo.

Una variante de la radioterapia es la braquiterapia que consiste en colocar la fuente de radiación en lecho tumoral mediante agujas, de esta manera la radiación es localizada y de mayor potencia.^{28, 29}

3.2.3. Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el empleo de uno o la combinación de varios fármacos para destruir células cancerosas deteniendo su capacidad para crecer y dividirse. Esta terapia puede aplicarse en tumores localizados o que se han diseminando. Por ello, es la alternativa de mayor éxito en casos avanzados de cáncer.

Actualmente hay más de 100 medicamentos disponibles en el mercado para la quimioterapia con diferentes mecanismos de acción pero que operan en conjunto para destruir el mayor número de células cancerosas. La mayor parte de estos fármacos actúan sobre el ADN de la célula alterando su ciclo de replicación.³¹

Los fármacos usados en quimioterapia se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción y estructura química encontrando los siguientes grupos:

- Agentes alquilantes. Generan radicales que se unen al ADN, impidiendo la replicación y pueden actuar en cualquier etapa del ciclo celular.
- Antimetabolitos. Son antagonistas de los metabolitos relacionados con la división celular impidiendo que se lleve a cabo la síntesis de ADN y ARN.
- Inhibidores de la mitosis (taxanos). Se unen a tubulina formando estructuras altamente estables o anómalas que impiden la mitosis.
- Inhibidor de la topoisomerasa I. Inhibe la torsión del ADN al formar un complejo estable entre el compuesto y una sección de la cadena de ADN.
- Inhibidor de la topoisomerasa II. Inhibe la catálisis de la torsión del ADN.
- L-Asparaginasa. Enzima que hidroliza la L-asparagina, un aminoácido esencial en la síntesis de proteínas y ADN.³²

3.3. Búsqueda y evaluación *in vitro* de nuevos fármacos con actividad antineoplásica

El cáncer es un grave problema de salud pública y los medicamentos actualmente disponibles en la quimioterapia tienen claras limitaciones. En las últimas décadas, se han realizado extensos estudios sobre el mecanismo y fisiopatología del cáncer con el objetivo de desarrollar nuevos medicamentos con mayor actividad antitumoral y menor toxicidad hacia el paciente. Los fármacos antineoplásicos actualmente disponibles presentan una elevada toxicidad sobre las células sanas y generan resistencia en las células cancerosas residuales cuando la terapia no fue efectiva o se administra por largos períodos, como es el caso de los tratamientos antihormonales del cáncer de próstata que pueden reducir inicialmente el tamaño del tumor pero fallan cuando se convierte en hormona independiente.³¹

Actualmente la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antineoplásica se basa en la construcción de grandes bibliotecas de compuestos derivados de fármacos con actividad probada, empleando síntesis combinatoria. Las nuevas moléculas se someten

a ensayos biológicos (*screening*) para identificar aquellas moléculas con mayor actividad. Estos modelos experimentales denominados *in vitro*, responden a la necesidad de generar resultados válidos, relativamente económicos, rápidos y sencillos, contribuyendo a la reducción del empleo de animales de laboratorio y abriendo la posibilidad de realizar estudios a nivel molecular.

El *screening* de compuestos con potencial actividad anticancerígena emplea grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos incluidas en el panel del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, que son expuestas a la sustancia de estudio por un periodo determinado, al cabo del cual se evalúa la viabilidad celular. La capacidad citotóxica de los agentes estudiados es interpretada como un indicativo de potencial actividad anticancerígena *in vitro*.³³

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento, a través de la medición de absorbancia o fluorescencia a una longitud de onda específica. Los métodos más utilizados son:

- Tinción con cristal violeta o sulforrodamina B.

En este bioensayo colorimétrico se emplea un colorante histológico que se une electrostáticamente a proteínas de la célula en condiciones ácidas moderadas, permitiendo medir la densidad celular después del tratamiento con el compuesto a evaluar. Este método es estable al ambiente, independiente del metabolismo intermediario y ofrece mayor sensibilidad, además de eliminar la contribución del disolvente o medio sobre la medición.^{32, 33}

- Medición de la función metabólica de las células con MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (formazán) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, generando una coloración púrpura.

La presencia de coloración indica la viabilidad de la célula, permitiendo cuantificar la supervivencia y proliferación celular después del tratamiento con el compuesto a evaluar. Otras sales de tetrazolio utilizadas para este ensayo son el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio (MTS) y el 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio-5-carboxanilido (XTT).^{33, 34}

3.4. Importancia de la quiralidad

La quiralidad es una característica presente en la naturaleza y en los sistemas biológicos, debido a que muchos compuestos endógenos como las proteínas y enzimas están constituidas exclusivamente por la forma L de sus aminoácidos, mientras que los carbohidratos están compuestos por la forma D de los azúcares. Estas características brindan un entorno altamente quiral en los sistemas biológicos que permiten diferenciar a los enantiómeros como sustancias con algunas características farmacocinéticas y farmacodinamia distintas.

La selectividad por uno de los enantiómeros se observa de la misma manera para los fármacos quirales, donde los enantiómeros pueden tener actividades farmacológicas diferentes, opuestas o bien poseer la misma actividad farmacológica con potencia distinta. Un ejemplo es el caso de la talidomida, que contribuyó al reconocimiento de la importancia de trabajar con enantiómeros puros.

La talidomida fue comercializada entre 1958 y 1963 como un sedante y calmante de náuseas para mujeres embarazadas sin efectos secundarios aparentes, sin embargo años más tarde se comprobó que poseía efectos teratogénicos que provocaron el nacimiento de bebés con focomelia, una anomalía congénita que se caracteriza por la carencia o tamaño reducido de las extremidades. La investigación de este caso reveló que existían dos enantiómeros de la talidomida, la forma *R* que producía el efecto sedante y la forma *S* que producía el efecto teratogénico. Este descubrimiento condujo a las agencias regulatorias como la *Food and Drug Administration* (FDA) y *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency* (MHRA) a implementar la política de evaluar por separado los efectos farmacológicos de cada uno de los enantiómeros, para verificar la eficacia clínica y asegurar que no presenten efectos tóxicos.^{35, 36}

En la década de los 80's con el desarrollo de las nuevas tecnologías, la preparación de enantiómeros puros incremento significativamente, de tal manera que en el período entre 1983–2002, el 39 % de los fármacos disponibles a nivel mundial correspondían a enantiómeros puros y solo el 23 % se comercializaban como racematos.

En la última década, la tendencia a comercializar fármacos quirales como enantiómeros puros ha incrementado cerca del 40 % y algunos de los medicamentos con las mayores ventas son atorvastatina cálcica (cardiovascular), simvastatina (cardiovascular), pravastatina sódica (cardiovascular), esomeprazol (gastrointestinal), amoxicilina y clavulanato de potasio (antibiótico) y valsartán (cardiovascular), los cuales alcanzaron ventas de más de mil millones de dólares por año a nivel mundial.

Es por ello, que la industria química y farmacéutica se encuentra en constante búsqueda de nuevos métodos sintéticos para la obtención de compuestos enantioméricamente puros que serán útiles en el desarrollo de nuevos fármacos.³⁷

3.5. Síntesis asimétrica

El procedimiento tradicional para la obtención de enantiómeros puros se basa en el empleo de rutas sintéticas convencionales, seguido de la resolución de las mezclas racémicas por métodos químicos o enzimáticos. Estas metodologías ofrecen simplicidad a nivel industrial, sin embargo su limitación principal es el rendimiento máximo que se puede alcanzar, es decir, sólo se puede obtener un 50 % del producto deseado en el mejor de los casos.

Una alternativa menos utilizada por su alto costo, es el empleo de sustratos enantiopuros obtenidos de fuentes naturales (*chiral pool*), de esta manera se pretende que el material de partida tenga la estereoquímica deseada y se realizan modificaciones que no afecten el centro estereogénico.

La última estrategia para acceder a compuestos enantioméricamente puros es la síntesis asimétrica que consiste en la creación de un nuevo centro estereogénico a través de una reacción controlada que puede ser enantioselectiva, diastereoselectiva o ambas, para obtener uno de los enantiómeros en mayor proporción. En este tipo de síntesis se suele

utilizar uno o varios agentes quirales o proquirales, que a través de interacciones en el estado de transición promueven la formación de un enantiómero sobre el otro, a esto se le conoce como inducción asimétrica.

La síntesis asimétrica se clasifica en cuatro categorías de acuerdo a su desarrollo:

- a) Primera generación. La estereoquímica de la reacción está controlada intramolecularmente por el sustrato que va a ser transformado, es decir, el sustrato quiral reacciona con un reactivo aquiral induciendo la formación selectiva de otro centro quiral, mediante un proceso diastereoselectivo.
- b) Segunda generación. Es una reacción diastereoselectiva que utiliza un auxiliar quiral que está incorporado de manera temporal en el sustrato y es eliminado después de llevar a cabo la transformación deseada.
- c) Tercera generación. La inducción asimétrica está controlada intermolecularmente por uno de los reactivos utilizados, sin ser parte del sustrato. Este proceso es enantioselectivo.
- d) Cuarta generación. La estereoquímica de la reacción está controlada por un catalizador, que permite obtener productos enantioméricamente puros, o enriquecidos a partir de reactivos no quirales. Los catalizadores pueden ser metálicos, organometálicos o biocatalizadores.^{38, 39}

3.5.1. Enaminonas como inductores quirales

En los últimos años las enaminonas han cobrado importancia en la síntesis orgánica combinatoria por su versatilidad como precursores de compuestos heterocíclicos y productos naturales con actividad biológica como pirazoles, oxazoles, quinolinas, dibenzodiazepinas, tetrahidropirimidinas, dihidropiridinas, naftofuranos tetrahidrobencoxazinas, ácidos tetrónicos, tetrahidrofenantridinas, entre otros.^{40, 41, 42} En años recientes, Xin y colaboradores reportaron la síntesis enantioselectiva de dihidropirimidinonas a partir de compuestos dicarbonílicos y aminas quirales que forman enaminonas *in situ* que favorecen la obtención de productos con altos excesos enantioméricos (*ee*).⁴³

Las enaminonas son compuestos altamente reactivos que pueden actuar como nucleófilos y/o electrófilos. La capacidad nucleofílica de éstas se debe a que poseen un nitrógeno en β que puede actuar como nucleófilo o deslocalizar el par de electrones por resonancia hacia carbono en β (Figura 3), mientras el carácter electrófilo se debe a que la enaminona es un sistema α,β -insaturado y en presencia de nucleófilos puede sufrir adición 1,2 ó 1,4.⁴¹

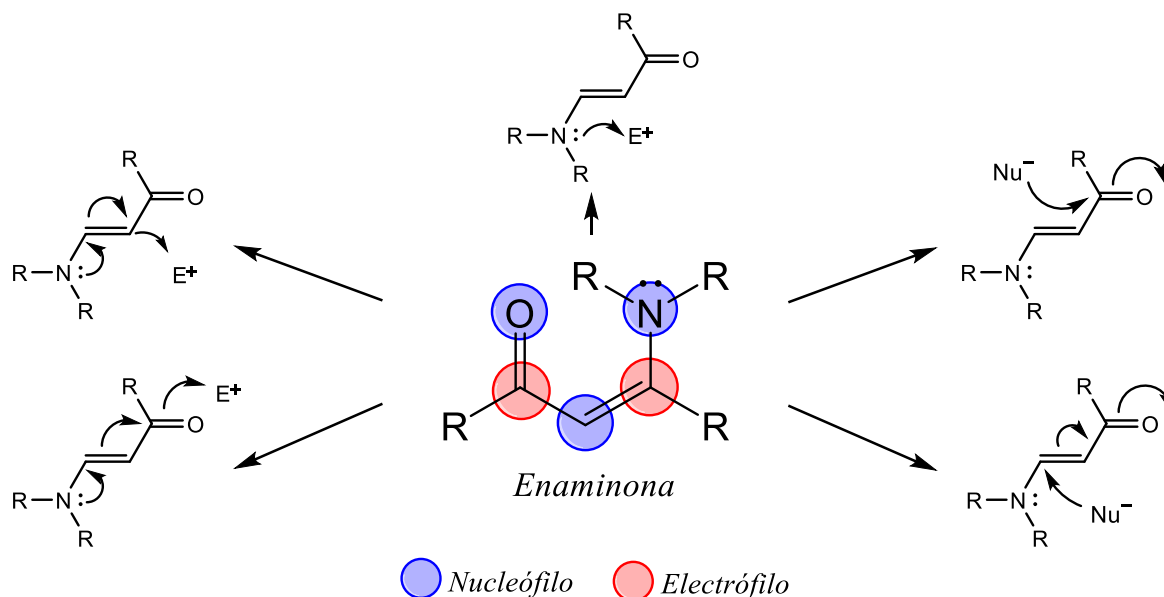
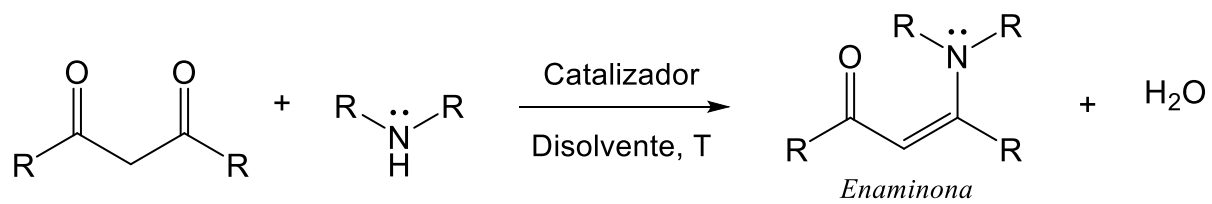


Figura 3. Reactividad de la enaminona como nucleófilo y electrófilo.

Para la síntesis de las enaminonas se han reportado diferentes metodologías por síntesis convencional utilizando diversos disolventes orgánicos o agua, o bien a través de la síntesis asistida por microondas (MO) como fuente de calentamiento utilizando disolventes polares o en ausencia de disolvente. De manera general, las enaminonas se preparan por condensación directa de un compuesto β -dicarbonílico que puede ser un β -cetoéster o una β -dicetona con una amina primaria o secundaria, con la eliminación de una molécula de agua (Esquema 5).⁴²



Esquema 5. Reacción general para la preparación de enaminonas

4. Planteamiento del problema

El interés de la industria farmacéutica por encontrar fármacos más efectivos y económicos, ha llevado a la búsqueda de alternativas de síntesis más eficientes, que involucren menor número de pasos y un menor tiempo de reacción. Por ello, el uso de las reacciones de multicomponentes (RMC) en el desarrollo de fármacos que contengan el núcleo dihidropirimidinona o su análogo dihidropirimidintiona se ha incrementado debido a la facilidad del proceso de síntesis, la diversidad estructural de las moléculas y la potencial actividad biológica.¹

Por otro lado, la demanda de nuevas metodologías para la obtención de productos enantiopuros, ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis enantioselectiva, encontrando importantes avances con la utilización de catalizadores asimétricos,¹⁴ seguido del uso de inductores quirales, un ejemplo de ello es el uso de enamionas derivadas de aminoácidos, por su bajo costo y alta reactividad.¹⁷

Adicionalmente en los últimos años la síntesis asistida por microondas ha cobrado importancia, porque ofrece mejoras significativas en los rendimientos, menor número de subproductos y disminución en los tiempos de reacción. La aplicación de esta metodología ha sido muy exitosa en reacciones de cicloadición, síntesis de heterociclos, reacciones libres de disolvente y catálisis de transferencia de fase.^{22, 23}

En la búsqueda de métodos más eficientes de preparación de DHPT con actividad citotóxica, antiinflamatoria o antioxidante, se propone por una reacción de Biginelli utilizando enamionas quirales como sustrato obtener un producto con alto exceso enantiomérico.

5. Hipótesis

La reacción de enaminonas, con uno o dos centros estereogénicos, aldehídos aromáticos y tiourea, a través de una reacción multicomponentes, permitirá la formación enantioselectiva de dihidropirimidintionas (DHPT) quirales vía formación de tetrahidropirimidintionas (THPT)

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad citotóxica de las dihidropirimidintionas quirales.

6.2. Objetivos específicos

- Sintetizar enaminonas quirales a partir de aminas quirales y compuestos β -dicarbonílicos utilizando síntesis convencional y asistida por microondas.
- Sintetizar dihidropirimidintionas quirales a partir de enaminonas quirales, tiourea y aldehídos aromáticos.
- Caracterizar las enaminonas y dihidropirimidintionas por métodos espectroscópicos.
- Evaluar la actividad citotóxica de las dihidropirimidintionas sobre líneas celulares de cáncer: HCT-15 (colon), U251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), MCF-7 (mama) y SKLU (pulmón).

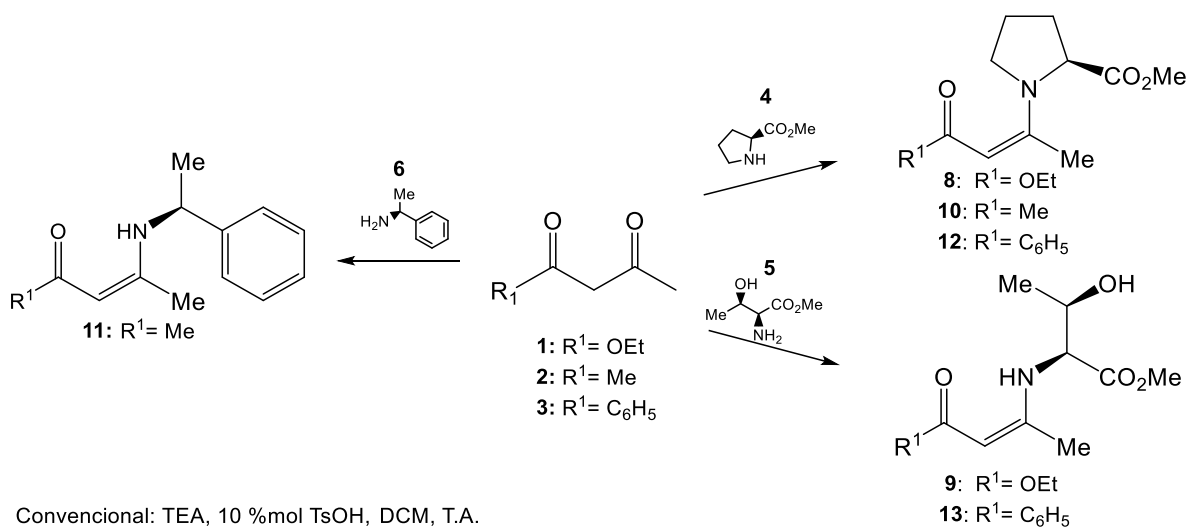
7. Metodología

7.1. Síntesis de enaminonas quirales

Las enaminonas quirales se prepararon por una adición nucleofílica de una amina quiral (éster metílico de α -L-aminoácidos) con un compuesto β -dicarbonílico en medio ácido, por dos metodologías.

7.1.1. Síntesis convencional

Las enaminonas **8–13** se prepararon por reacción de los compuestos β -dicarbonílicos (acetoacetato de etilo (**1**), 2,4-pentanodiona (**2**) y 1-fenil-1,3-butanodiona (**3**)) con la amina o aminoácido correspondiente (clorhidrato del éster metílico de (*S*)-L-prolina (**4**), clorhidrato del éster metílico de (*S*)-L-treonina (**5**) y (*S*)- α -metilbencilamina (**6**) en presencia de trietilamina (TEA) y ácido *p*-toluensulfónico (TsOH) al 10 %mol como catalizador, utilizando diclorometano (DCM) como disolvente con agitación constante a temperatura ambiente (T.A). Esquema 6



Convencional: TEA, 10 %mol TsOH, DCM, T.A.
 Asistida por MO: TEA, 10 %mol TsOH, MeOH, 150 °C

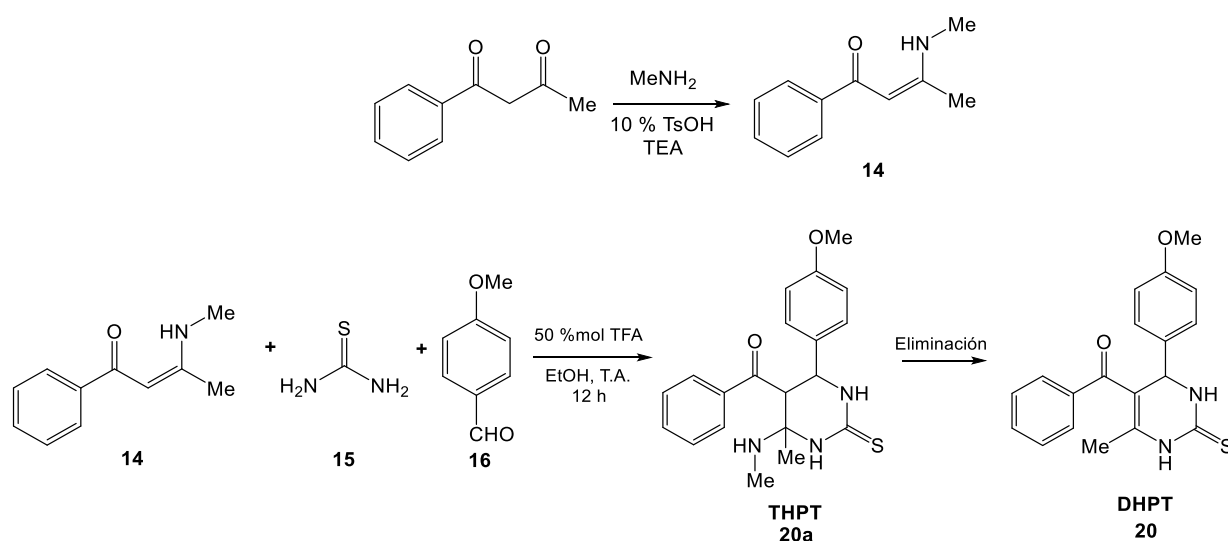
Esquema 6. Síntesis de enaminonas

7.1.2. Síntesis asistida por microondas

Las enaminonas **8–13** se prepararon por reacción de los compuestos β -dicarbonílicos (**1–3**) y las aminas quirales (**4–6**) en presencia de TEA y TsOH al 10 %mol como catalizador, empleando metanol absoluto (MeOH) como disolvente e irradiación de microondas (MO) como fuente de calentamiento a 150 °C, y agitación constante (Esquema 6).

7.2. Síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20)

Un estudio previo para establecer las condiciones de reacción para la obtención de las tetrahidropirimidintionas quirales fue la preparación del compuesto **20**, el cual se preparó usando la enaminona no quiral (**14**), siguiendo la metodología propuesta por Wan J. y Pan Y.²⁰ por reacción de **14**, tiourea (**15**) y 4-metoxibenzaldehído (**16**) en una relación 1/1.5/1, usando etanol como disolvente y 0.5 equivalentes de TFA (Esquema 7).



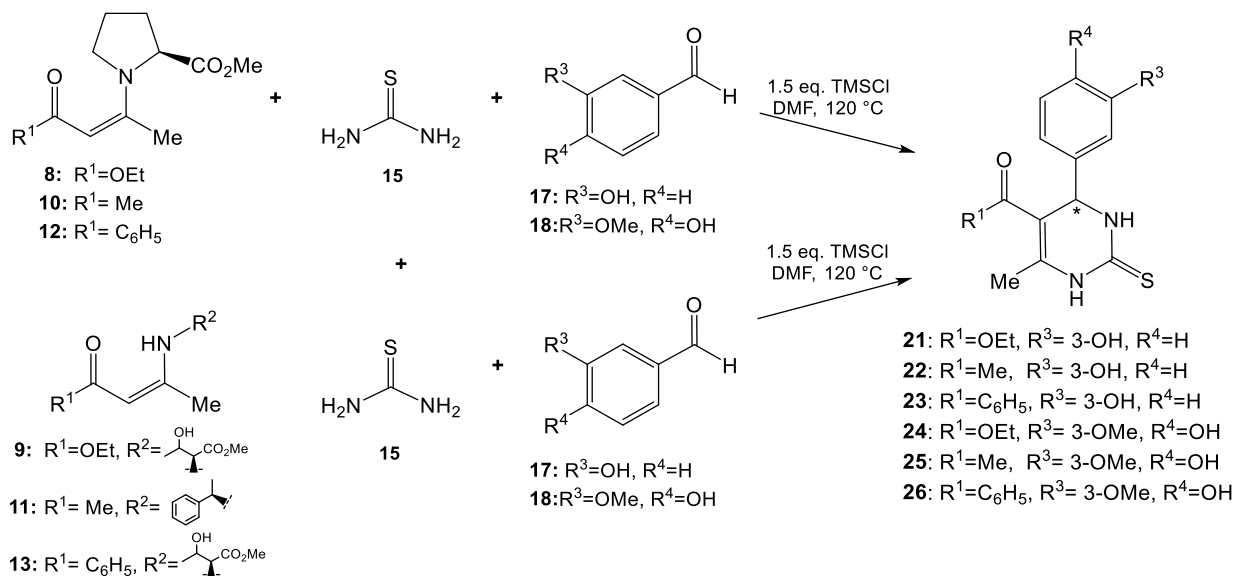
Esquema 7. Síntesis del compuesto **20**

7.3. Síntesis general de dihidropirimidintionas quirales

Las DHPT quirales se obtuvieron por la ciclocondensación de un aldehído, tiourea y una enaminona quiral, a través de reacción multicomponentes tipo Biginelli, utilizando ácidos de Lewis como catalizadores.

7.3.1. Síntesis de dihidropirimidintionas 21-26

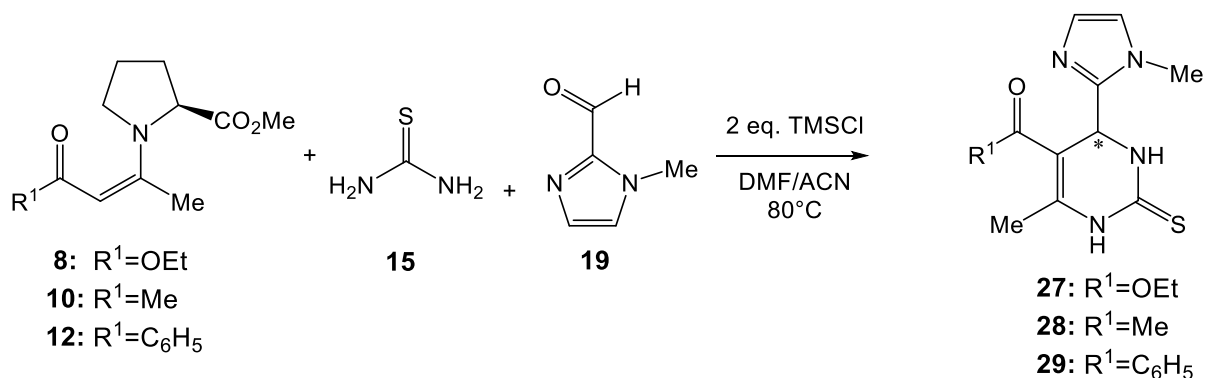
Las DHPT **21–26** se prepararon de acuerdo a la metodología propuesta por Wan J. y Pan Y, variando las condiciones de temperatura.¹⁸ Las enaminonas **8–13**, se hicieron reaccionar con tiourea (**15**) y los aldehídos aromáticos correspondientes (3-hidroxibenzaldehído (**17**) y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**18**)) en una relación 1/1.5/1, empleando 2 mL de DMF y 1.5 equivalentes de TMSCl como medio de reacción a $120\text{ }^\circ\text{C}$ y agitación constante (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de dihidropirimidintiones quirales **21–26**

7.3.2. Síntesis de dihidropirimidintiones **27-29**

Los compuestos **27-29** se prepararon utilizando una enaminona (**8**, **10** y **12**), tiourea (**15**) y 1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxaldehído (**19**) en una relación 1/1/1, empleando como disolvente 2 mL de una mezcla de DMF y acetonitrilo (1:4) y 2 equivalentes de TMSCl con calentamiento a 80 °C y agitación constante (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de dihidropirimidintiones **27–29**

7.4. Evaluación de la actividad citotóxica en líneas de cáncer humano por el método de Sulforrodamina B

Se realizó la evaluación citotóxica sobre seis líneas celulares de cáncer humano: HCT-15 (colon), U251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), MCF-7

(mama) y SKLU (pulmón) empleando el método de sulforodamida B, siguiendo el protocolo modificado de Monks³³ (Figura 4).

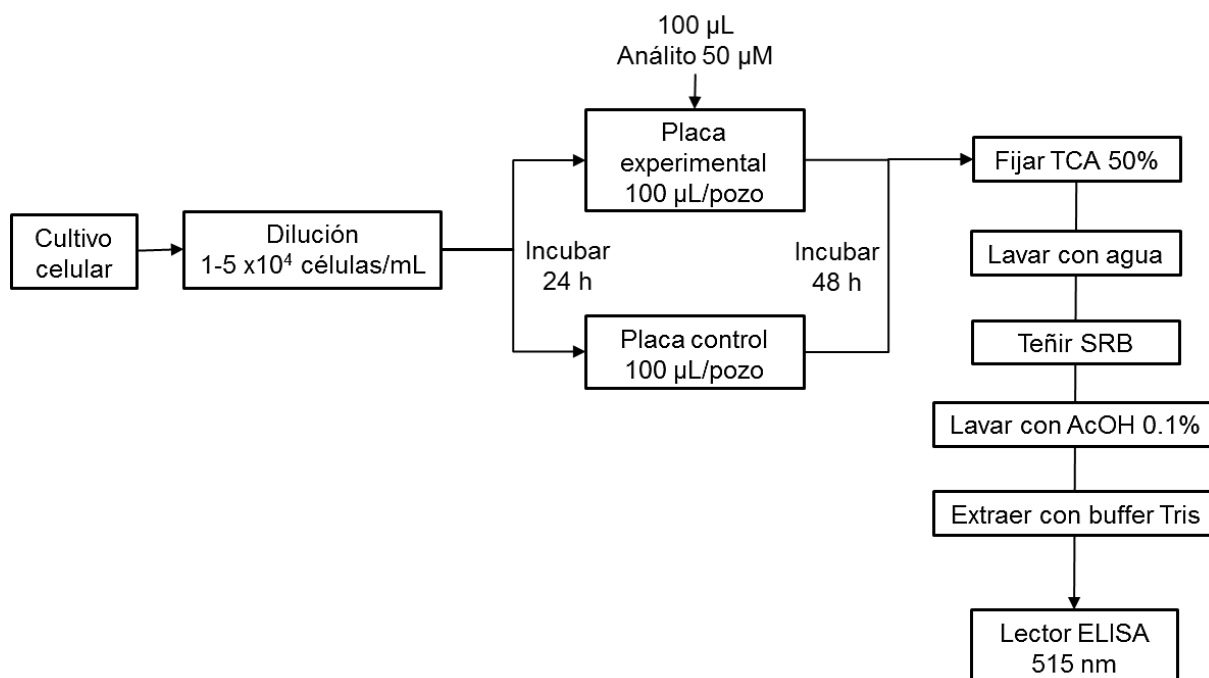


Figura 4. Proceso general para la evaluación citotóxica por el método de SRB

7.5. Relaciones estructura-actividad y acoplamiento molecular

La estructura cristalográfica de la proteína Eg5 (PDB 1Q0B) se obtuvo del *Protein Data Bank* (RCSB). La preparación de los ligandos y la proteína se realizó empleando *Maestro 10.4*, y *AutoDock Tools 1.5.6* (ADT).

Utilizando la proteína preparada se determinó la caja de búsqueda (Grid) utilizando *Autogrid* de ADT, la caja se centró en el sitio de unión con una dimensión de 60 x 60 x 60 Å. Los cálculos de acoplamiento molecular se determinaron para todos los ligandos utilizando *AutoDock Vina 1.1.2* empleando las condiciones estándar y 50 corridas. Finalmente, se realizó el análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los grupos generados, seleccionando las conformaciones de mínima energía (menor $\Delta G_{\text{unión}}$), las cuales fueron comparadas con la estructura cristalográfica del (*S*)-monastrol unido a Eg5.

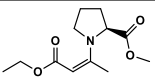
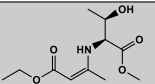
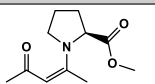
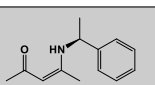
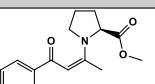
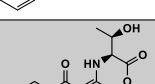
Resultados y Discusión

8. Resultados y discusión

8.1. Síntesis de enaminonas quirales

Las enaminonas **8–13** fueron preparadas por síntesis convencional y asistida por microondas. Los productos fueron aislados por precipitación y recristalizados en Hexano-Éter ó EtOH, con excepción de **10** y **11**, los cuales fueron purificados por cromatografía en columna usando como fase móvil Hexano-AcOEt (7:3). Los rendimientos, condiciones de reacción y características fisicoquímicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción y propiedades fisicoquímicas de las enaminonas **8-14**.

Enaminona	t rxn		% R		Disolvente/T		PF. (°C)	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$
	A	B	A	B	A	B		
 8	72 h	3 min	70.1	75.6	DCM T.A	MeOH 120 °C	47	+0.69
 9	24 h	2 min	45.1	62.0	DCM T.A	MeOH 120 °C	45–47	+1.09
 10	72 h	3 min	98.2	99.0	DCM T.A	MeOH 120 °C	Líquido	+0.83
 11	144 h	10 min	57.1	98.9	DCM T.A	MeOH 80 °C	Líquido	+0.81
 12	96 h	5 min	51.7	64.5	DCM T.A	MeOH 120 °C	121-123	+1.15
 13	96 h	5 min	58.4	72.4	DCM T.A	MeOH 120 °C	165-167	+0.69

A: síntesis convencional; **B:** síntesis asistida por microondas; **t rxn:** tiempo de reacción; **% R:** porcentaje de rendimiento; **T:** temperatura; **PF.:** punto de fusión.

Las enaminonas se obtuvieron con rendimientos que van de muy buenos a moderados 98.2-45.1 % para síntesis convencional y 99.0-62.0 % para síntesis asistida por MO. Entre ambas metodologías no se observó una diferencia importante en el rendimiento de la reacción, sin embargo con el uso de MO se logró disminuir de manera significativa el tiempo de reacción, de manera consistente con lo reportado en la literatura.^{40, 44}

Por otro lado, los rendimientos más altos se encontraron para **10** y **11** que corresponden a los derivados de 2,4-pentanediona, este resultado es de esperarse debido al mayor carácter electrofílico del carbonilo y la acidez del hidrógeno alfa (pKa de 8.95) que favorece la formación de la enamina. También es importante mencionar que aunque el compuesto dicarbonílico **3** presenta mayor carácter ácido (pKa de 8.23), la densidad

Resultados y Discusión

electrónica del anillo aromático disminuye el carácter electrofílico del carbonilo pudiendo repercutir en la formación de las enamionas, disminuyendo de esta manera el rendimiento (Figura 5).

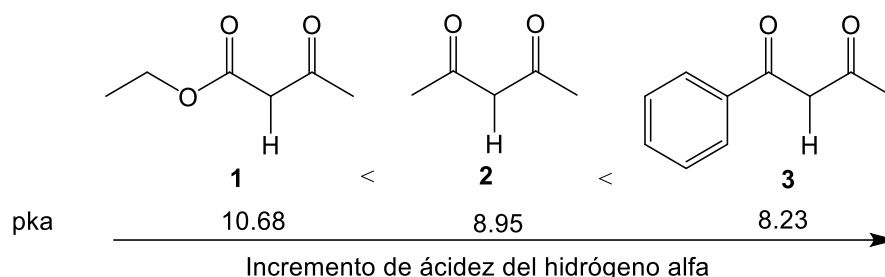
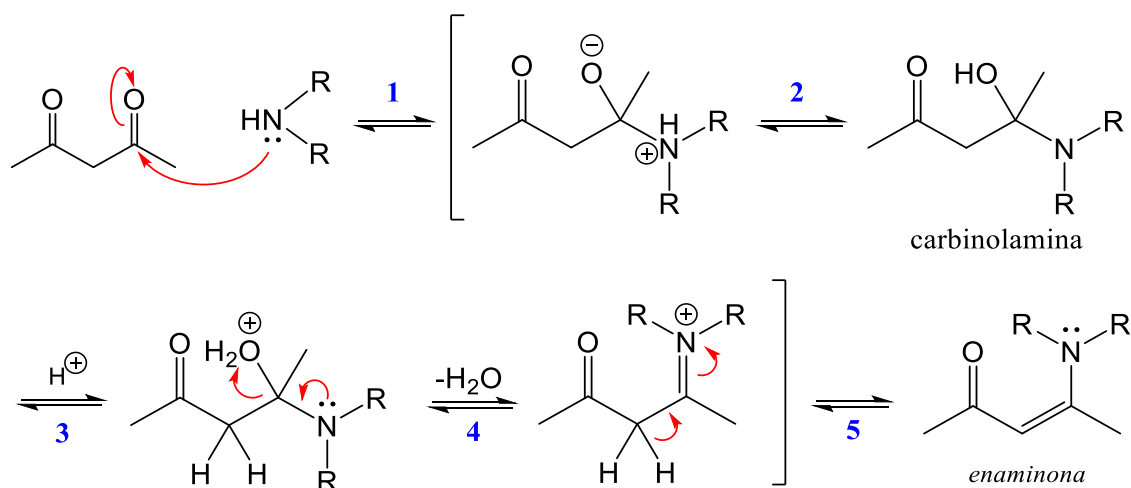


Figura 5. Valores experimentales de pKa para los hidrógenos α de los compuestos 1,3-dicarbonílicos

El mecanismo general de la reacción para la formación de enamionas se muestra en el Esquema 10, donde se puede observar que el primer paso es el ataque nucleofílico (1) sobre el carbonilo formando una carbinolamina, que sufre la eliminación de una molécula de agua para dar la sal de iminio, seguido de la eliminación de un protón para formar la enamionona deseada.



- 1: Ataque nucleofílico, 2: Transferencia de protón y formación de la carbinolamina,
- 3: Protonación del grupo hidroxilo, 4: Eliminación de agua y formación del ión iminio,
- 5: Pérdida de un protón del carbono alfa para la formación de la enamionona

Esquema 10. Mecanismo general de reacción para formación de enamionas

De acuerdo al mecanismo descrito anteriormente la condensación de un compuesto β -dicarbonílico y una amina puede dar lugar a dos posibles isómeros geométricos, sin embargo Lozada M.C y colaboradores ⁴⁴ reportaron que el uso de α -(L)-aminoácidos en la síntesis de enamionas favorece la formación selectiva del isómero Z, de acuerdo a esto se puede inferir que las enamionas sintetizadas se obtuvieron como isómero Z.

Además, es importante señalar que la estereoquímica del carbono quiral en la formación de las enaminonas por ambas metodologías no se modificó, obteniéndose enaminonas ópticamente activas, de acuerdo a los valores obtenidos de rotación óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ C}$) descritos en Tabla 1.

8.2. Elucidación estructural de enaminonas

Los compuestos **8-14** fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas de IR, UV, RMN de ^1H y ^{13}C , observándose patrones de señales características para estos productos.

8.2.1. Enaminonas de L-prolina-OMe

El análisis espectroscópico de las enaminonas **8**, **10** y **12**, las cuales poseen en su estructura L-prolina-OMe mostraron espectros similares. En la Figura 6 se muestra el espectro de infrarrojo **8**, donde pueden apreciarse las señales características para el carbonilo α,β -insaturado y el carbonilo del éster metílico, las señales para los estiramientos C=C-H, y la doble ligadura.

Las enaminonas **8**, **10** y **12** presentaron señales intensas correspondientes al estiramiento del carbonilo del éster metílico en 1749.83, 1748.68 y 1740.38 cm^{-1} respectivamente. También se observó una señal intensa en 1672.34 cm^{-1} para el carbonilo del éster α,β -insaturado de **8**, y en 1617.41 y 1622.20 cm^{-1} señales para los carbonilos de cetona de **10** y **12**. La presencia de la doble ligadura se observó como una señal en 3065.71, 3033.59 y 3044.37 cm^{-1} para el estiramiento C=C-H del hidrógeno vinílico, y una señal intensa en 1565.78, 1580.17 y 1532.74 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=C respectivamente.

En el análisis por UV-vis se encontraron los máximos asociados a la doble ligadura en 282.07, 224.45 y 243.35 nm para **8**, **10** y **12** respectivamente, además de una señal en 336.39 nm para el anillo aromático de **12**. El resumen de las señales de IR y los máximos encontrados en UV se muestran en la Tabla 2.

Resultados y Discusión

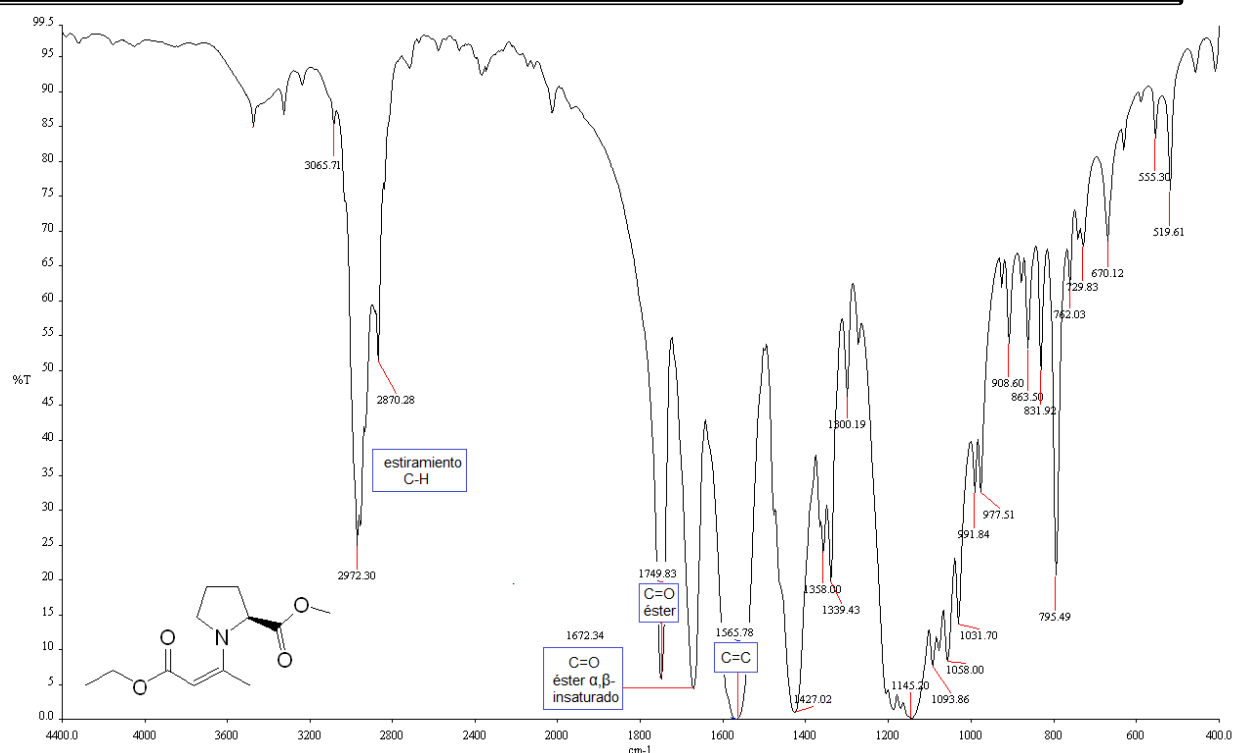


Figura 6. Espectro de infrarrojo del compuesto **8**

Tabla 2. Resumen de señales encontradas en IR y UV-vis para enamionas de L-prolina-OMe

Clave	ν (cm ⁻¹)					UV máx. (nm)
	C=O L-pro	C=O	C=C	C-H sp ³	C-H sp ²	
8	1749.83 éster	1672.34 éster	1565.78	2972.30 2870.28	3065.71	282.07
10	1740.38 éster	1617.41 cetona	1580.17	2975.17 2945.68	3033.59	224.45
12	1748.68 éster	1622.20 cetona	1532.74	2958.77 2884.12	3044.37	336.39 243.35

Por otro lado, el análisis de los espectros de RMN ¹H para estas enamionas mostró patrones de señales semejantes al tratarse de compuestos con la misma estructura base. En la Figura 7 se muestra el espectro de RMN ¹H para **8**, perteneciente a las enamionas con éster metílico de L-prolina en su estructura.

Resultados y Discusión

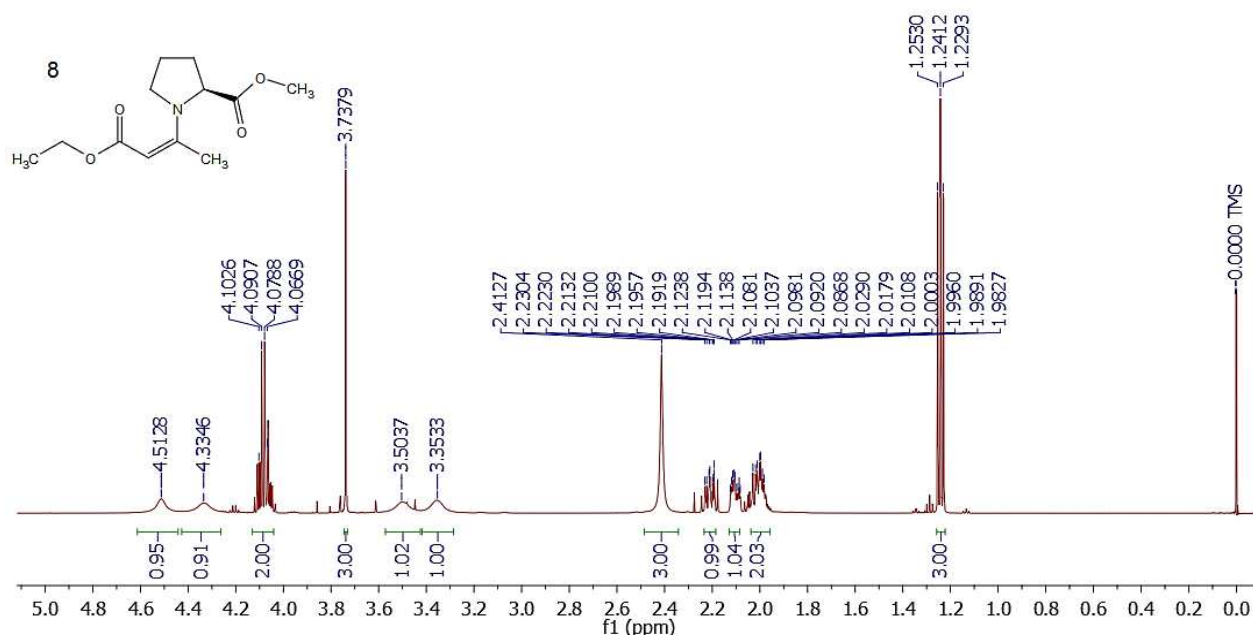


Figura 7. Espectro de RMN ^1H de la enaminona **8**

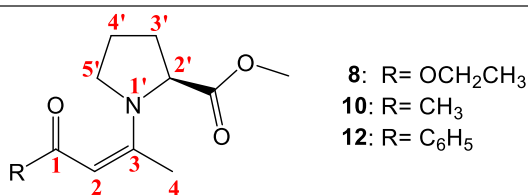
Las señales identificadas para **8**, **10** y **12** se observan como una señal ancha para el protón vinílico en 4.513, 5.048 y 5.646 ppm respectivamente, un singulete para el metilo base de la doble ligadura en 2.413, 2.452 y 2.607 ppm, un singulete para el metoxilo del éster en 3.738, 3.748 y 3.765 ppm respectivamente, y un grupo de señales complejas correspondientes a los hidrógenos del anillo de prolina entre 2.083-4.437 ppm.

También se observó un cuadruplete en 4.085 ppm y un triplete en 1.241 ppm con constante de acoplamiento de 7.14 Hz para el grupo etilo del éster de **8**, un singulete en 2.058 ppm para el metilo en **10**, así como señales complejas entre 7.832-7.368 ppm para los cinco protones del grupo benzoilo de **12**.

En la Tabla 3 se describe el resumen de los desplazamientos químicos (ppm), la multiplicidad y constantes de acoplamiento para todos los protones observados para las enaminonas de L-prolina-OMe.

Tabla 3. Propiedades espectroscópicas en RMN ^1H para enaminonas de L-prolina-OMe

Protón	8	10	12
H-2	4.513 sa	5.048 sa	5.646 sa
H-4	2.413 s	2.452 s	2.607 s
H-2'	4.335 sa	4.423 sa	4.437 sa
H-3'	2.230-2.192, m 2.124-2.083, m	2.243-2.196, m 2.134-2.109, m	2.304-2.238, m 2.169-2.149, m
H-4'	2.029-1.983 m	2.022 sa	2.107-2.049 m
H-5'	3.504, sa 3.353, sa	3.432 sa	3.527 sa
OCH ₃	3.738 s	3.748 s	3.765 s
R	4.085 c, $J=7.14$ Hz 1.241 t, $J=7.14$ Hz	2.058 s	7.832 sa 7.432-7.368 m



En los espectros de RMN ^{13}C de las enaminonas se observaron las señales para cada uno de los carbonos. Encontrando a desplazamientos mayores las señales para los carbonos sp^2 de los carbonilos, la doble ligadura y del anillo aromático, mientras que en desplazamientos bajos se localizan las señales para los carbonos sp^3 correspondientes a los grupos alquílicos y los carbonos del anillo de L-prolina.

En la Figura 8 se muestra el espectro de RMN de carbono para la enaminona **8**, donde se pueden observar las señales correspondientes a sus doce carbonos, de esta manera se comprueba que los productos obtenidos corresponden a las enaminonas propuestas.

Resultados y Discusión

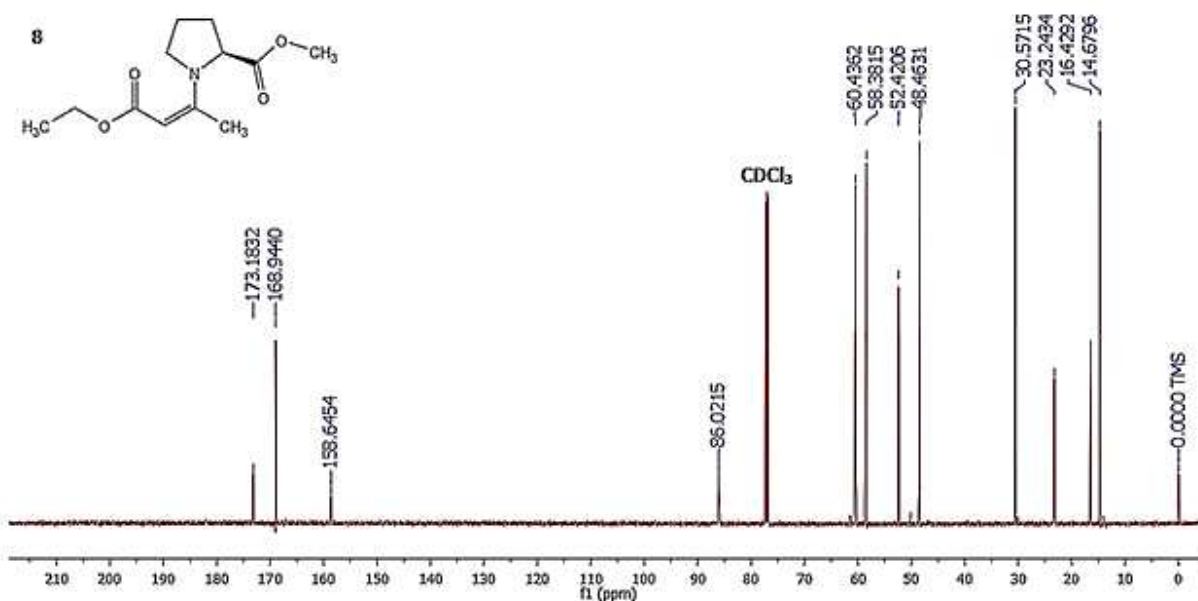


Figura 8. Espectro de RMN de carbona para la enaminona **8**

Tabla 4. Propiedades espectroscópicas en RMN de ^{13}C para las enaminonas de L-prolina-OMe.

Carbono	8	10	12
C-1	168.944	195.058	183.769
C-2	86.022	100.453	94.391
C-3	158.645	158.884	155.776
C-4	16.429	16.960	17.328
C=O	173.183	172.877	171.720
C-2'	60.436	60.503	61.779
C-3'	30.572	30.471	28.200
C-4'	23.243	23.217	24.974
C-5'	48.463	48.547	47.342
OCH₃	52.421	52.506	52.174
R	58.382 14.680	31.691	138.082, 133.127 128.734, 128.468

En la Tabla 4 se describe el resumen de los desplazamientos químicos (ppm) observados para los carbonos de las enaminonas de L-prolina-OMe **8**, **10** y **12**. Las señales más importantes para **8**, **10** y **12** corresponden al carbono del grupo carbonilo (C-1) en 168.994, 195.058 y 183.769 ppm respectivamente, los carbonos de la doble ligadura que se observan en 86.022, 100.453 y 94.391 ppm para (C-2), y en 158.645, 158.884 y 155.776 ppm para (C-3), y el carbono del metilo base de la doble ligadura (C-4) en 16.429,

Resultados y Discusión

16.960 y 17.328 ppm respectivamente. Además de los carbonos correspondientes al anillo de prolina entre 61.779-23.217 ppm.

8.2.2. Enaminonas de L-treonina-OMe

Las enaminonas **9** y **13** presentaron en espectroscopia de infrarrojo bandas de intensidad media en 3430.12 y 3386.60 cm^{-1} para los estiramientos O-H, en 3297.04 cm^{-1} para el estiramiento N-H y en 3069.82 cm^{-1} para el estiramiento C=C-H. En la región media del espectro se observan señales intensas en 1739.80 cm^{-1} y 1747.20 cm^{-1} para el estiramiento del grupo carbonilo del éster metílico de **9** y **13** respectivamente, además de una señal en 1650.73 cm^{-1} para el carbonilo del éster etílico de **9** y en 1601.17 cm^{-1} para la cetona aromática α,β -insaturada de **13**. También se observa una señal en 1605.82 cm^{-1} y 1585.22 cm^{-1} para el estiramiento C=C de la doble ligadura. En la Figura 9 se muestra el espectro de infrarrojo de la enaminona **9**.

Las enaminonas **9** y **13** presentaron en espectroscopia UV-vis un máximo en 283.74 y 243.47 nm respectivamente correspondiente a la doble ligadura, adicionalmente la enaminona **13** exhibió un máximo en 341.21 nm relacionado con el anillo aromático. En la Tabla 5 se resumen las principales señales identificadas en IR y los máximos encontrados en UV para estas enaminonas.

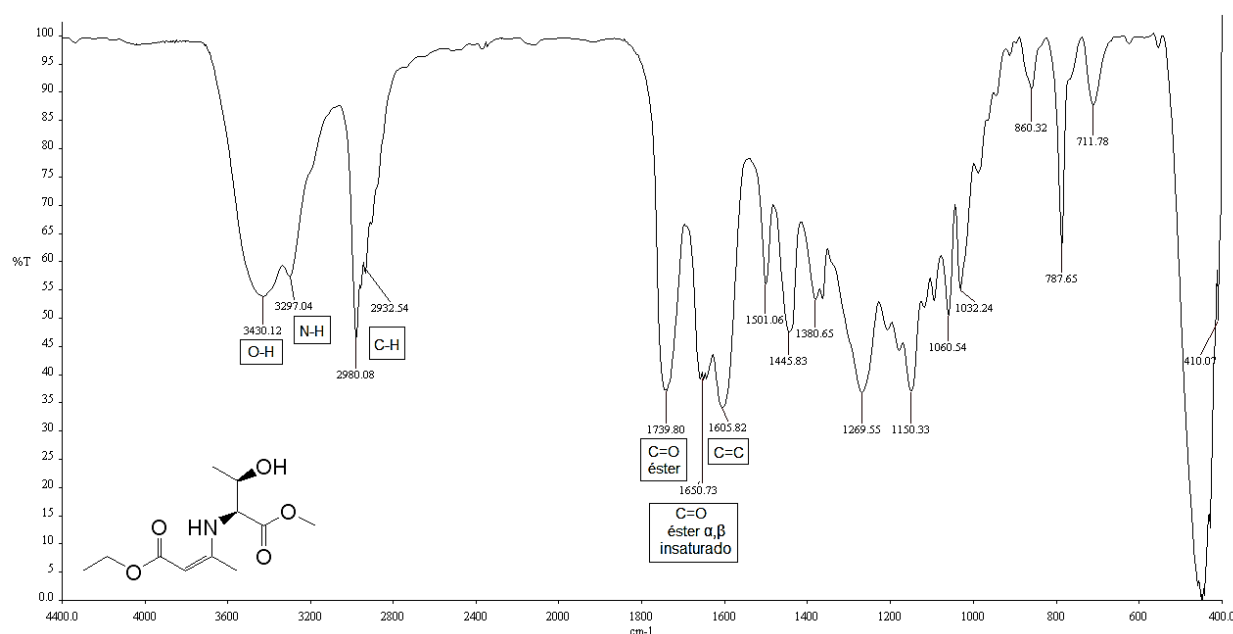


Figura 9. Espectro de infrarrojo para la enaminona **9**

Resultados y Discusión

Tabla 5. Señales observadas en infrarrojo y UV-vis para enaminonas de L-treonina-OMe

Clave	ν (cm ⁻¹)							UV Máximos (nm)
	OH	NH	C-H sp ²	C-H sp ³	C=O éster metílico	C=O	C=C	
9	3430.12	3297.04	NO	2980.08 2932.54	1739.80	1650.73 éster	1605.82	283.74
13	3386.60	NO	3069.82	2966.78 2922.96	1747.20	1601.17 cetona	1585.22	341.21 243.47

NO: No observada

Las enaminonas presentan señales características para los hidrógenos de los grupos alquílicos, vinílicos, aromáticos y del grupo amino. En la Tabla 6, se describen las señales de RMN ¹H para las enaminonas **9** y **13**, las cuales presentaron en 4.584 un doblete con constante de acoplamiento de 0.54 Hz y un singulete en 5.665 ppm para los protones vinílicos (H-2), siendo el protón de **13** el que se localiza a mayor desplazamiento químico a causa del efecto desprotector que ejerce el grupo benzoilo. Además de un singulete en 1.902 y 2.005 ppm para los protones del metilo base de la doble ligadura (H-4) de **9** y **13** respectivamente. También se observó un doblete en 9.002 y 11.708 ppm con constante de acoplamiento de 9.84 Hz y 9.78 Hz respectivamente para los protones unidos a nitrógeno que se acoplan con el protón vinílico.

Para las señales asociadas al fragmento de L-treonina-OMe se observó para **9** y **13** un singulete para el grupo metóxilo en 3.778 y 3.798 ppm, para el protón (H-2') del centro quiral α al carbonilo un doblete de doblete en 4.001 y 4.127 ppm con constantes de acoplamiento de 10.08 y 3.96 Hz, y 9.90 y 4.98 Hz respectivamente. Para el protón (H-3') base del alcohol se observó en 4.243 y 4.335-ppm un cuadruplete dobleteado con constante de acoplamiento de 6.36 y 3.96 Hz, los protones del metilo (H-4') se observaron como un doblete en 1.274 y 1.329 ppm con constantes de acoplamiento de 6.36 Hz. Solo para el compuesto **13** se observó el protón del grupo hidroxilo en 3.994 ppm como una señal ancha. Además, para el compuesto **9**, se observaron las señales características del grupo etilo del éster como un cuadruplete en 4.114 ppm y un triplete en 1.254 ppm con constante de acoplamiento de 7.14 Hz, mientras que para el compuesto **13**, se observan señales complejas entre 7.392-7.826 ppm para los cinco hidrógenos del grupo benzoilo.

Resultados y Discusión

Tabla 6. Propiedades espectroscópicas en RMN ^1H para enaminonas de L-treonina-OMe.

Protón	9	13
H-2	4.584 d, $J=0.54$ Hz	5.665 s
H-4	1.902 s	2.005 s
NH	9.002 d, $J=9.84$ Hz	11.708 d, $J=9.78$ Hz
H-2'	4.001 dd, $J=10.08, 3.96$ Hz	4.127 dd, $J=9.90, 4.98$ Hz
H-3'	4.243 cd, $J=6.36, 3.96$ Hz	4.335-4.307 m
H-4'	1.274 d, $J=6.36$ Hz	1.329 d, $J=6.36$ Hz
OH	NO	3.994 sa
OCH ₃	3.778 s	3.798 s
R	4.114 cd, $J=7.14, 0.66$ Hz 1.254 t, $J=7.14$ Hz	7.826 dd, $J=8.31, 1.62$ Hz 7.433 tt, $J=7.20, 1.38$ Hz 7.392 t, $J=7.20$ Hz

NO: No se observa

Para corroborar la estructura de los enaminonas **9** y **13** se realizaron los espectros de RMN ^{13}C , observando señales para cada uno de los carbonos, los cuales fueron asignados como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Desplazamientos químicos en RMN de ^{13}C para las enaminonas de L-treonina-OMe

Carbono	9	13
C-1	170.328	188.284
C-2	85.469	93.696
C-3	160.252	164.105
C-4	19.484	19.674
C-1'	171.573	170.748
C-2'	61.340	62.482
C-3'	68.374	68.556
C-4'	19.606	19.764
OCH ₃	52.624	52.769
R	58.675 14.572	139.774, 130.772 128.126, 127.076

8.2.3. Enaminona (S,Z)-fenil-3-((1-feniletil)amino)but-2-en-1-ona (11)

El espectro de infrarrojo para la enaminona **11** presentó en 1610.45 cm^{-1} una banda de absorción intensa para el carbonilo α,β -insaturado y en 1577.62 cm^{-1} una señal intensa para el estiramiento C=C. Además de una señal en 3027.65 cm^{-1} para el estiramiento

Resultados y Discusión

C=C-H (sp^2), y en 2970.59 cm^{-1} y 2917.32 cm^{-1} para el movimiento de tensión y flexión C-H de los grupos alquílicos (sp^3). En el espectro de IR no se observó una señal fina para el estiramiento N-H probablemente por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular (Figura 10). Por otro lado, en el espectro de UV-vis para la enaminona **11** se observaron dos máximos en 217.94 y 3313.99 nm correspondientes a la doble ligadura y el anillo aromático, respectivamente.

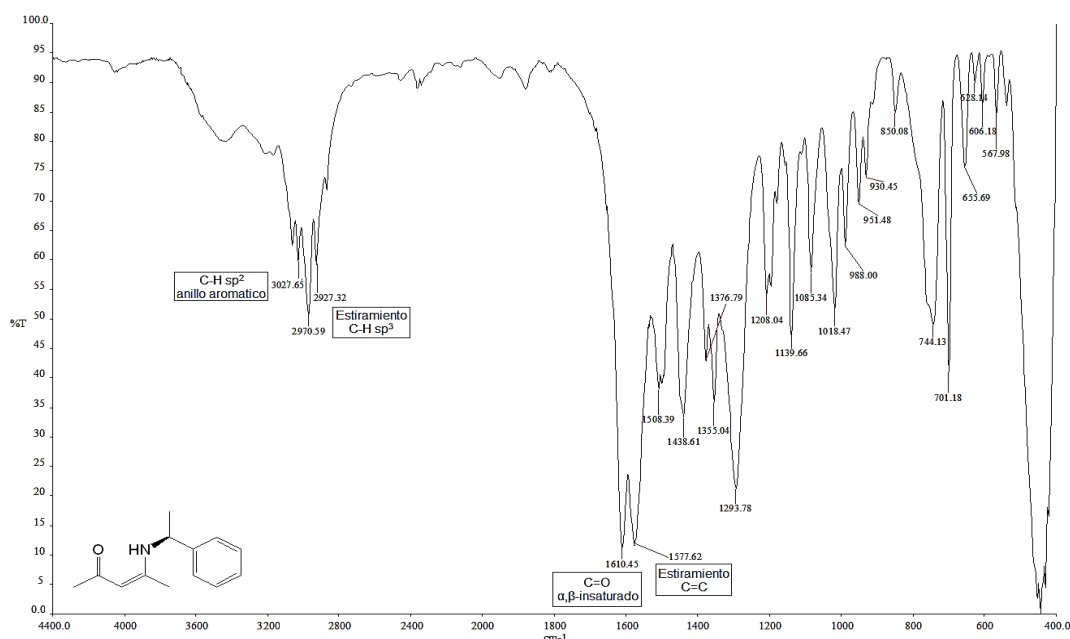


Figura 10. Espectro de infrarrojo para la enaminona **11**

En la Figura 11A se muestra el espectro de RMN ^1H de la enaminona **11**, donde se pudo observar una señal ancha en 11.243 ppm para el protón unido a nitrógeno, un singulete en 4.984 ppm para el protón vinílico (H-3) y un singulete para los protones del metilo base de la doble ligadura (H-5) en 1.781 ppm . También se observaron señales para el grupo amino en $4.684\text{--}4.637\text{ ppm}$ para el hidrógeno (H-1') como señal compleja, un doblete en 1.535 ppm para los protones del metilo (H-2') con una constante de acoplamiento de 6.84 Hz y señales entre 7.343 y 7.230 ppm para los cinco protones del grupo benzoilo.

Para corroborar la estructura de la enaminona **11** se realizó el espectro de RMN ^{13}C (Figura 11B), observando once señales que corresponden al total de carbonos. La asignación de señales de RMN ^{13}C y RMN ^1H se muestra en la Tabla 8.

Resultados y Discusión

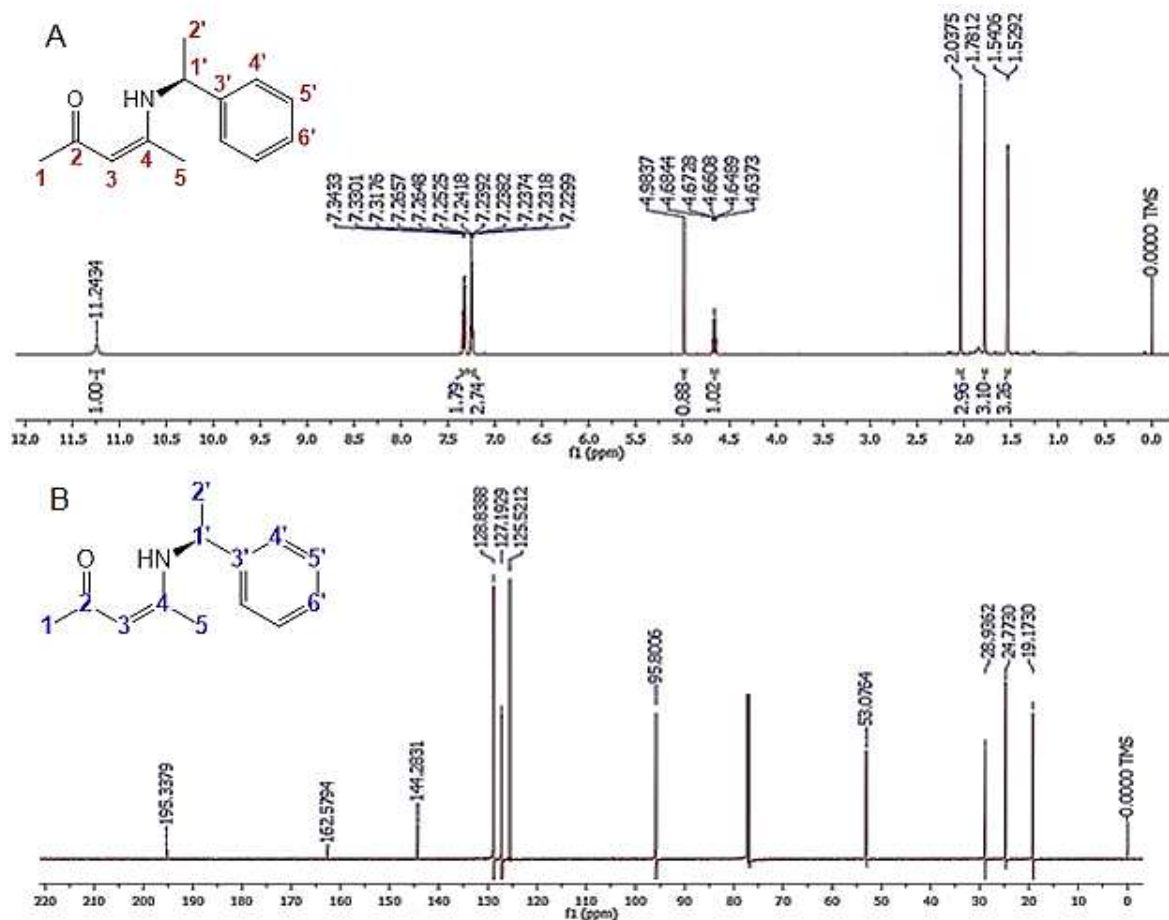


Figura 11. A: Espectro de RMN ^1H de 11, B: Espectro de RMN ^{13}C de 11

Tabla 8. Señales en RMN ^1H y RMN ^{13}C para la enaminona 11

Protón	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
H-1	2.038 s	C-1	28.936
H-3	4.984 s	C-2	195.338
H-5	1.781 s	C-3	95.801
NH	11.243 sa	C-4	162.579
H-1'	4.684-4.637 m	C-5	19.170
H-2'	1.535 d, $J=6.84$ Hz	C-1'	53.076
H-5'	7.343-7.318 m	C-2'	24.773
H-4' y H-6'	7.266-7.230 m	C-3' a C-6'	144.283, 125.521 128.839, 127.193

Resultados y Discusión

8.2.4. Enaminona (*Z*)-3-(metilamino)-1 fenilbut-2-en-1-ona (**14**)

El espectro de infrarrojo de la enaminona **14** mostró una banda de absorción en 3432.40 cm^{-1} asociada al estiramiento N-H, una señal débil en 3050.88 cm^{-1} para el estiramiento C-H, una señal intensa en 1596.43 cm^{-1} para el carbonilo α,β -insaturado y una señal intensa en 1579.16 cm^{-1} para el estiramiento C=C. Además de señales débiles para los movimientos de flexión y tensión para C-H sp^3 entre 2998.81-2809.46 cm^{-1} . Por otro lado, en el espectro de UV-vis se observaron dos máximos para la doble ligadura y el anillo aromático en 236.80 y 340.07 nm respectivamente.

En la Figura 12 se muestra el espectro de RMN ^1H de la enaminona **14**, observando las señales características en 11.329 ppm para el protón unido a nitrógeno, en 5.686 ppm un singulete para el protón vinílico (H-2) y en 2.056 ppm un singulete para los protones del metilo base de la doble ligadura (H-4). Además se observaron las señales del *N*-metilo en 3.011 ppm como un doblete con constante de acoplamiento de 5.28 Hz y señales complejas para los protones del grupo benzoilo entre 7.860 y 7.369 ppm

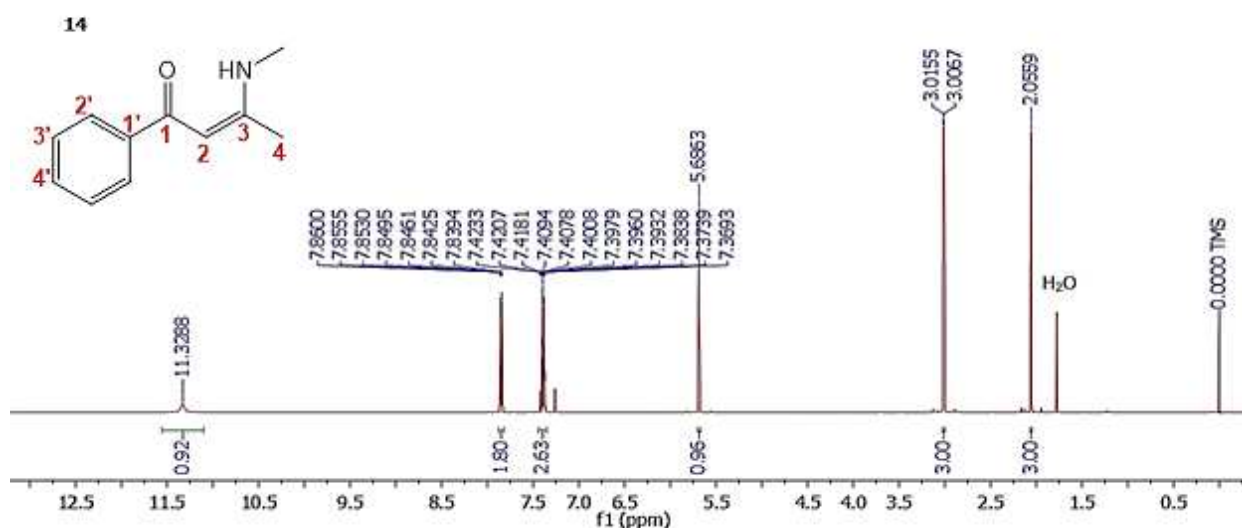


Figura 12. Espectro de RMN ^1H para la enaminona **14**

Finalmente la estructura de la enaminona **14** fue corroborada con el espectro de RMN ^{13}C , donde se observaron nueve señales diferentes para los carbonos de la enaminona (Figura 13).

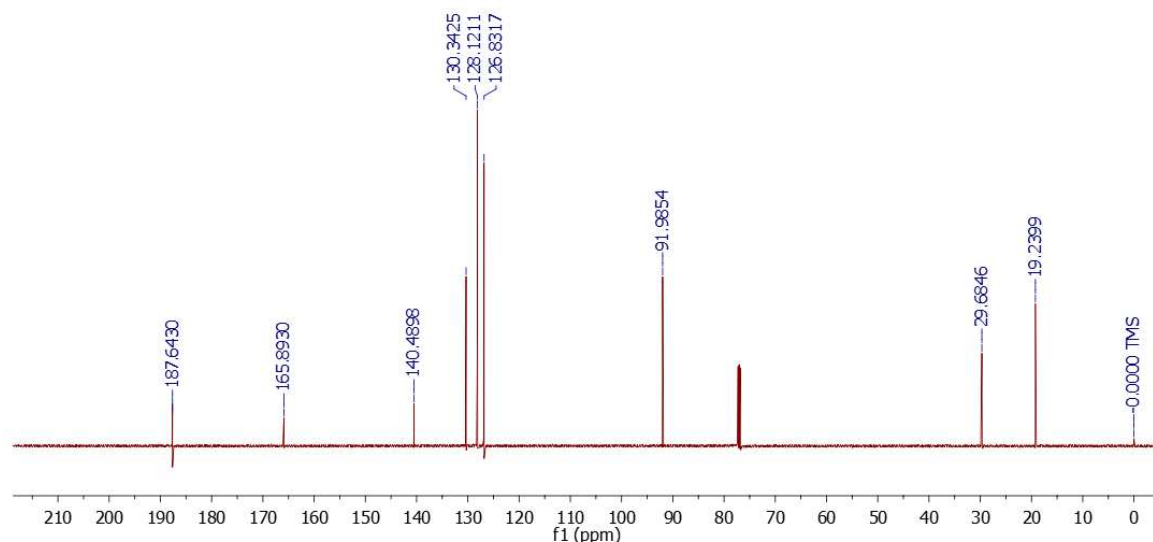
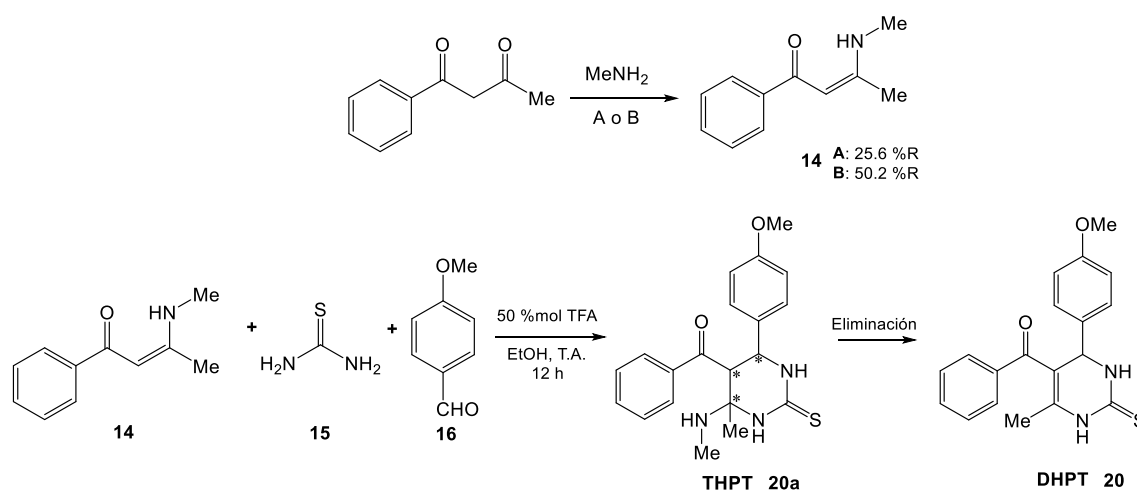


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C para la enaminona **14**

8.3. Síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (**20**)

El compuesto **20** se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Wan J. y Pan Y.,^{20, 21}, logrando aislar un sólido amarillo en un 47% de rendimiento como la probable THPT.(**20a**). El compuesto obtenido fue caracterizado por IR, RMN ^1H y ^{13}C .



A: 10% TsOH, TEA, DCM, T.A.
B: 10% TsOH, TEA, MeOH, MO a 150°C

Esquema 11. Síntesis de tetrahidropirimidintonas

8.3.1. Elucidación estructural del compuesto 20

El compuesto **20** presentó en espectroscopia de infrarrojo una señal intensa en 1618.42 cm^{-1} para el carbonilo, una señal intensa en 1211.79 cm^{-1} para el grupo C=S, una señal fina en 3315.43 cm^{-1} para al estiramiento N-H. Además de señales débiles en 3098.22 cm^{-1} y en 2999.84 cm^{-1} para el estiramiento C-H con hibridación sp^2 y sp^3 respectivamente. El espectro de UV-Vis de este compuesto presento tres máximos en 213.30, 252.80 y 333.77 nm.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) mostró 15 señales correspondientes a 15 tipos de carbonos diferentes, y no se observó una señal para el *N*-metilo característica del grupo amino de la THPT (**20a**). Este resultado se comprobó en el espectro de RMN ^1H (Figura 15) donde se observaron 10 señales correspondientes a 18 protones, donde se puede observar claramente la ausencia de las señales características de la THPT como son el protón en posición α al carbonilo y las señales de la metilamina. Además se esperaría que grupo metilo en posición β al carbonilo tuviera un desplazamiento químico cercano a 1.00 ppm característico de un metilo alifático.

Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H se pueden apreciar las señales características de la DHPT como lo son las señales para los N-H del anillo de pirimidina en 10.287 y 9.608 ppm, un doblete para el protón (H-4) en 5.235 ppm con constante de acoplamiento de 3.54 Hz y un singulete para el metilo base de la doble ligadura en 1.729 ppm. También se observan las señales en la región de los aromáticos para el grupo benzoilo entre 7.545-7.449 ppm y para el anillo aromático disustituido entre 7.097-6.884 ppm, además de un singulete para el grupo metóxilo en 3.711 ppm.

Con lo anterior se pudo comprobar que los productos obtenidos bajo estas condiciones de reacción son las DHPT correspondientes y en ningún caso se logró aislar la THPT, esto se atribuye a que las condiciones de reacción son muy ácidas, favoreciéndose la eliminación tipo Hoffman del hidrógeno alfa al carbonilo y del grupo amino protonado en β .

Resultados y Discusión

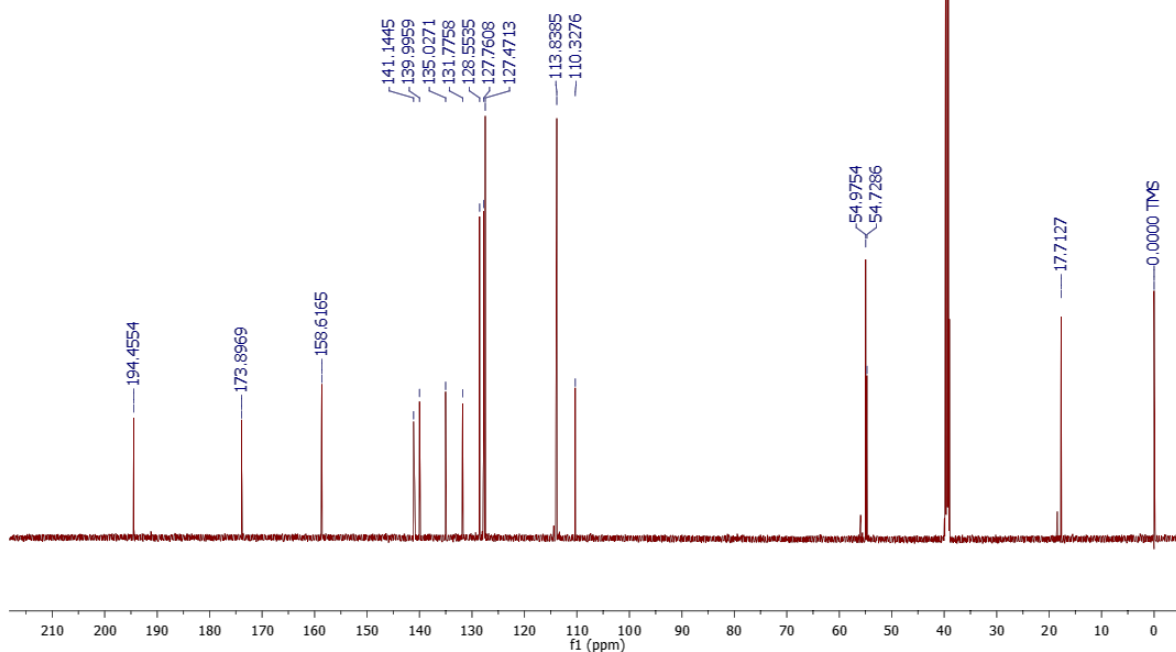


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 20

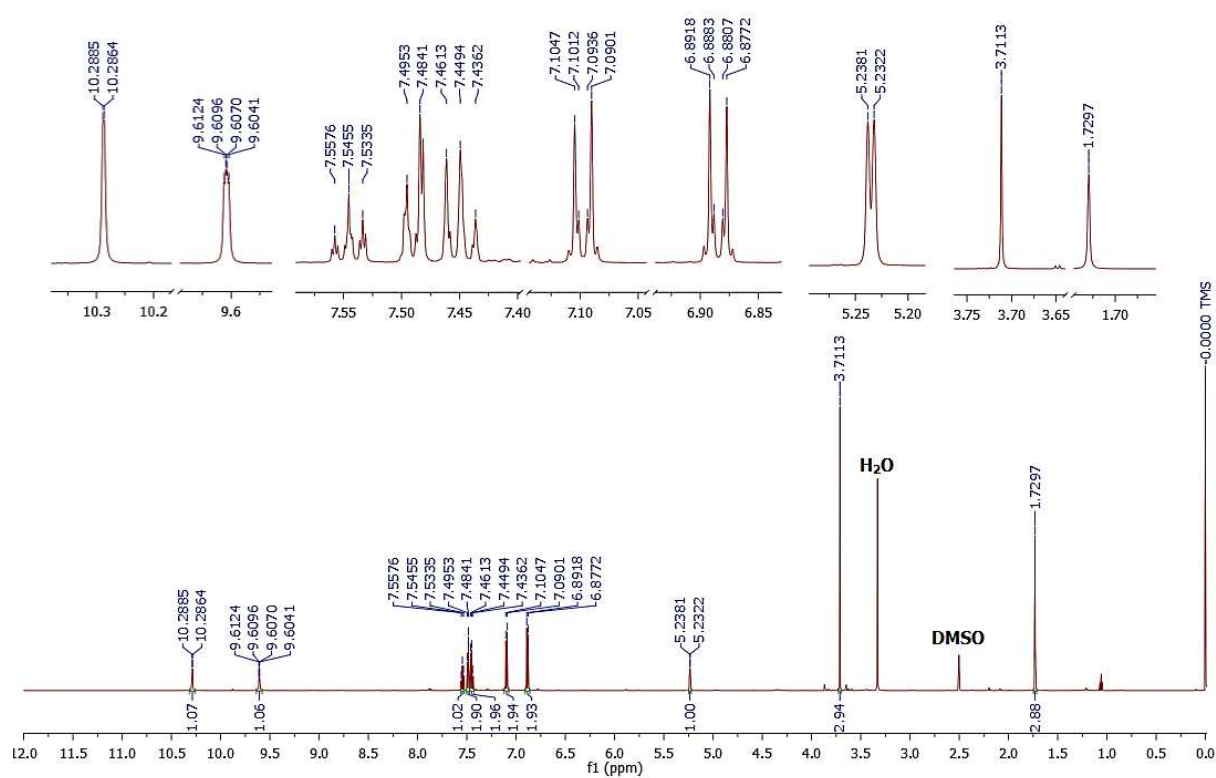


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H del producto 20

8.4. Síntesis de dihidropirimidintionas (DHPT)

La reacción de Biginelli es una de las reacciones de multicomponentes más utilizada para la obtención de sistemas heterocíclicos polifuncionales. Esta reacción se lleva a cabo a través de la ciclocondensación de un aldehído, un 1,3-cetoéster y urea o tiourea, permitiendo obtener dihidropirimidinonas o dihidropirimidintionas (DHPT).

Con base en reportes de dihidropirimidinas que presentan actividad biológica diferente para cada enantiómero¹, es necesario sintetizar estos compuestos como enantiómeros puros. En este estudio se busca obtener DHPMs enantioméricamente puras mediante síntesis asimétrica empleando auxiliares quirales.

8.4.1. Optimización de condiciones de reacción

Para la obtención de las dihidropirimidintionas se utilizó una enamionona (**8–13**), tiourea y el aldehído aromático 3-hidroxibenzaldehído (**17**) en una relación 1/1.5/1, variando el disolvente y la temperatura, así como probando diferentes catalizadores que han sido reportados para esta reacción, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de reacción (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimientos y condiciones de reacción para la síntesis de DHPT

Enaminona	Disolvente	Catalizador *	Temperatura	t rxn	Rendimiento
8	EtOH	ZnCl ₂	T. A.	96 h	< 10 %
11	EtOH	TsOH	T. A.	12 h	< 10 %
11	Benceno	TsOH	100 °C	72 h	21 %
8	EtOH	BF ₃ ·Et ₂ O	T. A.	96 h	17 %
9	EtOH	BF ₃ ·Et ₂ O	T. A.	120 h	16 %
11	EtOH	BF ₃ ·Et ₂ O	T. A.	18 h	22 %
9	EtOH	BF ₃ ·Et ₂ O	50 °C	120 h	18 %
9	EtOH	CAN/TMSCl	50 °C	48 h	< 10 %
11	EtOH	CAN/TMSCl	T. A.	12 h	32 %
9	EtOH	TMSCl	T. A.	24 h	65 %
9	DMF	TMSCl	120 °C	5 h	81 %
11	EtOH	TMSCl	T. A.	8 h	87 %
11	DMF	TMSCl	120 °C	2.5 h	84 %

*Los catalizadores ZnCl₂, TsOH y BF₃·Et₂O se usaron al 10 % mol, la mezcla CAN/TMSCl en 50 % mol en una relación 1:1 y el TMSCl se utilizó en 1.5 equivalentes.

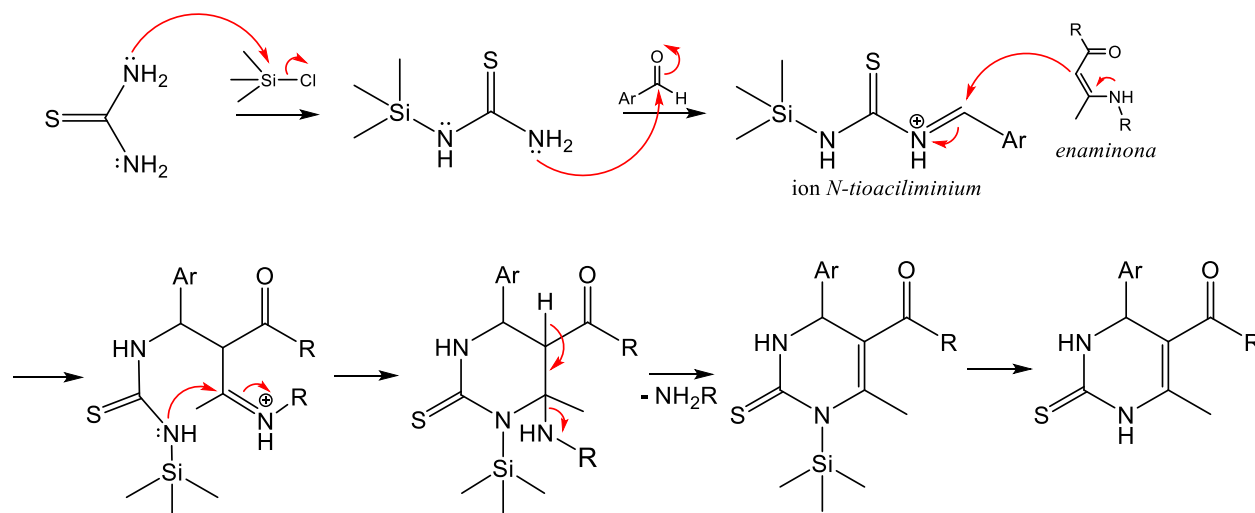
T. A.: Temperatura ambiente.

Resultados y Discusión

En los primeros estudios se probaron los tres ácidos de Lewis reportados para la síntesis de DHPT,¹ en cantidades catalíticas (10 % mol), encontrándose que la reacción catalizada con $ZnCl_2$ y $TsOH$ a temperatura ambiente o con calentamiento daban rendimientos que iban del 10 al 20%, con $BF_3 \cdot Et_2O$ a temperatura ambiente o calentamiento los rendimientos variaban del 16 al 20%, sin embargo en todos los casos quedaba materia prima sin reaccionar y había formación de subproductos.

En la búsqueda de mejores resultados se probaron otros catalizadores y se modificaron las concentraciones de mismos. Primero se utilizó una mezcla de $CAN/TMSCl$ ²¹ al 50 % mol, obteniéndose un rendimiento de 32%. Cuando se llevó a cabo la reacción con $TMSCl$ en cantidad equimolar de tiourea²⁰ los rendimientos incrementaron entre un 80 a 87% dependiendo de la enaminona y el disolvente utilizados, esto se puede explicar por la activación de la tiourea con el $TMSCl$ para formar el ion *N*-tioaciliminio, el cual reacciona con la enaminona a DHPT (Esquema 12).⁴⁶

De acuerdo a lo anterior se determinó que las condiciones óptimas de reacción para obtener las DHPT en mejores rendimientos y menores tiempos de reacción son utilizando $TMSCl$ y DMF como disolvente a $120^\circ C$.



Esquema 12. Mecanismo de reacción con $TMSCl$

Resultados y Discusión

8.4.2. Síntesis de dihidropirimidintionas 21-26

Las DHPT **21–26** se prepararon por ciclocondensación de las enaminonas **8–13**, tiourea **15** y los aldehídos aromáticos **17** y **18** en una relación 1/1.5/1, empleando 1.5 equivalentes de TMSCl y 2 mL de DMF como disolvente a 120 °C y agitación constante.¹⁸ Al término de la reacción los productos se aislaron por precipitación con agua helada y fueron purificados por cromatografía en columna o recristalización.

En la Tabla 10 se describen los tiempos de reacción, rendimientos, y puntos de fusión para cada una de las DHPT. En forma general, los productos se obtuvieron en rendimientos que van de buenos a moderados 83.5-47.0 %, observándose los menores rendimientos en las DHPT **24–26**, la cuales tienen dos sustituyentes en el anillo aromático (3-OMe y 4-OH). Este resultado es de esperarse debido al efecto electrodonador del grupo metoxilo en posición *para*, que disminuye la electrofilia del carbonilo del aldehído

Tabla 10. Rendimiento, tiempo de reacción y propiedades de las dihidropirimidintionas **21-26**

Enaminona	DHPT	R ₁	R ₃	R ₄	t rxn	% R	P. F (°C)
8	21	OCH ₃ CH ₂	OH	H	4.5 h	75.4	188-190
9	21	OCH ₃ CH ₂	OH	H	5 h	80.7	188-190
10	22	CH ₃	OH	H	4 h	76.2	238-240
11	22	CH ₃	OH	H	4 h	83.5	238-240
12	23	C ₆ H ₅	OH	H	5 h	69.5	246-248
13	23	C ₆ H ₅	OH	H	6 h	74.1	246-248
8	24	OCH ₃ CH ₂	OCH ₃	OH	2.5 h	48.5	211-213
9	24	OCH ₃ CH ₂	OCH ₃	OH	5 h	49.9	211-213
10	25	CH ₃	OCH ₃	OH	5 h	47.0	228-230
11	25	CH ₃	OCH ₃	OH	5 h	58.0	228-230
12	26	C ₆ H ₅	OCH ₃	OH	2 h	55.6	233-235
13	26	C ₆ H ₅	OCH ₃	OH	1 h	65.7	233-235

Por otro lado, los compuestos sintetizados a partir enaminonas derivadas de una amina primaria (**9**, **11** y **13**) dieron mayores rendimientos que las enaminonas derivadas del éster metílico de L-prolina (**8**, **10** y **12**).

Resultados y Discusión

8.4.2.1. Elucidación estructural de dihidropirimidintionas 21-26

En los espectros de infrarrojo se identificaron seis señales representativas para las DHPT sintetizadas (**21–26**). Entre 3467.45-3418.24 cm^{-1} se encuentran los estiramientos N-H del anillo de pirimidina, entre 3296.06-3245.98 cm^{-1} el estiramiento O-H del fenol, en 1630.28-1608.25 cm^{-1} se encuentran las bandas características del grupo C=O de éster o cetona α,β -insaturada, entre 1589.88-1576.58 cm^{-1} una banda intensa para el estiramiento C=C y entre 1200.00-1190.56 una banda intensa para el grupo C=S. Además de las bandas correspondientes al estiramiento C-H con hibridación sp^3 y sp^2 de los metilos, metilenos y de los hidrógenos aromáticos entre 3022.48-2989.34 cm^{-1} . A manera de ejemplo en la Figura 16 se muestra el espectro de infrarrojo para el compuesto **22**.

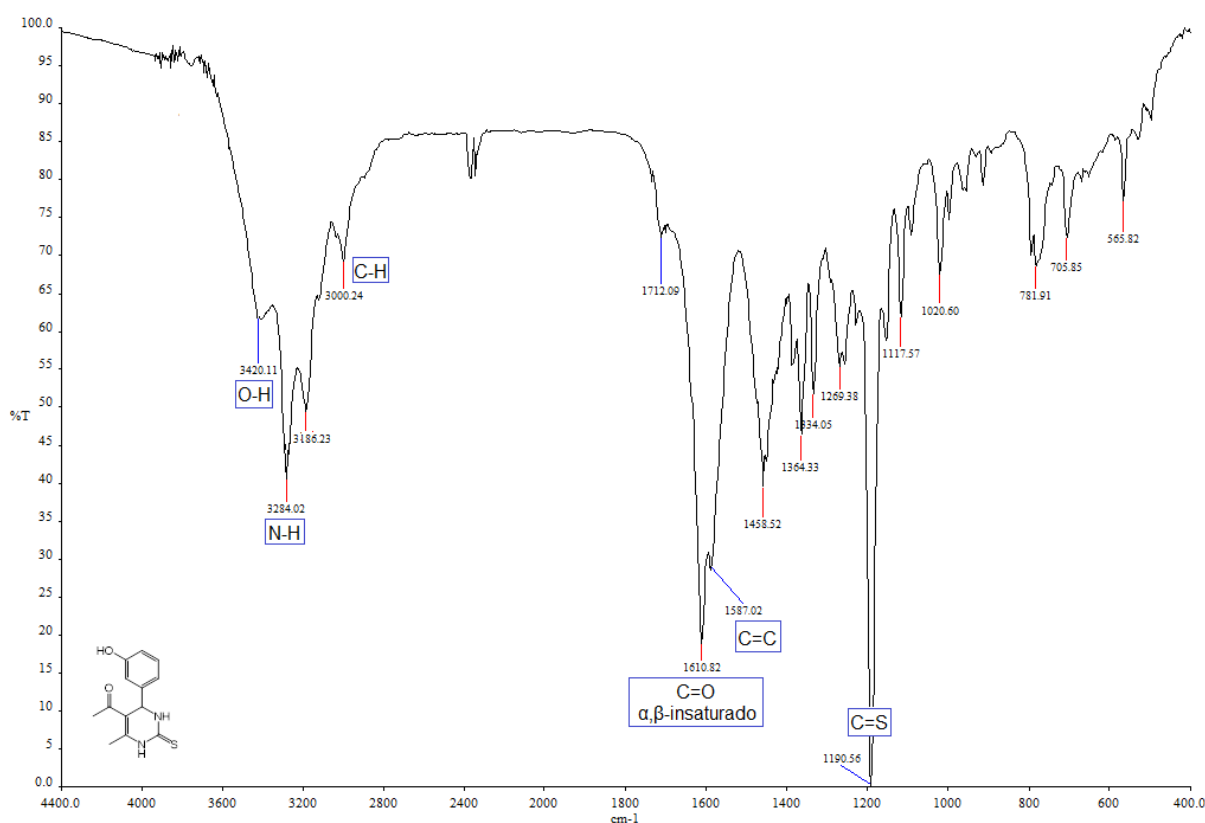


Figura 16. Espectro de infrarrojo del compuesto **22**

Las bandas de absorción identificadas en los espectros de IR permitieron comprobar que los productos **21–26** poseen en su estructura los grupos funcionales esperados, lo que demuestra que la ciclocondensación se llevó a cabo con éxito. La asignación de las señales más representativas para cada compuesto se muestra en la Tabla 11.

Resultados y Discusión

Tabla 11. Bandas características para las DHPT **21–26** en espectroscopia de IR

DHPT	NH	OH	C=O	C=S	C=C	C-H
21	3421.87	3256.10	1629.13	1190.82	1588.26	3011.39 2989.77
22	3420.11	3284.02	1610.82	1190.56	1587.02	3019.24 2997.13
23	3418.24	3245.98	1608.25	1200.00	1589.88	3022.48 2989.34
24	3465.44	3292.14	1630.28	1200.01	1583.61	3006.91
25	3467.45	3296.06	1628.74	1190.56	1585.48	3001.71
26	3462.17	3286.44	1624.77	1200.00	1576.58	3008.28

Los espectros de RMN ^1H de los compuestos obtenidos **21–26** presentaron el mismo tipo de señales para el anillo de DHPT, con diferencias en los desplazamientos debido a los sustituyentes.

Las señales características del anillo de DHPT son dos señales anchas en 10.286-10.222 ppm (H-3) y 9.696-9.551 ppm (H-1) para los protones unidos a nitrógeno del anillo de pirimidintiona, un doblete en 5.208-5.084 ppm para el protón (H-4) del centro estereogénico, y un singulete en 2.318-1.709 ppm para el metilo base de la doble ligadura. Además de grupos de señales en la región de 7.122-6.576 para los protones del anillo aromático di o trisustituido.

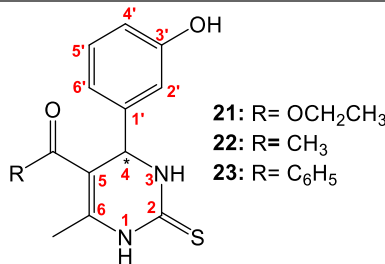
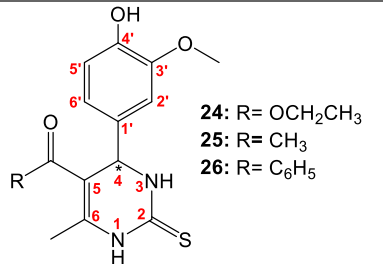
El resto de las señales observadas corresponden a los sustituyentes del anillo aromático y a los grupos alquílicos, encontrando entre 9.438-8.993 ppm un singulete para el protón fenólico y un singulete en 3.739-3.675 ppm para los protones el metóxilo. Para el grupo etóxilo de **21** y **24** se observa un cuadruplete en 4.023 y 4.022 ppm y un triplete en 1.124 y 1.122 ppm con constante de acoplamiento de 7.08 y 7.14 Hz respectivamente, para el metilo de **22** y **25** un singulete en 2.139 y 2.110 ppm, y para los protones del grupo benzoilo de **23** y **26** un grupo de señales complejas entre 7.548-7.439 ppm.

La asignación de las señales encontradas en RMN ^1H para los compuestos **21–26** se muestra en la Tabla 12, donde se puede observar que la mayor diferencia entre estos compuestos se encuentra en el desplazamiento químico del metilo base de la doble ligadura. Esta diferencia en los desplazamientos químicos se atribuye a la interacción del metilo con el grupo benzoilo de **23** y **26**, donde las señales aparecen en 1.709 ppm y

Resultados y Discusión

1.743 ppm respectivamente, debido a la nube electrónica del anillo aromático que se encuentra frente al metilo, la cual genera un efecto protector que favorece que la señal aparezca en frecuencias más bajas.

Tabla 12. Señales más importantes de RMN de ^1H para los compuestos **21-26**

Estructura						
	21	22	23	24	25	26
H-1	9.593 m	9.696 m	9.604 m	9.553 m	9.680 m	9.551 m
H-3	10.286 m	10.237 sa	10.284 sa	10.247 m	10.222 m	10.247 m
H-4	5.090 d, $J=3.84$ Hz	5.208 d, $J=3.96$ Hz	5.207 d, $J=3.54$ Hz	5.084 d, $J=3.72$ Hz	5.201 d, $J=3.78$ Hz	5.205 d, $J=3.42$ Hz
C=CCH₃	2.282 s	2.318 s	1.709 s	2.278 s	2.316 s	1.743 s
OH	9.427 s	9.439 s	9.463 s	8.993 s	9.056 s	8.999 s
OCH₃	NA	NA	NA	3.728 s	3.739 s	3.675 s
Anillo aromático	7.118 t, $J=7.62$ Hz 6.660-6.640 m	7.122 t, $J=7.74$ Hz 6.671-6.642 m	7.090 t, $J=7.80$ Hz 6.641-6.565 m	6.787 d, $J=2.04$ Hz 6.722 d, $J=8.16$ Hz 6.589 dd, $J=8.16,$ 2.10 Hz	6.849 d, $J=2.04$ Hz 6.719 d, $J=8.16$ Hz 6.576 dd, $J=8.16,$ 2.10 Hz	6.713 d, $J=8.10$ Hz 6.676 d, $J=2.04$ Hz 6.591 dd, $J=8.16,$ 2.10 Hz
R	4.023 c, $J=7.08$ Hz 1.124 t, $J=7.08$ Hz	2.139 s	7.548 t, $J=7.02$ Hz 7.485-7.439 m	4.023 cd, $J=7.14,$ 1.2 Hz 1.122 t, $J=7.14$ Hz	2.110 s	7.551 t, $J=7.27$ Hz 7.521-7.445 m

En la Figura 17, se muestra el espectro del compuesto **21**, donde se observan las señales características de una DHPT en 10.286 ppm y 9.593 ppm para los protones del N-H, estas señales aparecen a frecuencias altas, debido que están en α a la tioamida. También un doblete para (H-4) en 5.090 ppm con una constante de acoplamiento de 3.84 Hz y un singulete en 2.282 ppm que integra para tres hidrógenos del metilo base de la doble ligadura. Además de un triplete en 7.117 ppm con constante de acoplamiento de 7.62 Hz para (H-5'), un multiplete entre 6.660-6.640 ppm que integra para otros tres hidrógenos

Resultados y Discusión

del anillo aromático con patrón de sustitución 1,3 y un singlete en 9.427 ppm para el protón del fenol. También se observan las señales para el grupo etilo del éster, como un cuádruplete y triplete en 4.023 ppm y 1.124 ppm con constante de acoplamiento de 7.08 Hz.

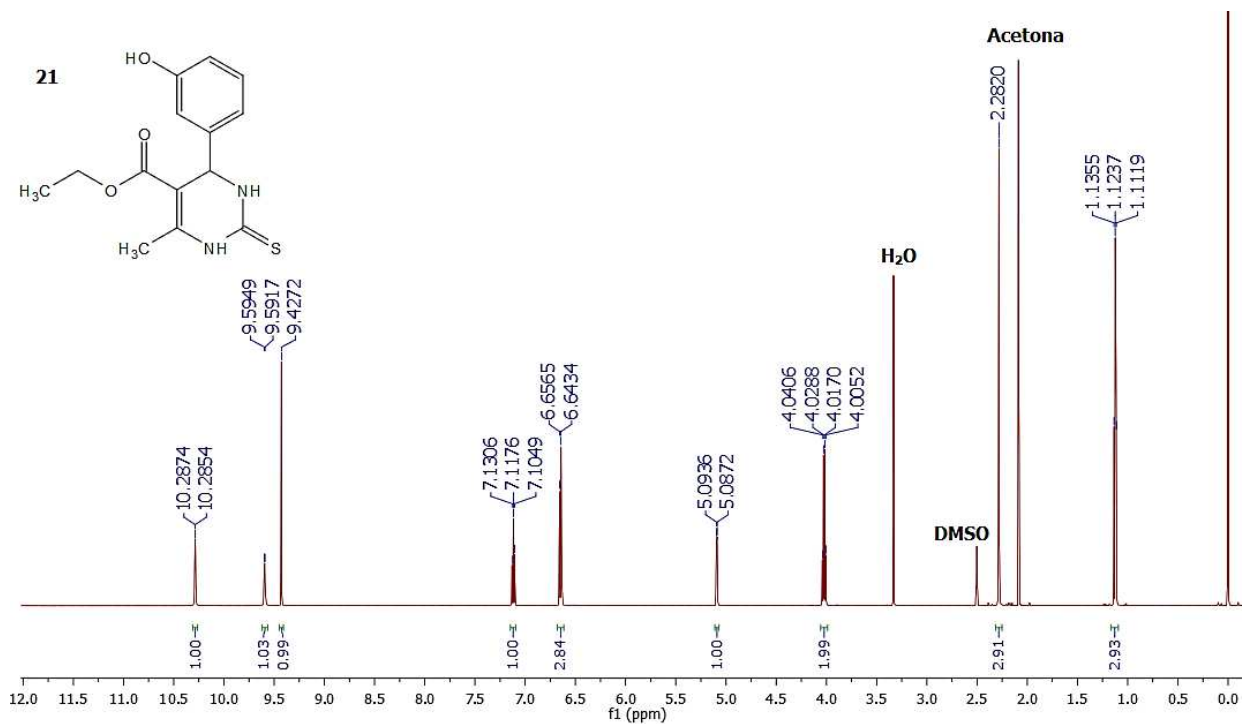


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **21**

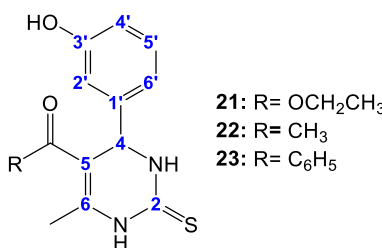
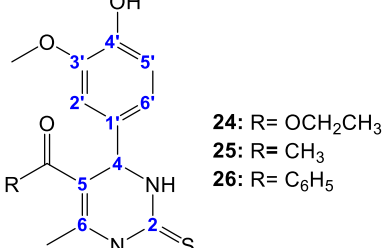
El análisis de los espectros de RMN ^{13}C confirmaron la obtención de las DHPT esperadas, se observaron las señales características para los carbonos del grupo $\text{C}=\text{O}$ entre 195.049-194.550 ppm para las cetonas y en 165.129-165.064 para los ésteres, el carbono de la tiona entre 174.650-173.512 ppm, los dos carbonos de la doble ligadura entre 144.798-140.764 ppm (C-6) y 110.831-100.673 ppm (C-5), el carbono del centro estereogénico (C-4) entre 55.777-53.552 ppm y el metilo base de la doble ligadura entre 18.154-17.008 ppm.

Además se observaron señales para los carbonos del anillo aromático sustituido en posición 1,3 entre 157.922-113.130 ppm, para el grupo etóxilo del éster aparecen dos señales entre 59.476-59.408 ppm y 13.980-13.935 ppm, para el metilo de la cetona una señal entre 30.191-30.049 ppm y para el anillo aromático de la fenona cuatro señales

Resultados y Discusión

entre 140.473-127.806 ppm. La asignación de las señales para los compuestos **21–26** en RMN ^{13}C se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Señales representativas en RMN de ^{13}C para las DHPT **21–26**

Estructura						
	21	22	23	24	25	26
C-2	174.073	173.836	174.650	173.920	173.513	173.839
C-4	53.835	53.715	55.777	53.552	53.568	55.053
C-5	100.673	110.223	110.831	100.866	109.936	110.306
C-6	144.724	144.180	144.798	144.484	144.027	140.764
C=O	165.064	194.710	195.049	165.129	194.952	194.550
C=CCH₃	17.046	18.077	18.154	17.008	18.007	17.595
C-1'	144.677	144.158	141.446	134.444	133.669	133.827
C-2'	113.130	113.318	113.470	110.823	111.091	110.634
C-3'	157.341	157.417	157.922	147.225	147.354	147.286
C-4'	114.493	114.559	115.074	146.039	146.084	146.043
C-5'	129.356	129.458	130.052	115.282	115.230	115.346
C-6'	116.881	117.064	117.148	118.421	118.577	118.599
OCH₃				55.462	55.413	55.435
R	59.476 13.935	30.191	132.390 128.302 129.124 140.473	59.408 13.980	30.049	139.903 128.547 127.806 131.798

En la tabla anterior, se puede observar que la señal de (C-5) para **21** y **24** tiene un desplazamiento químico menor (100.673 y 100.866 ppm) con respecto al resto de las DHPT, esto se atribuye al menor efecto electroatractor del grupo éster que favorece que el carbono alfa se encuentre a menor frecuencia de lo esperado para un carbonilo de cetona.

En la Figura 18 se muestra el espectro del compuesto **21**, donde se observan 14 señales correspondientes a una DHPT. Las señales características son: el grupo C=S en 174.073 ppm (C-2) que aparece con un desplazamiento menor que las cetonas, debido a que el azufre es menos electronegativo que el oxígeno, el carbono del carbonilo del éster en

Resultados y Discusión

165.064 ppm, las señales de los carbonos de la doble ligadura en 144.724 ppm (C-6) y 100.673 (C-5), la señal del carbono estereogénico (C-4) en 53.835 ppm y el metilo base de la doble ligadura en 17.046 ppm. Además se observan las 6 señales entre 157.341-113.130 para los carbonos del anillo aromático y dos señales para los carbonos del etóxilo en 59.476 ppm y 13.935 ppm.

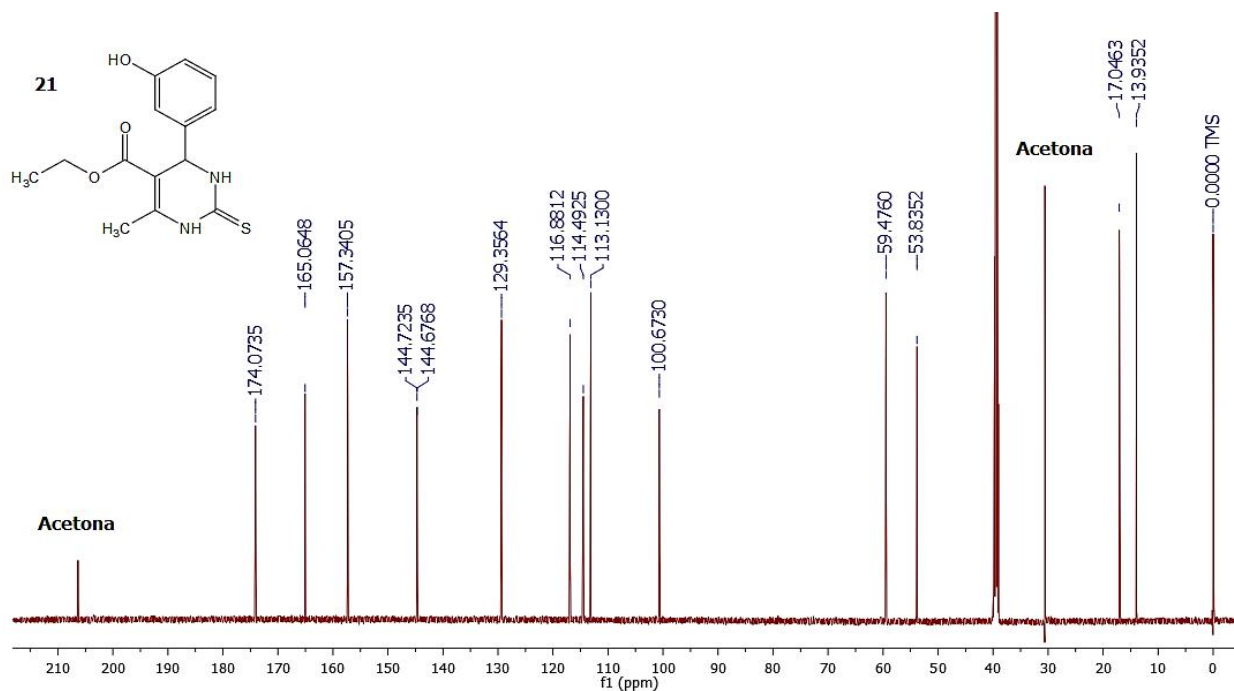
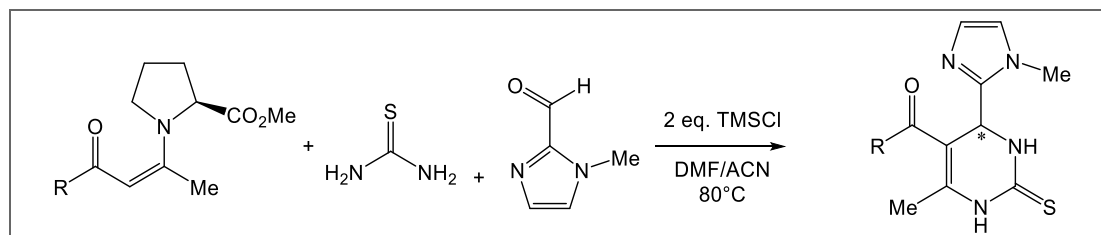


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **21**

8.4.3. Síntesis de dihidropirimidintionas 27–29

Los compuestos **27–29** se prepararon por reacción de la enaminona (**8**, **10** y **12**), tiourea (**15**) y 1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxaldehído (**19**) en una relación 1/1/1, disueltas en una mezcla de DMF y acetonitrilo (1:4) y 2 equivalentes de TMSCl a 80 °C.⁴⁴ Al término de la reacción se ajustó el pH entre 7-8 con una solución de Na_2CO_3 , seguido de enfriamiento para obtener los productos por precipitación. Los compuestos fueron purificados por cromatografía en columna o extracción sólido-líquido con MeOH como disolvente. Los tiempos de reacción, rendimiento y puntos de fusión se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Tiempo de reacción, rendimiento y punto de fusión de las dihidropirimidintionas **27–29**



DHPT	R	t rxn	% R	PF. (°C)
27	OCH ₂ CH ₃	3 h	48.79	>280
28	CH ₃	3 h	60.29	>280
29	C ₆ H ₅	5 h	54.50	257-260

Los puntos de fusión corresponden a la descomposición del producto

Los compuestos **27–29** se obtuvieron en rendimientos moderados del 48.79 al 60.29%, observándose el menor rendimiento en la DHPT **27**. La disminución del rendimiento para esta DHPT puede atribuirse a que los productos son dependientes del pH para obtenerse en su forma neutra.

8.4.3.1. Elucidación estructural de las dihidropirimidintionas **27–29**

Los compuestos **27–29** presentan el mismo sistema de anillos de DHPT e imidazol y solo se diferencian por el sustituyente en posición 5, por esta razón los espectros de IR, RMN de ¹H y ¹³C son muy semejantes y solo se diferencian por el sustituyente en 5.

Los espectros de infrarrojo para las DHPT **27–29** presentaron las mismas señales características como el estiramiento N-H entre 3430.01-3423.24 cm⁻¹, una banda de absorción en la región de 1589.18-1587.98 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento C=C y una señal intensa entre 1202.35-1200.00 cm⁻¹ para el grupo C=S. También las señales en 3132.59-3113.40 cm⁻¹ y 2970.10-2967.49 cm⁻¹ para los estiramientos C-H de los carbonos con hibridación sp² y sp³, respectivamente. Las bandas asociadas a los sustituyentes en 5 se observan en 1627.55 cm⁻¹ para el carbonilo del éster de **27**, y en 1610.07 y 1608.25 cm⁻¹ para las cetonas **28** y **29**, las cuales se encuentran desplazadas a menor frecuencia por efecto de la insaturación en posición α-β.

En la Figura 19 se muestra el espectro de infrarrojo del compuesto **29** y en la Tabla 15 la asignación de las señales en infrarrojo para las DHPT **27–29**

Resultados y Discusión

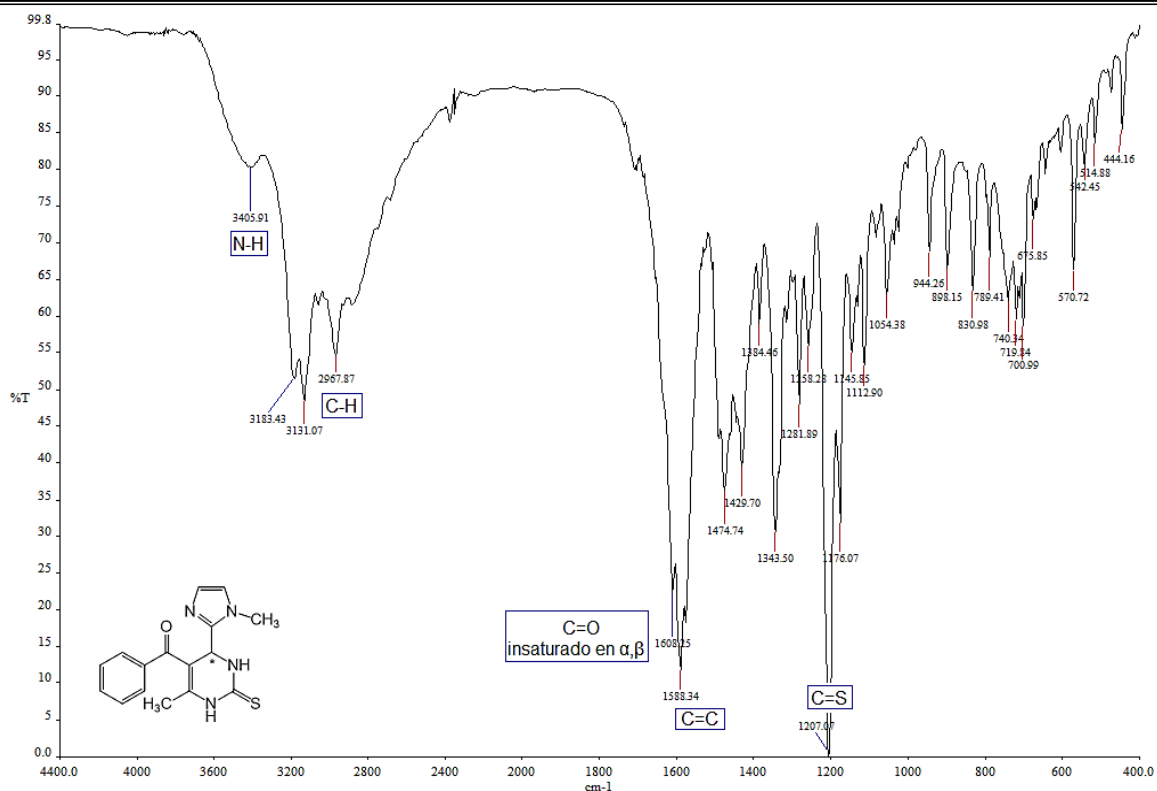


Figura 19. Espectro de infrarrojo para el compuesto 29

Tabla 15. Resumen de señales identificadas en infrarrojo para las DHPT 27-29

Estructura	DHPT	R	NH	C-H	C=O	C=S	C=C
	27	OCH ₂ CH ₃	3430.01	3110.40 2969.14	1627.55	1200.00	1589.18
	28	CH ₃	3426.38	3128.14 2970.10	1610.07	1200.10	1587.98
	29	C ₆ H ₅	3423.24	3132.59 2967.49	1608.25	1202.35	1588.41

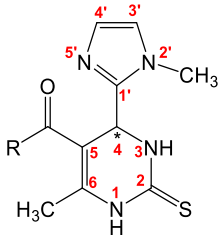
En los espectros de RMN ¹H de los compuestos **27–29** se observan las señales esperadas para los protones del anillo de imizadol, y del *N*-metilo. En el anillo de DHPT se observaron los protones unidos a nitrógeno, el hidrógeno del centro estereogénico, los tres protones del metilo base de la doble ligadura, así como las señales para el sustituyente en posición 5.

En la región de alta frecuencia del espectro se observaron las señales para los protones unidos a nitrógeno entre 10.310-10.267 ppm y 9.553-9.465 ppm, y dos dobletes para los

Resultados y Discusión

protones del anillo de imidazol entre 7.017-6.989 ppm (H-4') y 6.766-6.725 ppm (H-3'). En la región media del espectro se encuentra un doblete para el protón del centro estereogénico (H-4) entre 5.451-5.313 ppm. En la región de baja frecuencia se localizan las señales para los metilos y metilenos presentes en la molécula, encontrando entre 3.732-3.592 ppm un singulete para el *N*-metilo y entre 2.270-1.675 ppm un singulete para el metilo base de la doble ligadura. Para el grupo etilo del éster **27** se observaron una señal compleja en 3.969-3.923 ppm y un triplete en 1.037 ppm con una constante de acoplamiento de 7.14 Hz, para el metilo de **28** un singulete en 2.311 ppm, y dos señales complejas entre 7.538-7.484 ppm y 7.448-7.423 ppm que integran para tres y dos hidrógenos respectivamente, correspondientes al grupo benzoilo de **29**. La asignación de los desplazamientos químicos, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento para cada uno de los protones se describe en la Tabla 16.

Tabla 16. Asignación de señales en RMN ¹H para las DHPT **27–29**.

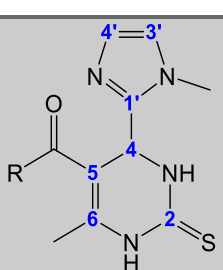
Estructura	Protón	27	28	29
 <p> 27: R= OCH₂CH₃ 28: R= CH₃ 29: R= C₆H₅ </p>	H-1	9.465 sa	9.553 sa	9.520 s
	H-3	10.272 sa	10.267 s	10.310 s
	H-4	5.313 s	5.395 d, <i>J</i> =3.42 Hz	5.451 d, <i>J</i> =2.76 Hz
	C=CCH₃	2.270 s	2.124 s	1.675 S
	H-3'	6.741 d, <i>J</i> =1.08 Hz	6.725 d, <i>J</i> =1.02 Hz	6.766 d, <i>J</i> =1.08 Hz
	H-4'	7.015 d, <i>J</i> =1.08 Hz	7.017 d, <i>J</i> =1.02 Hz	6.989 d, <i>J</i> =1.08 Hz
	N-CH₃	3.691 s	3.732 s	3.592 s
	R	3.969-3.923 m 1.037 t, <i>J</i> =7.14 Hz	2.311 s	7.538-7.484 m 7.448-7.423 m

Los espectros de RMN de ¹³C mostraron todos los carbonos de la estructura de los compuestos **27-29**. Las señales encontradas muestran en la región alta frecuencia el carbonilo de éster en 164.860 ppm para **27**, el carbonilo de cetona para **28** y **29** en 193.258 y 194.531 ppm, y el carbono del grupo C=S en 173.896, 172.841 y 173.896 ppm para **27**, **28** y **29** respectivamente. En la región media del espectro se localizan los carbonos con hibridación sp² correspondientes a la doble ligadura entre 145.09-142.632

Resultados y Discusión

ppm (C-6) y 108.456-98.587 ppm (C-5), los carbonos del anillo de imidazol entre 147.959-146.557 ppm (C-1'), 126.809-125.430 ppm (C-4') y 121.398-120.340 ppm (C-3'). En la región de menor frecuencia se encuentran las señales para los carbonos con hibridación sp^3 del carbono (C-4) del centro estereogénico entre 47.053-44.950 ppm (C-4), el *N*-metilo en 32.159-31.160 ppm y el metilo base de la doble ligadura entre 18.322-17.058 ppm. Además de las señales correspondientes al grupo etilo del éster **27** en 45.695 y 13.911 ppm, para el metilo de **28** una señal en 29.291 ppm, y entre 140.756-127.707 ppm cuatro señales para el grupo benzoilo de **29**. La asignación de las señales encontradas para estas DHPT en RMN ^{13}C se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Asignación de señales de RMN de ^{13}C para las DHPT **27–29**.

Estructura	Carbono	27	28	29
 <p>27: R= OCH₂CH₃ 28: R= CH₃ 29: R= C₆H₅</p>	C-2	173.756	172.841	173.896
	C-4	45.695	44.950	47.053
	C-5	98.587	108.182	108.456
	C-6	145.095	143.427	142.632
	C=CCH ₃	17.058	17.254	18.322
	C=O	164.860	193.258	194.531
	C-1'	147.959	146.557	147.523
	C-3'	121.072	120.340	121.398
	C-4'	126.633	125.430	126.809
	<i>N</i> -CH ₃	32.075	31.160	32.159
	R	59.305 13.911	29.291	140.756, 131.515 128.500, 127.707

8.5. Pureza óptica de las dihidropirimidintionas

Con el objetivo de determinar la actividad óptica de las DHPT obtenidas se midió la rotación óptica específica a 589 nm ($[\alpha]_D^{25^\circ C}$) de cada uno de los compuestos empleando un polarímetro automático (Anton Paar Modelo MCP 200) y una celda de un decímetro de longitud con capacidad de 2.0 mL y temperatura controlada a 25 ± 0.2 °C. Las lecturas fueron realizadas por quintuplicado de soluciones metanólicas de cada DHPT en concentraciones de 0.093-0.103 g/100 mL, y el cálculo de la rotación óptica específica fue realizado directamente por el equipo de acuerdo a la ecuación (1) descrita en la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).⁴⁷

Resultados y Discusión

Ecuación (1)
$$[\alpha]_D^{25^\circ C} = \frac{\alpha * 100}{l * c}$$

Donde: α = rotación óptica, l = longitud de la celda en decímetros y c = concentración de la muestra en g/100 mL.

Los valores de rotación óptica específica para cada una de las DHPT se muestran en la Tabla 18, donde se puede observar que la mayoría de los productos fueron ópticamente activos, sin embargo los valores de rotación óptica positivos y negativos indican que la inducción asimétrica por parte de las enaminonas no fue estereoselectiva.

Tabla 18. Valores de rotación óptica específica para las DHPT

Enaminona	DHPT	c (g/100 mL)	$[\alpha]_D^{20^\circ C}$
8	21	0.102	+0.00
9	21	0.101	+0.00
10	22	0.100	-9.20
11	22	0.100	+0.60
12	23	0.100	-11.40
13	23	0.101	+5.15
8	24	0.102	+2.74
9	24	0.100	+1.40
10	25	0.100	+0.40
11	25	0.103	+5.05
12	26	0.100	+4.40
13	26	0.093	+4.73
8	27	0.101	+0.79
10	28	0.101	+0.49
12	29	0.098	+0.00

Por otro lado, con base en los valores reportados en la literatura para el (*S*)-Monastrol (**21**): $[\alpha]_D^{20^\circ C}=+71$, $c=1.8$ en MeOH⁴⁶ y $[\alpha]_{436}^{20^\circ C}=+1.1$, $c=0.007$ en MeOH⁴⁹, no hubo inducción asimétrica cuando se utilizaron las enaminonas quirales en la formación de la DHPT y se obtuvo una mezcla racémica.

Las DHPT **22–29** mostraron valores de rotación óptica específica cercanos a cero, indicando excesos enantioméricos muy bajos, confirmando que las enaminonas quirales utilizadas no favorecieron la formación enantioselectiva de DHPT bajo las condiciones de reacción estudiadas.

Resultados y Discusión

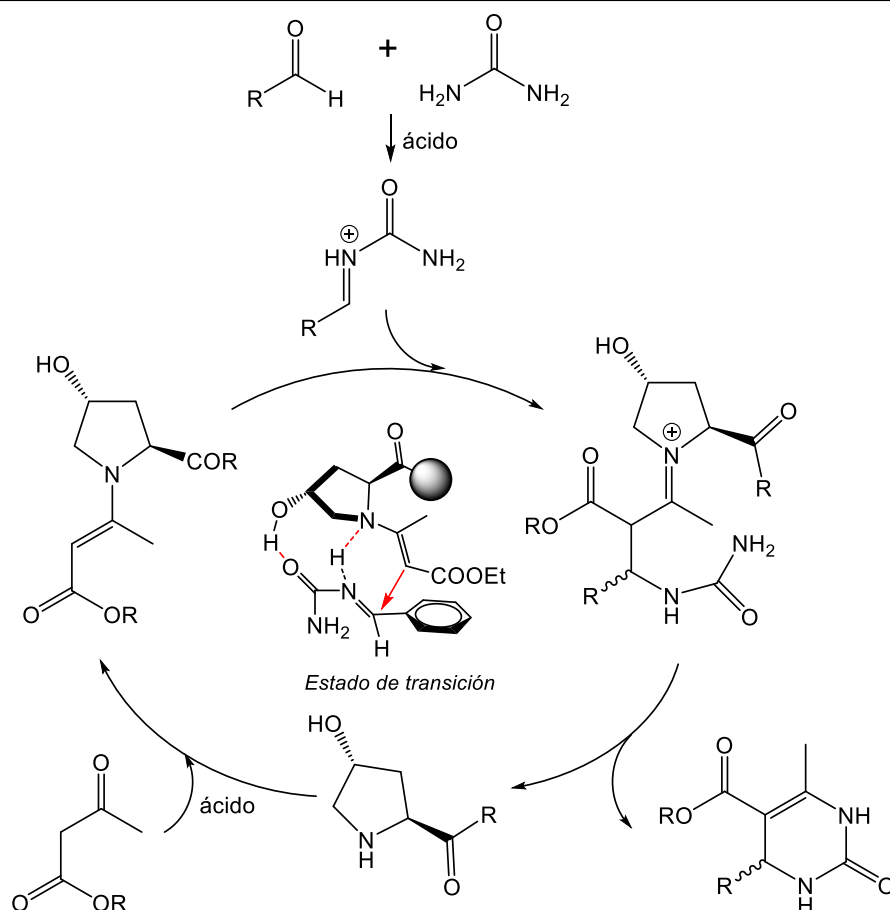
Aunque existen reportes en la literatura donde se utiliza a la (*S*)-L-prolina y derivados como catalizadores, en reacciones de condensación aldólica y se obtienen *e.e.* arriba del 70%,¹³ o reportes donde se utilizan derivados de la *trans*-4-hidroxi-prolina y se obtienen DHPM con altos *e.e.* que van del 60 al 90%,⁴³ en nuestro caso la presencia del éster metilo de L-prolina no dio los resultados esperados para las DHPT, resultado que concuerda con lo reportado por Mabry y Ganem, donde obtiene mezclas racémicas para DHPM cuando utilizando el mismo éster como catalizador.¹⁸

De manera general los aminoácidos son utilizados como catalizadores que forman iminas o enaminas *in situ* con los compuestos β -dicarbonilos, que son especies activadas que reaccionan con el ion *N*-tioaciliminio formado previamente por la condensación de el aldehído y la tiourea, para obtener la DHPT.

De acuerdo al mecanismo propuesto por Xin J. y colaboradores estas dos especies activadas están involucradas en la enantioselectividad de la reacción y para favorecer esta selectividad es necesario un sustituyente en la posición 4 del anillo de prolina con protones susceptibles a formar puentes de hidrógeno y un grupo alquílico voluminoso para conseguir una inducción asimétrica efectiva. En el Esquema 13 se muestra el mecanismo para la formación de las DHPT a partir de una enamina y el ion *N*-aciliminio, donde se puede observar que estas dos especies interactúan entre si a través de puentes de hidrógeno que favorecen el acercamiento por una de las caras, mientras que el grupo alquílico voluminoso impide la interacción en la cara posterior por efecto estérico.⁴³

El resultado anterior fue corroborado por Saha S. y colaboradores que obtuvieron DHPM con *e.e.* arriba del 90% cuando utilizaron catalizadores derivados de L-prolina con un sustituyente donador de protones en posición 4 y una amida aromática como grupo voluminoso.¹⁶

Resultados y Discusión



Esquema 13. Formación de DHPM vía enaminonas

Por otro lado, la aplicación de (*S*)-L-prolina u otros aminoácidos como catalizadores en reacciones de condensación o ciclocondensación, muestran ser eficientes para obtener los productos con altos rendimientos, argumentando que el aminoácido interactúa con los compuestos dicarbonílicos y/o el ion *N*-aciliminio a través de puentes de hidrógeno, activando dichos compuestos para favorecer la reacción.¹⁹

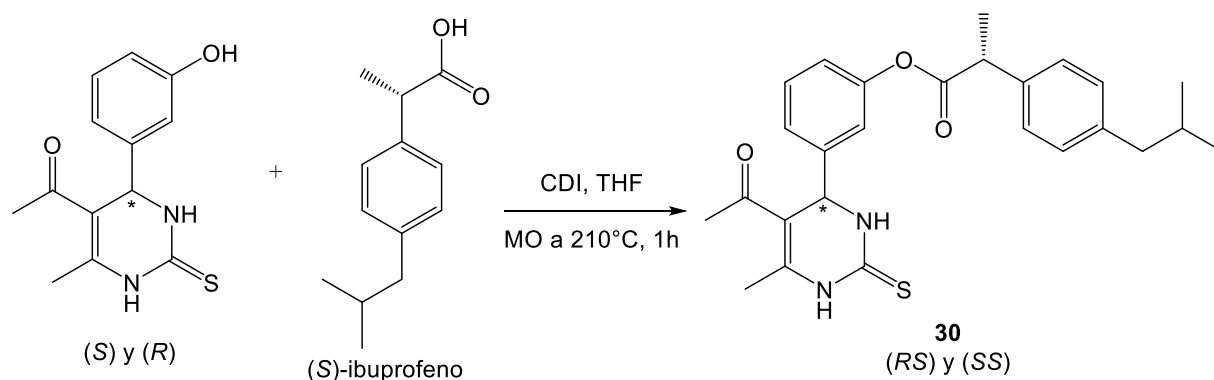
De acuerdo a lo anterior se puede determinar que el uso de las de enaminonas quirales sintetizadas en este trabajo como inductores de asimetría no tuvieron un efecto significativo sobre la enantioselectividad de las DHPT propuestas, sin embargo tuvieron un efecto importante sobre el rendimiento de la reacción, comprobando que las enaminonas son especies más reactivas que el correspondiente dicarbonílico.

Por otro lado, para corroborar la formación de la mezcla racémica de DHPT se realizó una derivatización de la DHPT **22**, con el fin de separar los diastereómeros y determinar la relación de enantiómeros formados, por RMN ¹H.

8.6. Derivatización de enantiómeros

Uno de los métodos empleados para conocer la relación entre enantiómeros es a través de la formación de sus correspondientes diasterómeros, utilizando un compuesto de configuración conocida, como el (*S*)-ibuprofeno. Los diasterómeros formados presentan propiedades físicas diferentes y pueden ser separados por cromatografía en columna.

Se prepararon ésteres diastereoisoméricos de la DHPT **22** con (*S*)-ibuprofeno, la esterificación se llevó a cabo a partir del (*S*)-ibuprofeno activado como el imidazólido por reacción con *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI), seguido de la adición de **22**. La mezcla de reacción fue calentada por irradiación con MO a 210 °C por 1h, para formar los dos ésteres diastereoisoméricos *SS* y *RS* (**30**). Esquema 14



Esquema 14. Síntesis de diasterómeros de DHPT con (*S*)-ibuprofeno

El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna, obteniéndose un 65 % de rendimiento de la mezcla de los diasterómeros, los cuales fueron caracterizados por RMN ¹H y RMN ¹³C con el objetivo de corroborar la estructura e identificar aquellas señales que permitieran determinar la relación de los enantiómeros en manera directa.

Resultados y Discusión

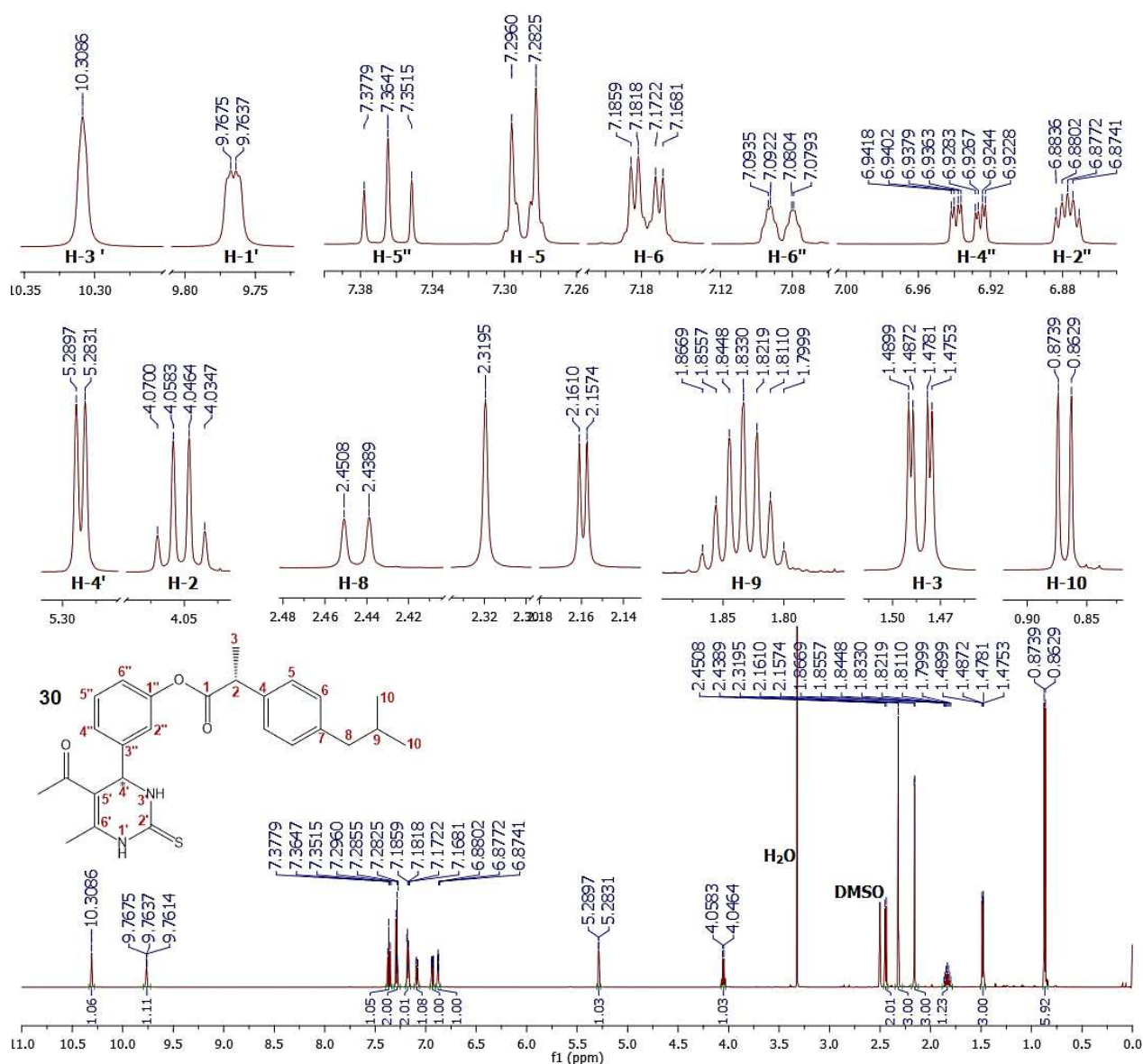


Figura 20. Espectro de RMN ^1H del éster diastereoisómico **30**

En la Figura 20 se muestra el espectro de RMN ^1H para los diastereómeros obtenidos (**30**) observando un singlete ancho en 10.309 ppm y 9.764 ppm para los protones unidos a nitrógeno (H-3') y (H-1') respectivamente. En la región de los protones aromáticos se observó un triplete en 7.365 ppm con $J=7.92$ Hz para (H-5''), un doblete en 7.086 ppm con $J=7.74$ para (H-6''), un ddd en 6.932 ppm con $J=8.10$, 2.34 y 0.96 Hz para (H-4'') y un multiplete en 6.877 ppm para (H-2''), todas señales del anillo sustituido en posición 1,3. Mientras que para el anillo sustituido en posición 1,4 se observaron dos señales en 7.289 ppm un doblete con $J=8.10$ Hz para (H-5) y un doble de doble en 7.177 ppm con $J=8.22$, 2.46 Hz para (H-6). En la región de baja frecuencia se observó un doblete en

Resultados y Discusión

2.445 ppm con $J= 7.14$ Hz para el metileno (H-8), en 1.833 ppm un nonaplete con $J= 6.54$ Hz para el protón del isopropilo (H-9) y en 0.868 ppm un doblete con $J= 6.60$ Hz para los metilos del isopropilo (H-10). También se observó un singulete en 2.319 ppm para el metilo de la cetona y un doblete en 2.159 ppm con $J= 2.16$ Hz para el metilo base de la doble ligadura. Así como las tres señales relacionadas con los centros estereogénicos. En 5.286 ppm un doblete con $J= 3.96$ Hz para el protón (H-4') de la DHPT, un cuadruplete en 4.052 ppm con $J= 7.14$ Hz para el protón (H-2) del ibuprofeno y dos dobletes en 1.490 y 1.475 ppm con una $J= 7.14$ Hz para los protones del metilo (H-3) del centro estereogénico de ibuprofeno, siendo esta última señal la que confirma que el producto obtenido es una mezcla de diasterómeros en una relación 50:50.

8.7. Actividad citotóxica, relaciones estructura-actividad y acoplamiento molecular

Existen reportes en la literatura de que algunas DHPT presentan actividad anticancerígena, siendo la más importante el Monastrol, el cual se ha demostrado que inhibe la acción de la enzima Kinesina Eg5 relacionada con la división celular.^{50, 51} Con el objetivo de mejorar esta actividad se han realizado modificaciones a esta estructura, siendo las más importantes las asociadas al anillo aromático y el grupo carbonilo, además de modificaciones que involucran la formación de nuevos ciclos adyacentes al anillo de pirimidina, entre otros.⁵

Por otro lado, el *screening* es utilizado como una prueba rápida para evaluar una serie de compuestos y encontrar aquellas moléculas que presenten actividad biológica sobre una o más líneas celulares. Con esta información se puede identificar la selectividad de la molécula sobre un tipo específico de células cancerosas y pueden establecerse relaciones estructura-actividad. Sin embargo, la prueba está limitada a determinar si hay o no actividad biológica y no proporcionan una información sobre el mecanismo de acción o las interacciones en el sitio de acción.

Para evaluar las actividad citotóxica de los compuestos análogos al monastrol **20–26, 29** (Figura 21), se realizó un *screening* primario siguiendo el protocolo propuesto por Monks.³³ Se utilizó una concentración fija de 50 $\mu\text{g/mL}$ de muestra disuelta en Dimetilsulfóxido (DMSO) sobre seis líneas celulares de cáncer: HCT-15 (colon), U251

Resultados y Discusión

(sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), MCF-7 (mama) y SKLU (pulmón) con el objetivo de encontrar aquellas moléculas que poseen una actividad inhibitoria por encima del 50 % a la concentración establecida, de esta manera se eligieron las moléculas con mayor potencial biológico, pero solo aquellas moléculas con un porcentaje de inhibición superior al 75 % son candidatas para el cálculo de la Concentración Inhibitoria media (CI₅₀). Como referencia se utilizó monastrol (**21**), debido a que se trata de una molécula con evidencia de actividad anticancerígena, además de ser la molécula líder como inhibidor de la enzima kinesina Eg5.

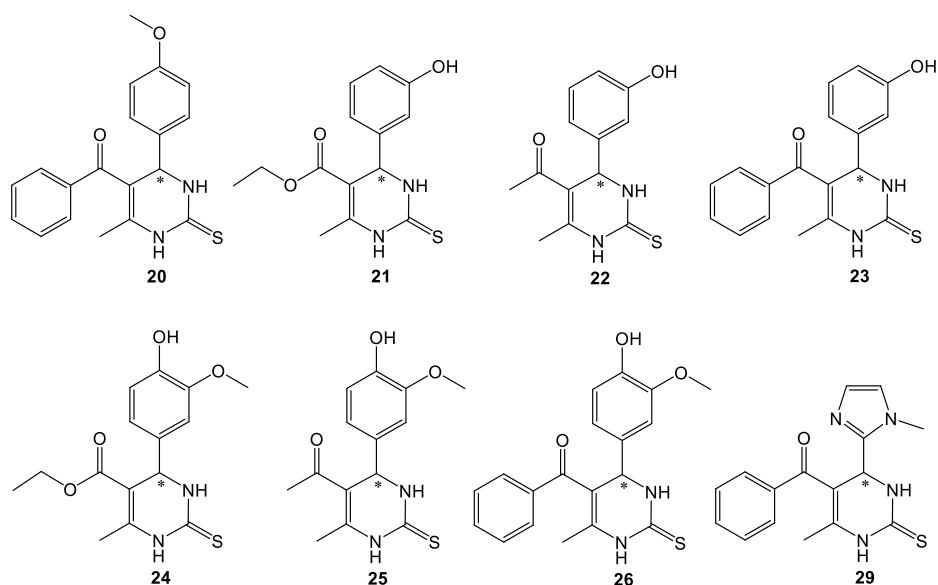


Figura 21. Estructura de las dihidropirimidintiones

En la Figura 22 se muestran los resultados del *screening*, donde podemos observar que el compuesto **21**, correspondiente al monastrol, presenta inhibición celular por encima del 50 % sobre las líneas celulares HCT-15 y K562. Este resultado indica que el monastrol es activo y específico para esas líneas celulares, teniendo mayor selectividad sobre la línea HCT-15 (78.54 % de inhibición celular). El compuesto **22** se comporta de manera similar al monastrol, sin embargo, fue ligeramente más activo sobre K562 (68.21%) pero menos activo contra HCT-15 (76.77%) en comparación con el monastrol. Por otra parte, el compuesto **23** presentó actividad citotóxica para todas las líneas celulares (inhibición celular superior a 50 %), teniendo mayor selectividad sobre K562 con 100 % de inhibición celular y SKLU-1 con 70.59 % de inhibición, sin embargo la actividad sobre HCT-15 fue menor en comparación con los compuestos **20–22** (inhibición del 57.72 %).

Resultados y Discusión

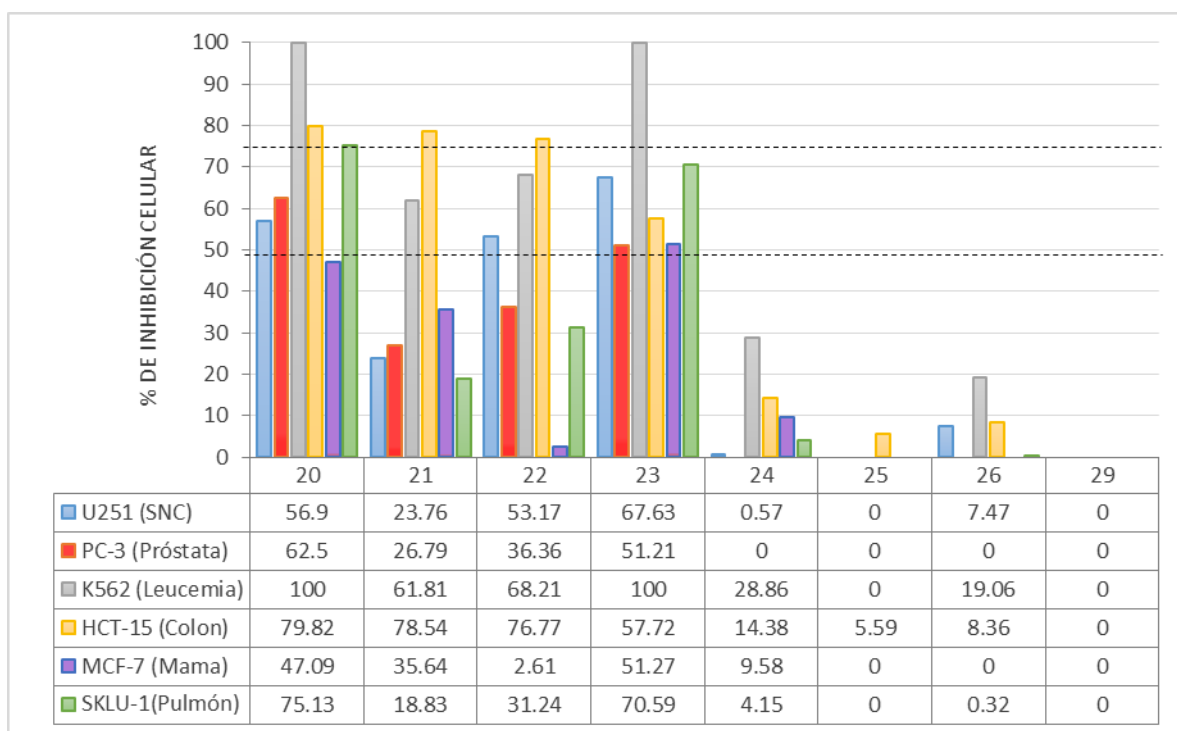


Figura 22 Porcentaje de inhibición del crecimiento por la línea celular para DHPTs.

Con lo anterior podemos establecer que la actividad de **21** no se modifica significativamente al sustituir el grupo éster con una cetona alifática (**22**). Este resultado coincide con lo observado en la estructura cristalográfica reportada por Yan y colaboradores para el monastrol (**21**) unido a la proteína Eg5 (Figura 23).⁵² La estructura cristalográfica muestra que no existen interacciones entre el sustituyente de la posición 5 del monastrol con Eg5 ya que se encuentra ubicado fuera del sitio de unión, no obstante, el hidroxilo sobre la posición 3 del sustituyente aromático y el nitrógeno de la posición 3 del anillo de pirimidina muestran una interacción por puente de hidrógeno importante con Glu-118 y Glu-116 respectivamente (Figura 24); de tal forma que cuando el hidroxilo se sustituye por un metoxilo o se cambia de posición en el anillo la actividad citotóxica se pierde (comparar compuestos **21** y **22** con **24** y **25**).

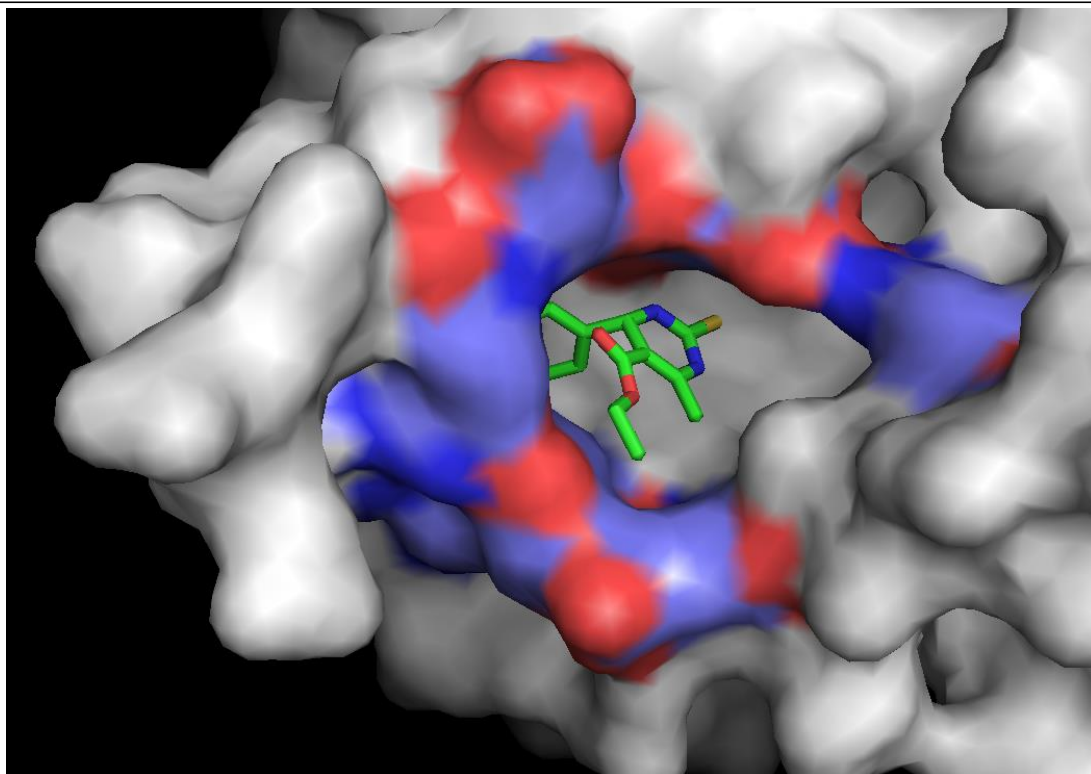


Figura 23. Estructura cristalográfica de monastrol unido a la proteína Eg5.

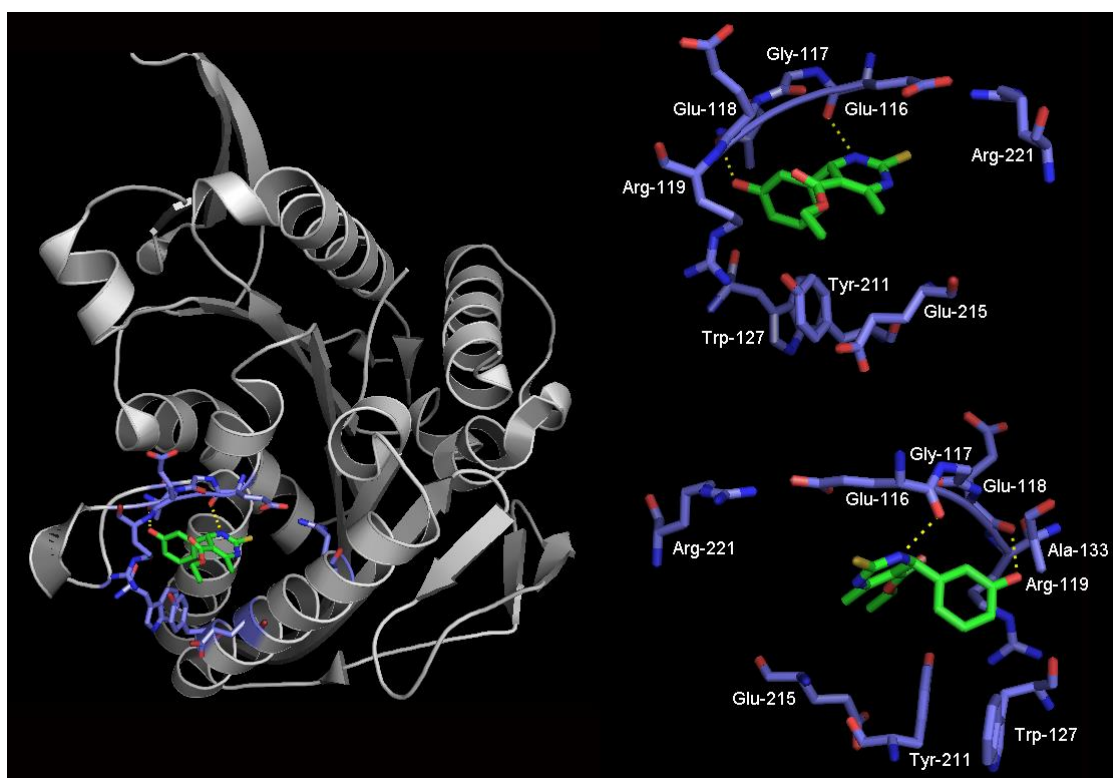


Figura 24. Interacciones por puente de hidrógeno en la estructura cristalográfica de monastrol unido a la proteína Eg5.

Resultados y Discusión

Por otro lado, se observa una excelente actividad citotóxica para los compuestos **20** y **23** que contienen una cetona aromática en la posición 5. Aunque esta observación contradice lo discutido anteriormente para los compuestos **21** y **22**, se ha reportado que los compuestos con un grupo benzoilo en posición 5 y una configuración (*R*) sobre la posición 4 pueden adoptar un distinto modo de unión sobre la proteína Eg5 y presentar una mejora importante en la actividad biológica. Esta evidencia ha sido reportada por García-Saez y colaboradores,⁵³ donde obtienen la estructura cristalográfica para el compuesto (*R*)-Mon-97 unido a Eg5 (Figura 25). Aunque el compuesto (*R*)-Mon-97 tiene una configuración opuesta con respecto al (*S*)-monastrol, es importante resaltar que los compuestos **20** y **23** fueron evaluados como mezclas racémicas por lo que ambos enantiómeros pueden contribuir a la actividad.

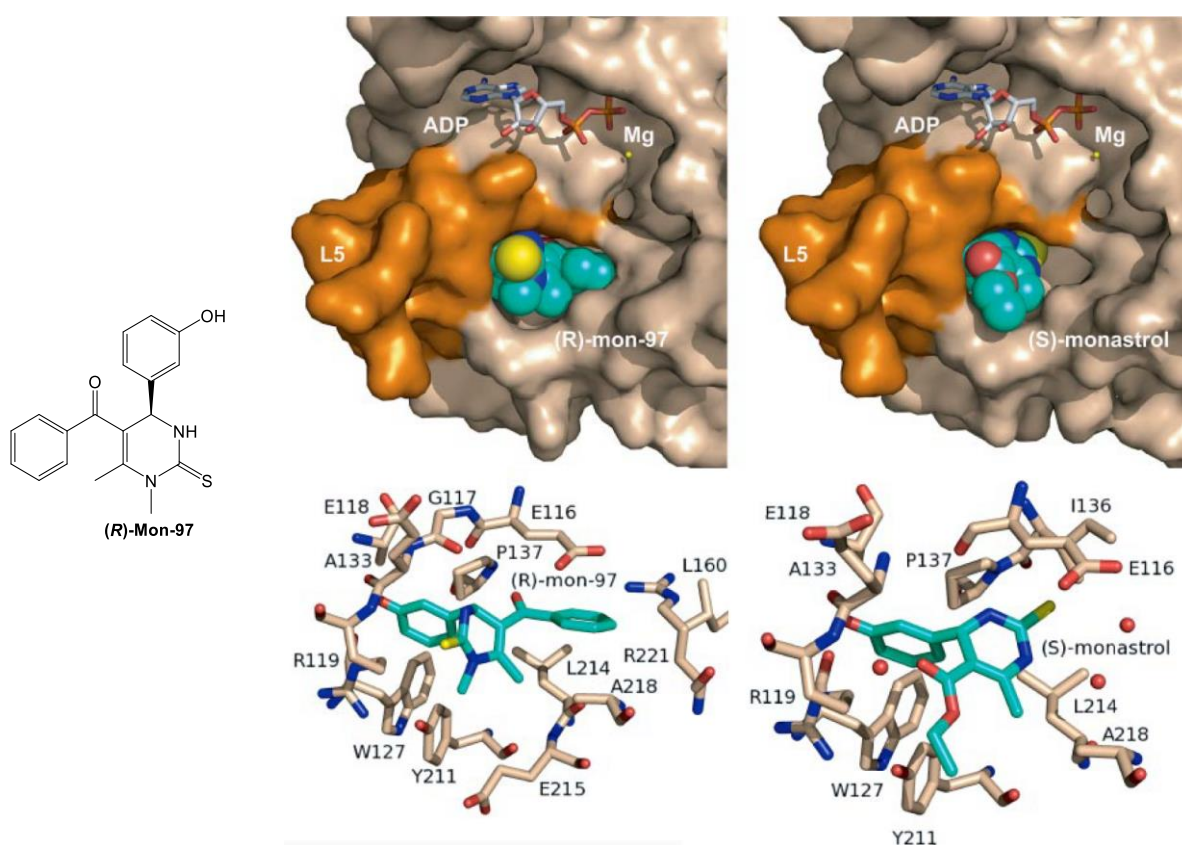


Figura 25. Estructura 2D del (*R*)-Mon-97 y acoplamiento molecular del (*R*)-Mon-97 y (*S*)-Monastrol en el sitio activo de Eg5. (Las imágenes fueron tomadas del artículo original de García-Saez y colaboradores).

Por otro lado, los compuestos **24–26**, no mostraron importante actividad citotóxica sobre ninguna línea celular, está perdida en la actividad puede estar relacionada con la ausencia de hidroxilo en la posición 3 del sustituyente aromático. El compuesto **29**

Resultados y Discusión

aunque tiene el grupo benzoilo sobre la posición 5, que lo hace similar a **20** y **23**, no posee un grupo fenilo en posición 4, característica que lo hace perder su actividad.

Con el fin de explicar de una mejor manera los resultados obtenidos en los ensayos biológicos, se realizaron estudios de acoplamiento molecular sobre la proteína Eg5. Primero se realizó el estudio de acoplamiento del monastrol (**21**) con el fin de comparar si el método es capaz de reproducir lo observado en la estructura cristalográfica. Los resultados mostraron dos modos de unión de mínima energía para el (*S*)-monastrol (**21**), Tabla 19. Uno de los modos de unión es muy similar a la estructura cristalográfica, mientras que el segundo modo de unión muestra al compuesto en una posición invertida, Figura 26.

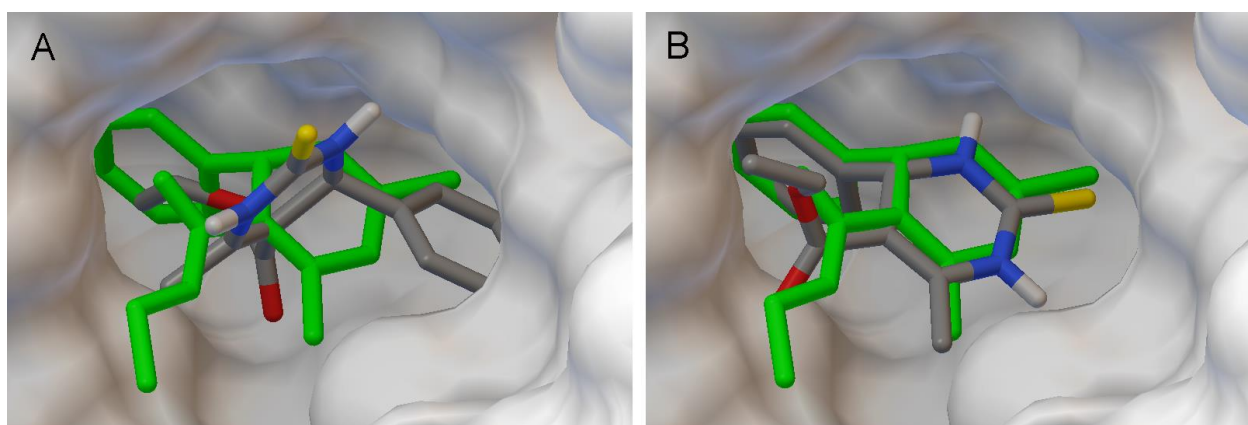


Figura 26. Modos de unión encontrados por acoplamiento molecular para monastrol (**21**). En verde: (*S*)-Monastrol de la estructura cristalográfica; En gris: molécula obtenida por acoplamiento molecular

Posteriormente se analizaron los enantiómeros (*S*) de los compuestos **22**, **24** y **25**, que tienen como característica en común un grupo acetilo o un éster etílico en posición 5. Los resultados para los modos de unión de mínima energía se muestran en la Tabla 19. Se observó una menor energía de unión (mayor afinidad) para los compuestos activos **21** y **22**, mientras que los compuestos inactivos tienen energías de unión más altas (peor afinidad). Es importante resaltar que **22** se une a Eg5 en el cálculo de acoplamiento molecular de una manera similar al (*S*)-monastrol en su estructura cristalográfica, mientras que **24** y **25** se unen en modo distinto, Figura 27. Los resultados observados de energía y modo de unión en el acoplamiento molecular coinciden con los resultados experimentales.

Resultados y Discusión

Tabla 19. Energía de unión derivada del acoplamiento molecular para **21**, **22**, **24** y **25**.

DHPT	21	22	24	25
$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	A: -7.5 B: -7.0	-7.3	-6.7	-6.5

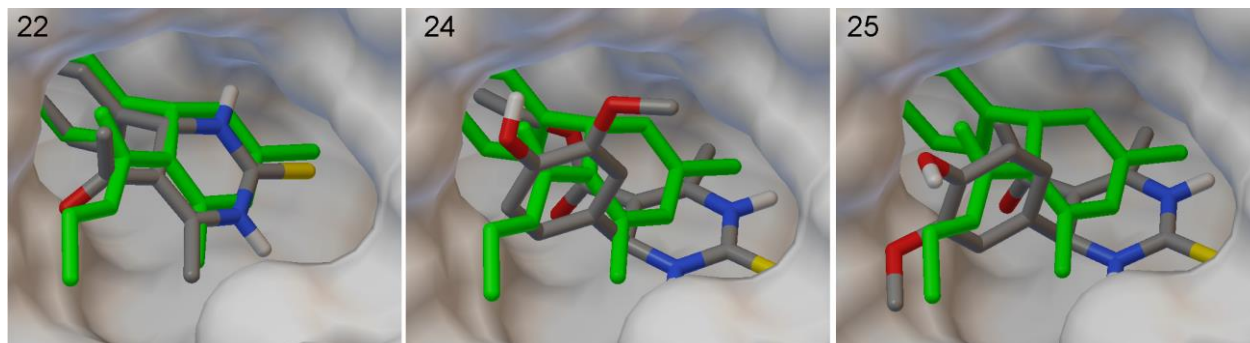


Figura 27. Modo de unión a Eg5 calculado por acoplamiento molecular para **22**, **24** y **25**.

En verde: (*S*)-Monastrol de la estructura cristalografía; En gris: molécula obtenida por acoplamiento molecular

Por otro lado, los compuestos **20**, **23**, **26** y **29** que tienen en común el grupo benzoilo en la posición 5 se sometieron a acoplamiento molecular y los resultados para los modos de unión de mínima energía se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Energía de unión derivada del acoplamiento molecular para **20**, **23**, **26** y **29**

DHPT	20	23	26	29
$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	-8.4	-8.8	-8.0	-7.9

Para estos compuestos se observa mayor afinidad (menores energías) principalmente para los compuestos activos (**20** y **23**), este resultado también está de acuerdo con los resultados experimentales. Sin embargo, ninguno de los compuestos activos se une de la misma manera en el acoplamiento molecular que el (*S*)-monastrol en la estructura cristalográfica, no obstante en la Figura 28 se observa que todos los compuestos se unen en una forma similar al modo de unión A calculado para el monastrol anteriormente (Figura 26). Este resultado también se puede relacionar con el modo de unión descrito en la bibliografía para el compuesto Mon-97 (Figura 25).⁵³

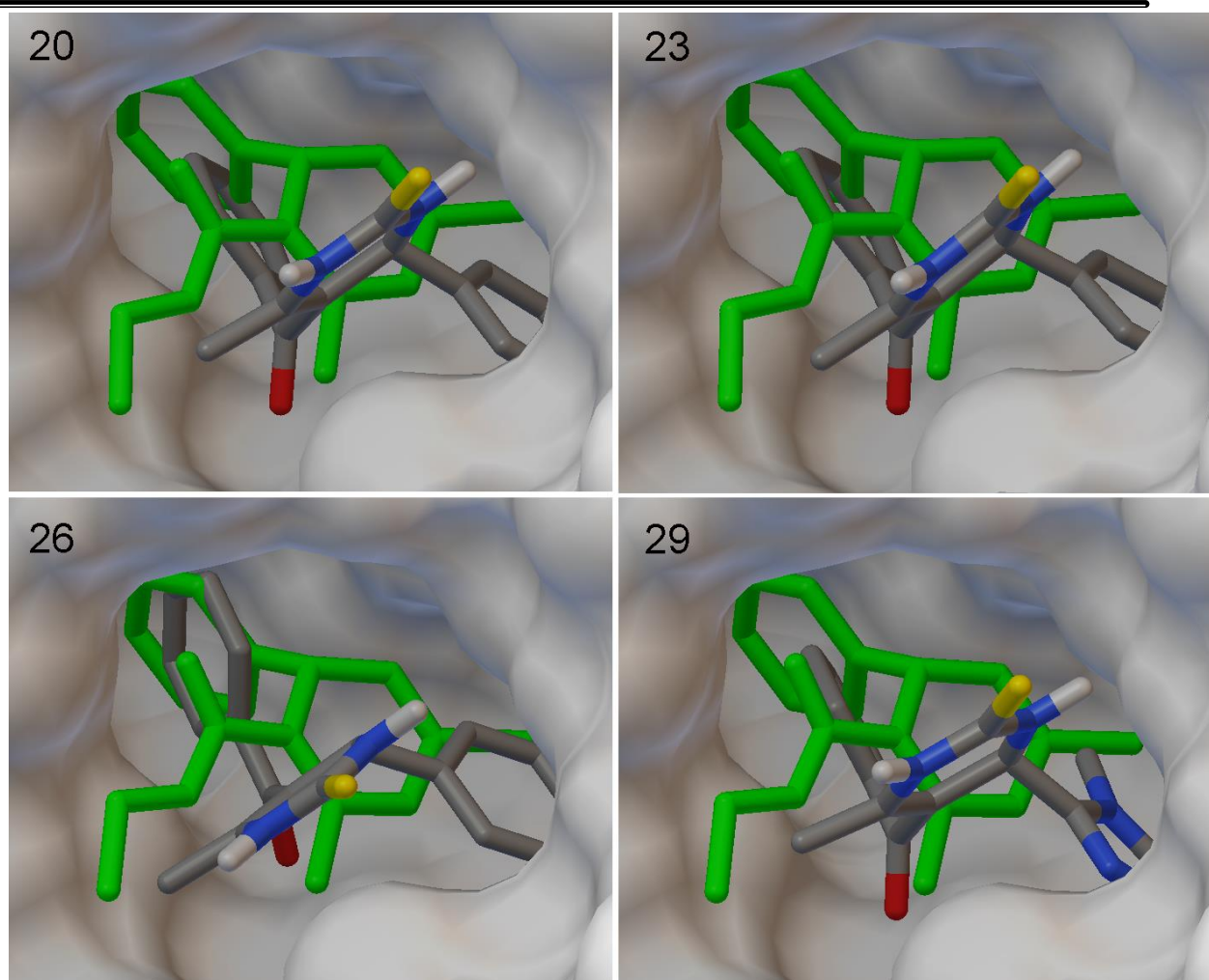


Figura 28. Modo de unión a Eg5 calculado por acoplamiento molecular para **20**, **23**, **26** y **29**. En verde: (S)-Monastrol de la estructura cristalografía; En gris: molécula obtenida por acoplamiento molecular

También se realizó el estudio de acoplamiento molecular para los enantiómeros *R* de todos los compuestos evaluados, en general, los compuestos en esta configuración muestran mayores energías de unión (menor afinidad), lo que coincide con lo descrito en la literatura donde los isómeros *R* son menos activos que los enantiómeros *S*, Tabla 21.

Tabla 21. Energía de unión calculada para los enantiómeros *R* y *S* de **20–26**, **29**

DHPT	20	21	22	23	24	25	26	29
Enantiómero (<i>R</i>)								
$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	-8.5	-7.0	-7.0	-8.6	-7.1	-6.6	-8.3	-7.8
Enantiómero (<i>S</i>)								
$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	-8.4	-7.5	-7.3	-8.8	-6.7	-6.5	-8.0	-7.9

Resultados y Discusión

De acuerdo a los resultados anteriores donde se encontró que los compuestos **20-23** mostraron una buena actividad citotóxica sobre las líneas K562 y HCT-15, se determinó su concentración inhibitoria media (CI_{50}).

El compuesto **23** presentó la mejor actividad para K562 (6.97 $\mu\text{g/mL}$), siendo 7 veces más activo que el monastrol (45.46 $\mu\text{g/mL}$), seguido del compuesto **20** (12.07 $\mu\text{g/mL}$), mientras que para HCT-15 el compuesto **20** fue 7 veces más activo (7.50 $\mu\text{g/mL}$) que monastrol (46.18 $\mu\text{g/mL}$), seguido del compuesto **23** (8.26 $\mu\text{g/mL}$).

De manera general los compuestos análogos a monastrol (**20**, **22** y **23**) mostraron una mejora en la actividad citotóxica, presentando los mejores resultados los productos con una cetona aromática en su estructura. Los resultados se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Determinación de la concentración inhibitoria 50 para las líneas K562 y HCT-15

DHPT	K562 CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	HCT-15 CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
20	12.07 \pm 1.7	7.50 \pm 1.8
21	45.46 \pm 1.2	46.18 \pm 0.9
22	28.70 \pm 3.4	54.25 \pm 4.1
23	6.97 \pm 0.1	8.26 \pm 0.2

Se reporta como promedio de concentración \pm error estándar de la media ($X \pm \text{ESM}$)

Aunque, son pocos los compuestos evaluados y es difícil establecer una correlación entre los valores de CI_{50} y la energía de unión obtenida por acoplamiento molecular, se observa una tendencia clara donde los compuestos más activos tienen los valores de energía más bajos (mayor afinidad calculada hacia Eg5).

9. Conclusiones

Las enaminonas quirales propuestas se sintetizaron con rendimientos moderados a buenos por síntesis convencional y asistida por MO, sin que se viera afectada la estereoquímica del aminoácido precursor.

No se lograron aislar las THPT y en su lugar se obtuvieron las DHPT como mezcla de enantiómeros, por lo que las enaminonas quirales propuestas no favorecieron la formación específica de uno de los enantiómeros. Las DHPT se obtuvieron con rendimientos que van de moderados a buenos y en algunos casos se mejoraron los tiempos de reacción con respecto a lo reportado en literatura.

Las DHPT **20**, **22** y **23** fueron 3.7:6.1, 1.6:0.9 y 6.5:5.6 veces más activas que el monastrol sobre las líneas celulares K-562 y HCT-15 respectivamente, observándose una mejora importante para los compuestos que contienen un grupo benzoilo y un hidroxilo en posición 3 de anillo de benceno.

Las DHPTs con anillos aromáticos disustituidos con grupos metoxilo en 3 e hidroxilo en 4 o anillos de imidazol presentaron baja actividad citotóxica, lo que confirma que para una buena actividad citotóxica se requiere de la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo de benceno.

Los resultados de evaluación biológica obtenidos concuerdan con la información que proporciona la estructura cristalográfica para el complejo (*S*)-monastrol-Eg5 y el complejo (*R*)-Mon-97-Eg5. Encontrando una relación clara entre los modos de unión y las energías calculadas por acoplamiento molecular con los resultados experimentales de citotoxicidad.

10. Parte experimental

10.1. Material y equipos

Los reactivos utilizados fueron marca Sigma-Aldrich y Merck grado reactivo, los disolventes fueron Merck y J.T. Baker grado analítico.

Se trabajó con un microondas Monowave 300, Anton Paar y se utilizaron viales de reacción de borosilicato con capacidad de 30 y 10 mL con barras magnéticas agitadoras, sellados con tapas de cierre de silicona recubiertas con teflón.

La caracterización de los productos se realizó con un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier Marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum RX I, en pastilla de bromuro de potasio, la frecuencia de las señales se reporta en cm^{-1} , y en un espectrofotómetro UV-VIS Marca Perkin-Elmer, modelo LAMBDA 35, usando soluciones de 1 a 2 mg en 25 mL de MeOH, la frecuencia de las señales se reporta en nm.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ^1H) y carbono 13 (RMN ^{13}C) se determinaron en un espectrómetro Marca Varian de 600 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, y DMSO- d_6 y CDCl_3 como disolventes.

Los puntos de fusión (PF.) se determinaron en un medidor de punto de fusión tipo Fisher-Johns y no están corregidos.

La rotación óptica se midió en un polarímetro digital automático Anton Paar Modelo MCP 200 empleando una celda de un decímetro de longitud y 2.0 mL de capacidad, además de soluciones de las muestras en concentración entre 0.093-0.103 g/100 mL en Metanol a 25 ± 0.2 °C. La rotación óptica específica fue calculada directamente por el equipo y se reporta en grados (°).

Los datos obtenidos en el ensayo biológico se analizaron en Excel paquetería Office 2013 calculando el promedio y desviación estándar, para el análisis de las curvas concentración-respuesta se realizó una regresión lineal ($r^2 < 0.9$) usando el programa estadístico GraphPad Prism 6.

Los resultados del análisis de acoplamiento molecular se realizaron empleando los programas de modelado molecular *Maestro 9.1*, *AutoDock Tools 1.5.6* y *AutoDock Vina 1.2.1*

El avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se determinaron por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de vidrio de 2.5 x 5 cm recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck).

La visualización de los compuestos orgánicos se llevó a cabo con una lámpara de luz ultravioleta. Para la elusión de las placas se emplearon los sistemas de disolventes indicados en cada uno de los procedimientos.

10.2. Procedimiento general para la obtención de enamionas

10.2.1. Síntesis convencional

En un matraz balón se colocaron el compuesto β -dicarbonílico **1-3** (2 mmol) y la correspondiente amina **4-7** (2 mmol) disueltos en DCM (20 mL) y TEA (2 mmol), seguido de la adición del TsOH (0.02 mmol) como catalizador. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por espacio de 24-96 h. Al término de la reacción se realizó un lavado con solución saturada de cloruro de sodio (3x5 mL), la fase orgánica fue recuperada y secada con sulfato de sodio anhidro. El disolvente fue removido a presión reducida y el producto fue purificado por cromatografía en columna utilizando una mezcla Hexano-Acetato de etilo 7:3.

10.2.2. Síntesis asistida por microondas

El compuesto β -dicarbonílico **1-3** (2 mmol) y la correspondiente amina **4-7** (2 mmol) fueron disueltos en MeOH absoluto (6 mL) en presencia de TEA (2 mmol) y TsOH (0.02 mmol), colocándose en un vial de reacción (capacidad de 10 mL) con tapa de cierre de silicona recubierta con teflón. La mezcla de reacción fue irradiada con microondas como fuente de calentamiento a 150 °C, y agitación de 400 rpm por 2-10 min. Al término de la reacción se eliminó el disolvente a presión reducida y el producto obtenido se disolvió en DCM, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (3 x 5 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. Los

productos se purificaron por cromatografía en columna utilizando una mezcla Hexano-Acetato de etilo 7:3.

(Z)-(4-Etoxi-4-oxobut-2-en-2-il)-L-prolinato de metilo (8). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 se obtuvieron cristales amarillo claro (éter etílico-Hexano); PF. 47 °C; UV-Vis λ_{\max} = 282.07 nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3065.71, 2972.30, 2956.21, 2870.28, 1749.83, 1672.34, 1565.78; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 4.513 (sa, 1H, H-2), 4.335 (sa, 1H, H-2'), 4.085 (c, 2H, J = 7.14 Hz, CH_2O), 3.738 (s, 3H, CH_3O), 3.504 (sa, 1H, H-5'), 3.353 (sa, 1H, H-5'), 2.413 (s, 3H, H-4), 2.230-2.192 (m, 1H, H-3'), 2.124-2.083 (m, 1H, H-3'), 2.029-1.983 (m, 2H, H-4'), 1.241 (t, 3H, J = 7.14 Hz, CH_3); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 173.183, 168.944, 158.645, 86.022, 60.436, 58.382, 52.421, 48.463, 30.572, 23.243, 16.429, 14.680; EM(ESI) para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calculado 242.1348, m/z encontrado 242.1152

(Z)-3-(((2S,3R)-3-Hidroxi-1-metoxi-1-oxobutan-2-il)amino)but-2-enoato de etilo (9). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 se obtuvieron cristales blancos (éter etílico-Hexano); PF. 45-47 °C; UV-Vis λ_{\max} = 283.74; IR (aceite, ν , cm^{-1}) 3430.12, 3297.04, 2980.08, 2932.54, 1739.80, 1650.73, 1605.82; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 9.002 (d, 1H, J = 9.84 Hz, NH), 4.584 (d, 1H, J = 0.54 Hz H-2), 4.243 (cd, 1H, J = 6.36, 3.96 Hz, H-3'), 4.114 (cd, 2H, J = 7.14, 0.66 Hz, CH_2O), 4.001 (dd, 1H, J = 10.08, 3.96 Hz, H-2'), 3.778 (s, 3H, OCH_3), 1.902 (s, 3H, H-4), 1.274 (d, 3H, J = 6.36 Hz, H-4'), 1.254 (t, 3H, J = 7.14 Hz, CH_3); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 171.573, 170.328, 160.252, 85.469, 68.374, 61.340, 58.675, 52.624, 19.606, 19.484, 14.572.

(Z)-(4-Oxopent-2-en-2-il)-L-prolinato de metilo (10). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 se obtuvo un aceite amarillo; UV-Vis λ_{\max} = 224.45; IR (aceite, ν , cm^{-1}) 3033.59, 2975.17, 2945.68, 1740.38, 1617.41, 1580.17; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 5.048 (sa, 1H, H-2), 4.423 (sa, 1H, H-2'), 3.748 (s, 3H, OCH_3), 3.432 (sa, 2H, H-5'), 2.452 (s, 3H, H-4), 2.243-2.196 (m, 1H, H-3'), 2.134-2.109 (m, 1H, H-3'), 2.058 (s, 3H, CH_3), 2.022 (sa, 2H, H-4'); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 195.058, 172.877, 158.884, 100.453, 60.503, 52.506, 48.547, 31.691, 30.471, 23.217, 16.960.

(S,Z)-4-1((1-Feniletil)amino)pent-3-en-2-ona (11). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 sin TsOH como catalizador, se obtuvo un aceite amarillo oscuro; UV-Vis λ_{\max} = 313.99, 217.94 nm; IR (aceite, ν , cm^{-1}) 3027.65, 2970.59, 2917.32, 1610.45, 1577.62; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 11.243 (sa, 1H, NH), 7.343-7.318 (m, 2H, ArH), 7.266-7.230 (m, 3H, ArH), 4.984 (s, 1H, H-3), 4.684-4.637 (m, 1H, H-1'), 2.038 (s, 3H, H-1), 1.781 (s, 3H, H-5), 1.535 (d, 3H, J = 6.84 Hz, H-2'); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 195.338, 162.579, 144.283, 125.521 128.839, 127.193, 95.801, 53.076, 28.936, 24.773, 19.170.

(Z)-(4-oxo-4-fenilbut-2-en-2-il)-L-prolinato de metilo (12). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 se obtuvieron cristales blancos (etanol); PF. 121-123 °C; UV-Vis λ_{\max} = 336.39, 243.35 nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3044.37, 2958.77, 2884.12, 1748.68, 1622.20, 1532.74; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.832 (sa, 2H, ArH), 7.432-7.368 (m, 3H, ArH), 5.646 (sa, 1H, H-2), 4.437 (sa, 1H, H-2'), 3.765 (s, 3H, OCH_3), 3.527 (sa, 2H, H-5'), 2.607 (sa, 3H, H-4), 2.304-2.238 (m, 1H, H-3'), 2.169-2.149 (m, 1H, H-3'), 2.107-2.049 (m, 2H, H-4'); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 183.769, 171.720, 155.776, 138.082, 133.127, 128.734, 128.468, 94.391, 61.779, 52.174, 47.342, 28.200, 24.974, 17.328; EM(ESI) para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calculado 274.1398, m/z encontrado 274.1142

(2S,3R)-3-Hidroxi-2-(((Z)-4-oxo-4-fenilbut-2-en-2-il)amino)butanoato de metilo (13). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2 se obtuvieron cristales blancos (etanol); PF. 165-167 °C; UV-Vis λ_{\max} = 341.21, 243.47 nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3386.60, 3069.82, 2966.78, 2922.96, 1747.20, 1601.17, 1585.22; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 11.708 (d, 1H, J = 9.78 Hz, NH), 7.826 (dd, 2H, J = 8.31, 1.62 Hz, ArH), 7.433 (tt, 2H, J = 7.20, 1.38 Hz, ArH), 7.392 (t, 1H, J = 7.20 Hz, ArH), 5.665 (s, 1H, H-2), 4.335-4.307 (m, 1H, H-3'), 4.127 (dd, 1H, J = 9.90 y 4.98 Hz, H-2'), 3.994 (sa, 1H, OH), 3.798 (s, 3H, OCH_3), 2.005 (s, 3H, H-4), 1.329 (d, 3H, J = 6.36 Hz, H-4'); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 188.284, 170.748, 164.105, 139.774, 130.772, 128.126, 120.076, 93.696, 68.556, 62.482, 52.769, 19.764, 19.674; EM(ESI) para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calculado 278.1348, m/z encontrado 278.1057

(Z)-3-(Metilamino)-1-fenilbut-2-en-1-ona (14). Siguiendo el procedimiento 10.2.1 o 10.2.2, se obtuvieron cristales amarillos (etanol); PF. 118-120 °C; UV-Vis $\lambda_{\text{max}} = 340.07, 236.80$ nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3432.40, 3050.88, 2998.81, 2809.46, 1596.43, 1579.16; RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 11.329 (sa, 1H, NH), 7.860-7.839 (m, 2H, ArH), 7.423-7.369 (m, 3H, ArH), 5.686 (s, 1H, H-2), 3.011 (d, 3H, $J = 5.28$ Hz, N-CH₃), 2.056 (s, 3H, H-4); RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , ppm): 187.643, 165.893, 140.490, 130.343, 128.121, 126.832, 91.985, 29.685, 19.240.

10.3. Procedimiento general para la síntesis de (4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20)

En un matraz balón fueron disueltos el 4-metoxibenzaldehído (2 mmol), la tiourea (3 mmol) y la enaminona **14** (2 mmol) en DMF (2 mL) y TMSCl (3 mmol), durante 12 h a temperatura ambiente con agitación constante. Al término de la reacción el producto fue aislado por precipitación en agua helada y purificado por recristalización (EtOH-H₂O) como un sólido amarillo.

(4-(4-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (20): Sólido amarillo (EtOH-H₂O); PF. 218-220 °C; UV-Vis $\lambda_{\text{max}} = 213.30, 252.80, 33.77$ nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3315.43, 3186.43, 3098.22, 2999.84, 1618.42, 1570.30, 1211.79; RMN ^1H (600, MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 10.287 (sa, 1H, H-3), 9.608 (sa, 1H, H-1), 7.545 (tt, 1H, $J = 7.26$ Hz, 1.50 Hz, ArH), 7.490 (dd, 2H, $J = 8.28$ Hz, 1.50 Hz, ArH), 7.449 (t, 2H, $J = 7.14$ Hz, ArH), 7.097 (d, 2H, $J = 8.76$ Hz, H-2'), 6.884 (d, 2H, $J = 8.76$ Hz, H-3'), 5.235 (d, 1H, $J = 3.54$ Hz, H-4), 3.711 (s, 3H, CH₃), 1.729 (s, 3H, CH₃); RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) 194.455, 173.897, 158.627, 141.145, 139.996, 135.027, 131.776, 128.554, 127.761, 127.471, 113.839, 110.328, 54.975, 54.729, 17.713.

10.4. Procedimiento general para la síntesis de DHPT 21-26

En un matraz balón provisto con un refrigerante fueron disueltos el aldehído (2 mmol) y la tiourea (3 mmol) en DMF (2 mL) y TMSCl (3 mmol), dejándose reaccionar por 10 min a 40 °C con agitación constante hasta obtener una suspensión blanca, enseguida se adicionó la enaminona (2 mmol), y la mezcla de reacción fue calentada a 120 °C con

agitación constante por espacio de 1-6 h. Al término de la reacción el producto fue aislado por precipitación en agua helada, y fue purificado por recristalización en EtOH o cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de Hexano-Acetato de etilo 7:3.

4-(3-Hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato de etilo (21). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido blanco (Hexano-AcOEt); PF. 188-190 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.005$ ($c = 0.1$, MeOH) UV-Vis $\lambda_{\max} = 306.16, 215.38$ nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3421.87, 3256.10, 3011.39, 2989.77, 1629.13, 1588.26, 1190.82; RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10.286 (m, 1H, H-3), 9.696 (m, 1H, H-1), 9.427 (s, 1H, OH), 7.118 (t, 1H, $J = 7.62$ Hz, H-5'), 6.660-6.640 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 5.090 (d, 1H, $J = 3.84$ Hz, H-4), 4.023 (c, 2H, $J = 7.08$ Hz, CH₂O), 2.282 (s, 3H, CH₃), 1.124 (t, 3H, $J = 7.08$ Hz, CH₃); RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 174.073, 165.064, 157.341, 144.724, 144.677, 129.356, 116.881, 114.493, 113.130, 100.673, 59.476, 53.835, 17.046, 13.935.

1-(4-(3-Hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)etan-1-ona (22). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido crema (EtOH); PF. 238-240 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.059$ ($c = 0.101$, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 323.86, 216.38$ nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3420.11, 3284.02, 3019.24, 2997.13, 1610.82, 1587.02, 1190.56; RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10.237 (sa, 1H, H-3), 9.696 (m, 1H, H-1), 9.439 (s, 1H, OH), 7.122 (t, 1H, $J = 7.74$ Hz, H-5'), 6.671-6.642 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 5.208 (d, 1H, $J = 3.96$ Hz, H-4), 2.318 (s, 3H, CH₃), 2.139 (s, 3H, CH₃); RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 194.710, 173.836, 157.417, 144.180, 144.158, 129.458, 117.064, 114.559, 113.318, 110.223, 53.715, 30.191, 18.077.

(4-(3-Hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)metanona (23). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido amarillo pálido (EtOH-H₂O); PF. 246-248 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.050$ ($c = 0.106$, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 214.93, 253.33, 332.90$ nm; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3418.24, 3245.98, 3022.48, 2989.34, 1608.25, 1589.88, 1200.00; RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10.284 (sa, 1H, H-3), 9.604 (m, 1H, H-1), 9.463 (s, 1H, OH), 7.548 (t, 1H, $J = 7.02$ Hz, ArH), 7.485-7.439 (m, 4H, ArH), 7.090 (t, 1H, $J = 7.80$ Hz, H-5'), 6.641-6.565 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 5.207 (d, 1H, $J = 3.54$ Hz, H-

4), 1.709 (s, 1H, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 195.049, 174.650, 157.922, 144.798, 141.446, 140.473, 132.390, 130.052, 129.124, 128.302, 117.148, 115.074, 113.470, 110.831, 55.777, 18.154.

4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato de etilo (24). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido amarillo pálido (EtOH-H₂O); PF. 211-213 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.045$ (*c* = 0.098, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 307.08, 215.01$ nm; IR (KBr, ν , cm⁻¹) 3465.44, 3292.14, 3006.91, 1630.28, 1583.61, 1200.01; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.247 (m, 1H, H-3), 9.553 (m, 1H, H-1), 8.993 (s, 1H, OH), 6.787 (d, 1H, *J* = 2.04 Hz, H-2'), 6.722 (d, 1H, *J* = 8.16 Hz, H-5'), 6.589 (dd, 1H, *J* = 8.16, 2.10 Hz, H-6'), 5.084 (d, 1H, *J* = 3.72 Hz, H-4), 4.023 (cd, 2H, *J* = 7.14 y 1.2 Hz, CH₂O), 3.728 (s, 3H, CH₃O), 2.278 (s, 3H, CH₃), 1.122 (t, 3H, *J* = 7.08 Hz, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 173.920, 165.129, 147.225, 146.039, 144.484, 134.444, 118.421, 115.282, 110.823, 100.866, 59.408, 55.462, 53.552, 17.008, 13.980.

1-(4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)etan-1-ona (25). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido amarillo (EtOH); PF. 228-230 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.061$ (*c* = 0.102, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 324.83, 214.49$ nm; IR (KBr, ν , cm⁻¹) 3467.45, 3296.06, 3001.71, 1628.74, 1585.48, 1190.56; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.222 (m, 1H, H-3), 9.680 (m, 1H, H-1), 9.056 (s, 1H, OH), 6.849 (d, 1H, *J* = 2.04 Hz, H-2'), 6.719 (d, 1H, *J* = 8.16 Hz, H-5'), 6.576 (dd, 1H, *J* = 8.16 y 2.10 Hz, H-6'), 5.201 (d, 1H, *J* = 3.78 Hz, H-4), 3.739 (s, 3H, CH₃O), 2.316 (s, 3H, CH₃), 2.110 (s, 3H, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 194.952, 173.513, 147.354, 146.084, 144.027, 133.669, 118.577, 115.230, 111.091, 109.936, 55.413, 53.568, 30.049, 18.007.

(4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropiridin-5-il)(fenil)metanona (26). Siguiendo el procedimiento 10.3 se obtuvo un sólido amarillo (EtOH-H₂O); PF. 233-235 °C; $[\alpha]_D^{25} = +0.091$ (*c* = 0.101, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 214.77, 252.41, 334.50$ nm; IR (KBr, ν , cm⁻¹) 3462.17, 3286.44, 3008.28, 1624.77, 1576.58, 1200.00; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.247 (m, 1H, H-3), 9.551 (m, 1H, H-1), 8.999 (s, 1H, OH), 7.551 (t, 2H, *J* = 7.27 Hz, ArH), 7.521-7.445 (m, 3H, ArH), 6.713 (d, 1H, *J* = 8.10 Hz, H-5'), 6.676 (d, 1H, *J* = 2.04 Hz, H-2'), 6.591 (dd, 1H, *J* = 8.16, 2.10 Hz, H-6'),

5.205 (d, 1H, $J = 3.42$ Hz, H-4), 3.675 (s, 3H, CH₃O), 1.743 (s, 3H, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 194.550, 173.839, 147.286, 146.043, 140.764, 139.903, 133.827, 131.798, 128.547, 127.806, 118.599, 115.346, 110.634, 110.306, 55.435, 55.053, 17.595.

10.5. Procedimiento general para la síntesis de DHPT 27-29

En un matraz balón provisto con un refrigerante el 1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxaldehído (2 mmol) y la tiourea (2 mmol) fueron disueltos en una mezcla de DMF:ACN (0.4:1.6 mL) en presencia de TMSCl (4 mmol), dejándose reaccionar por 10 min a 40 °C. Enseguida se adicionó la enamina (2 mmol), y se aumentó la temperatura a 80 °C con agitación constante por espacio de 3-5 h. Al término de la reacción se ajustó el pH entre 7-8 con solución saturada de Na₂CO₃, seguido de enfriamiento para obtener los productos por precipitación. Los productos aislados fueron purificados por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de Hexano-Acetato 2:8 ó bien por extracción sólido-líquido con MeOH como disolvente.

6-metil-4-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato de etilo (27): Siguiendo el procedimiento 10.4 se obtuvo un sólido amarillo claro (MeOH); PF. >280°C (descomposición); $[\alpha]_D^{25} = +0.79$ ($c = 0.101$, MeOH); UV-Vis $\lambda_{\max} = 214.77$, 252.41, 334.50 nm; IR (KBr, ν , cm⁻¹) 3430.01, 3100.40, 2969.14, 1627.55, 1589.18, 1200.00; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.271 (sa, 1H, H-3), 9.464 (sa, 1H, H-1), 7.015 (d, 1H, $J = 1.08$ Hz, H-4'), 6.741 (d, 1H, $J = 1.08$ Hz, H-3'), 5.313 (s, 1H, H-4), 3.969-3.923 (m, 2H, CH₂O), 3.691 (s, 3H, N-CH₃), 2.270 (s, 3H, CH₃), 1.037 (t, 3H, $J = 7.11$ Hz, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 173.756, 164.860, 147.959, 145.095, 126.633, 121.072, 98.587, 59.305, 45.695, 32.075, 17.058, 13.911; EM(ESI) para C₁₂H₁₆N₄O₂S: [M+H]⁺ m/z calculado 281.1028, m/z encontrado 281.1054

1-(6-metil-4-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)etan-1-ona (28): Siguiendo el procedimiento 10.4 se obtuvo un sólido amarillo claro (MeOH); PF. >280 °C (descomposición); $[\alpha]_D^{25} = +0.49$ ($c = 0.101$, MeOH); IR (KBr, ν , cm⁻¹) 3426.38, 3128.14, 2970.10, 1610.07, 1587.98, 1200.10; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.267 (s, 1H, H-3), 9.553 (sa, 1H, H-1), 7.017 (d, 1H, $J = 1.02$ Hz, H-4'), 6.725 (d, 1H, $J = 1.02$ Hz, H-3'), 5.395 (d, 1H, $J = 3.42$ Hz, H-4), 3.732 (s, 3H, N-CH₃), 2.311 (s, 3H, CH₃),

2.124 (s, 3H, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 193.258, 172.841, 146.557, 143.427, 125.430, 120.340, 108.182, 44.950, 31.160, 29.291, 17.254; EM(ESI) para C₁₁H₁₄N₄OS: [M+H]⁺ *m/z* calculado 251.0922, *m/z* encontrado 251.1017

(6-metil-4-(1-metil-1H-imidazol-2-il)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)(fenil)meta (29): Siguiendo el procedimiento 10.4 se obtuvo un sólido blanco (Hexano-AcOEt); PF. 256 °C (descomposición); [α]_D²⁵ = +0.00 (*c* = 0.98, MeOH); IR (KBr, ν, cm⁻¹) 3423.24, 3132.24, 2967.49, 1608.25, 1588.41, 1202.35; RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 10.310 (s, 1H, H-3), 9.520 (s, 1H, -1H), 7.538-7.484 (m, 3H, ArH), 7.448-7.423 (m, 2H, ArH), 6.989 (d, 1H, *J*= 1.08 Hz, H-4'), 6.766 (d, 1H, *J*= 1.08 Hz, H-3'), 5.451 (d, 1H, *J*= 2.76 Hz, H-4), 3.592 (s, 3H, N-CH₃), 1.675 (s, 3H, CH₃); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 194.531, 173.896, 147.523, 142.632, 140.756, 131.515, 128.500, 127.707, 126.809, 121.398, 108.456, 47.053, 32.159, 18.322; EM(ESI) para C₁₆H₁₆N₄OS: [M+H]⁺ *m/z* calculado 313.1078, *m/z* encontrado 313.1062.

10.6. Evaluación de la actividad citotóxica

El protocolo consistió en utilizar líneas celulares de cáncer humano cultivadas en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10 %), y una mezcla de antibióticos-antimicótico, las cuales se depositaron en placas de 96 pozos por triplicado en un volumen de 100 μL/pozo con una densidad de inóculo de 5x10⁴ a 10x10⁴ células/mL de acuerdo a la línea celular empleada (Tabla 23). Se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ para favorecer que las células se adhieran al fondo de la placa.

Tabla 23. Densidad de inóculo para las líneas celulares de cáncer humano

Línea celular	Densidad de inóculo
HCT-15 (colon)	10x10 ⁴
U251 (sistema nervioso central)	7.5x10 ⁴
PC-3 (próstata)	7.5x10 ⁴
K-562 (leucemia)	5.0x10 ⁴
MCF-7 (mama)	5.0x10 ⁴
SKLU (pulmón)	10x10 ⁴

Para el *screening* primario y la curva concentración-respuesta, los compuestos **20-26** y **29** fueron disueltos en DMSO a una concentración de 50 µg/mL. Se tomó una alícuota de la solución madre y se diluyó en medio de cultivo suplementado. Se agregaron 100 µL de la solución con el compuesto a evaluar quedando la concentración final en un rango de 1 a 100 µM. Nuevamente la microplaca fue incubada por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el período de incubación, las células fueron fijadas *in situ* añadiendo 50 µL de una solución de ácido tricloroacético frío al 50% e incubadas a 4 °C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se efectuó añadiendo 100 µL de una solución al 0.4 % de sulforrodamina B e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La sulforrodamina B no unida fue removida con lavados de ácido acético al 1 % y se dejaron secar al ambiente. Las placas teñidas y secas se trataron con 100 µL de buffer de Tris (tri(hidroximetil)aminometano) y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo.

La densidad óptica (DO) se midió en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm, los datos fueron procesados empleando el promedio de la DO de los 3 pozos/línea celular tratada con el compuesto (DOt), los 3 pozos tratados con DMSO (DOc) y 3 pozos de testigos, es decir, aquellos que no tiene células pero si compuesto (DOb). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la Ecuación 2.

$$\text{Ecuación (2)} \quad \%IC = \left(100 - \frac{DOt-DOb}{DOc-DOb}\right) * 100$$

10.7. Preparación de los ligandos y la proteína Eg5

La estructura cristalográfica de la proteína Eg5 se obtuvo del *Protein Data Bank* (RCSB) usando el código 1Q0B en formato *PDB como proteína dimerica. El archivo fue procesado en *Maestro 10.4* para eliminar el monómero B, las moléculas de agua, cofactores y ligandos presentes en la estructura. Enseguida la energía de la proteína fue minimizada aplicando el campo de fuerza OPLS-AA, usando la función *Protein Preparation Wizard* de *Maestro 10.4*, el archivo fue guardado en formato *PDB. Finalmente el archivo fue exportado a *AutoDock Tools 1.5.6* (ADT), donde se determinaron las coordenadas de la caja de búsqueda (Grid) centrado en el sitio de unión

con una dimensión de 60 x 60 x 60 Å empleando *Autogrid*. El archivo fue guardado en formato *PDBQT.

Los ligandos fueron construidos en *Maestro 9.1*, basados en la configuración del (S)-monastrol en la estructura cristalografía. Los cuales fueron sometieron a un proceso de minimización aplicando el campo de fuerza PLSS-AA y fueron guardados en formato *PDB. La preparación de los ligandos se realizó empleando ADT donde se asignaron cargas *gasteiger* y se definieron los enlaces rotables. El archivo se guardó en formato *PDQT.

10.8. Acoplamiento molecular

Los cálculos de acoplamiento molecular se determinaron para todos los ligandos utilizando *AutoDock Vina 1.1.2* empleando las condiciones estándar y 50 corridas. El análisis de los resultados para cada uno de los ligandos se realizó en ADT, seleccionando las conformaciones de mínima energía (menor $\Delta G_{\text{unión}}$), las cuales fueron comparadas con la estructura cristalográfica del (S)-monastrol unido a Eg5.

11. Referencias

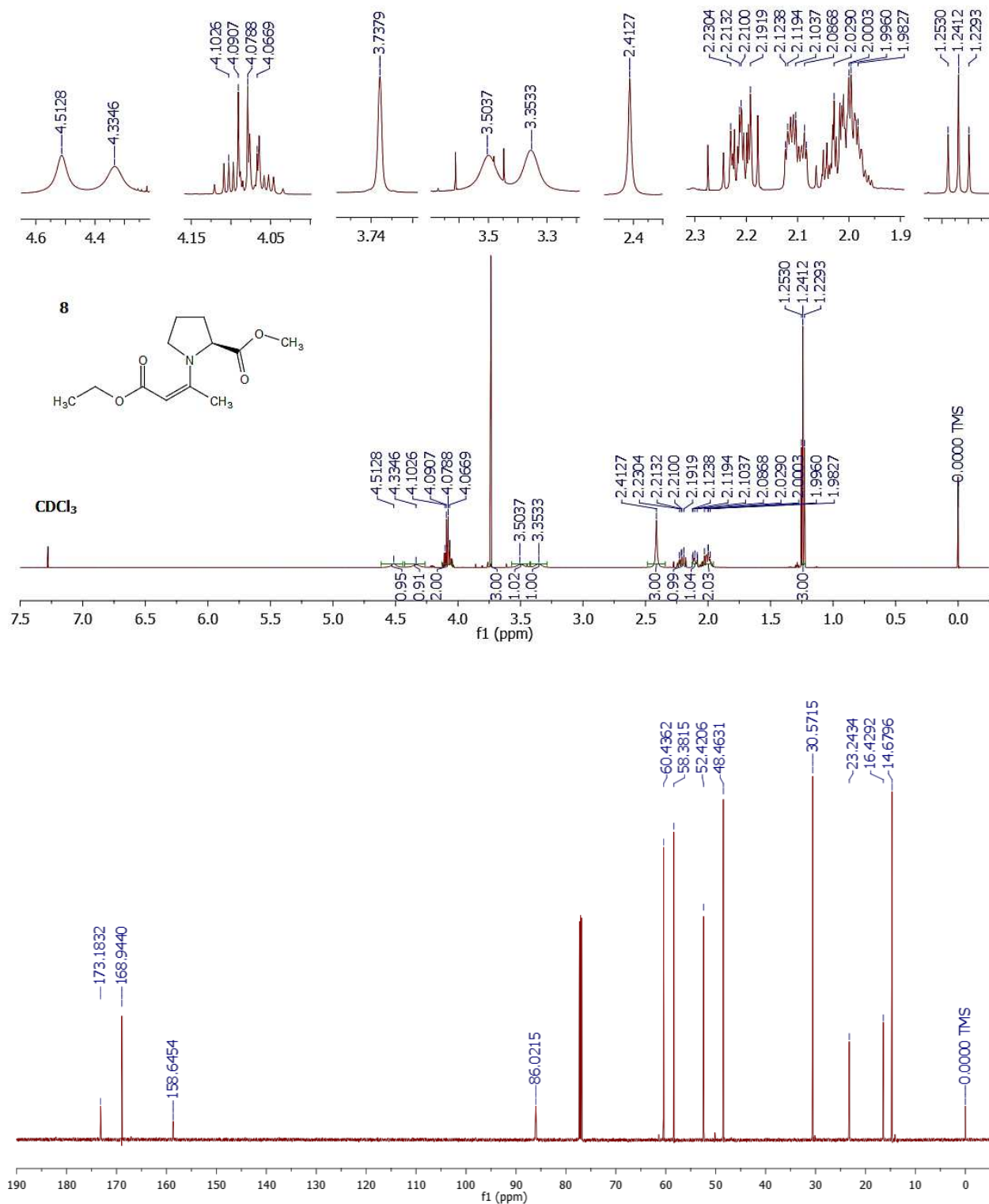
1. Sandhu S., Sandhu J. S. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. *Arkivoc*, 2012. I, 66–133.
2. Zhu J., Hugues B. (2005) Multicomponent Reactions. Primera Ed. Wiley- VCH. Alemania. 484
3. Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* 1893. 23, 360.
4. Kappe O. C. Recent Advances in the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. New Tricks from an Old Dog. *Acc. Chem. Res.* 2000. 33, 879–888.
5. De Fátima A., Braga T. C., Da silva L.N., Terra B. S., Oliveira B. G. F., Leite D. S., Modolo L.V. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J. Adv. Res.* 2015. 6, 363–373.
6. Marvaniya H. M., Parikh P. K., Sen D. J. Synthesis and in-vitro screening of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives for antihypertensive and calcium channel blocking activity. *J. Appl. Pharm. Science.* 2011. 1(5), 109–113.
7. Borse B. N., Borude V. S., Shukla S. R. Synthesis of novel dihydropyrimidin-2(1H)-ones derivatives using lipase and their antimicrobial activity. *Curr. Chem. Lett.* 2012. 1(2), 59–68.
8. Kaur J., Dutta S. Chang K. P., Singh N. A member of the Ras oncogene family, RAP1A, mediates antileishmanial activity of monastrol. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. 68(5), 1071–1080.
9. Tale R. H., Rodge A. H., Hatnapure G. D., Keche A. P., Patil K. M., Pawar K. P. The synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activity evaluation of novel thioanalogs of 3,4-dihydrothiopyrimidin-2(1H)-one derivatives of N-aryl urea. *Med. Chem. Res.* 2012. 21(12), 4252–4260.
10. Da Silva D. L., Reis F. S., Muniz D. R., Ruiz A. L. T.G., de Carvalho J. E., Sabino A. A., Modolo L. V., de Fátima A., Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 2645–2650.
11. Kim J., Park C., Ok T., So W., Jo M., Seo M., Kim Y., Sohn J. H., Park Y., Ju M. K., Kim J., Han S. J., Kim T. H., Cechetto J., Nam J., Sommer P., No Z. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. 22(5), 2119–2124.
12. De Graaff C., Ruijter E., Orru R. V. A. Recent developments in asymmetric multicomponent reactions. *Chem. Soc. Rev.* 2012. 41(10), 3969–4009.
13. List B., Lerner R. A., Barbas III C. F., Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2000. 122, 2395–2396.
14. Huang Y., Yang F., Zhu C. Highly enantioselective Biginelli reaction using a new chiral Ytterbium catalyst: Asymmetric Synthesis of Dihydropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. 127, 16386–16387.
15. Blasco A. M., Thumann S., Wittmann J., Athanassios G., Gröger H. Enantioselective biocatalytic synthesis of (S)-monastrol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. 20(15), 4679–4682.
16. Saha S., Moorthy J. N. Enantioselective Organocatalytic Biginelli Reaction: Dependence of the Catalyst on Sterics, Hydrogen Bonding, and Reinforced Chirality. *J. Org. Chem.* 2011. 76, 396–402.
17. Yadav J. S., Praveen Kumar S., Kondaji G., Srinivasa Rao R., Nagaiah K., A Novel L-proline Catalyzed Biginelli Reaction: One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones under Solvent-Free Conditions. *Chem. Lett.* 2004. 33, 1168–1169.
18. Mabry J., Ganem B. Studies on the Biginelli reaction: A mild and selective route to 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones via enamine intermediates. *Tetrahedron Lett.* 2006. 47(1), 55–56.
19. Pandey J., Anand N., Tripathi R. P., L-Proline catalyzed multicomponent reaction of 3,4-dihydro-(2H)-pyran, urea/thiourea, and aldehydes: diastereoselective synthesis of hexahydropyrano pyrimidinones (thiones). *Tetrahedron.* 2009. 65, 9350–9356.

20. Wan J.P., Pan Y. J. Chemo-/regioselective synthesis of 6-unsubstituted dihydropyrimidinones, 1,3-thiazines and chromones via novel variants of Biginelli reaction. *Chem Comm.* 2009. 1(19), 2768–2770.
21. Wan J. P., Wang C., Pan Y. Novel four-component reaction towards diastereoselective synthesis of tetrahydropyrimidinethiones. *Tetrahedron.* 2011. 67, 922–926.
22. Stadler A. y Kappe O.C. Automated Library Generation Using Sequential Microwave-Assisted Chemistry. Application toward the Biginelli Multicomponent Condensation. *J. Comb. Chem.* 2001. 3, 624–630.
23. Kappe O.C, Stadler A., Dallinger. D. (2012). *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry.* 2da Ed. Wiley-VCH. Alemania. 347–367.
24. Organización Mundial de la salud. Nota descriptiva N° 297. Cáncer. Fecha de consulta: Mayo 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
25. Infocancer México. Acerca del cáncer. 2013. Fecha de consulta: Junio 2015. Disponible en: <http://www.infocancer.org.mx/acerca-del-cncer-con2i0.html>.
26. World Health Organization. Cancer prevention. 2015. Fecha de consulta junio 2015. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>
27. International Agency for Research on Cancer. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Fecha de consulta: 13 de Julio de 2015. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_pop_sel.aspx.
28. Instituto Nacional del Cáncer. Tratamientos contra el cáncer. Fecha de consulta: 13 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.
29. Organización mundial de la salud. Tratamiento del cáncer. Fecha de consulta 13 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>.
30. Infocancer Mexico. Tratamiento. 2013. Fecha de consulta 13 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.infocancer.org.mx/tratamiento-con454i0.html>.
31. Gibbs J. B. Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science.* 2000. 287, 1969–1973.
32. Montoya-Hernández A. A. Tesis de licenciatura: Revisión bibliográfica de los modelos experimentales en fase preclínica para evaluar actividad antineoplásica. 2011. UNAM FES-Zaragoza.
33. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker K. P., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of culture human tumor cell lines. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1991. 83, 757–766.
34. Escobar M. L., Rivera A., Aristizábal G.F.A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae.* 2010. 17(1), 67–74. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&lng=en.
35. De Camp W.H., The FDA Perspective on the Development of Stereoisomers. *Chirality.* 1989. 1, 2–6.
36. Nation R.L. Chirality in New Drug Development. Clinical Pharmacokinetic Considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 1994. 27(4), 249–255.
37. Caner H., Groner E., Levy L., Agranat I. Trends in the development of chiral drugs. *DDT.* 2004. 9(3), 105–110.
38. Stephenson G.R., Genet J.P., *Advanced Asymmetric Synthesis.* Design of asymmetric synthesis. Ed. Springer Science - Business Media Dordrecht. Primera edición. 1996. 1–8.
39. Islam M.R., Mahdi J.G., Bowen I.D. Pharmacological Importance of Stereochemical Resolution of Enantiomeric Drugs. *Drug Safety.* 1997. 17(3), 149–165.

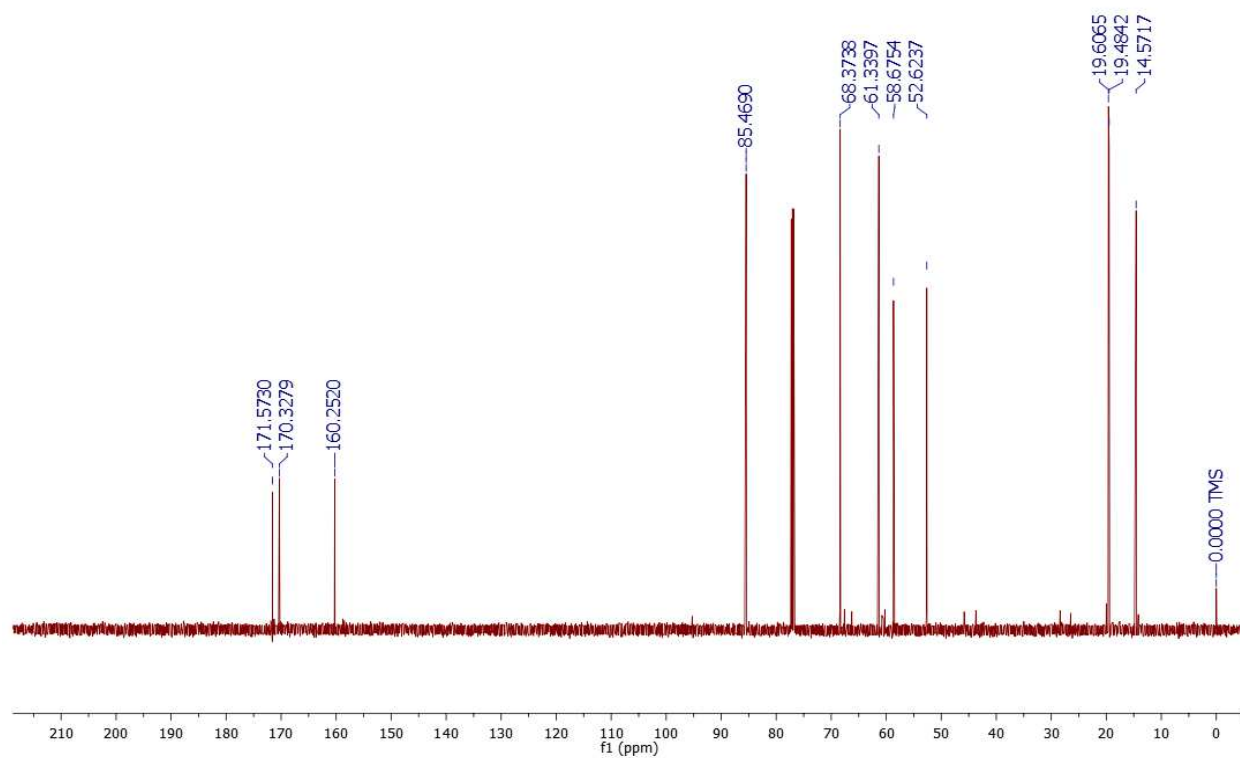
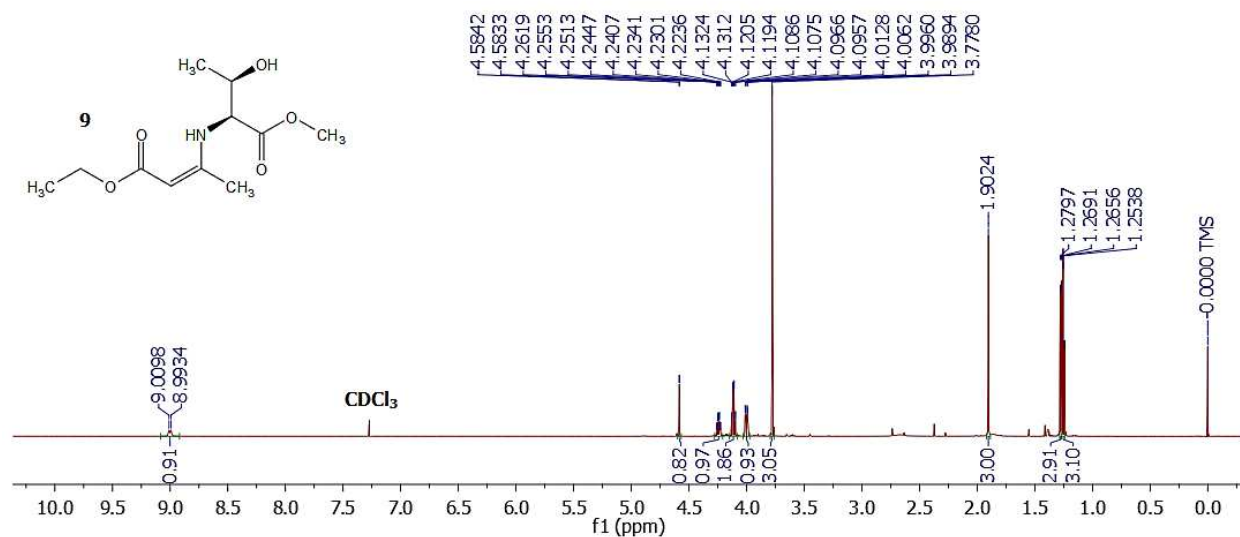
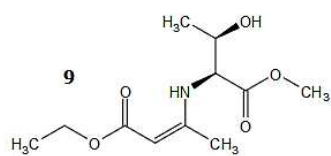
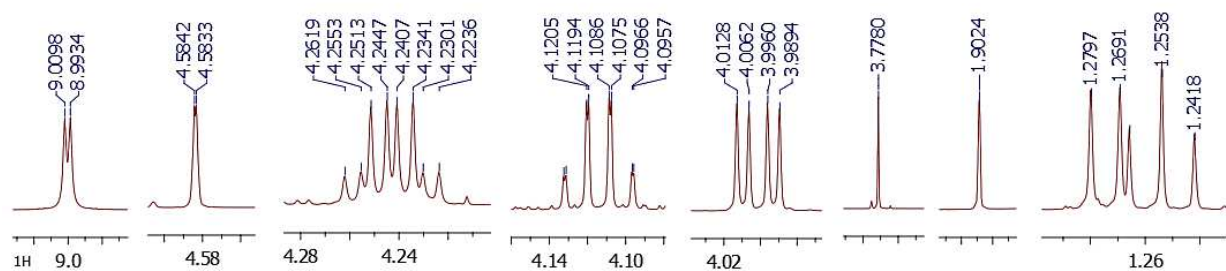
40. Govindh B., Diwakar B. S., Murthy Y. L. N., A brief review on synthesis & applications of β -enamino carbonyl compounds. *Org. Commun.* 2012. 5, 105–119.
41. Riyadh S. M., Abdelhamid I. A., Al-Matar H. M., Hilmy N. M., Elnagdi M. H. Enamines as precursors to polyfunctional heteroaromatic compounds; a decade of development. *Heterocycles.* 2008. 75(8), 1849–1905.
42. Al-Mousawi S. M., El-Asasery M. A., Elnagdi M. H. Enaminones in Heterocyclic Synthesis: A Novel Route to Tetrahydropyrimidines, Dihydropyridines, Triacylbenzenes and Naphthofurans under Microwave Irradiation. *Molecules.* 2010. 15(1), 58–67.
43. Xin J., Chang L., Hou Z., Shang D., Liu X., Feng X. An Enantioselective Biginelli Reaction Catalyzed by a Simple Chiral Secondary Amine and Achiral Brønsted Acid by a Dual-Activation Route. *Chem. Eur. J.* 2008. 14, 3177–3181.
44. Lozada C. M., Enríquez R. G., Soriano-García M., Toscano R., Gnecco, D. X-ray crystal structures of new chiral enaminones from 2,4-pentanedione and their heterocyclic derivatives. *J. Chem. Cryst.* 2007. 37(2), 119–123.
45. De Graaff C., Ruijter E., Orru R. V. A. Recent developments in asymmetric multicomponent reactions. *Chem. Soc. Rev.* 2012. 41, 3969–4009.
46. Kantevari S., Bantu R., Nagarapu L. TMSCl mediated highly efficient one-pot synthesis of octahydroquinazolinone and 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives. *Arkivoc.* 2006. XVI, 136–148.
47. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11^a Edición. Secretaria de salud. Mexico. 2014.
48. Dondoni A., Massi A., Sabbatini S. Improved synthesis and preparative scale resolution of racemic monastrol. *Tetrahedron Lett.* 2002. 43, 5913–5916.
49. Kappe O. C., Shishkin O. V., Uray G., Verdino P. X-Ray Structure, Conformational Analysis, Enantioseparation, and Determination of Absolute Configuration of the Mitotic Kinesin Eg5 Inhibitor Monastrol. *Tetrahedron.* 2000. 56, 1859–1862.
50. Maliga Z., Kapoor T. M., Mitchison T. J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem & Biol.* 2002. 9, 989–996.
51. Cochran J. C., Gatial III J. E., Kapoor T. M., Gilber S. P. Monastrol Inhibition of the Mitotic Kinesin Eg5. *J. Biol Chem.* 2005. 280(13), 12658–12667.
52. Yan Y., Sardana V., Xu B., Homnick C., Halczenko W., Buser C.A., Schaber M., Hartman G.D., Huber H.E., Kuo L.C. Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J. Mol. Biol.* 2004. 335, 547–554.
53. Garcia-Saez I., DeBonis S., Lopez R., Trucco F., Rousseau B., Thuéry P., Kozielski F. Structure of Human Eg5 in Complex with a New Monastrol-based Inhibitor Bound in the R Configuration. *J. Biol. Chem.* 2007. 282(13), 9740–9747.

I. Espectros

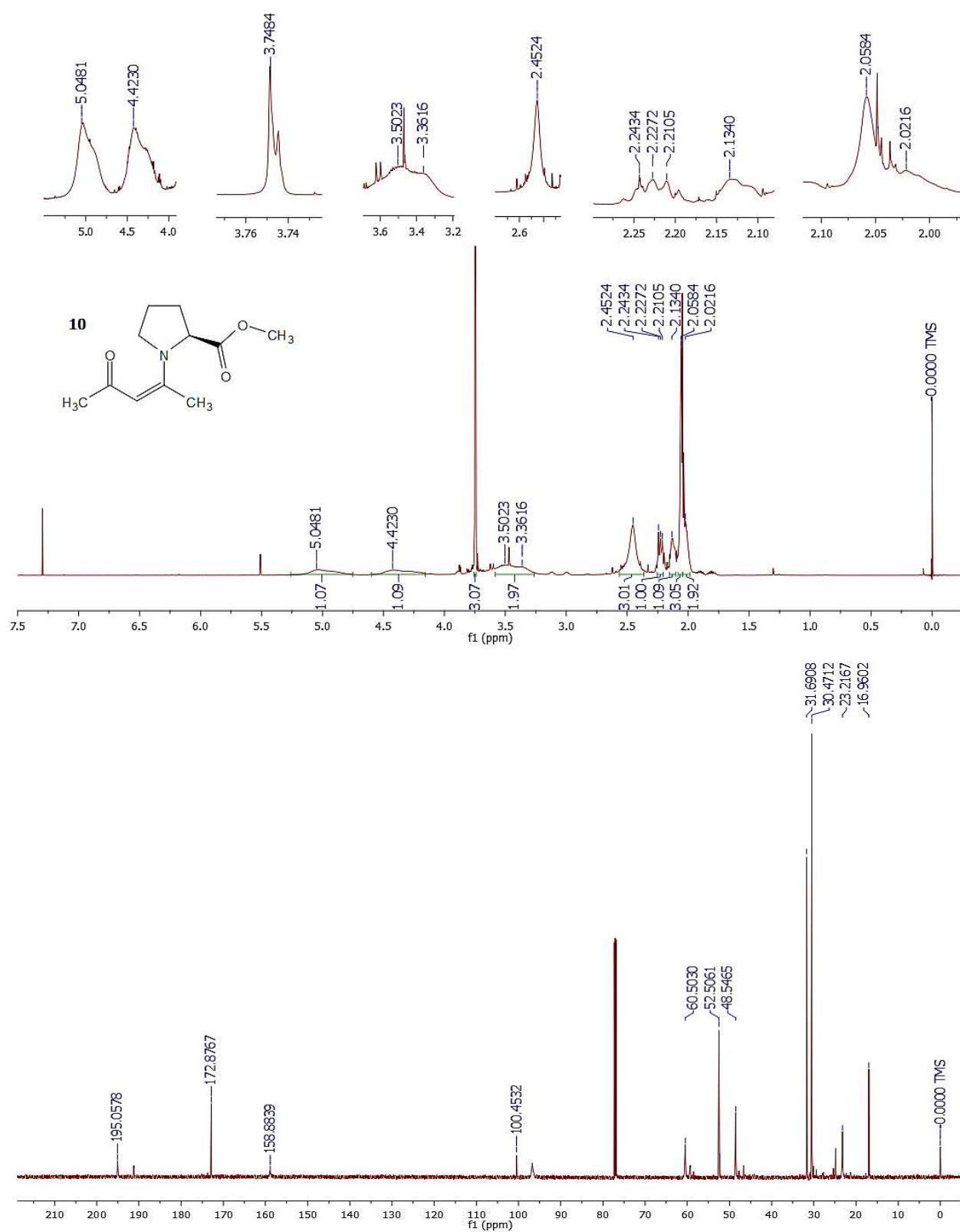
Anexo I



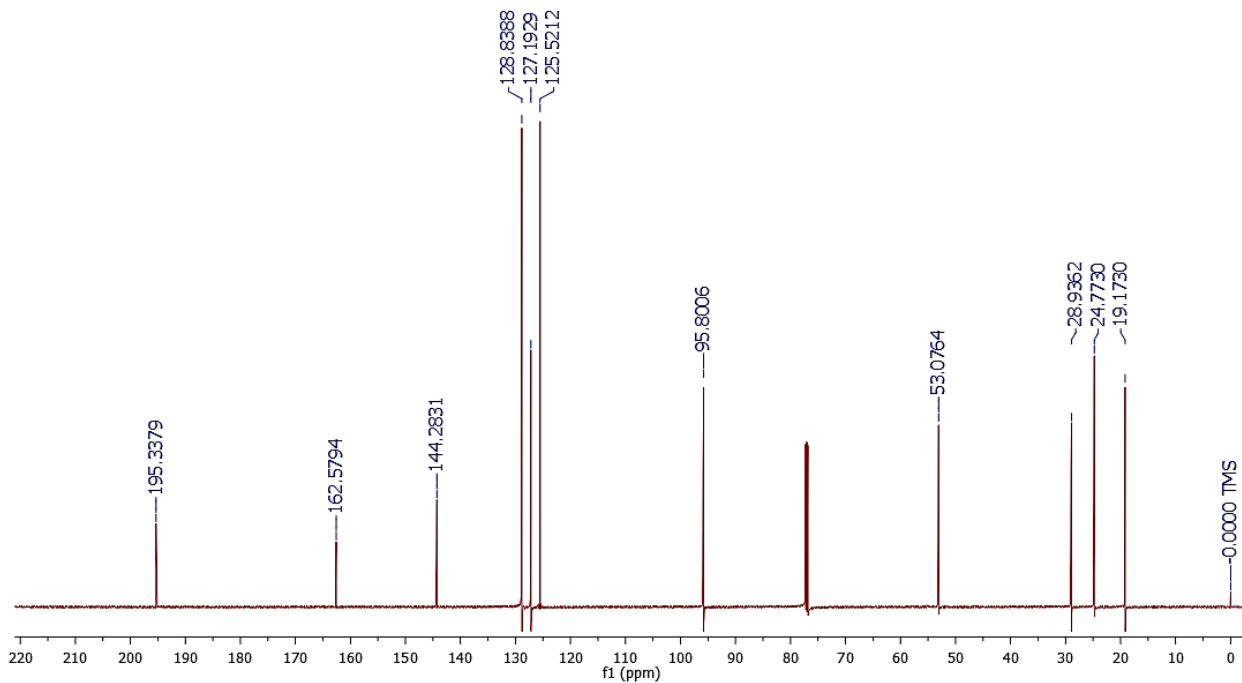
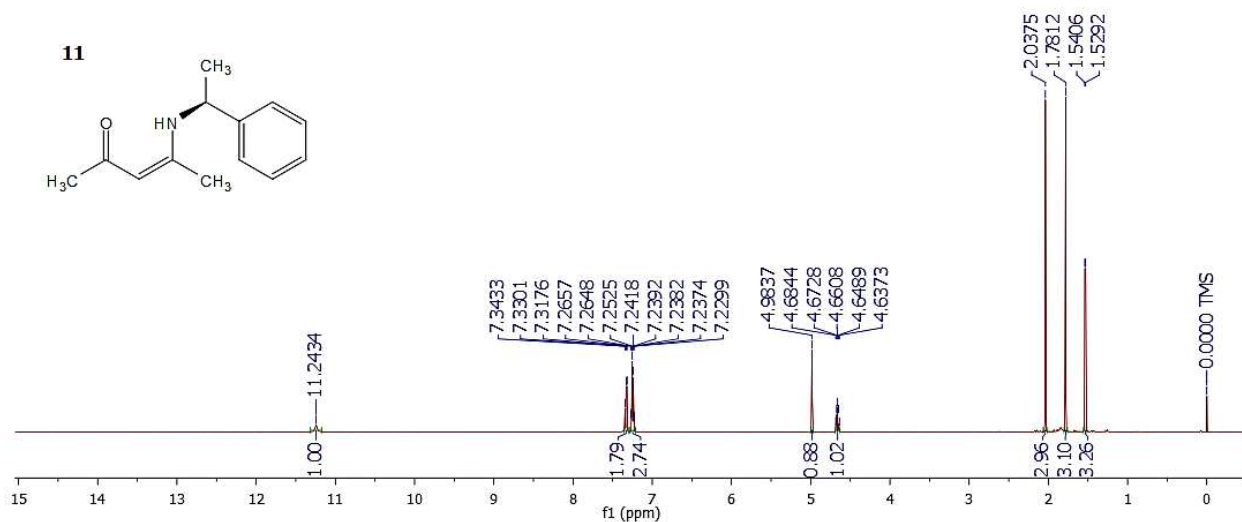
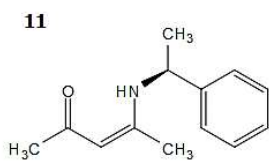
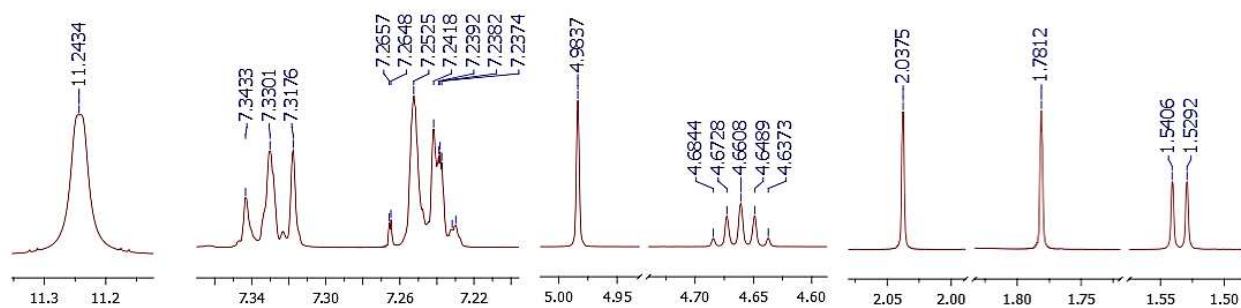
Anexo I



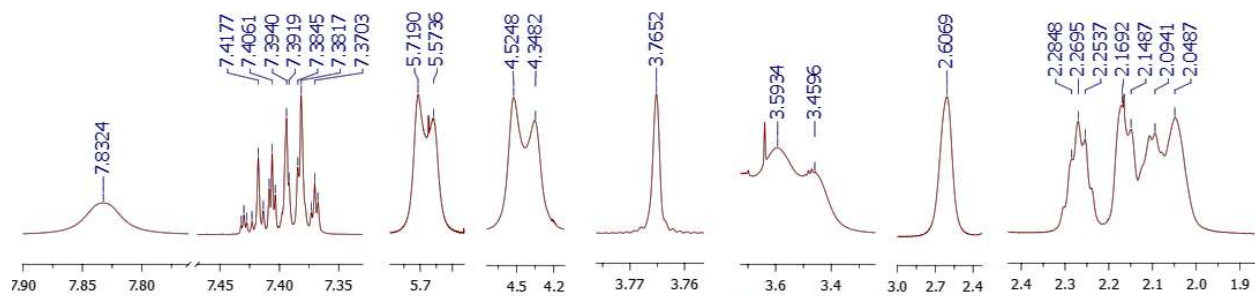
Anexo I



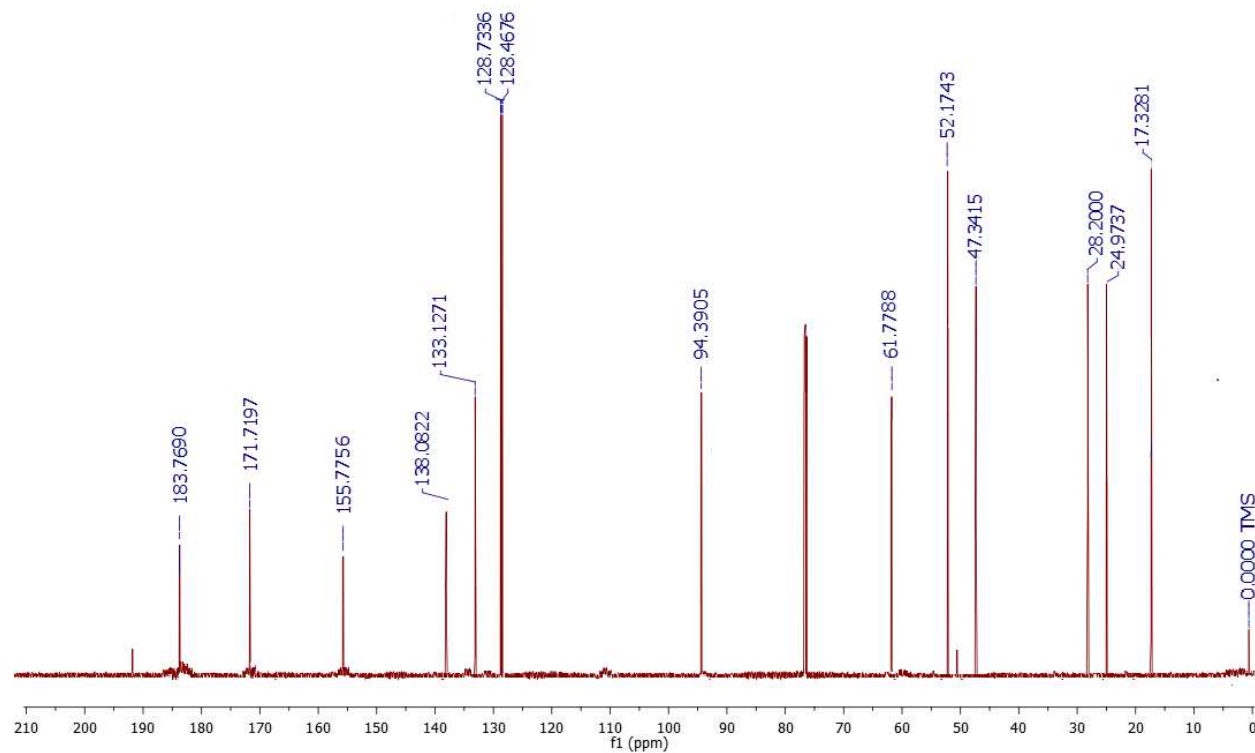
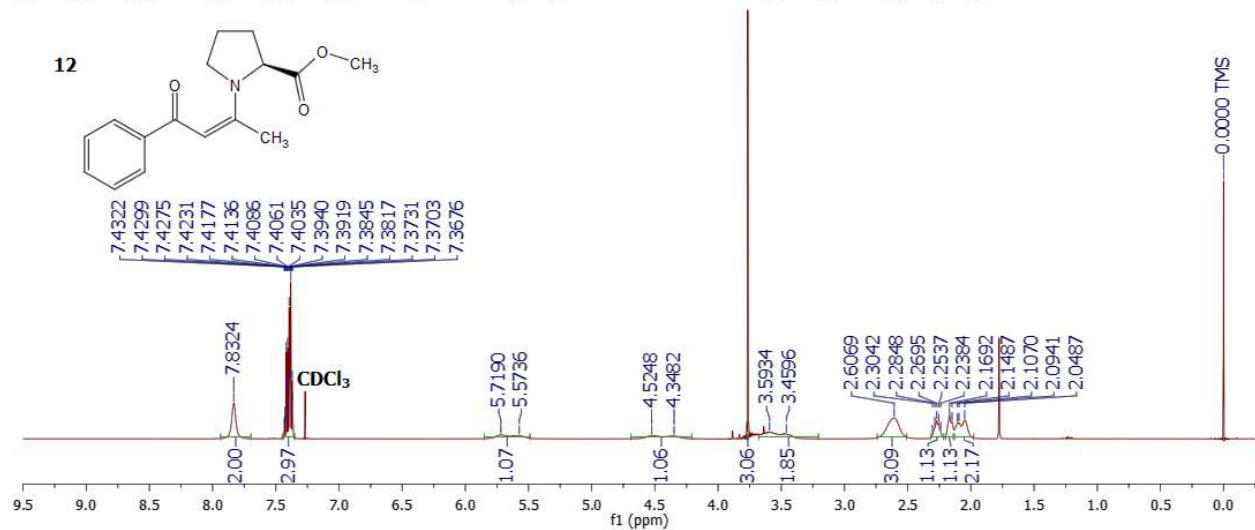
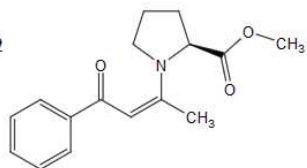
Anexo I



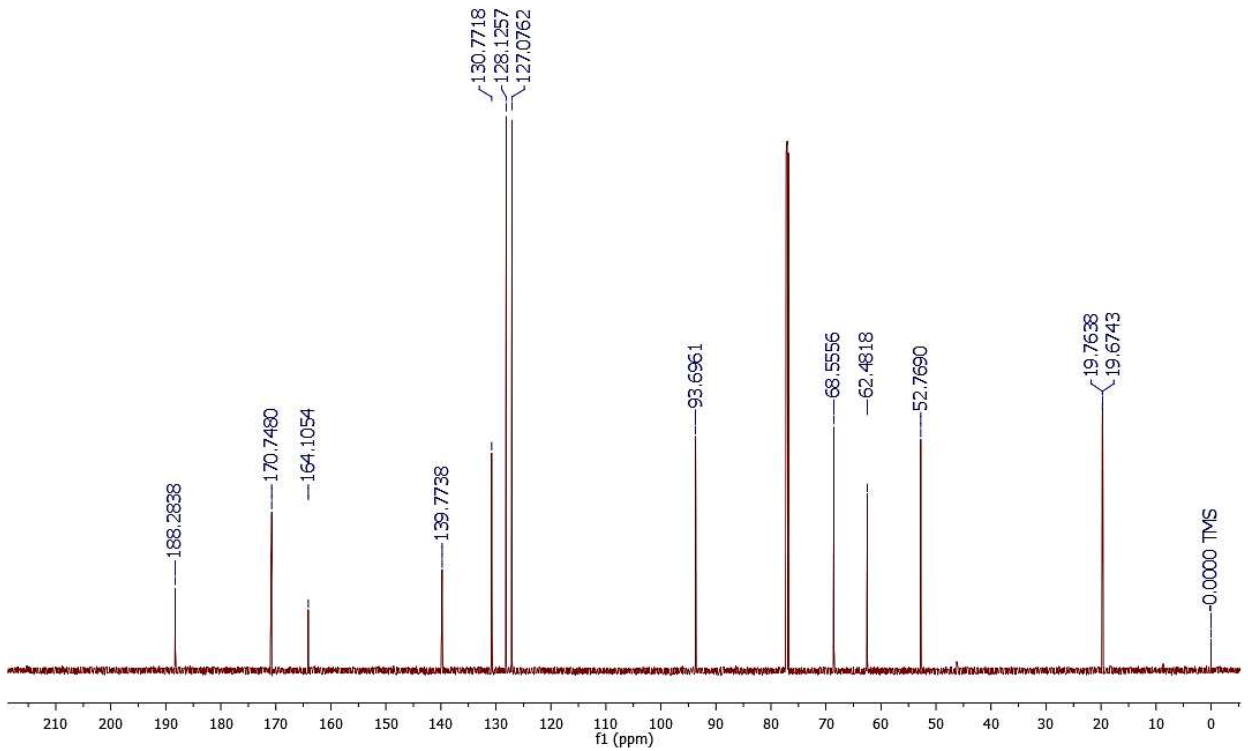
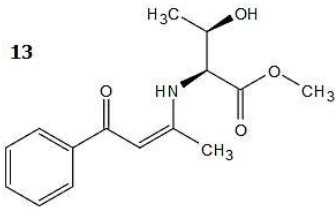
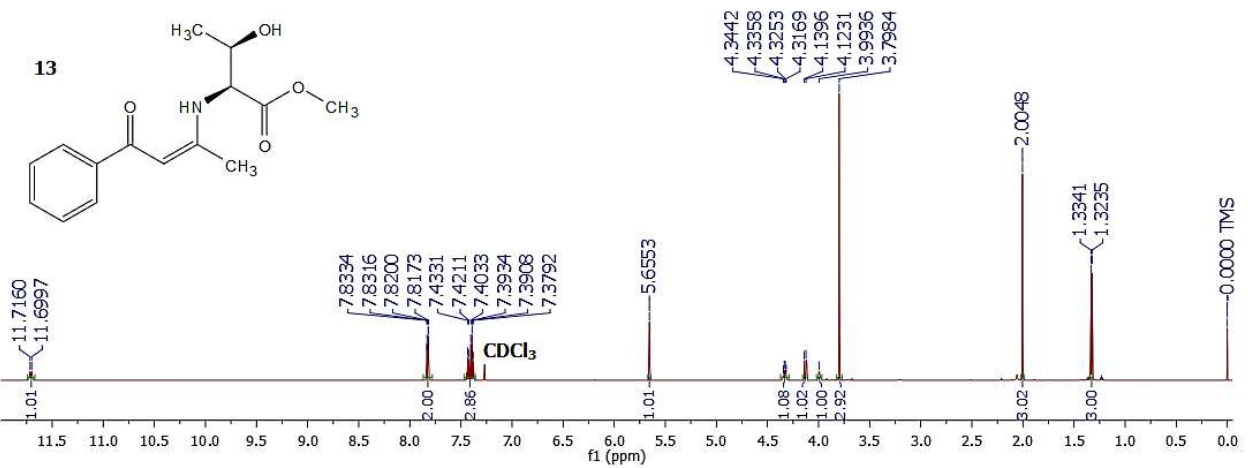
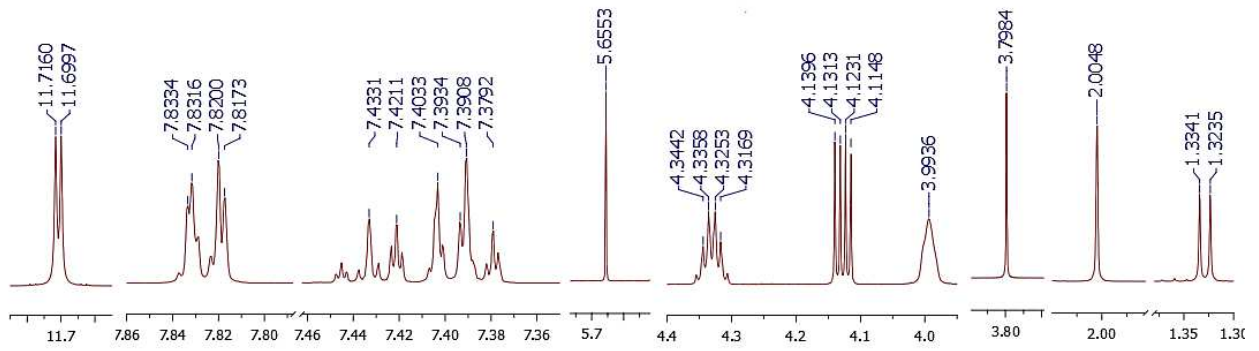
Anexo I



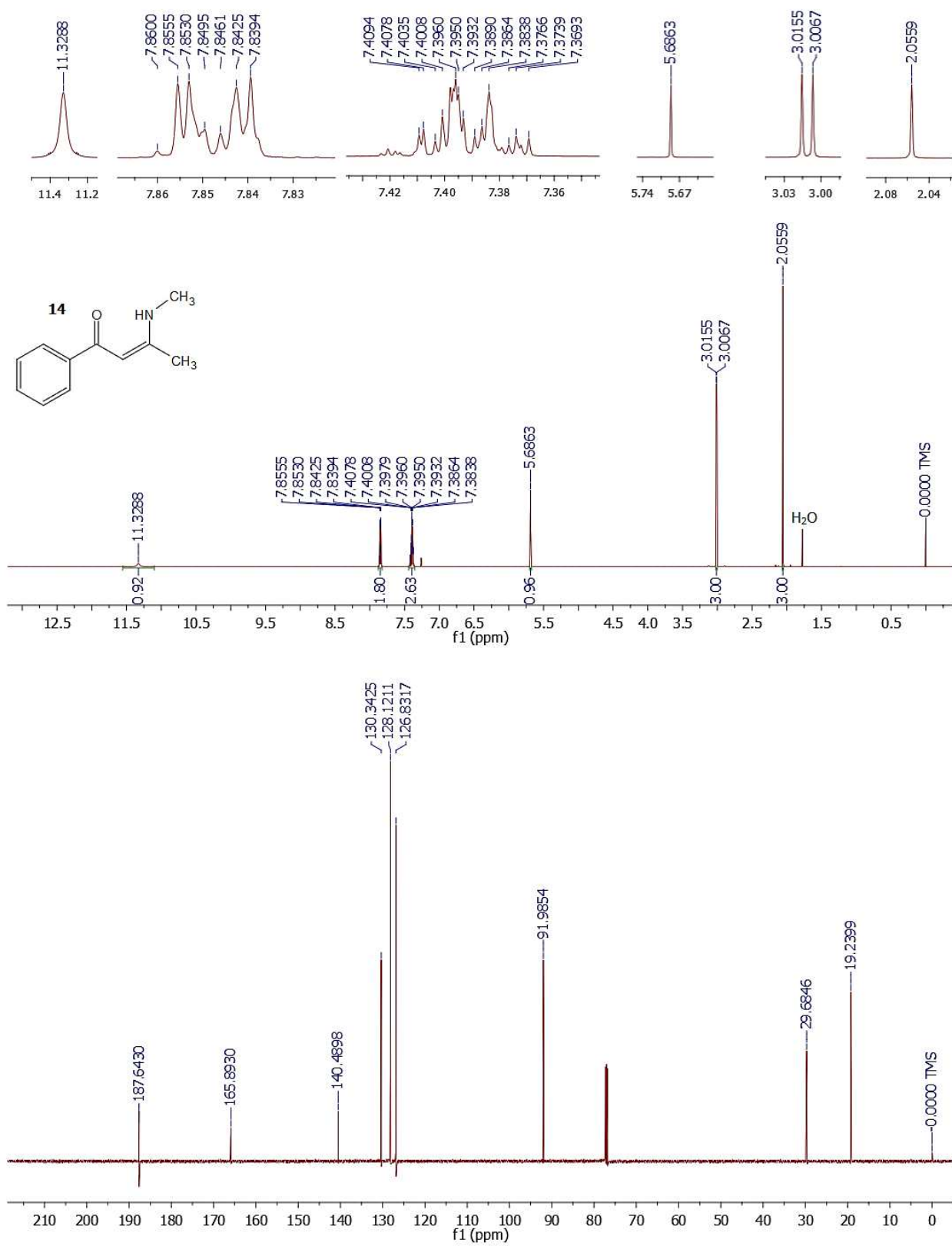
12



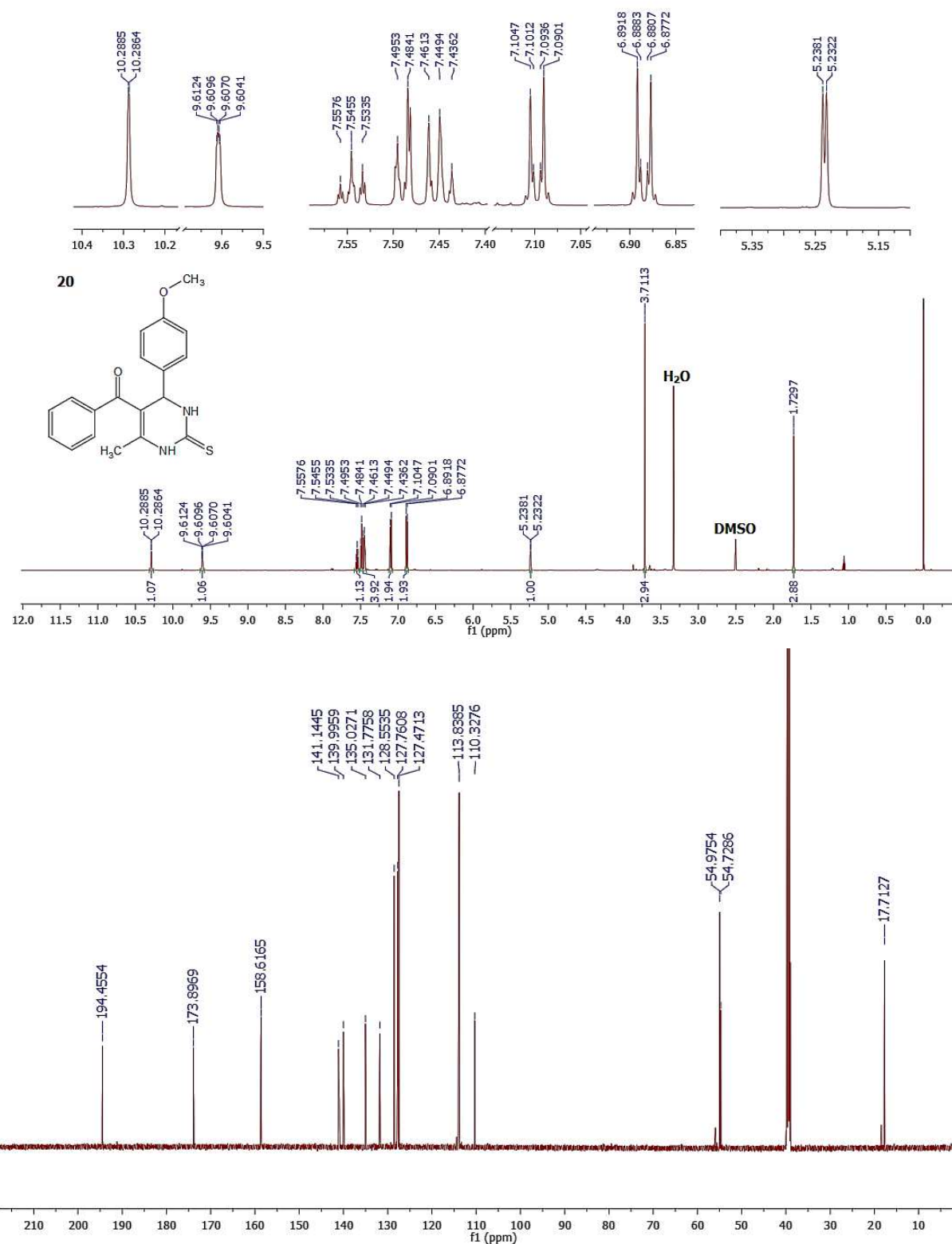
Anexo I



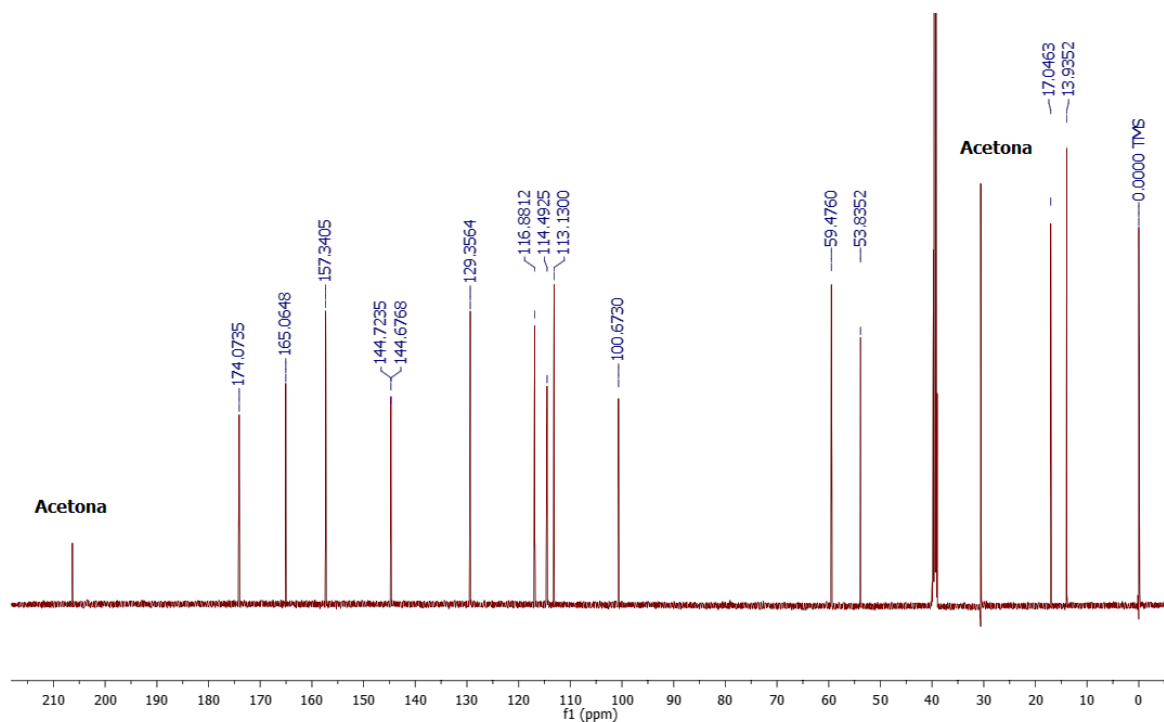
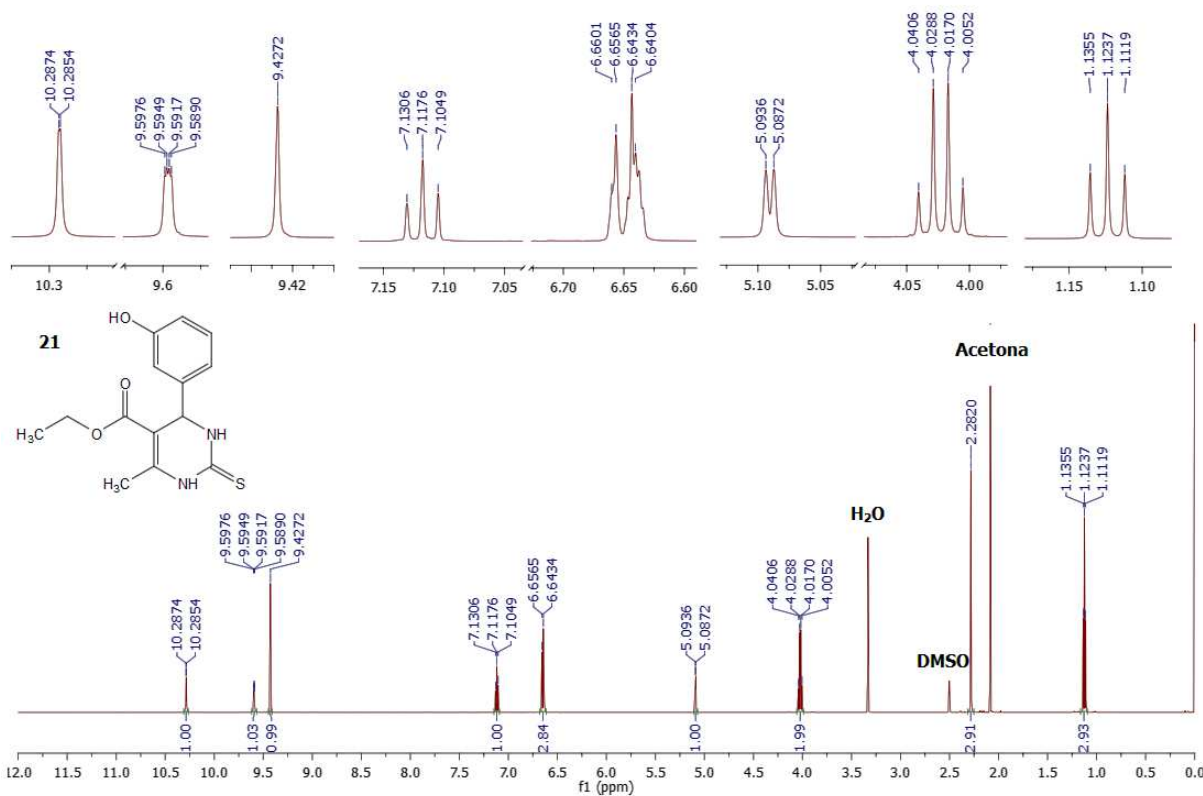
Anexo I



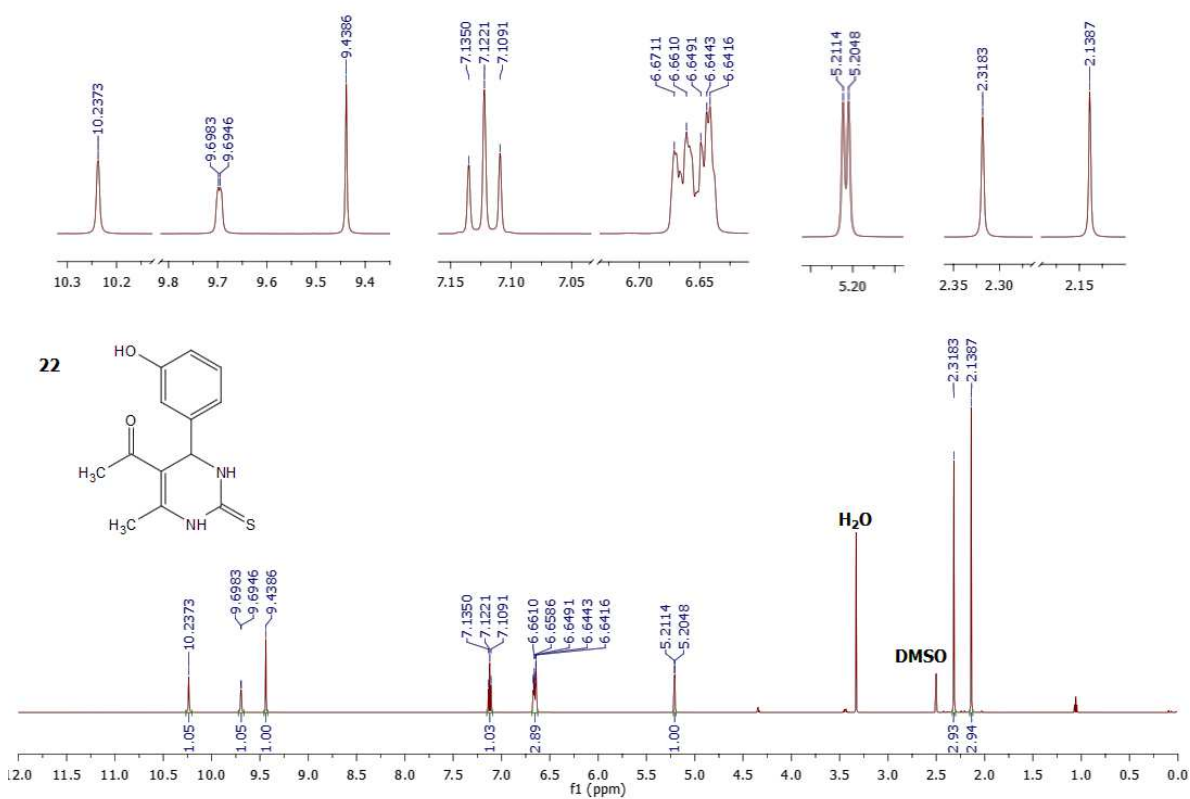
Anexo I



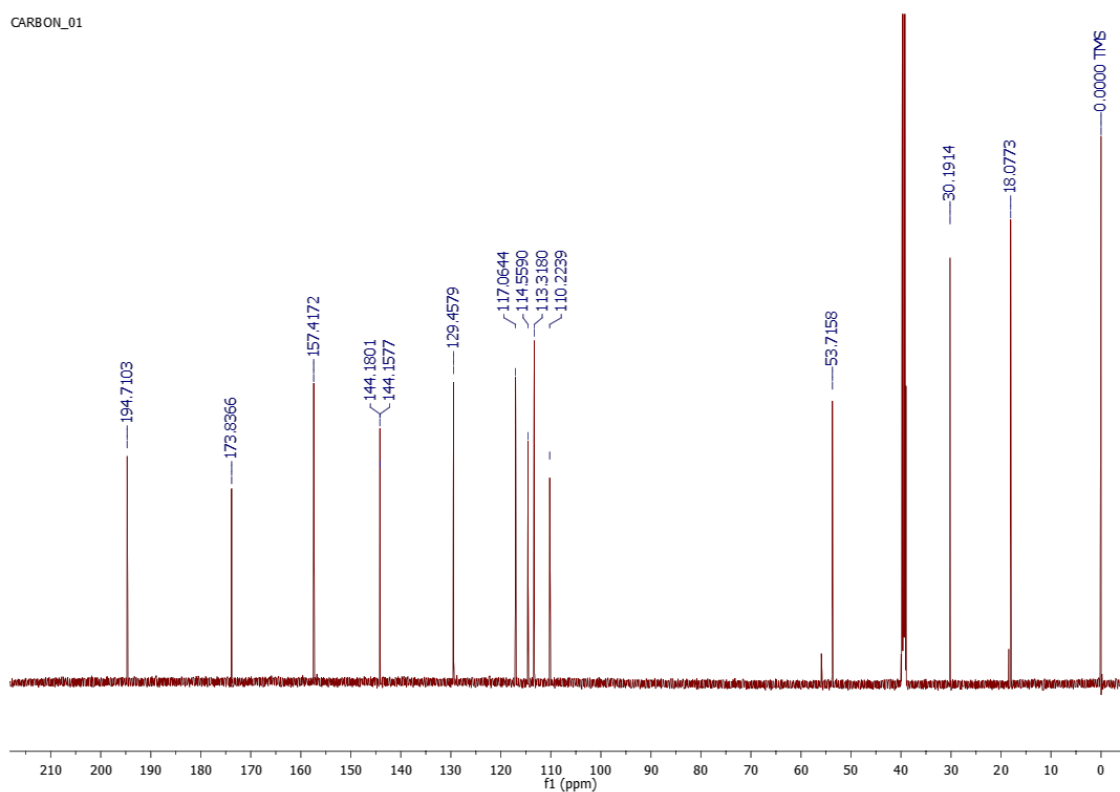
Anexo I



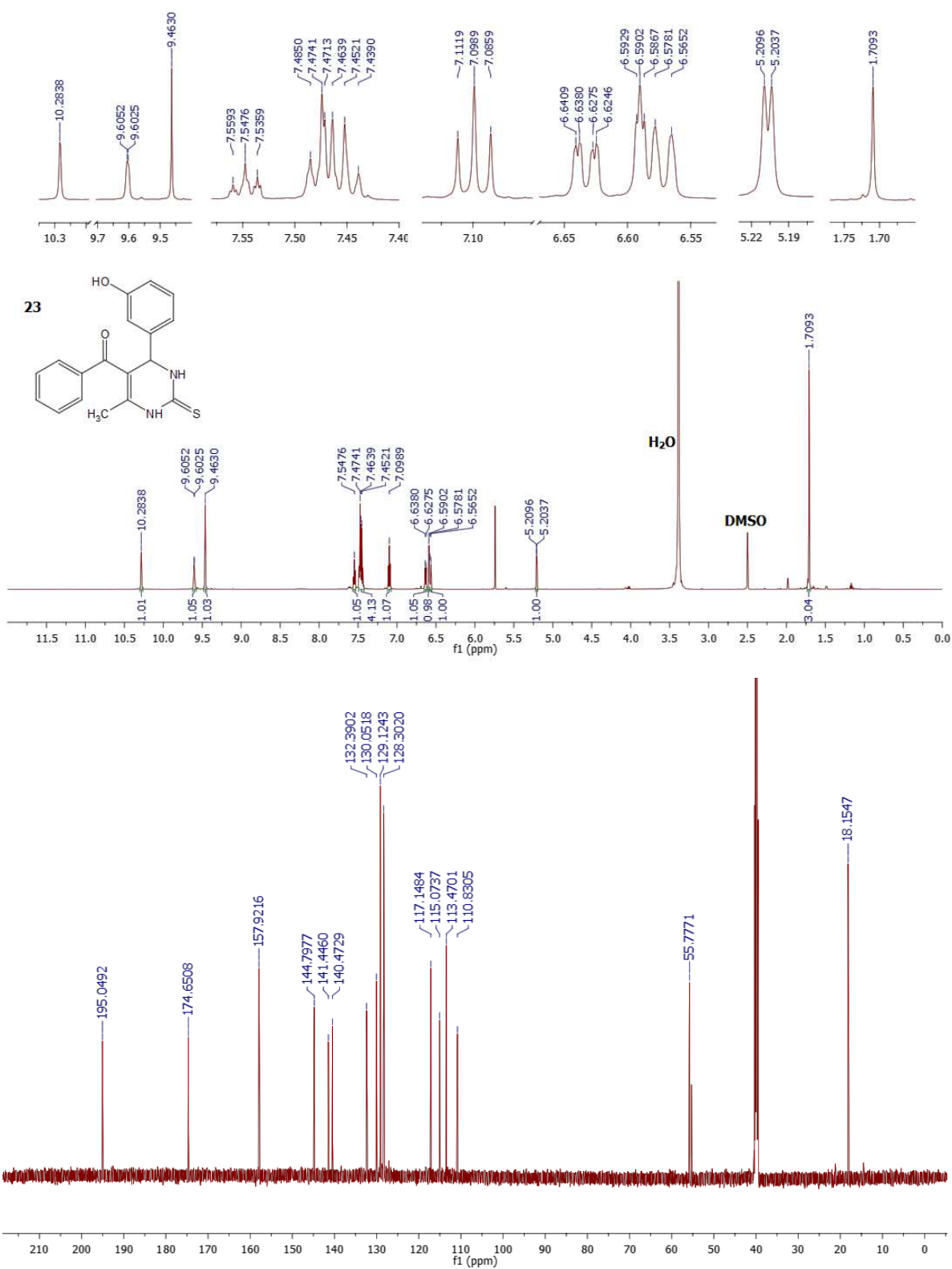
Anexo I



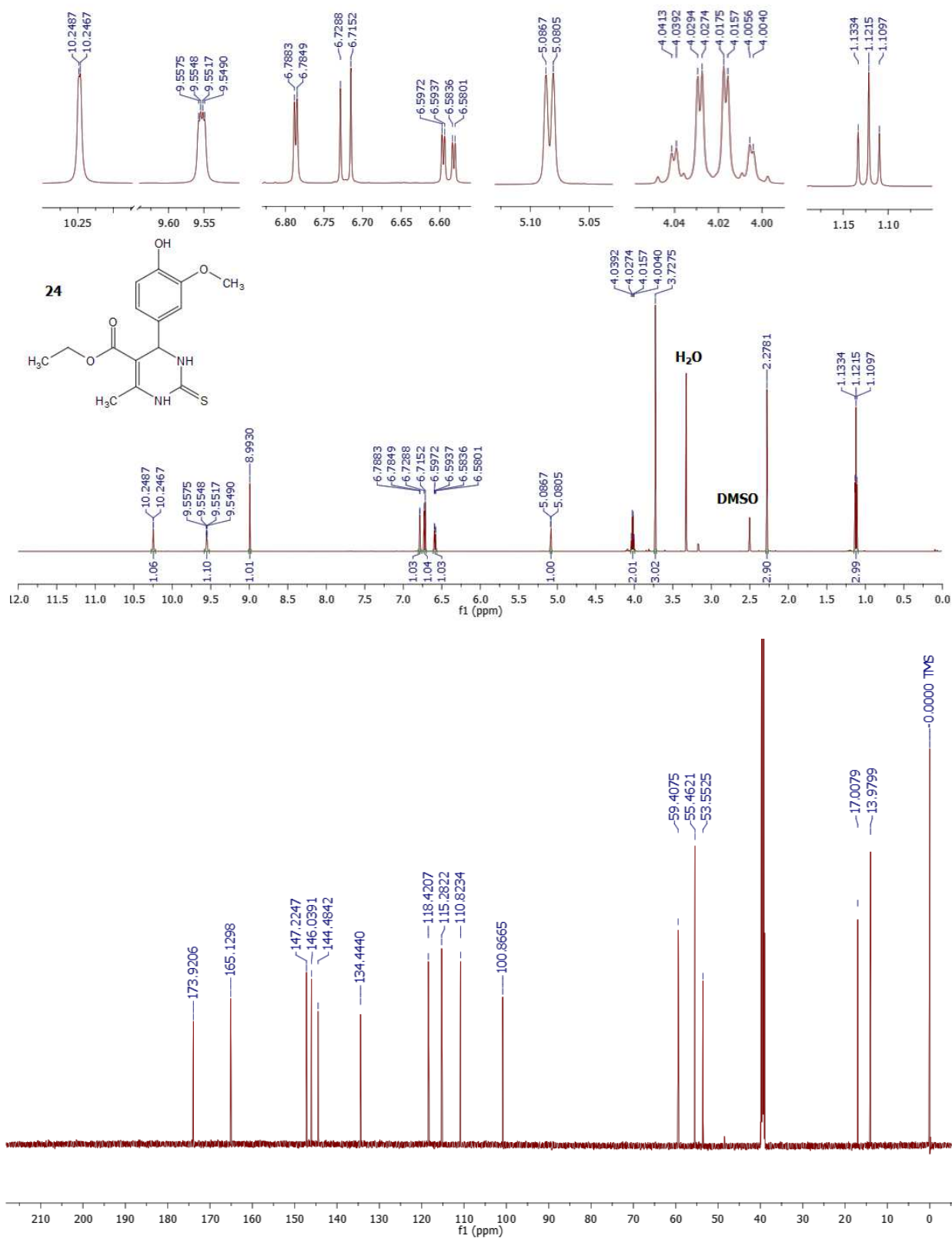
CARBON_01



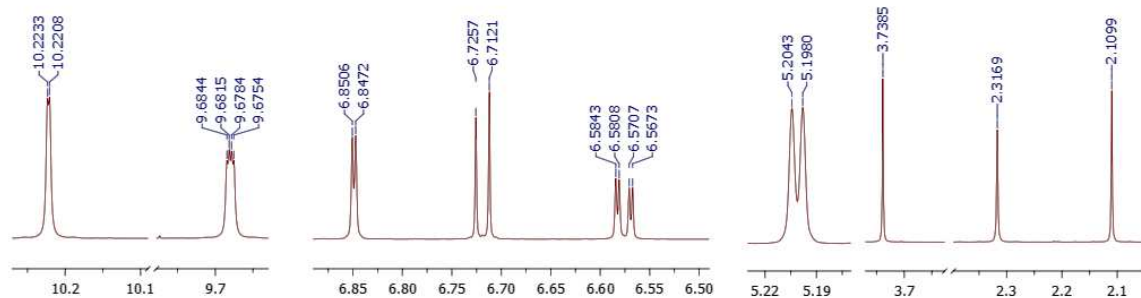
Anexo I



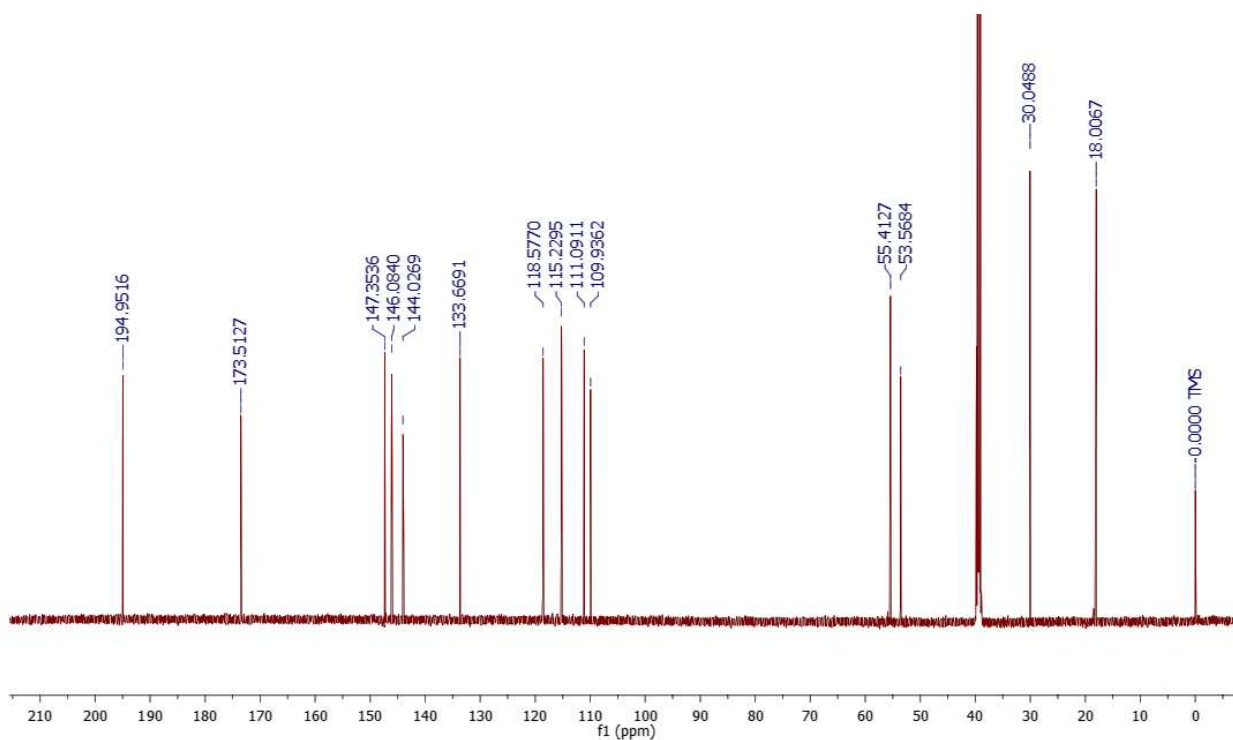
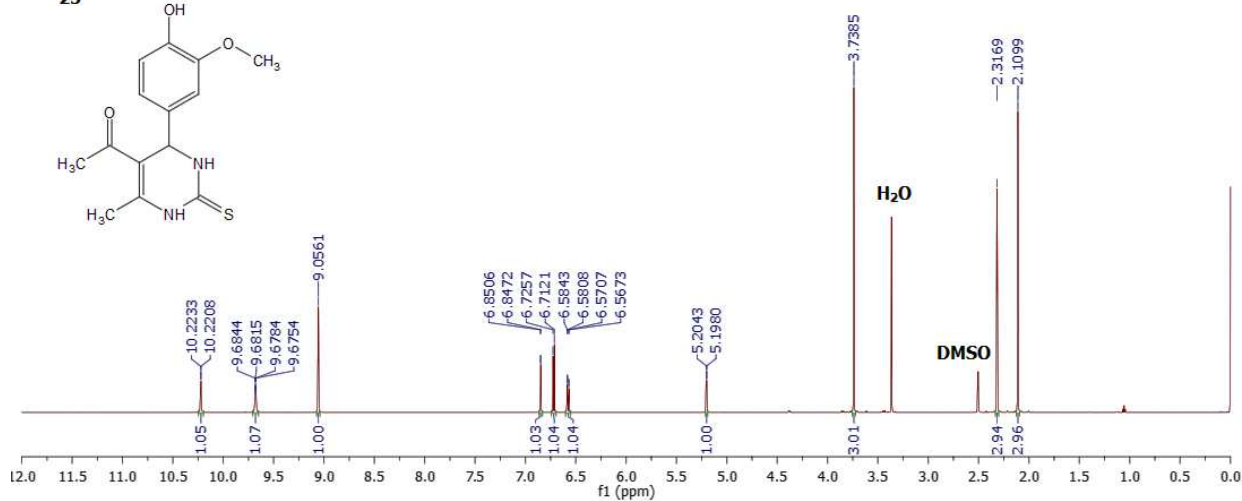
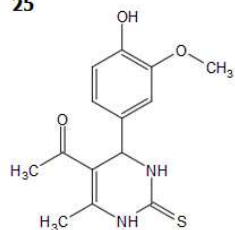
Anexo I



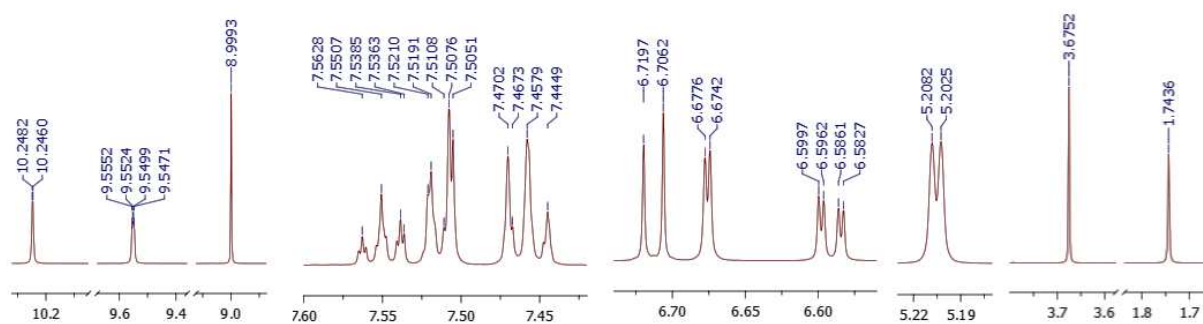
Anexo I



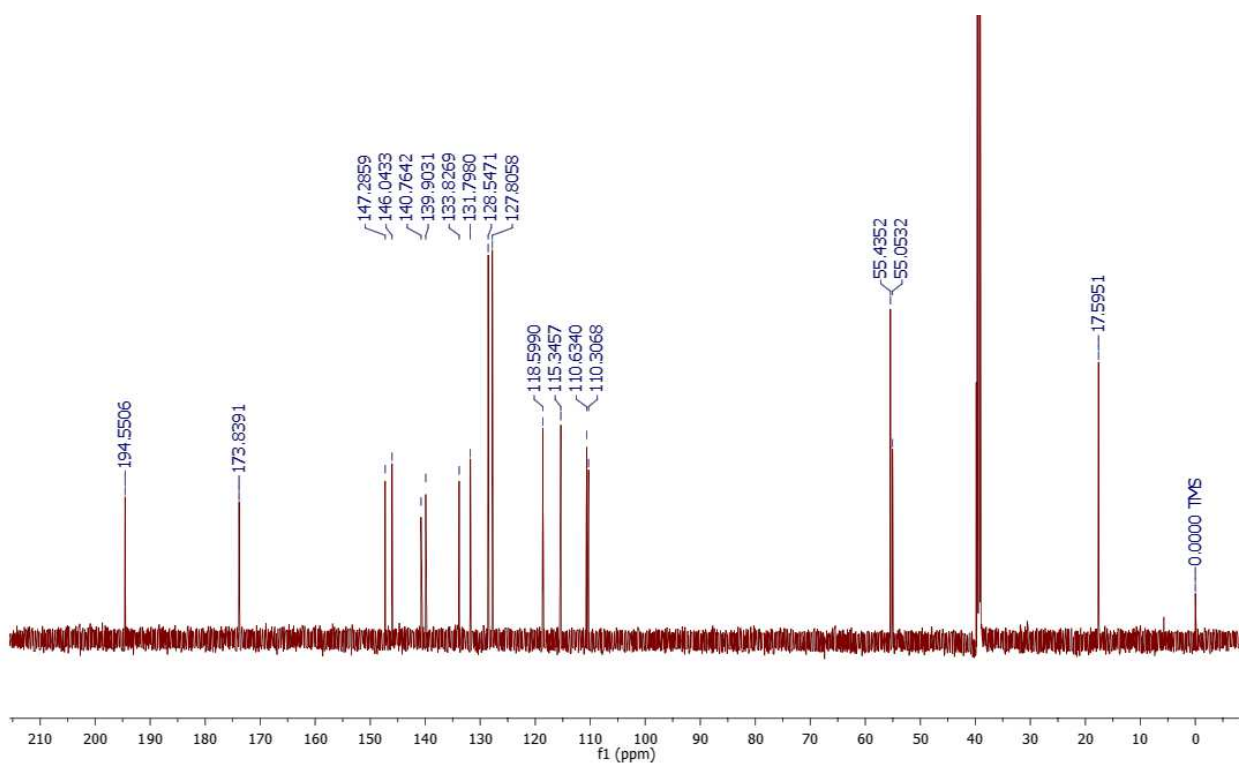
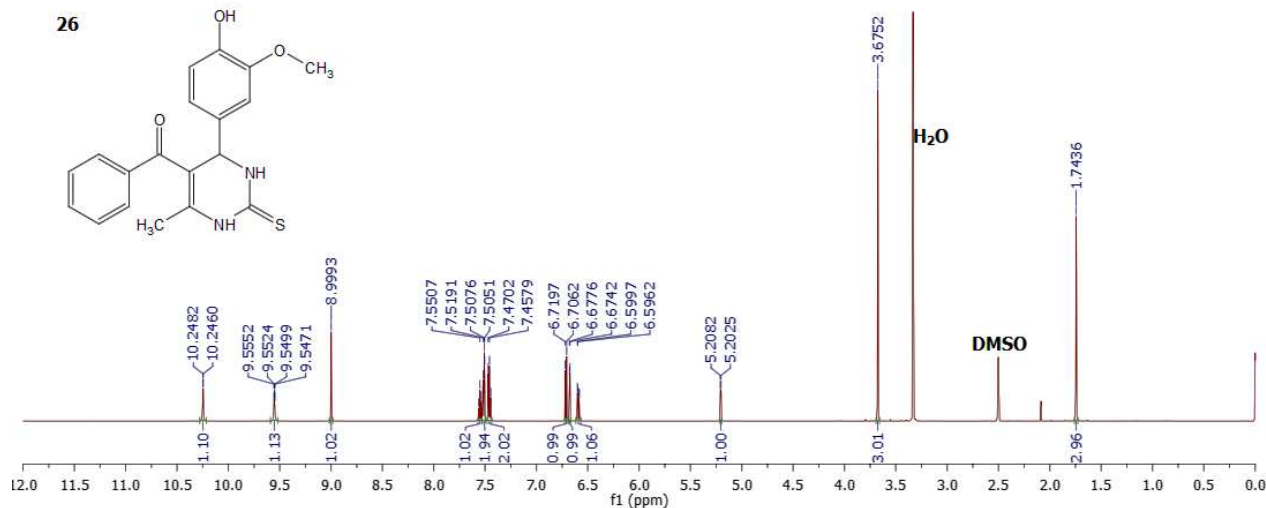
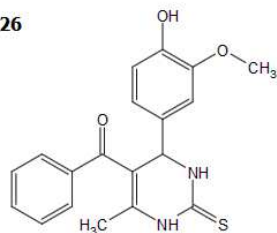
25



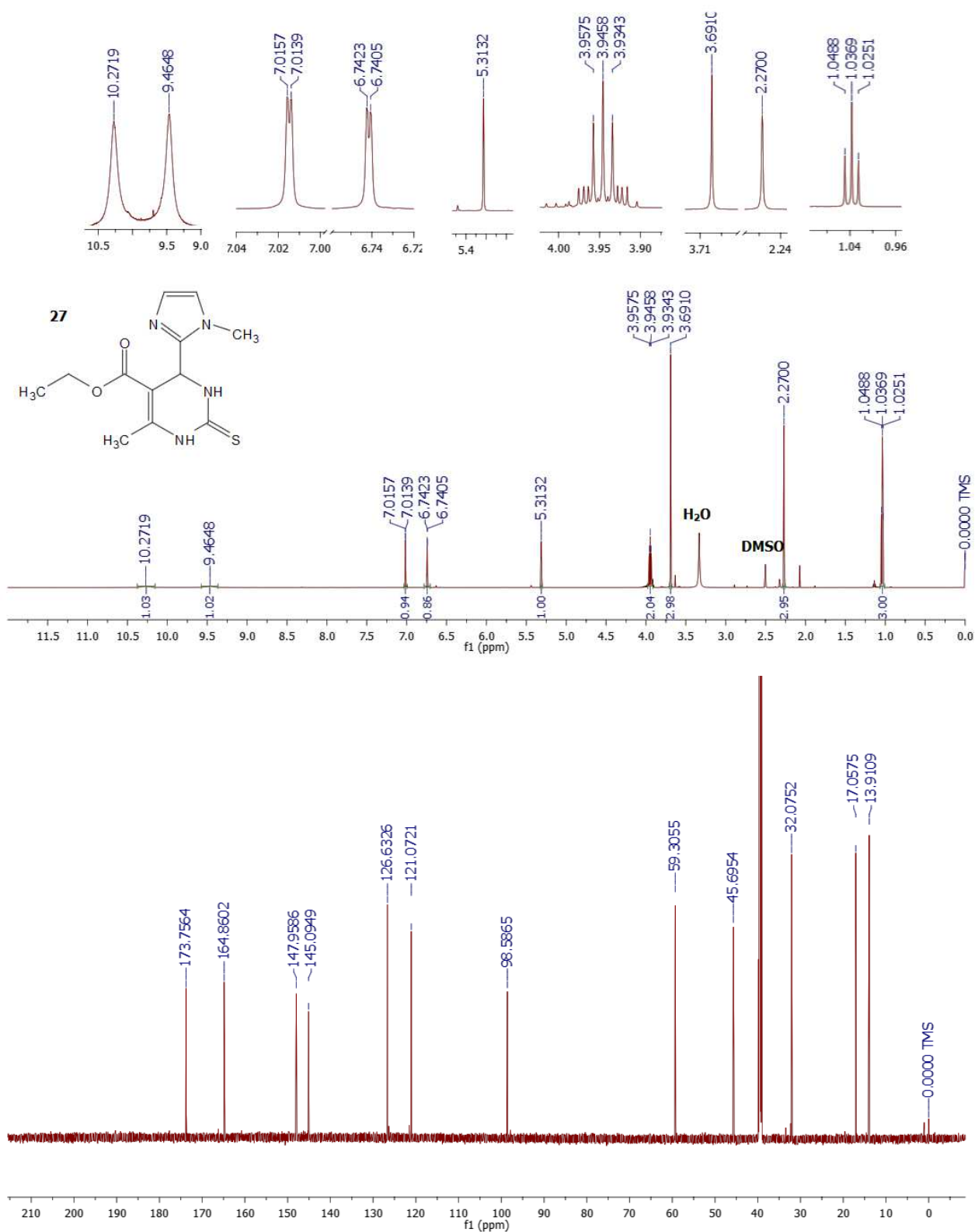
Anexo I



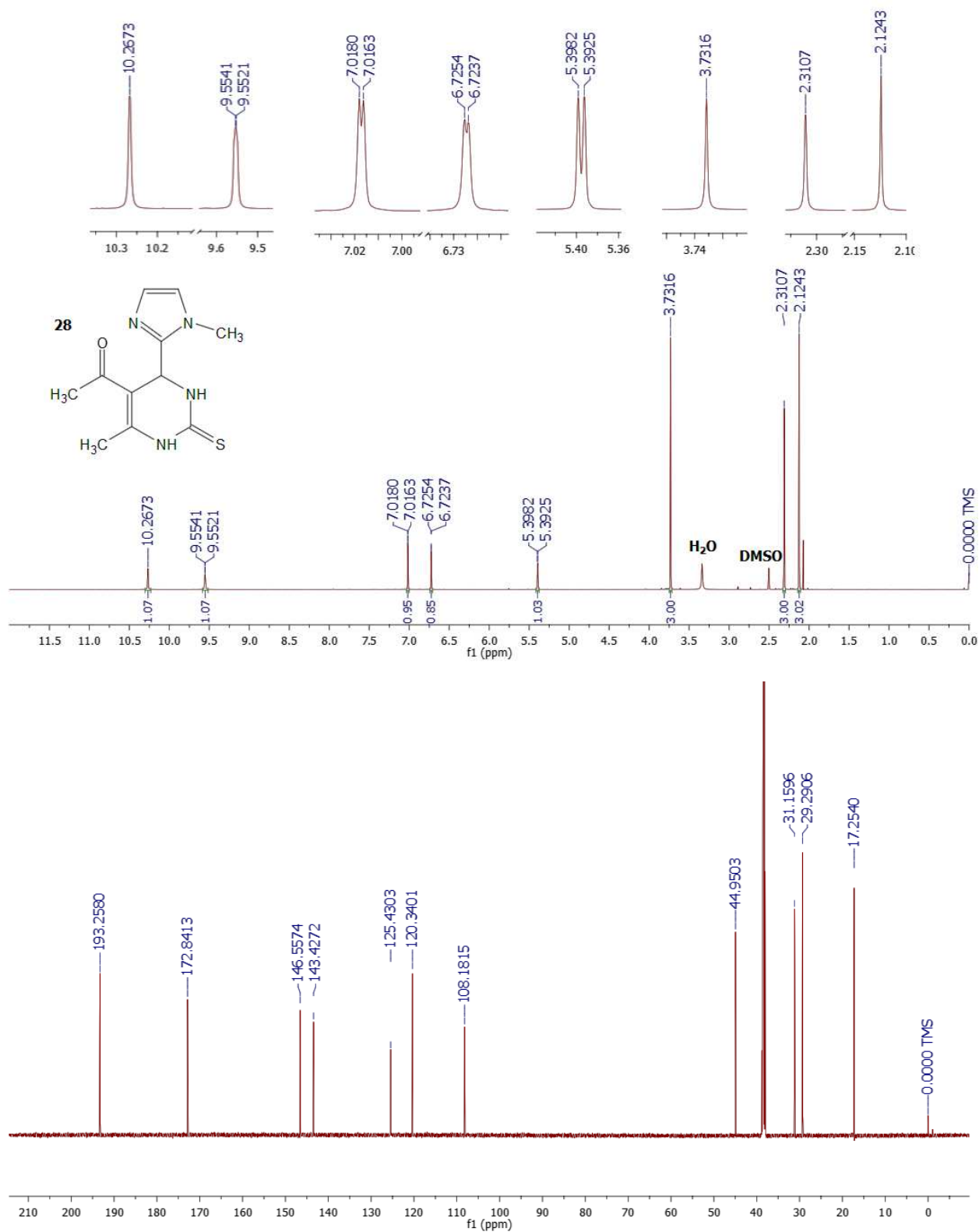
26



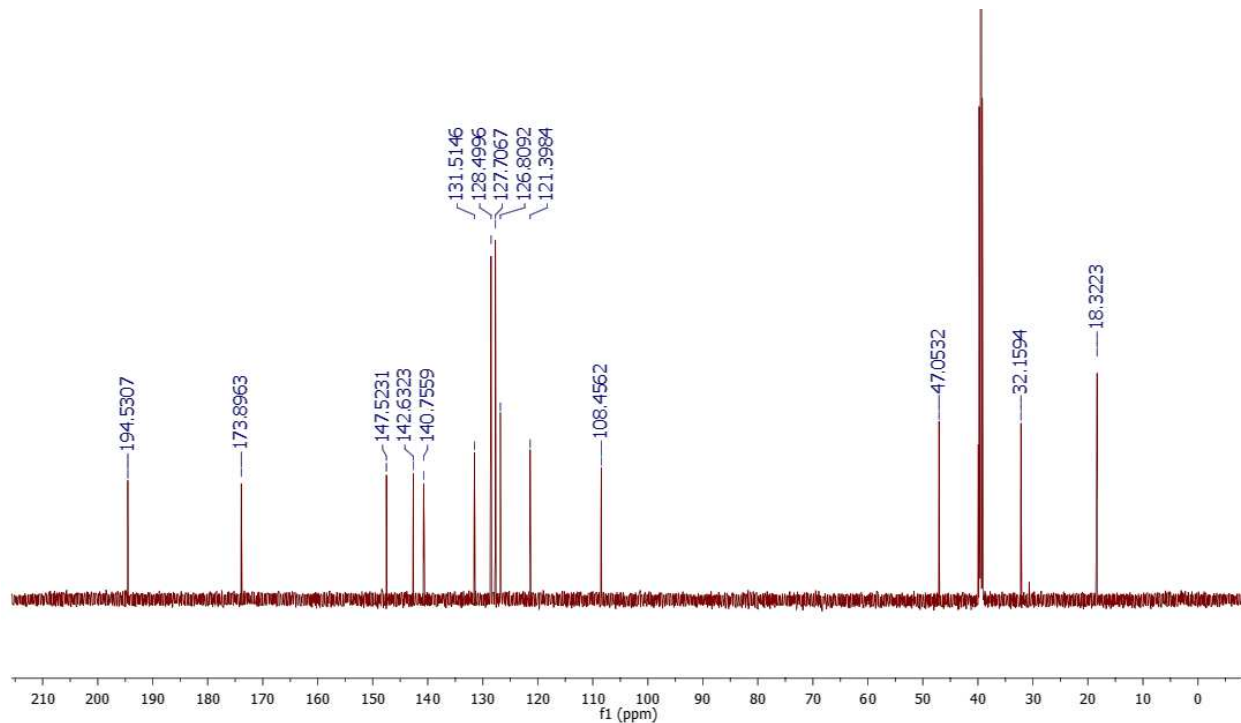
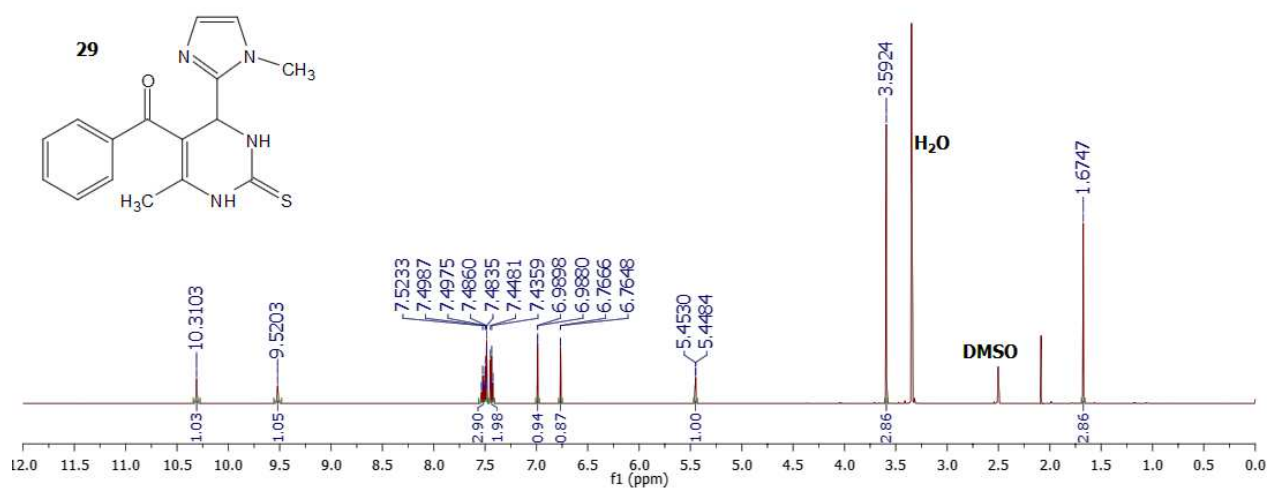
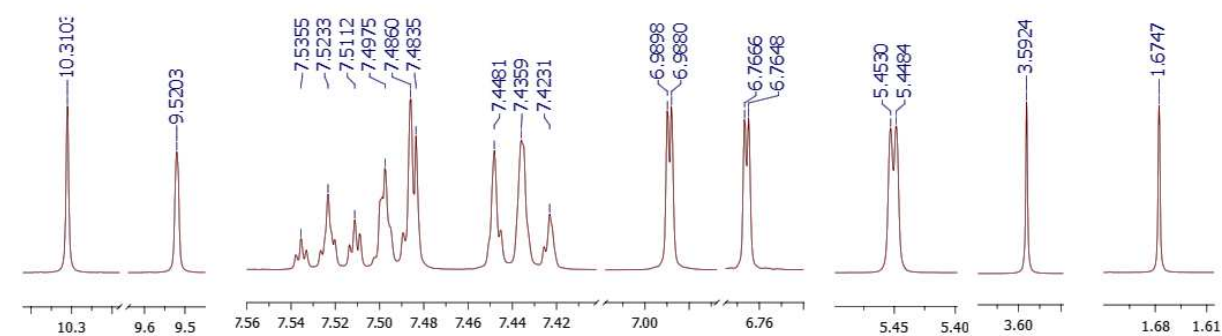
Anexo I



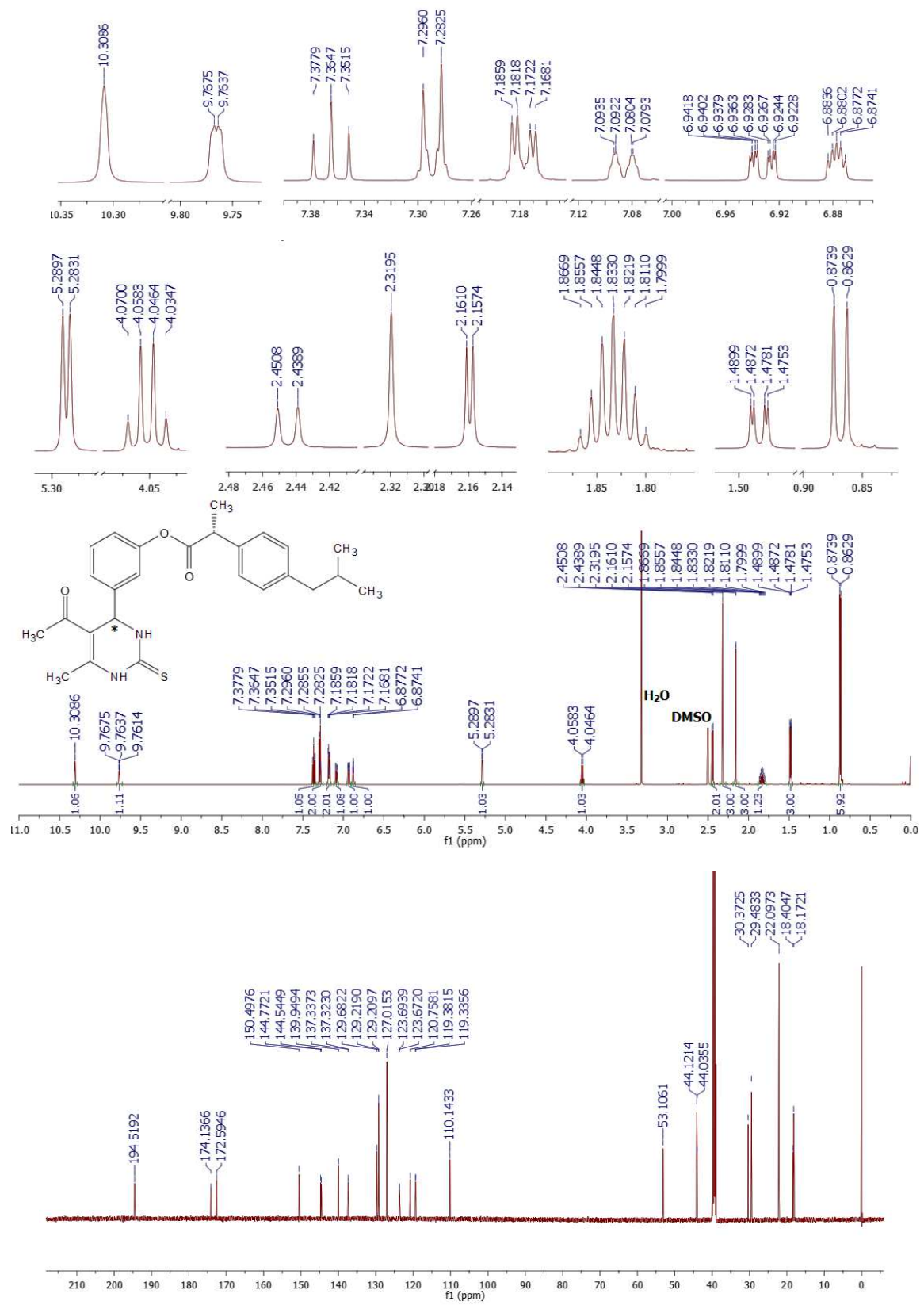
Anexo I



Anexo I



Anexo I



II. Trabajos presentados



Síntesis enantioselectiva de dihidropirimidintionas a partir de enamionas quirales

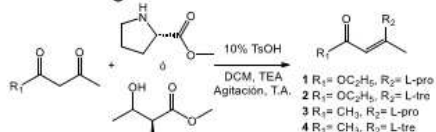
Karen Rodríguez Villar, Ma. Concepción Lozada G.[†], Jaime Pérez V., Ma. Teresa Ramírez A., Olivia Soria A. Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, México, D.F. 04960 Email: kgarenrodrv@hotmail.com, soriao@correo.xoc.uam.mx

Palabras clave: enamionas, pirimidintionas, enantioselectivo

Introducción

Las reacciones de multicomponentes ofrecen simplicidad y eficiencia a los enfoques sintéticos de la química combinatoria, una de las reacciones más empleadas es la de Biginelli, para obtener 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas (DHPM), los cuales han presentado actividad biológica como: moduladores de los canales de calcio, antivirales, antimicóticos, antihipertensivos, antibacterianos, antiinflamatorios, anticancerígenos y antioxidantes.^{1,2}

El desarrollo de síntesis enantioselectivas de DHPM ha cobrado gran importancia debido a las diferencias observadas en la actividad biológica de los enantiómeros, por ejemplo, el (S)-Monastrol que mostró ser 15 veces más potente como anticancerígeno que su enantiómero.³ En este trabajo proponemos el uso de enamionas quirales, obtenidas de aminoácidos (Esquema 1), para favorecer la formación de uno de los enantiómeros en la reacción de Biginelli.^{4,5}

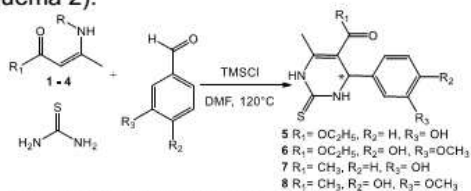


Esquema 1. Síntesis de enamionas

Resultados y discusión

Síntesis de dihidropirimidintionas (DHPT)

Las DHPT fueron obtenidas a partir de la enamionas indicada, tiourea, el aldehído correspondiente y TMSCl en una relación molar (1:1.5:1:1.5) en DMF por calentamiento a 120°C (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de las dihidropirimidintionas

Todos los compuestos fueron caracterizados por p.f., IR, UV, RMN ¹H y ¹³C y rotación óptica específica.

Las DHPT se obtuvieron en rendimientos moderados, observándose mejores rendimientos para las obtenidas a partir de las enamionas de L-treonina que de L-prolina.

Los valores de rotación óptica específica mostraron que el uso de enamionas quirales favorece la formación de uno de los enantiómeros. Con base en los valores reportados en la literatura corresponde al isómero S.

Tabla 1. Rendimiento y características de las DHPT

DHPT	Enamionas	t (h)	% R	p.f. (°C)	[α] _D ²⁵ °C *
5	1	4.5	75.4	188-190	+0.625
	2	5	80.7		+0.893
6	1	2.5	48.5	211-213	+1.000
	2	5	49.9		+1.075
7	3	5	69.5	246-248	+0.666
	4	6	74.1		+0.625
8	3	2	55.6	233-235	+1.023
	4	1	65.7		+0.075

* (S)-Monastrol [α]_D = +1.1 (c=0.007, MeOH)⁶; para las DHPT (c=0.0040 – 0.0056, MeOH)

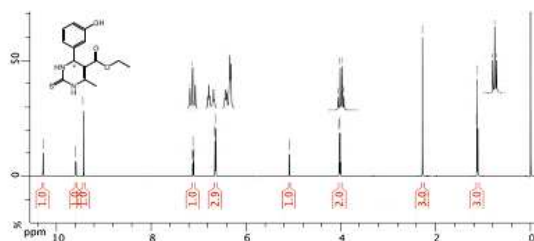


Figura 1. Espectro de RMN ¹H de (5) 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato de etilo

Conclusión

Se obtuvieron enantioselectivamente las DHPT en rendimientos moderados, utilizando enamionas quirales.

Referencias

- Da Silva D. L., Reis F. S., Muniz D. R., Ruiz A. L., de Carvalho J. E., Sabino A. A., Modolo L. V., de Fátima A. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2645–2650.
- Sandhu S., Sandhu J. S. *Arkivoc.* **2012**, *1*, 66–133.
- Maliga Z., Kapoor T.M., Mitchison T.J. *Chem. & Biol.* **2002**, *9*, 989–996.
- Jie-Ping W., Yuan-Jiang P. *Chem. Commun.* **2009**, 2768–2770.
- Yadav J. S., Praveen Kumar S., Kondaji G., Srinivasa Rao R., Nagaiah K. *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 1168–1169.
- Kappe O.C., Shishkin O.V., Uray G., Verdino P. *Tetrahedron.* **2000**, *56*, 1859–1862.

Karen Rodríguez Villar,¹ Ma. Concepción Lozada G.,^{2,†} Jaime Pérez Villanueva,² Ma. Teresa Ramírez Apan,³ Antonio Nieto Camacho,³ Olivia Soria Arteché²
¹Maestría en Ciencias Farmacéuticas, ²Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, México, D.F. 04960, ³Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.
 Email: qkarenrodv@hotmail.com soriao@correo.xoc.uam.mx

Introducción

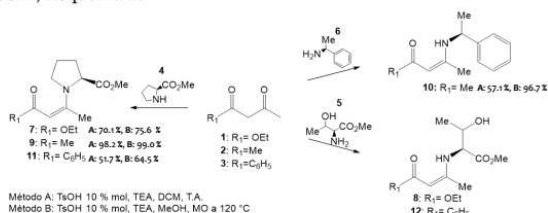
El cáncer constituye un grave problema de salud pública, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México y el mundo. Por ello la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos como enantiómeros puros para mejorar la actividad biológica y evitar reacciones adversas, ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías en síntesis asimétrica.

En el presente trabajo se presenta la síntesis de siete análogos del (S)-Monastrol (dihidropirimidintiona), identificado como potente anticancerígeno (inhibidor específico de la kinesina Eg5), por medio de una reacción multicomponentes tipo Biginelli empleando enamionas quirales como auxiliares quirales, tiourea y aldehídos aromáticos, para obtener compuestos con un alto exceso enantiomérico, los cuales fueron evaluados contra seis líneas celulares de cáncer.

Metodología

Síntesis de enamionas quirales

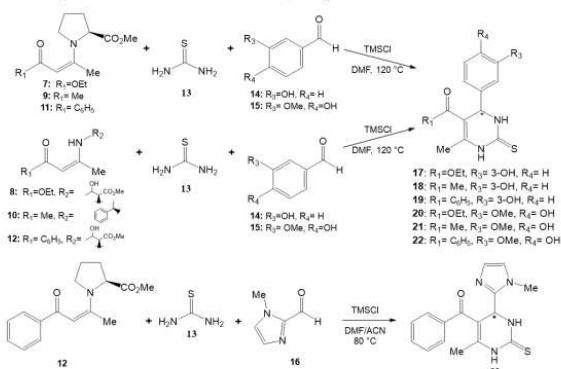
Las enamionas 7-12 fueron obtenidas a partir de compuestos β-dicarbónicos (1-3) y aminas quirales (4-6) en presencia de TEA y TsOH, Esquema 1.



Esquema 1. Síntesis y rendimiento de las enamionas quirales

Síntesis de dihidropirimidintionas (DHPT)

Las DHPT fueron obtenidas a partir de la enamionas indicada, tiourea, el aldehído correspondiente y TMSCl en una relación molar (1:1.5:1:1.5) en DMF por calentamiento a 120 °C, Esquema 2.



Esquema 2. Síntesis de dihidropirimidintionas

Evaluación citotóxica

Las DHPT fueron evaluadas en seis líneas celulares de cáncer humano: HCT-15 (colon), U251 (SNC), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), MCF-7 (mama) y SKLU (pulmón), mediante el ensayo de Sulforrodamina B, a una concentración fija de 50 μM.

Referencias:

1. World Cancer Report 2014, IARC. ; 2. Sandhu S. and Sandhu J.S. *Arkiwoc*, 2012, 1, 66-133. ; 3. Wan J. and Pan Y. *Chem. Commun.* 2009, 19, 2768-2770. ; 4. Kantavari S., Bantu R., Nagarapu L. *Arkiwoc*.

Resultados y discusión

Las DHPT se obtuvieron con rendimientos de 47% a 83.5%, y fueron caracterizados por IR, UV-vis y RMN (Figura 2), se determinó $[\alpha]_D$, mostrando bajo exceso enantiomérico (*ee*), indicando que la inducción asimétrica utilizando enamionas quirales no favorece significativamente la formación de uno de los enantiómeros. Los rendimientos y las propiedades físicoquímicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción y propiedades FQ de las DHPT

Enamionas	Aldehído	t rxn (h)	% R	DHPT	P.F. (°C)	Color	$[\alpha]_D$
8	15	4.5	75.4	17	188-190	Crema	+0.005
9	15	5	80.7	17	188-190	Crema	+0.006
10	15	4	76.2	18	238-240	Crema	-9.200
11	15	4	83.5	18	238-240	Crema	-2.000
12	15	5	69.5	19	246-248	Crema	-11.400
13	15	6	74.1	19	246-248	Crema	+5.150
8	16	2.5	48.5	20	211-213	Blanco	+2.740
9	16	5	49.9	20	211-213	Blanco	+2.740
10	16	5	47.0	21	228-230	Amarillo	+0.400
11	16	5	58.0	21	228-230	Amarillo	+5.050
12	16	2	55.6	22	233-235	Amarillo	+4.400
13	16	1	65.7	22	233-235	Amarillo	+4.730
12	17	6	54.5	23	258-260	Blanco	+4.800

* (S)-Monastrol: $[\alpha]_D^{25} +71.0$, (c=0.1 g/100 mL en MeOH)

Los resultados del *screening* en líneas celulares de cáncer se muestran en la Figura 1, donde se observa que 17-19 poseen actividad citotóxica, mientras que 20-23 no la presentan. Por otra parte, 19 es específico para la línea K-562, mientras que 17 y 18 tienen actividad similar para K-562 y HCT-15.

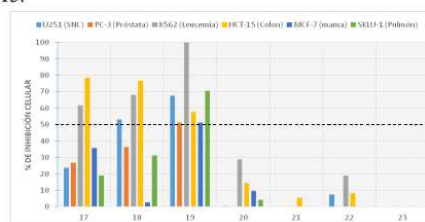


Figura 1. Valores de inhibición celular de dihidropirimidintionas

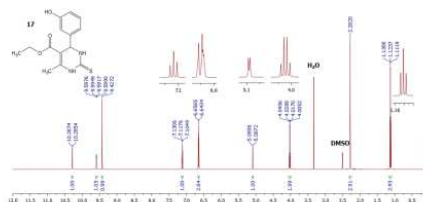


Figura 2. Espectro de RMN ¹H del 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato de etilo (17)

Conclusiones

Las enamionas sintetizadas utilizando MO como fuente de calentamiento, se obtuvieron con buenos rendimientos y menores tiempos de reacción que por síntesis convencional.

Las DHPT se obtuvieron en rendimiento moderado a bueno, mostrando bajo *ee*, lo que demuestra que el uso de enamionas quirales no favorece la formación de uno de los enantiómeros.

Las DHPT 17-19 con un grupo 3-OH presentaron mayor actividad citotóxica, teniendo mayor especificidad sobre las líneas K-562 (leucemia) y HCT-15 (colon).