

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL**

**Alumno:** Luis Javier Melgoza Ramírez

**Matrícula:** 2123056059

**División:** Ciencias Biológicas y de la Salud

**Departamento:** Sistemas Biológicos

**Licenciatura:** Químico Farmacéutico Biólogo

**Proyecto:**

**“Diseño, síntesis y evaluación de las actividades citotóxica y antioxidante,  
de los híbridos del núcleo cumarina y derivados del ácido cinámico”**

**Pertenece al proyecto genérico:**

**“Síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas”**

**Asesor (es):** Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa  
Dr. Jaime Pérez Villanueva

**Lugar de realización:** Laboratorio de Síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas, Edificio “N”. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco.  
Departamento de Sistemas Biológicos

**Fecha de inicio y término.** 9-abril-2018 - 9-octubre-2018

**Diciembre 2019**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y a la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

Al laboratorio de síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas, del Departamento de Sistemas Biológicos. Por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de servicio social en sus instalaciones.

A mis asesores, Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa y Dr. Jaime Pérez Villanueva, por la orientación, paciencia y apoyo brindado durante este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A MIS PADRES:** Victoria Ramírez y Luis Manuel Melgoza, porque inculcaron en mí principios y valores que me han hecho una persona de bien, de principios y han sido un ejemplo a seguir en todos los ámbitos de la vida. Mamá y Papá nunca olvidaré todos los esfuerzos que hicieron para sacarme adelante y a ser de mi la persona que soy, a pesar de las dificultades que pasamos aun así me mostraron el camino del triunfo, muchas gracias por todo.

**A MIS HERMANOS:** Víctor, Antonio, José y Flor: Les agradezco de todo corazón por su apoyo, su confianza y el creer en mí. Por ver la vida de manera diferente, por todo lo que hicieron para apoyarme en este camino.

Al Dr. Juan Francisco Palacios por creer en mí, por su invaluable apoyo en el desarrollo de este proyecto, por su confianza y paciencia, por todos los conocimientos que me transmitió, por sus consejos y por los momentos agradables que nos hizo pasar. Muchas gracias.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<b>Antecedentes</b> .....	7
<b>Cáncer</b> .....	7
<b>Estrés oxidativo</b> .....	7
<b>Antioxidantes</b> .....	8
<b>Los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos</b> .....	8
<b>Cumarinas: su importancia en el desarrollo de nuevos fármacos</b> .....	9
<b>Ácido cinámico y sus derivados</b> .....	9
<b>Híbridos como estrategia para el diseño de fármacos</b> .....	10
<b>Diseño de los híbridos de cumarina y derivados del ácido cinámico</b> .....	11
<b>Planteamiento del problema y objetivos</b> .....	11
<b>Planteamiento del problema</b> .....	11
<b>Objetivo general</b> .....	12
<b>Objetivos específicos</b> .....	12
<b>Metodología</b> .....	12
<b>Síntesis</b> .....	13
<b>Síntesis de 3-acetil cumarina (3-AC)</b> .....	13
<b>Síntesis de cumarinilchalconas (1a-d)</b> .....	13
<b>Síntesis de cumarinilpirazoles (2a-d)</b> .....	14
<b>Evaluación de la actividad antioxidante</b> .....	15
<b>Ensayo DPPH</b> .....	15
<b>Ensayo ABTS</b> .....	15
<b>Evaluación de citotoxicidad</b> .....	16
<b>Ensayo MTT</b> .....	16
<b>Resultados</b> .....	16
<b>Síntesis 3-AC</b> .....	17
<b>Síntesis híbridos</b> .....	17
<b>Elucidación estructural</b> .....	18
<b>Espectroscopia IR</b> .....	18
<b>Espectroscopia RMN</b> .....	19
<b>Evaluación actividad antioxidante</b> .....	20
<b>Evaluación citotoxicidad</b> .....	22
<b>Conclusiones</b> .....	22
<b>Bibliografía</b> .....	23
<b>Anexos</b> .....	25

## 1. Resumen

El cáncer ha cobrado gran importancia en los últimos años como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se trata de una enfermedad multifactorial caracterizada por el crecimiento y diseminación incontrolada de células. Uno de los posibles factores que participan en la aparición de este padecimiento es el estrés oxidante. Numerosos estudios han demostrado que los radicales libres tienen implicación directa en una gran variedad de padecimientos en el hombre, como el cáncer. Por lo anterior, es importante encontrar o desarrollar agentes que sean útiles para contrarrestar los efectos de los radicales libres y es deseable que posean otros efectos farmacológicos relevantes.

En el diseño de fármacos, una de las estrategias para la obtención de nuevos compuestos bioactivos es la generación de compuestos híbridos; estos consisten en la unión de dos núcleos con actividades biológicas por separado y, se espera, que los nuevos compuestos presenten los mismos efectos biológicos o se potencien. A este tipo de sustancias se les denomina “híbridos” o “agentes duales”. En el presente trabajo, se reporta la síntesis y evaluación biológica (citotóxica y antioxidante), de una serie de híbridos de cumarina y ácido cinámico.

La síntesis se realizó mediante la preparación de la 3-acetilcumarina (**3-AC**), a través de la condensación de Knoevenagel. Después, la **3-AC** se hizo reaccionar con distintos aldehídos aromáticos, en presencia de cantidades catalíticas de piperidina y empleando radiación de microondas como fuente de energía. Lo anterior permitió obtener una primera serie de diferentes cumarinilchalconas (**1a-d**), posteriormente, y con la finalidad de explorar la importancia de la región de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en las relaciones estructura-actividad, las cumarinilchalconas se modificaron mediante la introducción de un anillo dihidropirazol, haciendo reaccionar a los híbridos de la serie 1 (**1a-d**) con hidrato de hidracina y medio básico en un reactor de microondas para obtener la segunda serie de híbridos (**2a-d**). Todos los compuestos fueron caracterizados estructuralmente mediante el análisis de sus espectros de IR, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas. También se realizaron las evaluaciones de citotoxicidad sobre cinco líneas celulares con el ensayo de MTT, y de actividad antioxidante mediante los ensayos de decoloración de DPPH y ABTS.

En los resultados de la síntesis, los rendimientos en la formación de los híbridos de la serie 1 fueron bajos (19–65%); mientras que la serie 2 del anillo pirazol, los rendimientos mejoraron bastante (47–90%). No obstante, los tiempos de reacción fueron sensiblemente menores (minutos), que los reportados en la literatura. En lo que respecta a las evaluaciones biológicas, los derivados de la serie 2 fueron las moléculas que presentaron moderada actividad antioxidante, mientras que la serie 1, presentó mejor actividad citotóxica, sobresaliendo el compuesto **1d**, en las cinco líneas celulares, con valores de 7.65 (SW620), 3.72 (HeLa), 23.57 (SKLU-1), 53.65 (MDA MB 231) y 8.64 (K562)  $\mu\text{M}$ .

## 2. Introducción

Los productos naturales han jugado un papel muy importante en el combate de enfermedades y también son la fuente más abundante de moléculas empleadas en la terapéutica actual o en la obtención de núcleos base para la modificación o diseño de nuevas moléculas bioactivas. Con el avance de las nuevas tecnologías para el descubrimiento de fármacos tales como el diseño racional de fármacos, la química combinatoria y el cribado de alto rendimiento; los productos naturales siguen siendo un elemento esencial en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En México y a nivel mundial, cada vez son más recurrentes los casos de cáncer, llegando a ocupar un lugar importante entre los principales casos de muerte en la población, por lo que es importante averiguar las causas de este mal, así como distintos medios para combatirlo.

Uno de los principales factores que hoy en día se reconocen como agente causal en esta enfermedad son los radicales libres (RL). Los RL han tomado un rol muy importante en el campo de la biología por su implicación en distintas enfermedades de tipo crónico-degenerativas. Entre estas enfermedades están, neurodegenerativas, síndrome metabólico, complicaciones de la diabetes, tuberculosis, cáncer, entre otras. Estos padecimientos requieren de un arsenal de medicamentos de distinta clase para su mitigación o tratamiento. El enfoque clásico en el desarrollo de fármacos contra estos padecimientos nos dice que “un compuesto-un blanco”, pero hoy en día resulta poco rentable para enfrentar a estas enfermedades crónico-degenerativas e infecciosas. Para atacar estos males se utilizan varios medicamentos y muchas veces termina siendo perjudicial, ya que el paciente termina por abandonar su medicación, ya sea por el excesivo número de medicamentos a consumir, por la presencia de efectos indeseables propios de los fármacos administrados o por las interacciones que estos compuestos pueden tener.

Por este motivo, la formulación de dos o más sustancias activas en una sola presentación farmacéutica mejora el desempeño de dichos tratamientos. Mejor aún, el diseño de una sola sustancia que pueda contener los grupos farmacóforos de varios compuestos con múltiples efectos biológicos es deseable. A estos compuestos se les denomina “fármacos multifuncionales o fármacos híbridos”.<sup>1,2</sup>

En nuestro esfuerzo por encontrar nuevas moléculas multifuncionales, se propone en este proyecto de servicio social el diseño y la síntesis de compuestos híbridos a partir de una asociación molecular de los núcleos de la cumarina y derivados del ácido cinámico, para formar nuevos compuestos líderes que sea más efectivos que sus precursores como citotóxicos, antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos.

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Cáncer

El término cáncer engloba a más de 100 diferentes tipos de enfermedad que tienen como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales. Por tratarse de un padecimiento crónico-degenerativo, su incidencia y tasa de mortalidad se incrementan con la edad.<sup>1</sup> Se trata de uno de los principales problemas de salud pública y la segunda causa de muerte a nivel mundial.

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte. Se ha reportado que por esta enfermedad fallecen 14 de cada 100 mexicanos, quienes la padecen cuentan con una baja esperanza de vida y la prevalencia de este mal aumenta día con día. Este es un serio problema y un gran desafío para la medicina moderna por su diagnóstico específico, seguido de la efectividad del tratamiento.

En hombres, los principales tipos de cáncer que padecen son en orden descendente; próstata, pulmón, bronquios, colon, recto y vejiga. En mujeres, la más alta prevalencia se encuentra en cánceres de seno, pulmón, bronquios, colon, recto, uterino y tiroideo.<sup>3</sup> En niños, los padecimientos neoplásicos que se presentan con mayor frecuencia son los relacionados con la sangre y con el cerebro.<sup>4</sup>

En general, el cáncer interrumpe las relaciones celulares y provoca la disfunción de los genes vitales. Esta alteración es dañina en el ciclo celular y conduce a una proliferación anormal.<sup>6,7</sup> Los protooncogenes son responsables de la división celular y el crecimiento en condiciones normales, pero se convierten en oncogenes durante la mutación genética, que son los más peligrosos para la existencia celular.<sup>8</sup> Además, la falta de genes supresores de tumores desencadena una división celular no controlada. Normalmente, los genes de reparación se traducen en proteínas o enzimas que tienen propiedades de reparación.<sup>9</sup>

El proceso carcinogénico se desencadena de manera inicial, por una serie de mutaciones en genes que cambian el funcionamiento de la célula. Algunos productos químicos que tienen un importante rol formando dichas mutaciones en los genes y células cancerígenas son los RL. Estos compuestos causan diferentes tipos de cambios químicos en el ADN, por lo que podrían ser mutagénicos y estar involucrados en la etiología del cáncer. Las células cancerosas en particular, en comparación con las células normales, tienen niveles más altos de especies reactivas de oxígeno (EROS) y son más susceptibles a la disfunción mitocondrial debido a su mayor tasa metabólica. Las células cancerosas muestran niveles elevados de estrés oxidativo debido a la activación de oncogenes y la pérdida de supresores de tumores. Las EROS, al alterar las señales de crecimiento y la expresión génica, causan la proliferación continua de células cancerosas, además pueden dañar el ADN al inducir modificaciones de la base, deleciones, roturas de la hebra, reordenamientos cromosómicos además de hiper-e hipo-metilación del ADN.<sup>9</sup>

#### 3.2. Estrés oxidativo

Se define al estrés oxidativo (EO) como la ausencia en el balance entre la ocurrencia o aparición de especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERNS) en los organismos, y la pérdida de la capacidad para contrarrestar su acción mediante los sistemas de protección antioxidante internos. Es decir, el EO se da por una disminución en la capacidad protectora de los sistemas endógenos para luchar contra la oxidación hacia las biomoléculas importantes

como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Los RL en el estrés oxidativo se han confirmado como contribuyentes en la patogénesis de muchos problemas de salud crónica como condiciones neurodegenerativas, enfisema, enfermedades cardiovasculares, cataratas y cáncer.<sup>10</sup>

Los RL representan especies químicas reactivas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo y son capaces de tener una existencia independiente. Algunos ejemplos de estos son el súper oxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) y radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ). Se pueden producir a partir de fuentes endógenas o exógenas, las fuentes endógenas de estas especies incluyen diferentes órganos celulares, como mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico, donde el consumo de oxígeno es alto y las fuentes exógenas pueden venir de malos hábitos de alimentación o estilo de vida.<sup>11</sup>

### 3.3. Antioxidantes

Un antioxidante es una especie química capaz de evitar la oxidación de otras especies químicas, previniendo el daño que los RL pueden causar en otras moléculas.

El cuerpo humano tiene sus propios mecanismos de defensa para contrarrestar los altos niveles de EROS y ERNS. Estos contienen antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (antioxidantes endógenos). Algunos de los enzimáticos son la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Por su parte, los no enzimáticos como el glutatión, vitamina C,  $\beta$ -caroteno y selenio, están presentes en el organismo.<sup>12</sup>

En la actualidad existen una gran variedad de antioxidantes exógenos, pueden ser de origen natural o sintético, que se utilizan en la terapéutica actual como el resveratrol. Aunque estos antioxidantes presentan algunos inconvenientes, los estudios *in vitro* han mostrado que son excelentes inhibidores de los RL. No obstante, su capacidad de atraparlos en células o tejidos es muy baja comparada con las enzimas antioxidantes endógenas.

Estos antioxidantes exógenos de origen natural, como las polihidroxi flavonas, flavononas, flavonoles, isoflavonas, chalconas, entre otros más; pueden ser encontrados en plantas. Por tanto, las características antioxidantes de los materiales derivados de las plantas se pueden atribuir a su contenido de polifenoles. Además de estos, existen antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), galato de propilo y terbutilhidroquinona. A pesar de ser excelentes antioxidantes, se ha demostrado que el BHT y el BHA, conllevan a problemas de salud importantes, como daños en el hígado y carcinogénesis.<sup>13</sup>

### 3.4. Los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos

Por miles de años, la humanidad ha confiado en la naturaleza para cubrir sus necesidades básicas de alimentación y de salud. En particular, las plantas medicinales han representado la base de sus sistemas de salud tradicionales, con registros muy antiguos, en ellos se detalla el uso de distintas especies vegetales para el tratamiento de varias enfermedades. Pero no solo los preparados obtenidos de las plantas resultan útiles en la terapéutica, también los compuestos obtenidos por modificación de los metabolitos aislados de ellas son apreciados, no solo por sus efectos biológicos, sino también porque representan excelentes núcleos base para la obtención de moléculas con mejores perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos.<sup>14</sup>



En el diseño de nuevas moléculas con actividad terapéutica, se presta especial atención al grupo de los compuestos heterocíclicos. La presencia de estos sistemas en una gran variedad de derivados biológicamente activos da cuenta de su importancia. Entre los núcleos más comúnmente observados destacan aquellos que en su estructura poseen uno o dos átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre.<sup>15</sup> Los productos naturales son una fuente de estas estructuras químicas novedosas, a partir de ellos se han obtenido muchas estructuras químicas que se utilizan como moléculas “líderes”. Estas moléculas poseen características estructurales que son difíciles de obtener por síntesis, tales como sistemas de anillos fusionados o centros quirales. De lo anterior, muchas revisiones bibliográficas han dado cuenta y han enfatizado la importancia de los productos naturales en el proceso para el descubrimiento de nuevos fármacos.<sup>16</sup>

### 3.5. Cumarinas: su importancia en el desarrollo de nuevos fármacos

Las cumarinas, también conocidas como 2*H*-1-benzopiran-2-onas (Figura 1), pertenecen a la familia de los fenoles y forman parte de un grupo selecto de moléculas de origen natural que poseen características muy interesantes desde los puntos de vista terapéutico y estructural, que pueden servir de base para el diseño de nuevas moléculas con actividad farmacológica. Representan una familia de compuestos con una gama de actividad biológica muy interesante, dentro de estas destacan los efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, neuroprotectores, antimicrobianos y anticoagulantes.<sup>17</sup>

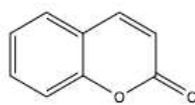


Figura 1. Núcleo 2*H*-1-Benzopiran-2-ona o cumarina.

Esta relevancia biológica inherente de las cumarinas ha atraído la atención de muchos investigadores en la búsqueda de nuevas moléculas activas utilizando el núcleo 2*H*-1-benzopiran-2-ona como molécula líder. Como estas moléculas no se aíslan en cantidades suficientes a partir de fuentes naturales, se ha optado por obtenerlas a través de síntesis química. Entre los métodos de obtención destacan: la condensación de Pechmann, la reacción de Perkin y de Wittin, así como la condensación de Knoevenagel, entre otras, para poder disponer de cantidades suficientes para posteriores modificaciones estructurales.<sup>18</sup>

### 3.6. Ácido cinámico y sus derivados

Por su parte, el ácido cinámico (Figura 2) es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza, es un ácido acrílico sustituido por un grupo fenilo en posición 3. Este ácido y sus derivados polihidroxilados (los ácidos cafeíco, sinápico y ferúlico) se les encuentran en el café, las manzanas, frutas cítricas, los propóleos y el vino, entre otras.

En años recientes, los derivados del ácido *trans*-cinámico han sido de gran interés debido a sus efectos biológicos que incluyen actividades anticancerosa, antioxidante, antimicrobiana y antiparasitaria.<sup>19</sup> Recientemente se demostró que los ácidos cafeíco y ferúlico inhiben a las enzimas 5 y 12-lipooxigenasas, lo cual podría ser de utilidad para tratar el asma bronquial. Por esto mismo se han sintetizado diversos compuestos híbridos que contienen el grupo

farmacofórico cinamoil en su estructura y se ha observado una mejora significativa en su actividad citotóxica, antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante.<sup>20,21</sup>

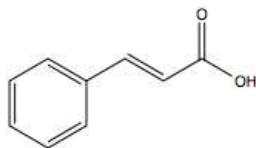


Figura 2. Ácido cinámico.

### 3.7. Híbridos como estrategia para el diseño de fármacos

Dentro de las metodologías para la síntesis rápida de nuevos fármacos y el desarrollo de análogos empleando productos naturales o sintéticos, destaca la preparación de compuestos híbridos. La hibridación molecular es una estrategia de diseño racional de nuevos ligandos o prototipos basados en el reconocimiento de las subunidades farmacofóricas de dos o más compuestos activos de los cuales derivará la nueva molécula, a través de una adecuada unión de esas subunidades.<sup>22</sup>

Desde hace algunos años, esta estrategia de hibridación molecular ha surgido como un enfoque novedoso porque involucra la unión de dos o más farmacóforos en una sola estructura base para desarrollar moléculas híbridas multifuncionales. En otras palabras, es una modificación molecular para obtener compuestos multi-ligandos con ventajas en sus propiedades farmacocinéticas sobre la administración concomitante de las moléculas de donde proceden los farmacóforos. El término “multi-ligando” se aplica para fármacos que reconocen más de un receptor o blanco terapéutico.<sup>23</sup>

Estas nuevas moléculas tienen actividades biológicas múltiples, un perfil selectivo modificado, modos de acción diferentes o duales y/o reducidos efectos secundarios indeseables, todo esto debido a la mezcla de los farmacóforos en una sola estructura. Una vez evaluada, estas moléculas pueden ser optimizadas para mejorar sus perfiles farmacocinéticos y su biodisponibilidad. Empleando esta estrategia, varios grupos de investigación han diseñado y sintetizado una gran variedad de moléculas híbridas.<sup>24</sup> En la naturaleza también existen ejemplos de híbridos exitosos, tal es el caso de la vinblastina, un indol-alcaloide dimérico constituido por la catarantina y la vindolina. Ambos compuestos por si solos presentan un efecto citotóxico débil, una vez juntos en la vinblastina se obtiene un compuesto con una alta actividad citotóxica.<sup>25</sup> La hibridación o acoplamiento de diversas cumarinas con otros núcleos como el resveratrol, chalconas, triazoles, pirazolininas o el ácido  $\alpha$ -lipóico han producido nuevas moléculas con efectos biológicos importantes como vasorelajantes, inhibidores de la MAO-B (monoaminoxidasa B), antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios, entre otras actividades. Por lo tanto, el enfoque de la hibridación molecular juega un papel muy importante en el desarrollo de nuevas moléculas para tratar enfermedades multifactoriales.

### 3.8. Diseño de los híbridos de cumarina y derivados del ácido cinámico

Como ya se mencionó, el núcleo cumarina provee un farmacóforo importante por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, citotóxicas y antiinflamatorias. Por su parte la porción de los derivados de tipo cinamoil proveen propiedades antimicrobianas, antiprotozoarias, antioxidantes y antiinflamatorias. Los compuestos híbridos resultantes podrían poseer mejores efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos y citotóxicos que sus precursores.

De lo anterior, en este trabajo se propuso la síntesis de dos series de compuestos híbridos. En la primera serie (Figura 3) se obtendrán los híbridos de la cumarina con derivados del ácido cinámico, el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado permanecerá inalterado y se observará el efecto de los sustituyentes en el anillo aromático en la actividad biológica a evaluar. Mientras que en la segunda serie (Figura 4) se estudiará el efecto de modificar el carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, con la formación de un pirazol, el cual ha mostrado actividades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas cuando se encuentra presente en algunas moléculas.<sup>26</sup>

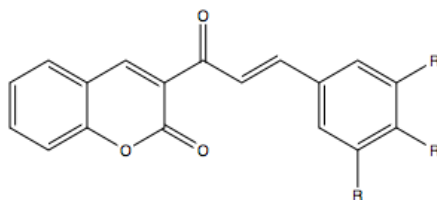


Figura 3. Híbridos de cumarina con derivados del ácido cinámico propuestos, con el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado inalterado.

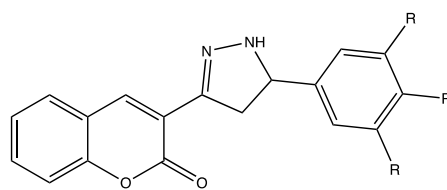


Figura 4. Híbridos de cumarina con derivados del ácido cinámico propuestos, con el carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado sustituido por un pirazol.

## 4. Planteamiento del problema y objetivos

### 4.1. Planteamiento del problema

Considerando la necesidad de contar con agentes terapéuticos eficaces contra enfermedades de importancia en México y en el mundo, es necesario realizar investigación básica que permita obtener moléculas con amplio potencial terapéutico empleando enfoques novedosos como la generación de compuestos híbridos.

## 4.2. Objetivo general

Sintetizar y evaluar el efecto antioxidante y citotóxico de dos series de híbridos de cumarina y derivados del ácido cinámico.

## 4.3. Objetivos específicos

- Sintetizar una primera serie (**1a-d**) de híbridos de cumarina y derivados de ácido cinámico con sustituciones en el anillo aromático del ácido con grupos metoxilo, empleando microondas como fuente de energía.
- Sintetizar una segunda serie de híbridos (**2a-d**) de cumarina y derivados de ácido cinámico con las mismas sustituciones en el anillo aromático, pero introduciendo un anillo dihidropirazol en el sistema del carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, empleando microondas como fuente de energía.
- Caracterizar la estructura de los compuestos obtenidos mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos (resonancia magnética nuclear, espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas).
- Evaluar la citotoxicidad sobre seis líneas celulares, empleando el método de MTT.
- Evaluar el efecto antioxidante en las dos pruebas de decoloración (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) de las dos series de híbridos.

## 5. Metodología

La síntesis y purificación de las dos series de híbridos, así como sus intermediarios, se realizó en el laboratorio de Síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas (N-015) de la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. De igual forma, se realizaron los estudios de citotoxicidad y efecto antioxidante.

### Equipos y reactivos

Para la síntesis de los compuestos se utilizaron materias primas comerciales de la marca Sigma-Aldrich (acetoacetato de etilo, piperidina, hidrato de hidracina, benzaldehído, salicilaldehído, 4-metoxibenzaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído) y disolventes grado analítico de las marcas J.T. Baker (etanol absoluto, acetato de etilo). Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor Monowave 300 de la marca Anton Paar que utiliza microondas como fuente de energía. El monitoreo del avance de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) en placas de sílica gel F<sub>254</sub> de la marca Millipore; para el revelado de las placas se utilizó una lámpara de UV Entela modelo UVGL-25. La purificación de los compuestos se realizó mediante cristalización simple utilizando etanol absoluto. Los puntos de fusión se determinaron con un equipo Melting Point M-565 de la marca Büchi.

Las estructuras de los compuestos se establecieron mediante espectroscopía infrarroja, utilizando un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum RX, en pastilla de KBr y reportando señales en  $\text{cm}^{-1}$ . Además, se usó Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno y carbono (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) utilizando un

equipo de 600 MHz marca Varian, tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Para las pruebas de actividad antioxidante y citotoxicidad se usó un equipo Synergy 2 Lector de microplacas multimodo BioTek (BioTek, Winooski, VT, USA).

## 5.1. Síntesis

### 5.1.1. Síntesis de 3-acetilcumarina (**3-AC**)

La **3-AC**, se sintetizó mediante una reacción de condensación entre 1 equivalente de salicilaldehído y 1.2 equivalentes de acetoacetato de etilo en presencia de piperidina (Figura 5).

En un matraz bola se colocaron 10 mmol de salicilaldehído y 12 mmol de acetoacetato de etilo en presencia de etanol absoluto utilizando 500  $\mu\text{L}$  de piperidina sobre un baño de hielo y en agitación. Al cabo de 20 a 25 minutos, se obtuvo un precipitado de color amarillo, este se filtró y se recristalizó en etanol absoluto; la reacción se monitoreo por cromatografía en capa fina.

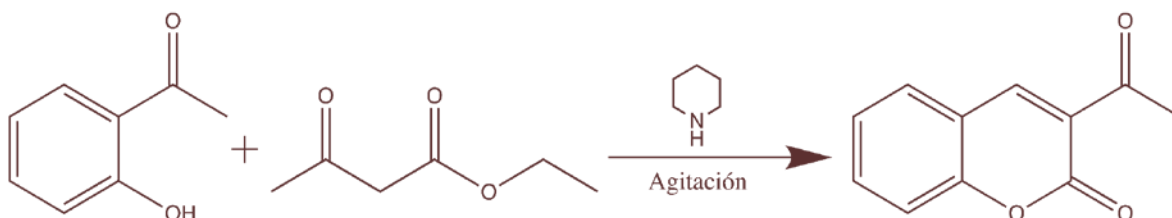


Figura 5. Síntesis de 3-acetilcumarina (**3-AC**).

### 5.1.2. Síntesis de la serie uno (**1a-d**) de los híbridos de cumarina

Las cumarinilchalconas fueron sintetizadas a partir de la condensación entre la **3-AC** y el correspondiente aldehído aromático sustituido (Figura 6).

En un tubo cónico de vidrio de 30 mL para reactor de microondas provisto con una barra magnética, se pusieron a reaccionar 1 mmol de **3-AC** con 1.2 mmoles del respectivo aldehído aromático sustituido, en presencia de piperidina y 5 mL de etanol como disolvente. Las reacciones se realizaron en tres ciclos de 5 minutos cada uno a 100 °C de temperatura y una velocidad de agitación de 600 rpm. Enseguida, se enfriaron a temperatura ambiente y se dejaron reposar en baño de hielo hasta que se obtuvieron precipitados. Estos se filtraron y se recristalizaron con etanol absoluto.

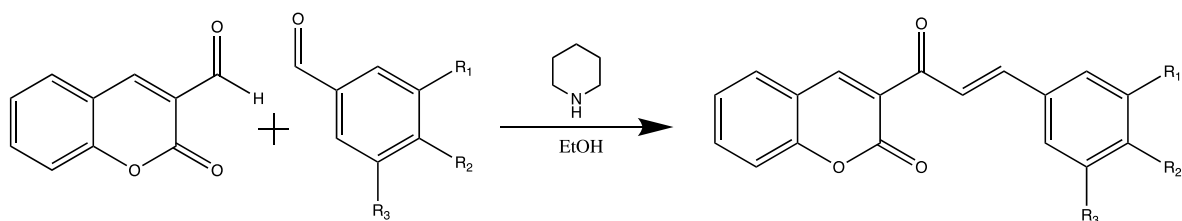


Figura 6. Síntesis de la serie 1 (**1a-d**) de cumarinilchalconas.

Tabla 1. Grupos sustituyentes de cumarinilchalconas

<b>1a</b>	R <sub>1</sub> : H; R <sub>2</sub> : H; R <sub>3</sub> : H.
<b>1b</b>	R <sub>1</sub> : H; R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> : H.
<b>1c</b>	R <sub>1</sub> : OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> : H.
<b>1d</b>	R <sub>1</sub> : OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> : OCH <sub>3</sub> .

### 5.1.3. Síntesis de la serie dos de híbridos (**2a-d**)

Los compuestos de la serie dos fueron el resultado de la introducción de un anillo dihidropirazol, aprovechando la reactividad del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado de las cumarinilchalconas de la serie uno (Figura 7). La reacción se realizó en un reactor Monowave 300 de Anton Paar, en tubos cónicos de 30 mL provistos con una barra magnética. Se pusieron a reaccionar 1 mmol del híbrido correspondiente con 1.2 mmoles del hidrato de hidracina en presencia de 5 mL de etanol como disolvente. Se usaron tres ciclos para el caso de **2a**, **c** y **d**. En el caso de **2b**, fueron solo 2 ciclos. Para **a**, **c** y **d**, el primer ciclo fue de 15 minutos con una temperatura máxima de 160 °C a 400 rpm; posteriormente siguieron 2 ciclos de cinco minutos cada uno con una temperatura máxima de 120 °C con la misma agitación. Por su parte el híbrido **2b** solo necesitó dos ciclos, el primero de 15 minutos con una temperatura máxima de 160 °C a 400 rpm, el segundo de 5 minutos con una temperatura máxima de 120 °C y la misma velocidad de agitación. Una vez terminada la síntesis, los tubos de reacción se dejaron reposar hasta obtener un precipitado, el cual se filtró y recrystalizó en etanol absoluto hasta su purificación.

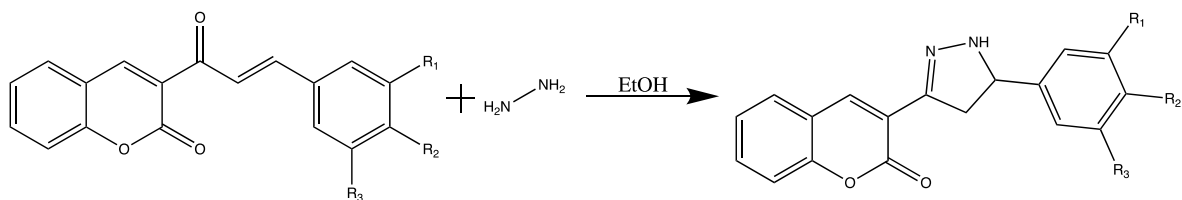


Figura 7. Síntesis de cumarinildihidropirazoles.

Tabla 2. Grupos sustituyentes de cumarinildihidropirazoles

<b>2a</b>	R <sub>1</sub> : H, R <sub>2</sub> : H, R <sub>3</sub> : H.
<b>2b</b>	R <sub>1</sub> : H, R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> : H.
<b>2c</b>	R <sub>1</sub> : OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> : H.
<b>2d</b>	R <sub>1</sub> : OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> : OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> : OCH <sub>3</sub> .

## 5.2. Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por los métodos de decoloración de los radicales DPPH• y ABTS•. Ambas son pruebas espectrofotométricas basadas en la pérdida de color que ambos radicales tienen, una vez neutralizados se pierde esta coloración y se cuantifica en un espectrofotómetro.

### 5.2.1. Ensayo de decoloración de radical DPPH

El ensayo de decoloración del radical DPPH se realizó de acuerdo al método de Chanda<sup>27</sup> con algunas modificaciones. Se utilizaron 100 µL de los híbridos de ambas series a diferentes concentraciones (1.95–500 µg/mL) con 100 µL de una solución metanólica de DPPH (0.208 mM) en una placa de 96 pozos. Esta mezcla se dejó reposar durante 20 min en la oscuridad y se leyó en un lector ELISA a una longitud de onda de 517 nm.<sup>15</sup> Se utilizó como control positivo al butilhidroxitolueno (BHT). Para ello, se realizó una curva de calibración (1.95–500 µg/mL).

### 5.2.2. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS

La preparación del catión radical se lleva a cabo 16 horas previas al ensayo mezclando cantidades iguales de dos soluciones, una de ABTS 7 mM y otra de persulfato de potasio a 2.45 mM manteniéndolo en la oscuridad.<sup>13</sup> A esta solución se le llamó, solución Stock. El día del ensayo, la solución de Stock se ajusta a una absorbancia de 0.8, esta solución se le denomina, solución de trabajo.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µL de los híbridos de prueba a diferentes concentraciones (1.95–500 µg/mL) y 150 µL de la solución de trabajo del radical ABTS<sup>+</sup> en cada pocillo, dejando reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La placa se leyó en un lector ELISA a una longitud de onda de 734 nm.<sup>15</sup> Como control positivo se utilizó BHT, por lo que se realizó una curva de calibración (1.95–500 µg/mL).

Para ambas determinaciones, se calculó el porcentaje de atrapamiento de radicales con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ atrapamiento} = \frac{Ac - Ap}{Ac} * 100$$

Ac es la absorbancia del control negativo y Ap es la absorbancia del problema.

### 5.3. Evaluación de la citotoxicidad sobre líneas celulares de cáncer

#### 5.3.1. Ensayo MTT

La citotoxicidad se evaluó en seis líneas celulares de cáncer: SW620 (colon), HeLa (cervicouterino), SKLU-1 (pulmón), PC-3 (próstata), MDAMB231 (seno) y K562 (leucemia), con una modificación del ensayo de MTT. Brevemente, cada una de las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $6 \times 10^3$  células/pozo que contienen 20 mg/mL de fitohemaglutinina y las células de cada línea a  $7 \times 10^3$  células/pocillo conteniendo 200  $\mu$ L del medio correspondiente. Después de 24 h, las células se trataron con diferentes concentraciones de los híbridos o el vehículo, que se agregaron a cada pocillo en un volumen de 50  $\mu$ L, para dar un volumen total de 250  $\mu$ L con la concentración final indicada. La viabilidad celular se determinó 48 h más tarde, momento en el que se eliminó el medio y se agregaron 20  $\mu$ L de MTT a una concentración de 2.5 mg/mL (Sigma, St Louis, MO, USA) en PBS pH 7.2. Después de 2 h, se añadieron 0.2 mL de DMSO a cada pocillo, seguido de agitación suave. La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas multimodal (BioTek, Winooski, VT, USA). La cantidad de formazán detectada es proporcional al número de células vivas, y la inhibición del crecimiento celular se determinó mediante la fórmula:

$$\text{Inhibición del crecimiento celular \%} = \frac{(1 - \text{Abs de células tratadas})}{\text{Abs de células no tratadas}} * (100)$$

Los datos presentados son el resultado de tres experimentos independientes con seis repeticiones cada uno. Los valores de concentración inhibitoria para el 50% del crecimiento celular ( $CI_{50}$ ) se determinaron a partir de curvas de inhibición de concentración / viabilidad utilizando una regresión no lineal con el paquete de software OriginPRO 7.0, (OriginLab, Northampton, MA, EE. UU.).

## 6. Resultados y discusión

Los compuestos sintetizados se obtuvieron en cantidad suficiente para la determinación de sus puntos de fusión y su caracterización por métodos espectroscópicos de IR, RMN y Espectrometría de masas, así como su posterior evaluación biológica en ensayos *in vitro*. En la Tabla 3 y Tabla 4 se muestran los puntos de fusión obtenidos, así como sus rendimientos particular y global.



## 6.1 Síntesis

### 6.1.1 Síntesis de la 3-acetilcumarina (**3-AC**)

La materia prima de partida para la síntesis de los híbridos es la **3-AC**. Finalizada la reacción, se obtuvo un sólido amarillo, el cual se filtró y se recristalizó con etanol. El producto final fueron cristales amarillos opacos, la reacción tuvo un rendimiento del 90% y el producto presentó un punto de fusión de 125° C. Acorde con lo reportado en la literatura.<sup>29</sup>

### 6.1.2 Síntesis de los híbridos **1a-d**

En la síntesis de los híbridos de tipo cumarinilchalcona, los rendimientos fueron bajos. Esto se debió a que hubo la necesidad de realizar varias recristalizaciones hasta obtener al producto puro. No obstante que los cuatro híbridos (**1a-d**) se sintetizaron mediante la misma metodología (asistida por MO), se obtuvieron resultados distintos. El híbrido **1b**, presentó el mejor rendimiento después de la cristalización (Tabla 3); por su parte, el híbrido **1a** se obtuvo en cantidades moderadas (42.2%), esto porque requirió varias recristalizaciones para obtener un producto de buena calidad. El compuesto **1c**, presentó mayores problemas; requirió de la disminución de la cantidad de piperidina para promover la formación del compuesto, el rendimiento fue moderado. En general, los rendimientos fueron de moderados a malos, pero se obtuvieron en cantidad suficiente para caracterizarlas y realizar las evaluaciones previstas.

**Tabla 3. Resultados obtenidos de la síntesis de las cumarinilchalconas**

COMPUESTO (Clave)	CONDICIONES (Temperatura, tiempo)	ASPECTO Y COLOR	P.F. (°C)	RENDIMIENTO (%)
<b>1a</b>	120°C, 4 min	Cristales Naranjas	166.9	42.2
<b>1b</b>	120°C, 8 min	Cristales Amarillos	165	64.6
<b>1c</b>	120°C, 10 min	Cristales Amarillos	156	19.5
<b>1d</b>	140°C, 10 min	Cristales Amarillos	167.5	40.3

Una vez obtenidos los híbridos de la primera serie, además de las evaluaciones biológicas y su caracterización por espectroscopia y espectrometría, estos se utilizaron como materia prima para la obtención de la segunda serie donde se modificó el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado agregando hidrato de hidracina y formar un heterociclo dihidropirazol, de acuerdo a la Figura 4. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos de la formación del anillo pirazol en la cumarinilchalcona

COMPUESTO (Clave)	CONDICIONES (Temperatura, tiempo)	ASPECTO Y COLOR	P.F. (° C)	RENDIMIENTO (%)
<b>2a</b>	140°C, 25 min	Cristales Amarillo	126	90
<b>2b</b>	140°C, 25 min	Cristales Amarillo	101	47
<b>2c</b>	140°C, 20 min	Cristales Amarillo	183	72
<b>2d</b>	140°C, 25 min	Cristales Amarillo	142	69

## 6.2. Elucidación estructural

Los compuestos fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas de IR, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y Espectrometría de masas. Para el análisis de los espectros de RMN se utilizó el software *MestReNova V.6.0.2 2009 Mestrelab Research S.L.*

### 6.2.1. Espectroscopia IR

Las señales obtenidas en los espectros de infrarrojo son muy parecidas entre las dos series. Destaca que para la serie 1 se observa la presencia de dos grupos carbonilo ( $\alpha$ -pirona de la cumarina y el carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado), mientras que en la serie 2 desaparece la segunda señal del grupo carbonilo y se aprecian los grupos amino. Para la serie 1, el grupo carbonilo del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado muestra señales de 1580 a 1610  $\text{cm}^{-1}$ , el carbonilo en el anillo del núcleo cumarina muestra señales de 1716 a 1727  $\text{cm}^{-1}$ , el estiramiento de los C-H en el anillo aromático va de 3414 a 3448  $\text{cm}^{-1}$ , el estiramiento de los C-H de los alquenos va de 2935 a 3034  $\text{cm}^{-1}$  y finalmente la señal del doble enlace se aprecia de 1634 a 1656  $\text{cm}^{-1}$ . En la Tabla 5 se resumen las señales más importantes observadas para la **3-AC** y la serie 1.

Tabla 5. Señales representativas de los espectros IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de la **3-AC** y las cumarinilchalconas de la serie 1.

	<b>3-AC</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>1c</b>	<b>1d</b>
<b>C=O</b>	1706	1610	1606	1604	1580
<b>C=O Ar</b>	1634	1726	1719	1716	1727
<b>C-H Ar</b>		3422	3448	3414	3431
<b>C-H Alqueno</b>		3022	3034	2935	2946
<b>C=C</b>		1655	1634	1654	1656
<b>C-O</b>	1297 1259				

En el caso de los productos de la serie 2, donde se generó un dihidropirazol aprovechando la reactividad del grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, las señales observadas en sus espectros de IR son muy parecidas a las de la serie 1 (Tabla 6). Destaca la desaparición de la señal del carbonilo del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado y la detección de la señal N-H en el intervalo de 3288 a 3341  $\text{cm}^{-1}$ ; se conserva el grupo carbonilo del núcleo cumarina (1716 a 1733  $\text{cm}^{-1}$ ), el estiramiento de C-H en el sistema aromático en 3030 y hasta 3448  $\text{cm}^{-1}$ , los dobles enlaces dentro de los anillos dieron señales de 1591 a 1608  $\text{cm}^{-1}$  formando película de KBr para todos los híbridos.

Tabla 6. Señales representativas de los espectros IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de los dihidropirazoles de la serie 2

	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>2d</b>
<b>N-H</b>	3341	3314	3322	3288
<b>C=O</b>	1716	1733	1726	1731
<b>C-H Ar</b>	3030	3448	3340	3443
<b>C=C Ar</b>	1604	1608	1607	1591

### 6.2.2. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas

Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y de espectrometría de masas fueron analizados y asignados a cada compuesto. A continuación, se presenta los datos obtenidos de este proceso. Los espectros están en los anexos a este escrito.

3-Acetilcumarina (**3-AC**).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.51 (s, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.35 (m, 2H), 2.73 (s, 3H).

3-Cinamoil-2H-cromen-2-ona (**1a**).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.59 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.42 (m 3H), 7.36 (ddd, 1H). EM (m/z) 277.

3-(3-(4-Metoxifenil)acriloil)-2H-cromen-2-ona (**1b**).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.57 (s, 1H), 7.88 – 7.78 (m, 2H), 7.65 (dd, J = 17.8, 8.1 Hz, 4H), 7.40 – 7.32 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186.26, 161.93, 159.35, 155.13, 147.83, 145.07, 134.08, 130.80, 129.95, 127.54, 125.46, 124.91, 121.56, 118.57, 116.64, 114.36, 55.41. EM (m/z) 307.

3-(3-(3,4-Dimetoxifenil)acriloil)-2H-cromen-2-ona (**1c**).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (s, 1H), 7.93 – 7.85 (m, 2H), 7.73 (dd, J = 14.2, 7.5 Hz, 2H), 7.47 – 7.40 (m, 2H), 7.33 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.00 (d, J = 9.7 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186.21, 159.41, 155.11, 151.68, 149.14, 147.84, 145.32, 134.10, 129.96, 127.79, 125.44, 124.94, 124.01, 121.74, 118.56, 116.64, 110.94, 110.11, 55.98, 55.91. EM (m/z) 337.

3-(3-(3,4,5-Trimetoxifenil)acriloil)-2*H*-2-ona (**1d**). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.58 (s, 1H), 7.81 (q, J = 15.6 Hz, 2H), 7.69 – 7.63 (m, 2H), 7.41 – 7.33 (m, 2H), 6.89 (s, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.89 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 186.26, 159.41, 155.16, 153.36, 148.05, 145.17, 140.61, 134.24, 130.26, 130.02, 125.28, 125.01, 123.15, 118.52, 116.68, 105.97, 61.00, 56.16. EM (m/z) 267.

3-(5-Fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il)-2*H*-cromen-2-ona (**2a**). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.75 (d, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.66 (dd, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.57 (td 3H), 7.50 (ddt, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (qd, 1H), 4.37 (dtd, 1H), 2.86 (m, 2H), 2.75 (dd, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.32, 153.76, 151.06, 135.96, 131.14, 130.82, 130.8, 128.76, 128.41, 127.09, 123.61, 123.22, 120.03, 116.77, 57.49, 40.11. EM (m/z) 291.1128.

3-[5-(4-Metoxifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il]-2*H*-cromen-2-ona (**2b**). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.65 (d, 2H), 7.75 (d, 1H), 7.66 (dd, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.01 (m, 2H), 4.37 (dtd, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.86-2.85 (dd, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.32, 161.17, 153.76, 150.82, 135.96, 130.8, 128.76, 127.09, 124.69, 124.1, 123.61, 120.03, 116.77, 118.63, 57.49, 55.32, 40.22. EM (m/z) 321.1228.

3-[5-(3,4-Dimetoxifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il]-2*H*-cromen-2-ona (**2c**). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.49 (d, 2H), 7.75 (d, 1H), 7.66 (dd, 2H), 7.57 (td, 2H), 7.48 (dd, 1H), 7.08 (d, 1H), 4.37 (d, 6H), 3.85 (d, 1H), 2.89-2.78 (dd, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.32, 153.76, 151.45, 150.62, 147.52, 136.96, 130.8, 128.76, 127.09, 125.64, 123.61, 120.03, 113.08, 116.77, 110.65, 106.98, 57.49, 55.9, 40.16. EM (m/z) 351.1337.

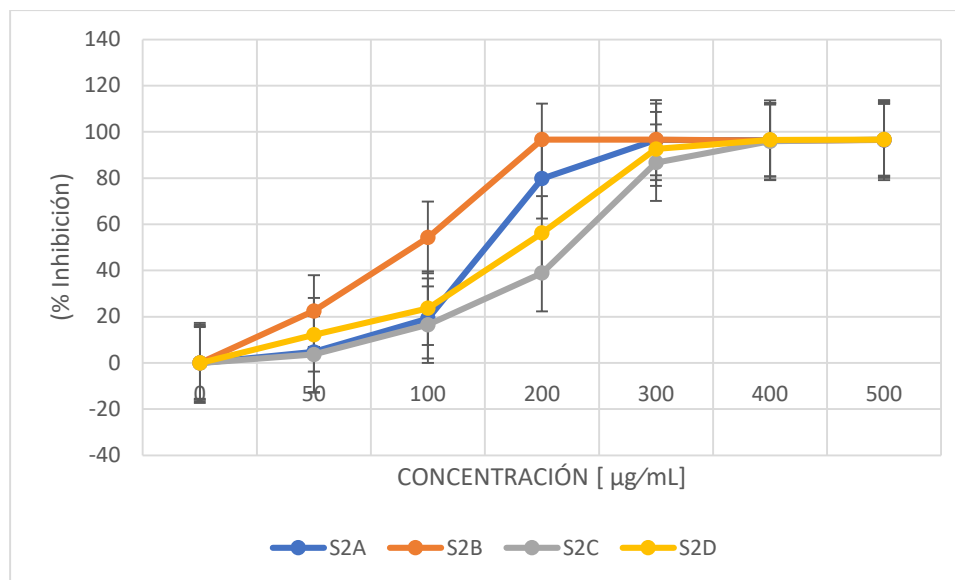
3-[5-(3,4,5-Trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il]-2*H*-cromen-2-ona (**2d**). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d, 1H), 7.66 (dd, 1H), 7.57 (td, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.01 (s, 2H), 4.37 (dtd, 1H), 3.9 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 2.92-2.81 (dd, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.32, 153.76, 150.32, 141.18, 135.96, 130.8, 127.09, 123.61, 120.03, 116.77, 100.57, 60.79, 57.49, 56.25, 40.11. EM (m/z) 381.1446.

### 6.3. Evaluación de la actividad antioxidante

Los resultados de los ensayos para la actividad antioxidante *in vitro* por la decoloración de los radicales ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>•</sup> no presentaron buenos resultados. Solo en la segunda serie, donde los compuestos tienen el anillo dihidropirazol, se observó efecto antioxidante, aunque pobre (Tabla 7). Estos resultados nos permiten proponer que la actividad antioxidante de esta serie de compuestos puede deberse a la presencia del anillo dihidropirazol, ya que es la única diferencia estructural que se puede apreciar con respecto a la serie 1, los cuales fueron inactivos.

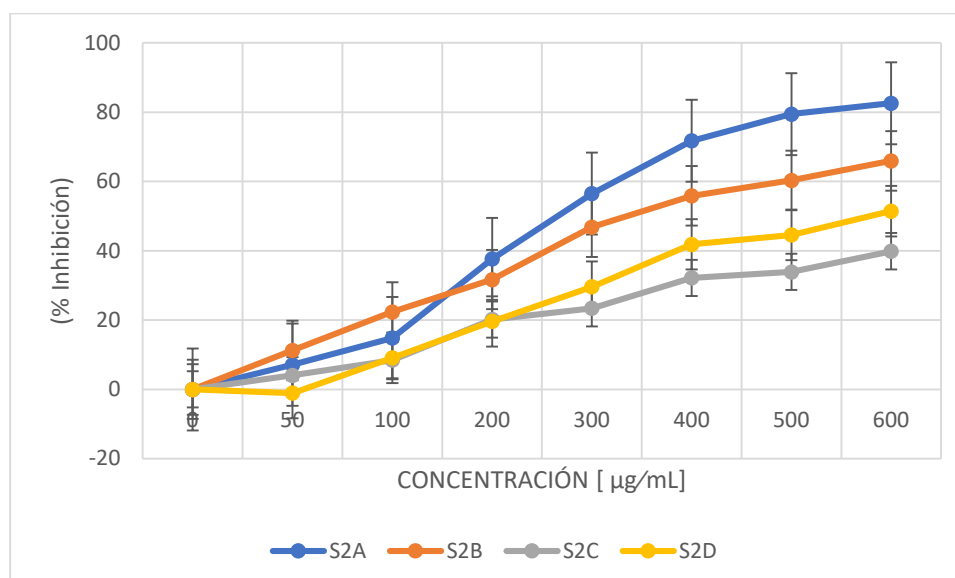
Tabla 7. Resultados  $CI_{50}$  para la serie 2

	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>2d</b>	BHT
<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu M</math>) DPPH</b>	949.226	776	2043.7	1428.34	1324.93
<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu M</math>) ABTS</b>	542.656	315.63	414.76	452.3	1240



Gráfica 1. Actividad antioxidante de los híbridos de la serie 2 y el compuesto de referencia BHT por el método de decoloración de ABTS.

En el ensayo de ABTS, todos los híbridos de la serie 2 mostraron mejor inhibición que el compuesto de referencia. El compuesto **2b**, que tiene un metoxilo en la posición 4 del anillo cinamoilo, muestra una  $CI_{50}$  de 315.63  $\mu M$ , enseguida el **2c**, **2a** y finalmente, **2d**, en un intervalo de  $CI_{50}$  de entre 414.76 y 452.3  $\mu M$ .



Gráfica 2. Actividad antioxidante de los híbridos de la serie 2 y el compuesto de referencia BHT por el método de decoloración del DPPH.

En el caso de la prueba de decoloración del DPPH, podemos observar para la serie 2, una pobre actividad comparándolos con la referencia, el BHT. Tal vez se puede destacar la actividad del compuesto **2**, teniendo muy buena actividad antioxidante incluso mejor que la referencia.

#### 6.4. Evaluación de la citotoxicidad

Para determinar el potencial citotóxico, se emplearon las líneas celulares SW620 (cáncer de colon), SKLU-1 (pulmón), PC-3 (próstata), MDAMB231 (Seno), K562 (leucemia) y HeLa (cáncer cervicouterino). Los resultados obtenidos mostraron que solo la primera serie de los híbridos a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  provocaron una disminución notable de la viabilidad celular en las dos líneas celulares, por lo que se decidió determinar su concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ). De los productos evaluados, el compuesto **1d** fue el más activo sobre varias de las líneas celulares empleadas, este compuesto contiene en su estructura tres grupos metoxilo como sustituyentes. Los demás presentaron buena actividad citotóxica, sin embargo, fueron ligeramente menores. La serie 2 resultó inactiva ( $>120 \mu\text{M}$ ).

Tabla 8.  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los híbridos sobre las líneas celulares a 48 h de exposición.

	SW620 (colon)	HeLa (cervicouterino)	SKLU-1 (pulmón)	PC-3 (próstata)	MDAMB23 1 (seno)	K562 (leucemia)
<b>Serie 1</b>						
<b>1a</b>	28.46 $\pm$ 5.75	33.11 $\pm$ 8.98	43.43 $\pm$ 9.71	32.46 $\pm$ 21.5	95.95 $\pm$ 28.43	17.72 $\pm$ 10.8
<b>1b</b>	32.68 $\pm$ 12.87	16.16 $\pm$ 5.92	36.81 $\pm$ 15.43	>120	65.27 $\pm$ 10.52	>120
<b>1c</b>	49.53 $\pm$ 7.93	32.22 $\pm$ 14.19	36.66 $\pm$ 19.21	>120	74.62 $\pm$ 10.78	>120
<b>1d</b>	7.65 $\pm$ 2.21	3.72 $\pm$ 2.35	23.57 $\pm$ 4.96	>120	53.65 $\pm$ 10.68	8.64 $\pm$ 3.12
<b>Serie 2</b>						
<b>2a</b>	>120	>120	>120	>120	>120	>120
<b>2b</b>	>120	>120	>120	>120	>120	>120
<b>2c</b>	>120	>120	>120	>120	>120	>120
<b>2d</b>	>120	>120	>120	>120	>120	>120

#### 7. Conclusiones

En esta investigación se logró la síntesis de los ocho híbridos propuestos, en cantidades suficientes para su caracterización, así como para las pruebas biológicas a las que se les sometió.

Según lo reportado en la bibliografía, los núcleos empleados para sintetizar los híbridos presentan gran cantidad de actividades biológicas, por este motivo la decisión de utilizarlos esperando encontrar actividad dual o potenciar alguna de las que cada uno ofrece por separado. En esta ocasión solo se revisó la actividad citotóxica y antioxidante. En el caso de la actividad antioxidante, la primera serie fue inactiva, mientras que la serie 2, una vez formado el anillo dihidropirazol en el sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, mostró una actividad antioxidante modesta. Por su parte, el análisis de citotoxicidad, contrario a la actividad antioxidante, la segunda serie fue inactiva, solo la primera fue activa por lo que se concluye

que esta actividad está relacionada con el sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado y el patrón de sustitución trimetoxilado del híbrido más activo. De lo anterior, se tiene registrado en la literatura que los compuestos trimetoxilados presentan buena actividad citotóxica.

## 8. Bibliografía

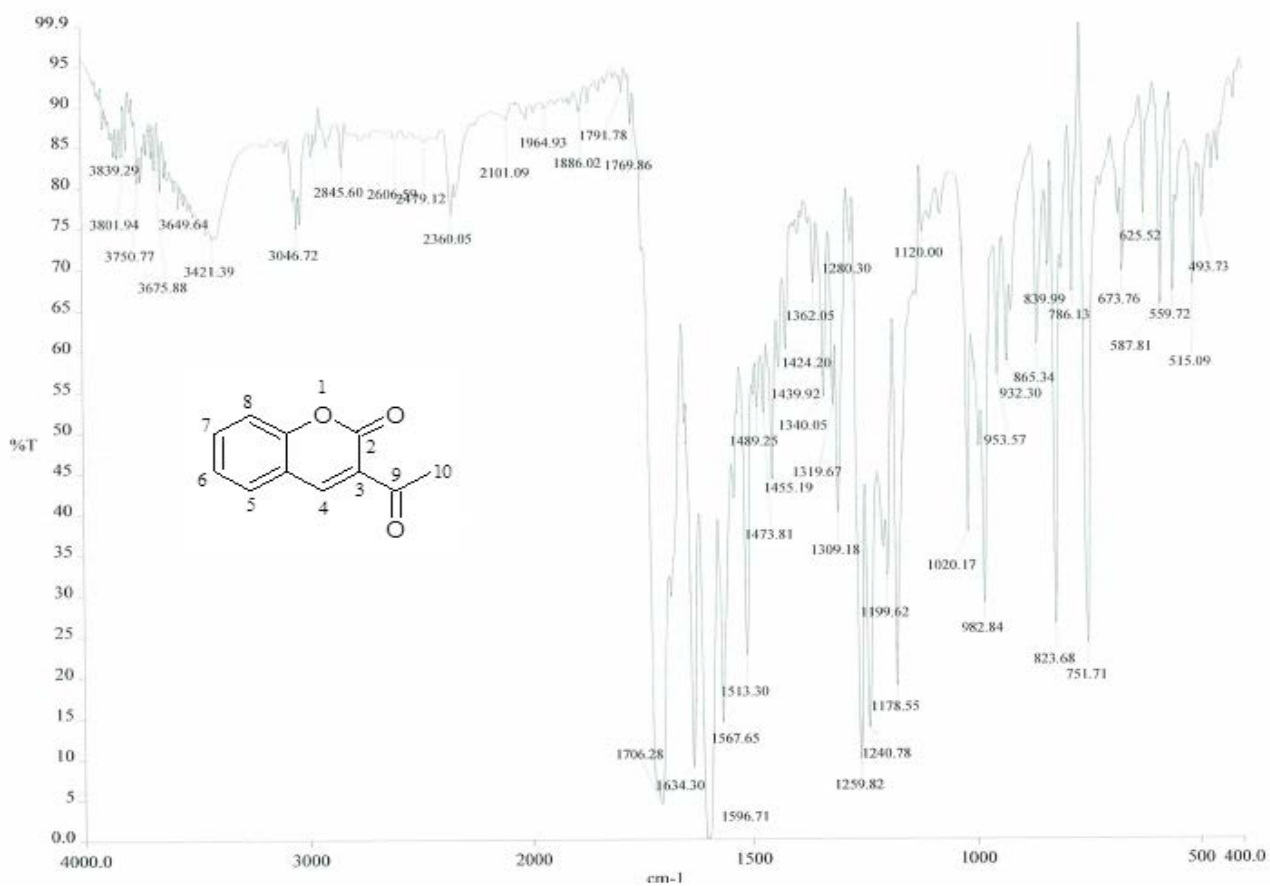
1. INEGI. (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Comunicado de prensa núm. 61/18, 2 de febrero de 2018. [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf)
2. Lazar, C., Kluczyk, A., Kiyota, T. y Konishi, Y. (2004). Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method. *Journal of Medicinal Chemistry*. **47**, 6973-6982.
3. Bansal, Y. y Silakari, O. (2014). Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **76**, 31-42.3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, 2016, *CA Cancer J Clin*. 2016; **66**: 7-30.
4. Schottenfeld D. Fraumeni Jr JF. Cancer Epidemiology and prevention. *Oxford University Press*; 2006.
5. Poon SL, McPherson JR, Tan P, The BT, Rozen SG. Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. *Genome Med*. 2014; **6**: 24
6. Seto M. Honma K, Nakagawa M. Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Sci*. 2010; **101**: 573-578.
7. Cigudosa JC, Parsa NZ, Louie DC, et al. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes, Chromosomes Cancer*. 1999; **25**: 123-133.
8. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Cannani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985; **315**: 550-554.
9. Wei Q, Li L, Chen D. DNA Repair. Genetic Instability, and cancer: World Scientific. 2007.10. Valko M., Izakovic M., Mazur M., et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004; **266**: 37-56
10. Pisoschi Aurelia, Pop Aneta. The Role of Antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; **97**: 55-74.
11. Dreher D., Junod A.F. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. *European Journal of Cancer*. 1996; **1**: 30-38.
12. Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., et al. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2002; **127**: 183-198.
13. Shahidi F., Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015; **18**: 757-781.
14. Cragg, G. M. y Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drugs leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1830**, 3670-3695.
15. Kumar, K. A., Renuka, N., Pavithra, G. y Kumar, V. (2015). Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *Journal of Chemical and Pharmacological Research*. **7**, 67-81.
16. Xiao, Z., Morris-Natschke, S. L. y Lee, K-H. (2016). Strategies for the optimization of natural leads to anticancer drugs or drug candidates. *Medicinal Chemistry Reviews*. **36**, 32-91.
17. Jameel, E., Umar, T., Kumar, J. y Hoda, N. (2016). *Chemical Biology & Drug Design*. **87**, 21-38.

18. Kumar, K. A., Renuka, N., Pavithra, G. y Kumar, V. (2015). Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *Journal of Chemical and Pharmacological Research*. **7**, 67-81.
19. Aquino Carvalho, S., Kaiser, M., Brun, R., Ferreira da Silva, E. y Fraga, C. A. M. (2014). Antiprotozoal activity of (E)-cinnamic N-acylhydrazone derivatives. *Molecules*, **19**, 20374-20381.
20. Guzman, J. D. (2014). Natural cinnamic acids, synthetic derivates and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules*, **19**, 19292-19349.
21. Peperidou, A., Kapoukranidou, D., Kontogiorgis, C. y Hadjipavlou-Litina, D. (2014). Multitarget molecular hybrids of cinnamic acids. *Molecules*, **19**, 20197-20266.
22. Viegas-Junior, C., Danuello, A., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E. J. y Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hibridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*. **14**, 1829-1852.
23. Bosquesi, P. L., Ferreira Melo, T. R., Oliveira Vizioli, E., dos Santos, J. L. y Chung, M. C. (2011). Anti-inflammatory drug design using a molecular hibridization approach. *Pharmaceuticals*. **4**, 1450-1474.
24. Sandhu, S., Bansal, Y., Silaraki, O. y Bansal, G. (2014). Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **22**, 3806-3814.
25. Palanichamy, K. y Kaliappan, K. (2013). A hybrid approach to new molecular scaffolds. *Pure and Applied Chemistry*. **85**, 1185-1202.
26. Güniz, S. y Senkardes, S., Recent advances in bioactives pyrazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **97**, 786-815.
27. Palacios-Espinosa J. F., Arroyo-García O., García-Valencia G., et al. Evidence of the anti-Helicobacter pylori, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea Aequipetala* infusion. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; **151**: 990-998.
28. González-Sánchez I., Solano J., Loza-Mejía M., et al. Antineoplastic activity of thiazolo[5,4-b]quinolone derivate D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; **46**: 2102-2108.
29. Khoobi, M., Emami, S., Dehghan, G., Foroumadi, A., Ramazani, A., y Shafiee, A. (2011). Síntesis y actividad de captación de radicales libres de derivados cumarínicos que contienen un motivo de 2-metilbenzotiazolina. *Archiv der Pharmazie*, 344 (9), 588-594.



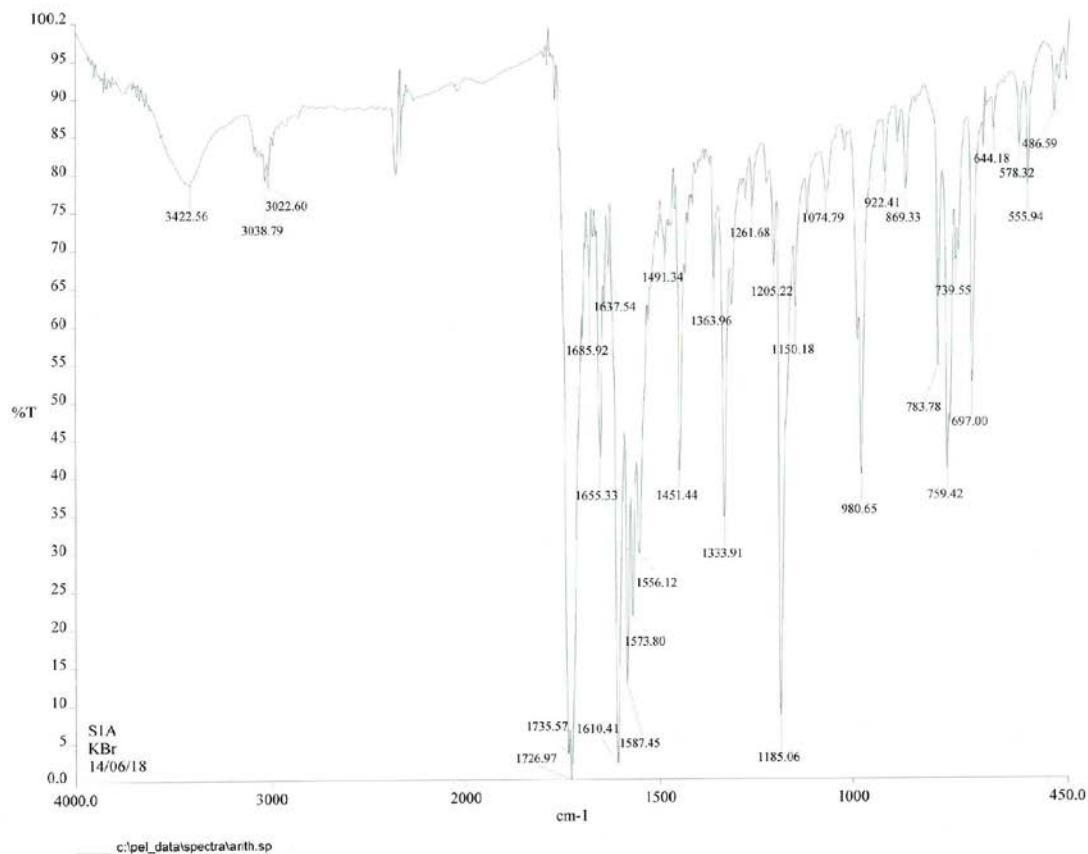
## 8. Anexos

### Anexo 1. Espectro IR 3-AC



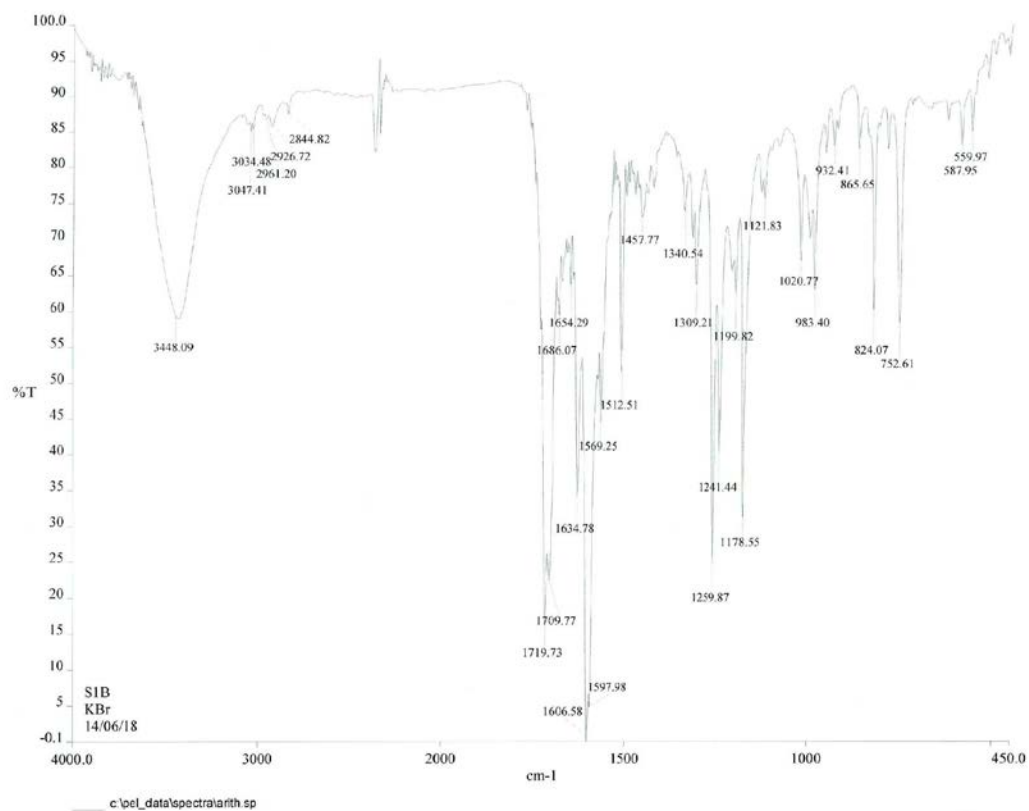
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
<b>1706</b>	Estiramiento aromático C=O
<b>1634</b>	Estiramiento C=O
<b>3421</b>	Estiramiento aromático C-H
<b>3045</b>	Estiramiento C-H
<b>1178</b>	Estiramiento C=C

## Anexo 2. Espectro IR híbrido **1a**



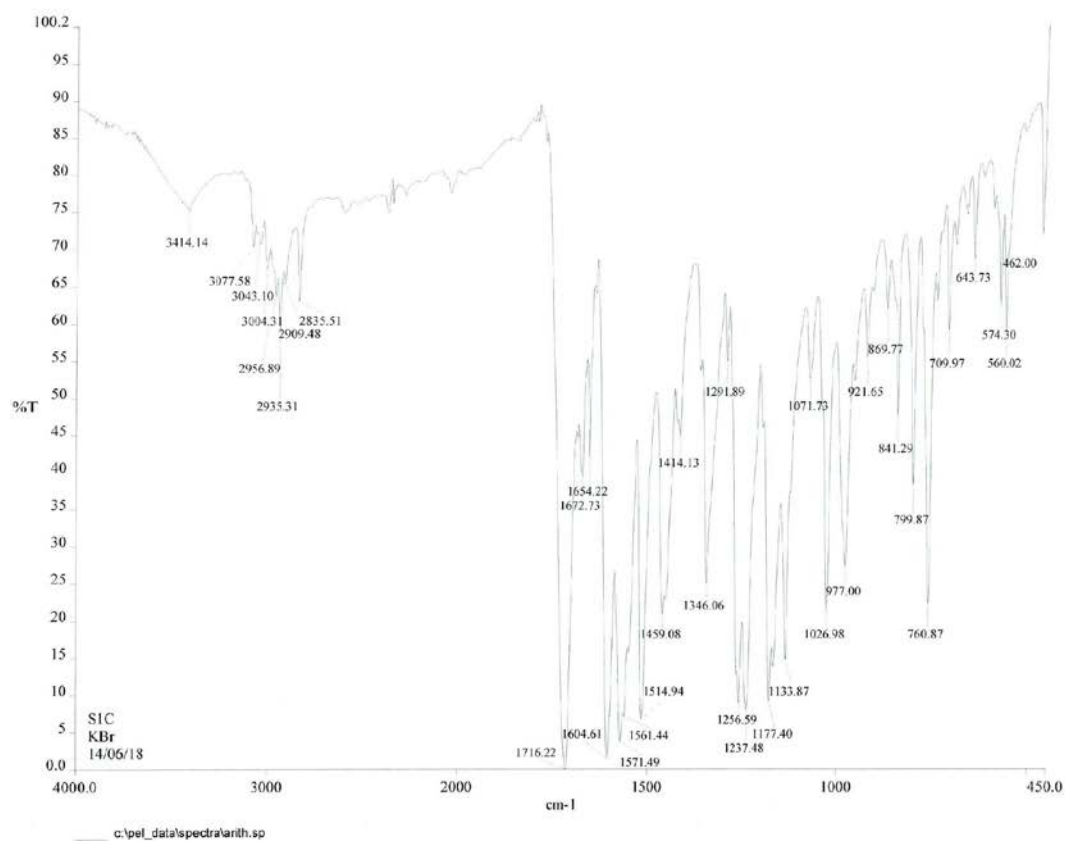
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1726	Estiramiento aromático C=O
1610	Estiramiento C=O
3422	Estiramiento aromático C-H
3038-3022	Estiramiento alifático C-H
1185	Estiramiento C=C

### Anexo 3. Espectro IR híbrido **1b**



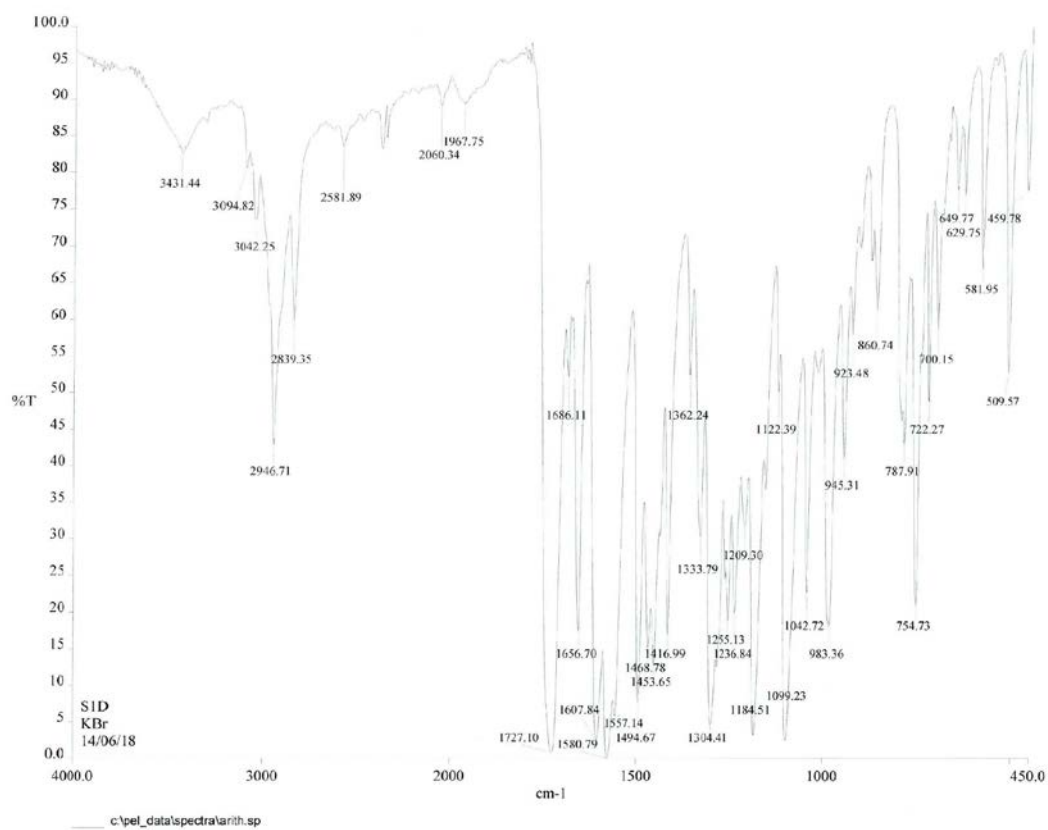
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1719	Estiramiento aromático C=O
1606	Estiramiento C=O
3448	Estiramiento aromático C-H
3047-2926	Estiramiento alifático C-H
1259	Estiramiento C=C

#### Anexo 4. Espectro IR híbrido **1c**



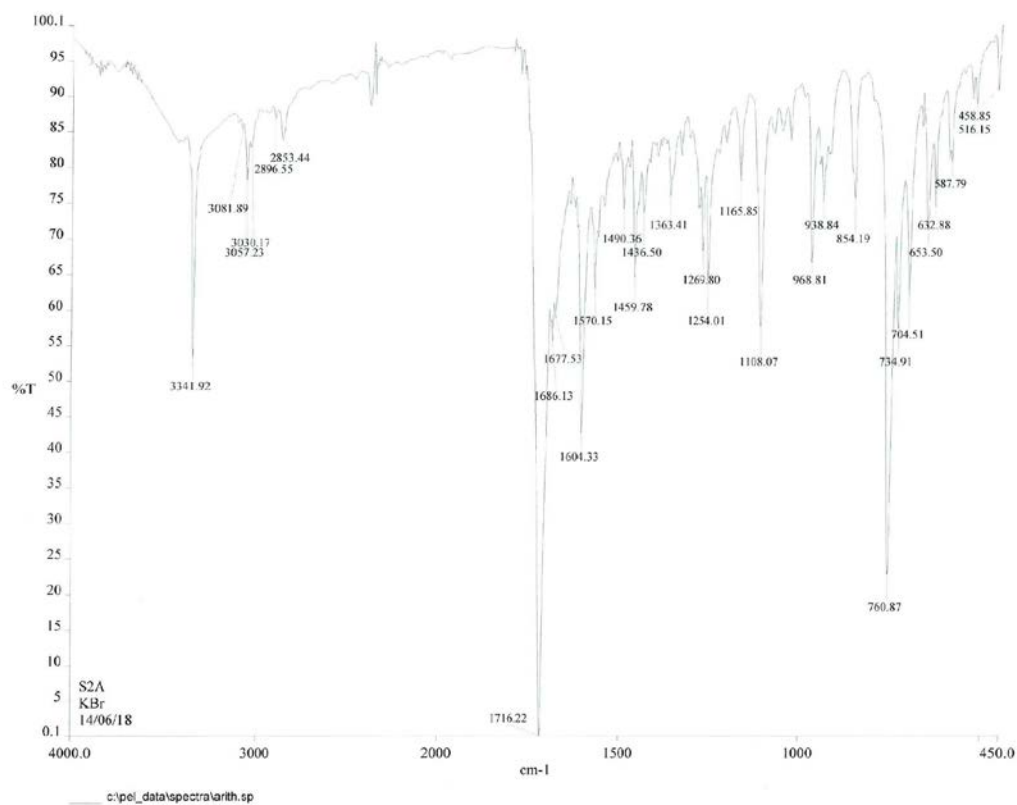
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1716	Estiramiento aromático C=O
1604	Estiramiento C=O
3414	Estiramiento aromático C-H
2935	Estiramiento alifático C-H
1237	Estiramiento C=C

## Anexo 5. Espectro IR híbrido **1d**



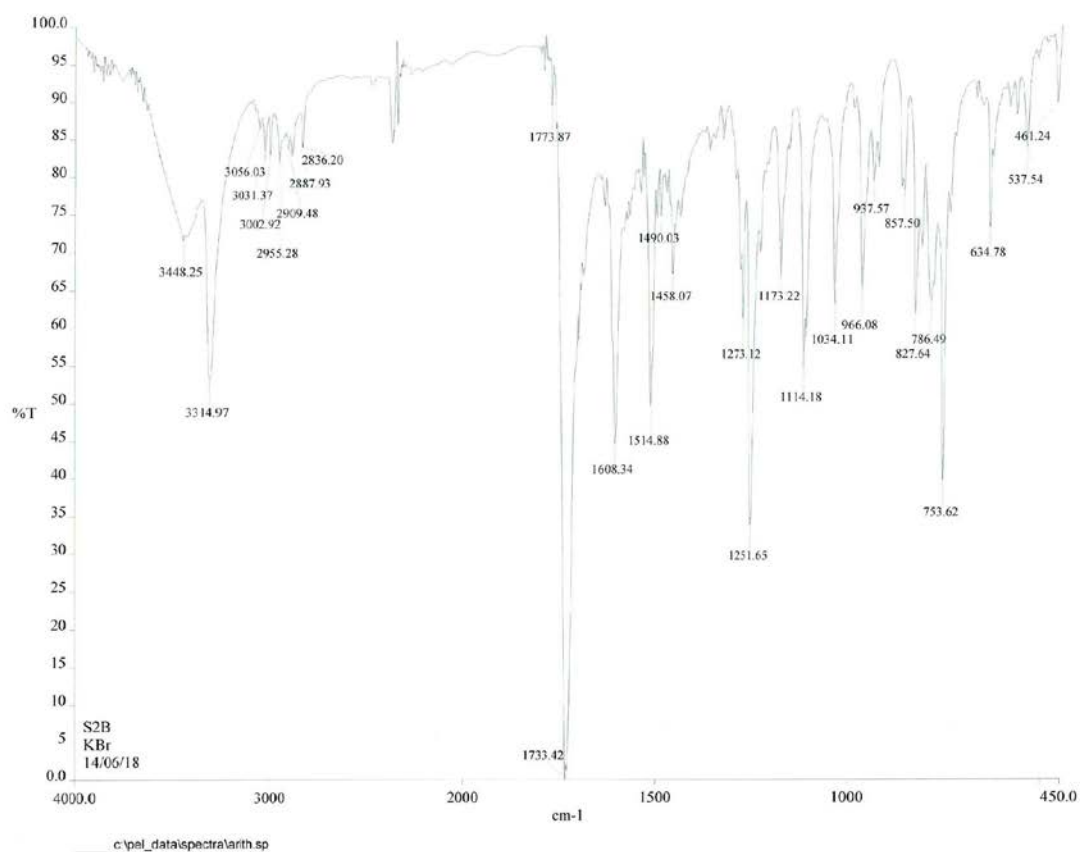
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1727	Estiramiento aromático C=O
1656	Estiramiento C=O
3431	Estiramiento aromático C-H
2946	Estiramiento alifático C-H
1304	Estiramiento C=C

## Anexo 6. Espectro IR híbrido 2a



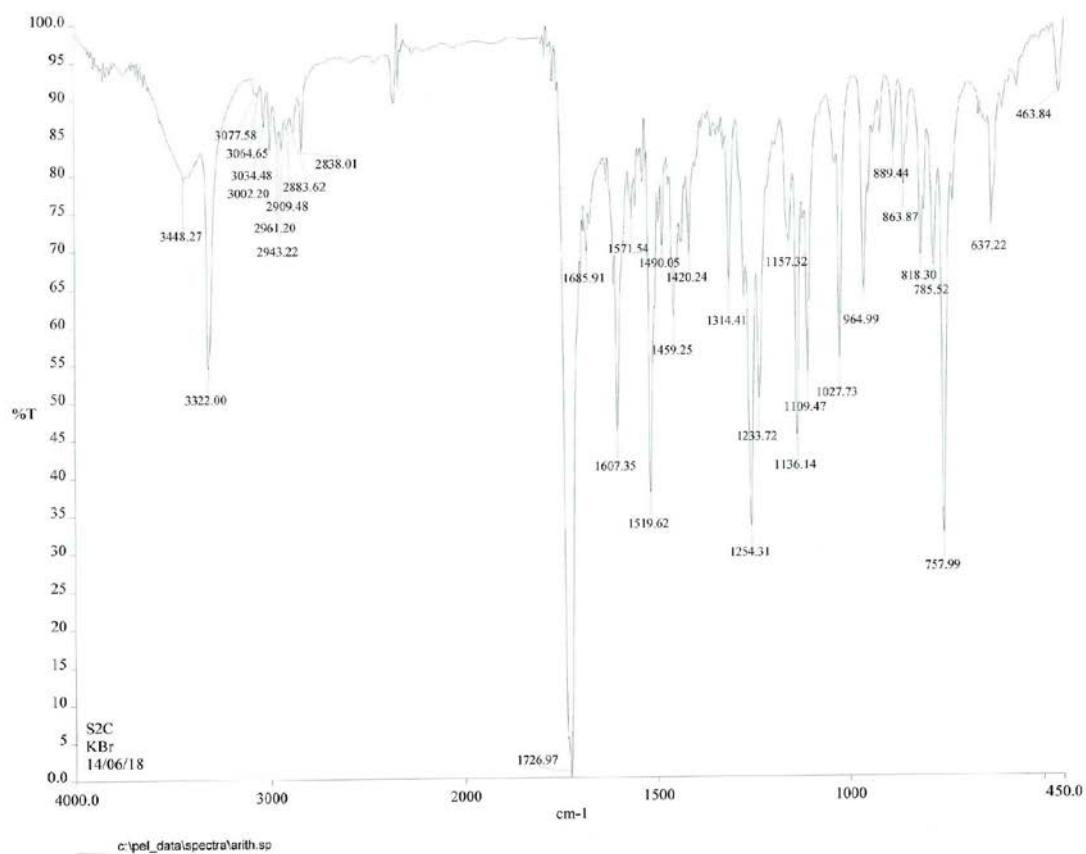
Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1716	Estiramiento aromático C=O
3341	Estiramiento N-H
3057	Estiramiento aromático C-H
1604	Estiramiento alifático C=C
1254	Estiramiento C-O

## Anexo 7. Espectro IR híbrido **2b**



Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1733	Estiramiento aromático C=O
3314	Estiramiento N-H
3448	Estiramiento aromático C-H
1108	Estiramiento alifático C=C
1251	Estiramiento C-O

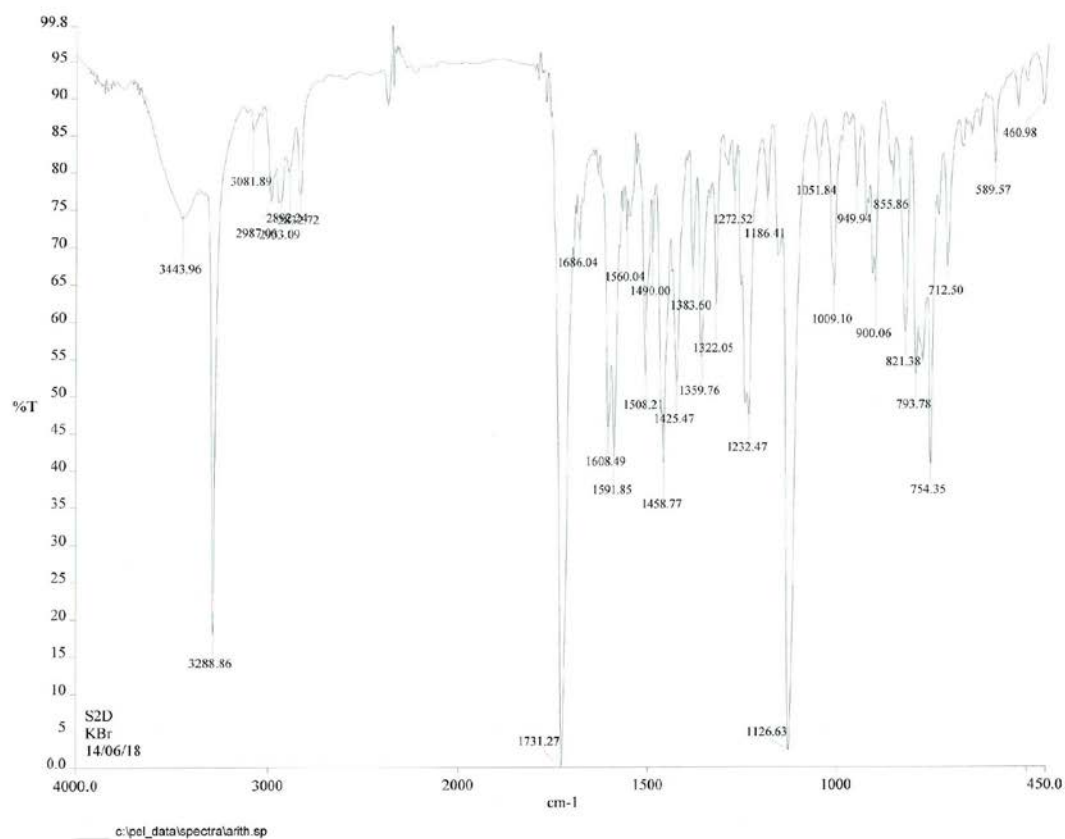
## Anexo 8. Espectro IR híbrido 2c



Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1726	Estiramiento aromático C=O
3322	Estiramiento N-H
3448	Estiramiento aromático C-H
1607	Estiramiento alifático C=C
1254	Estiramiento C-O

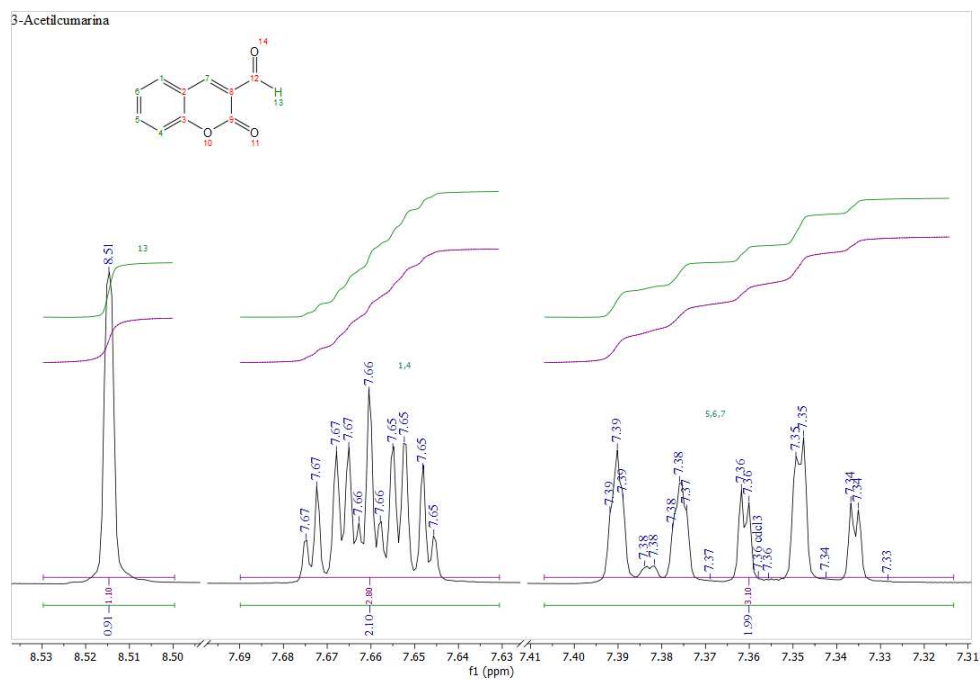


## Anexo 9. Espectro IR híbrido 2d

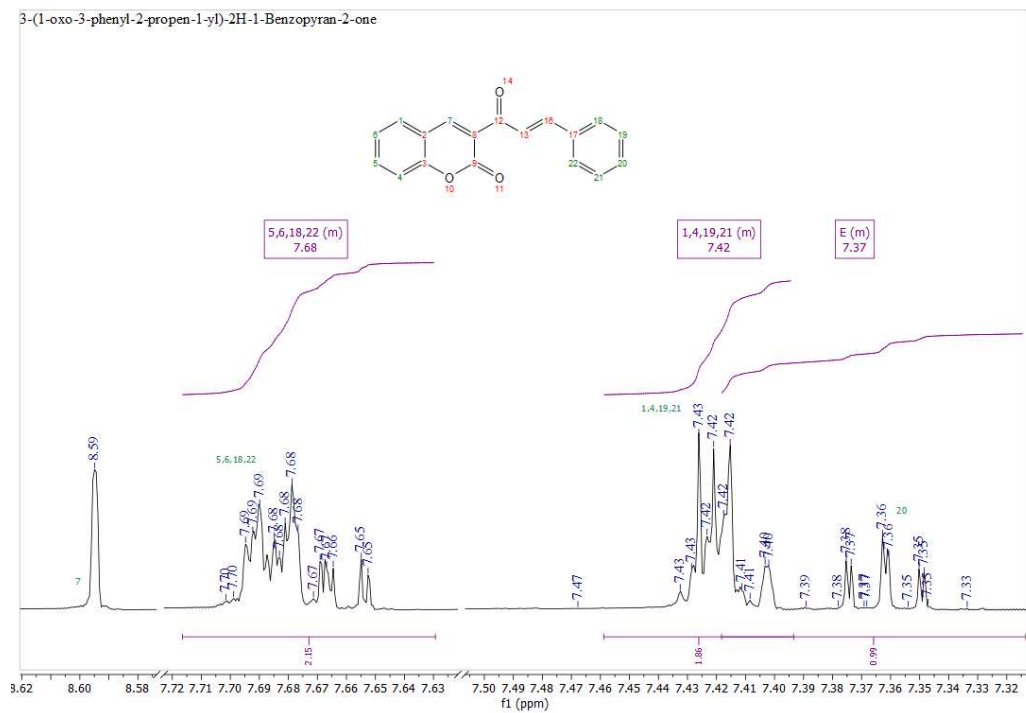


Frecuencia de vibración (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibración
1731	Estiramiento aromático C=O
3288	Estiramiento N-H
3443	Estiramiento aromático C-H
1591	Estiramiento alifático C=C
1232	Estiramiento C-O

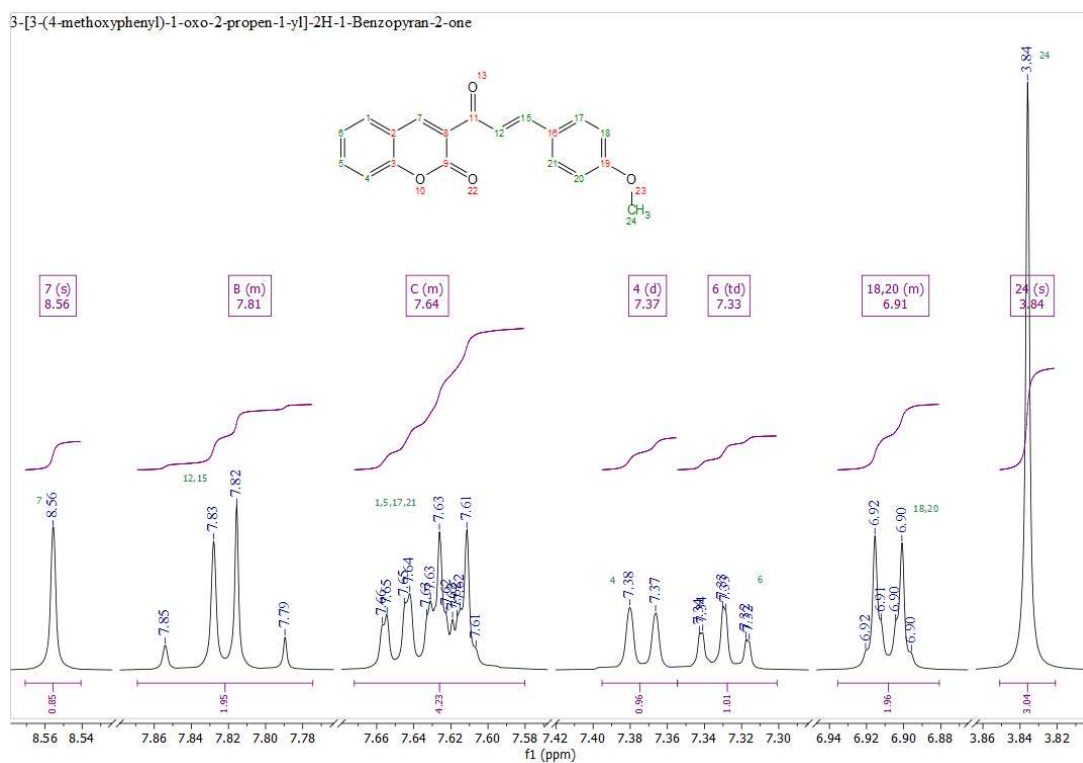
## Anexo 10. Espectro RMN $^1\text{H}$ de la 3-AC



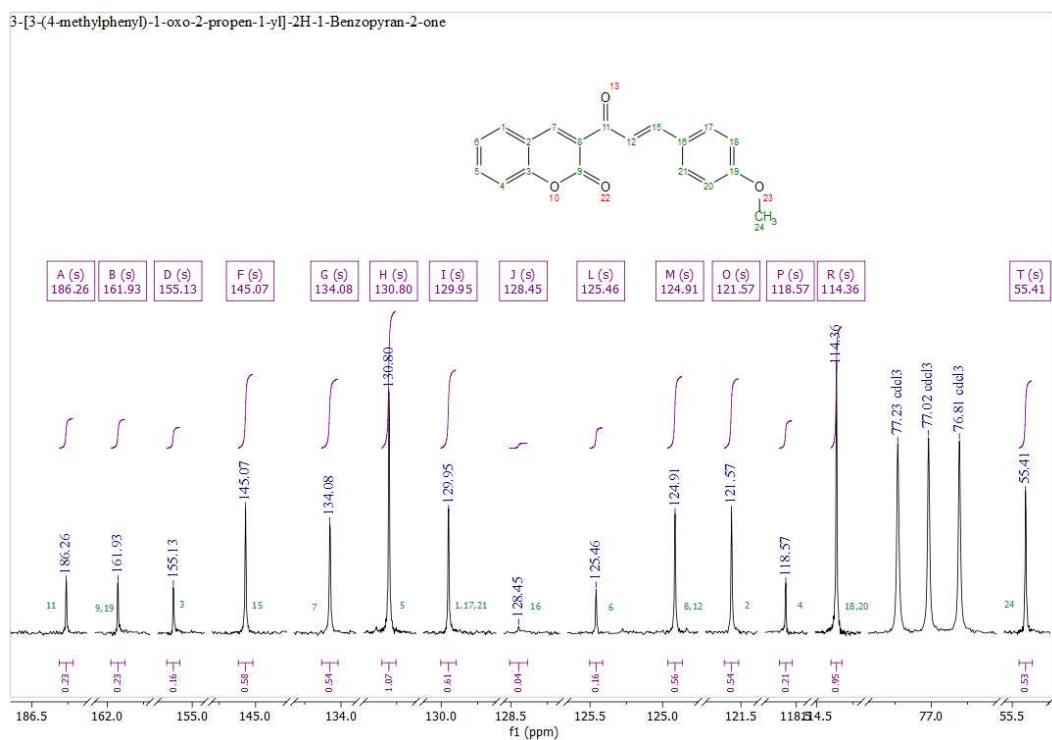
## Anexo 11. Espectro RMN $^1\text{H}$ del híbrido **1a**



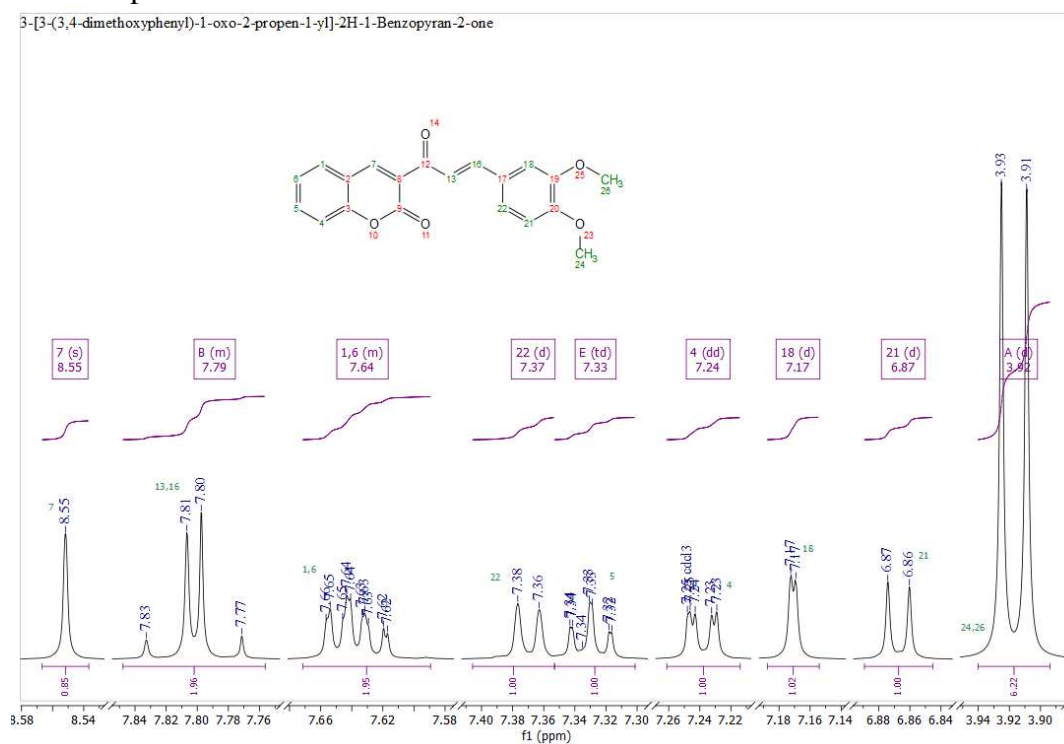
Anexo 12. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del híbrido **1b**



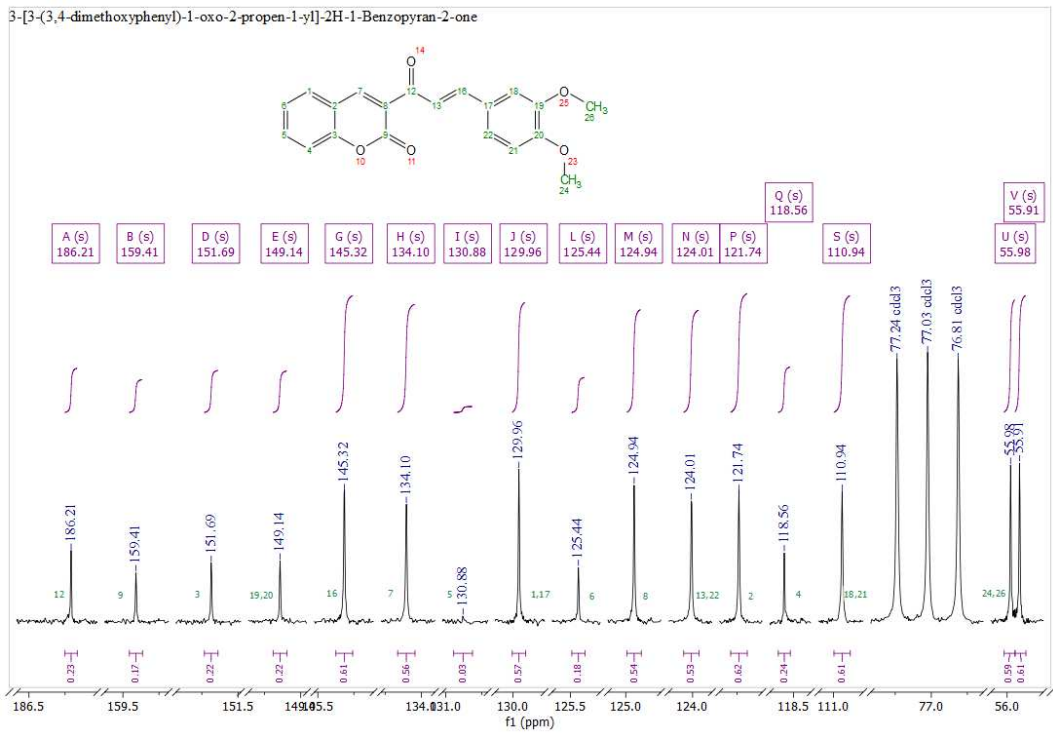
Anexo 13. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del híbrido **1b**



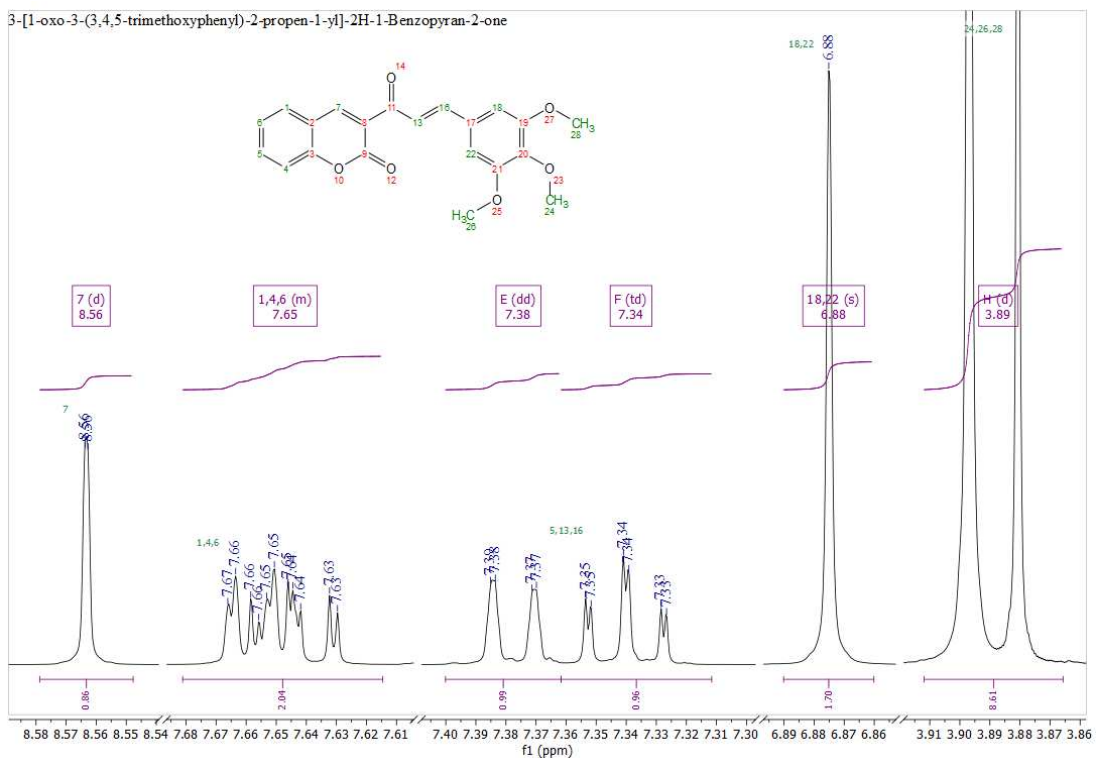
### Anexo 14. Espectro RMN <sup>1</sup>H del híbrido 1c



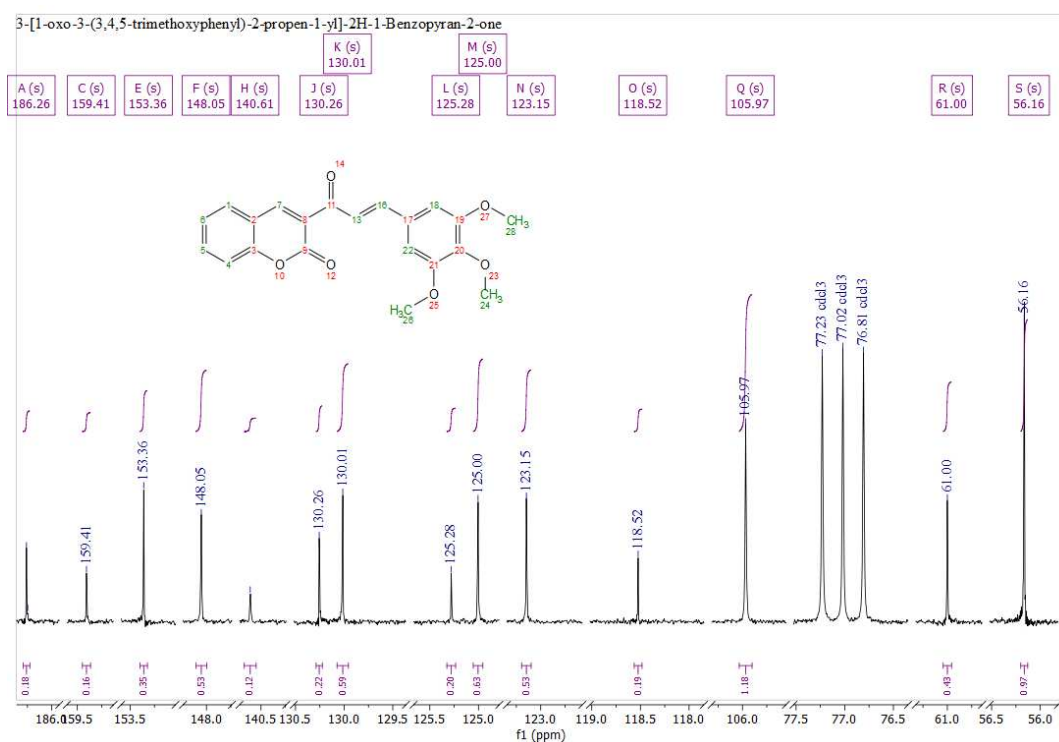
### Anexo 15. Espectro RMN <sup>13</sup>C del híbrido 1c



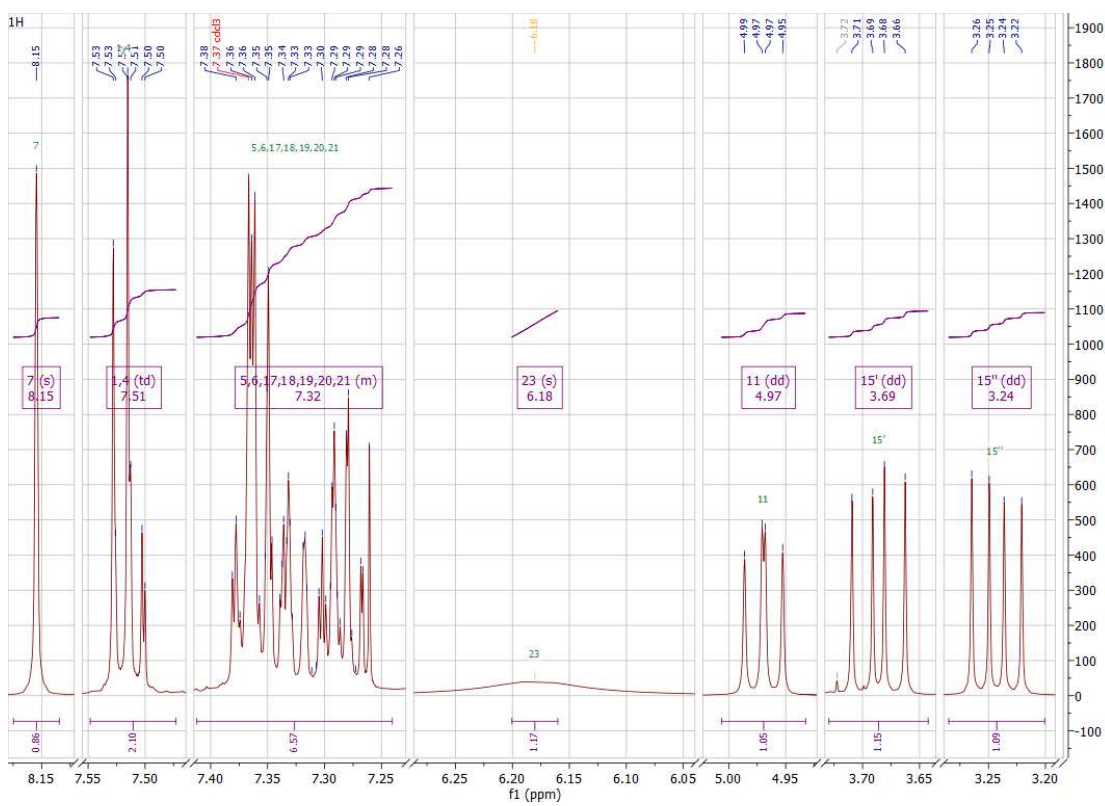
### Anexo 16. Espectro RMN <sup>1</sup>H del híbrido **1d**



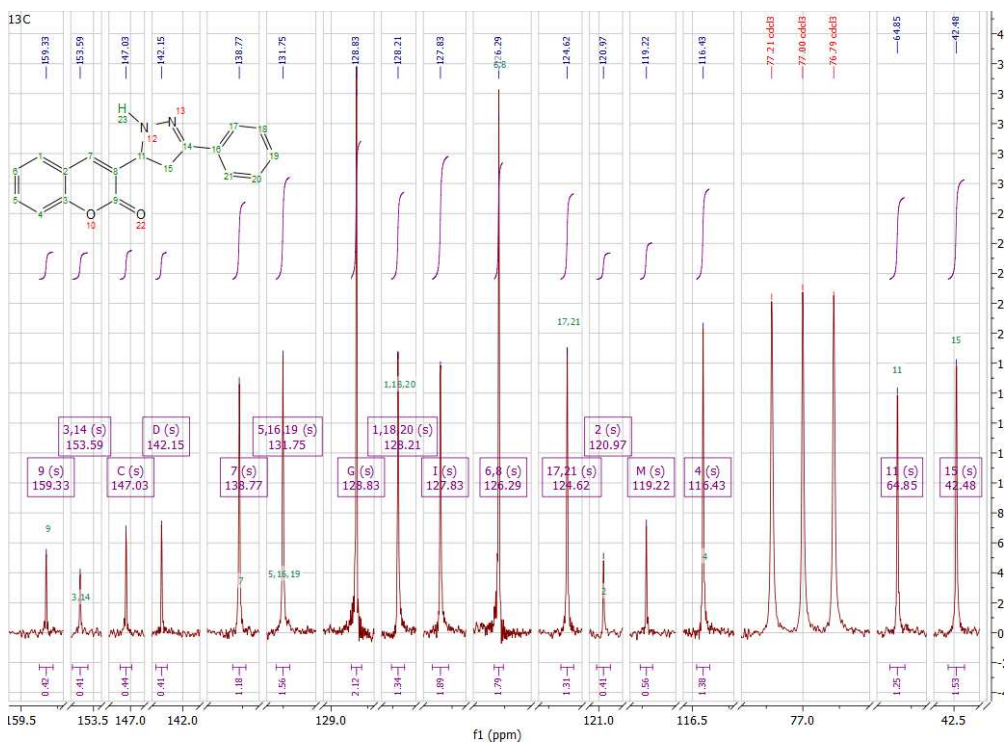
## Anexo 17. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del híbrido **1d**



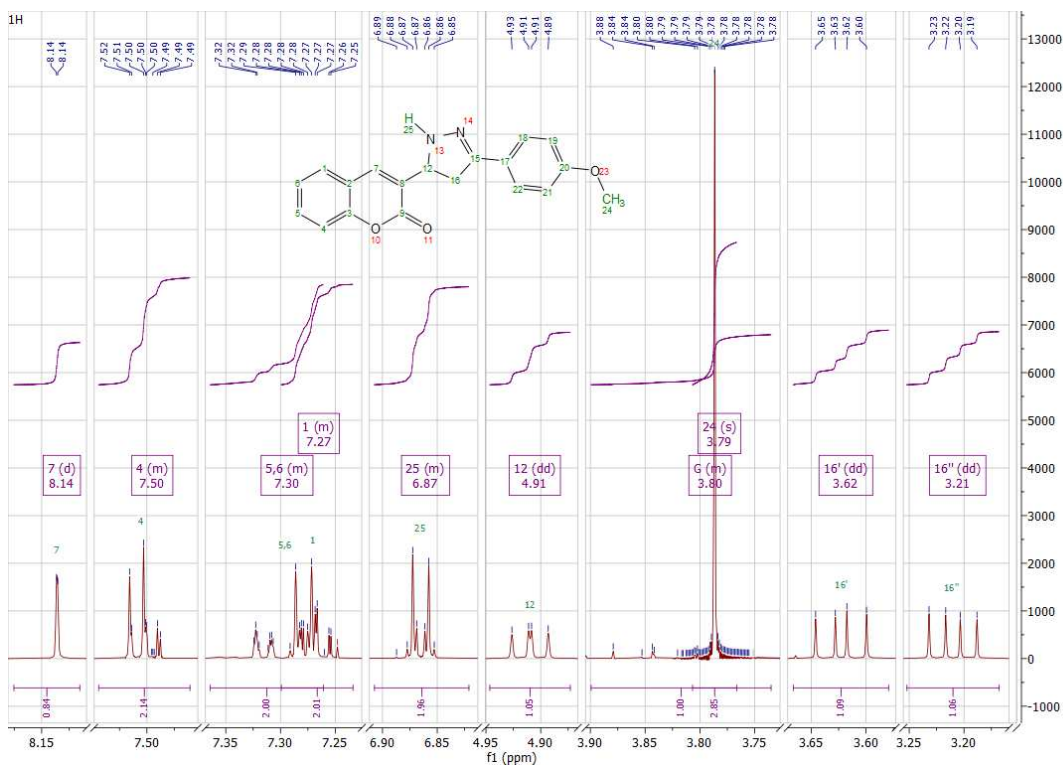
## Anexo 19. Espectro RMN $^1\text{H}$ del híbrido **2a**



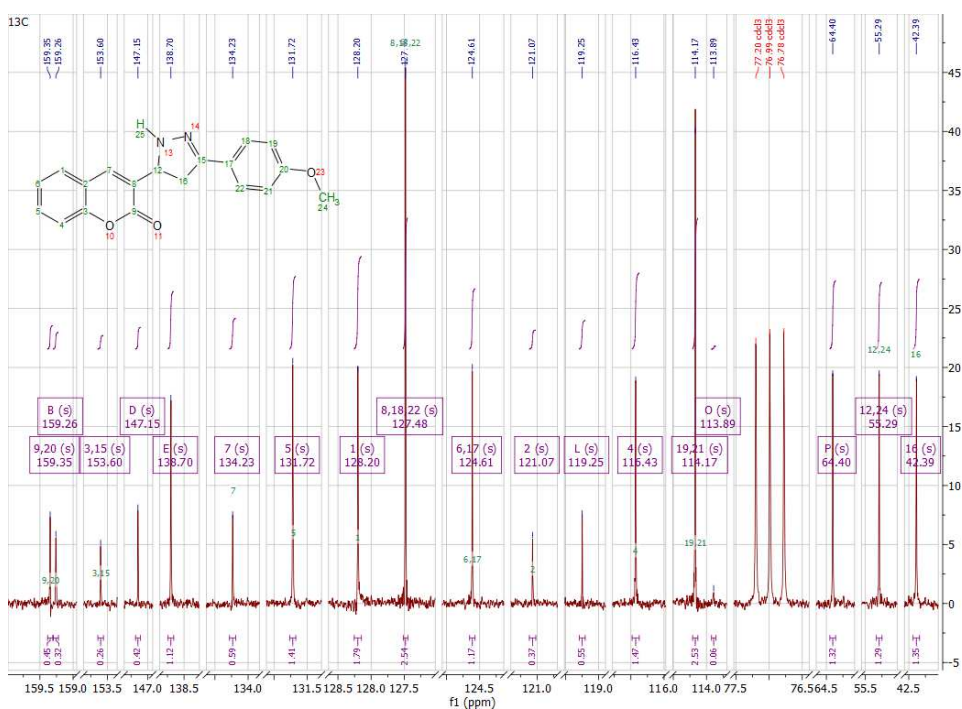
## Anexo 20. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del híbrido **2a**



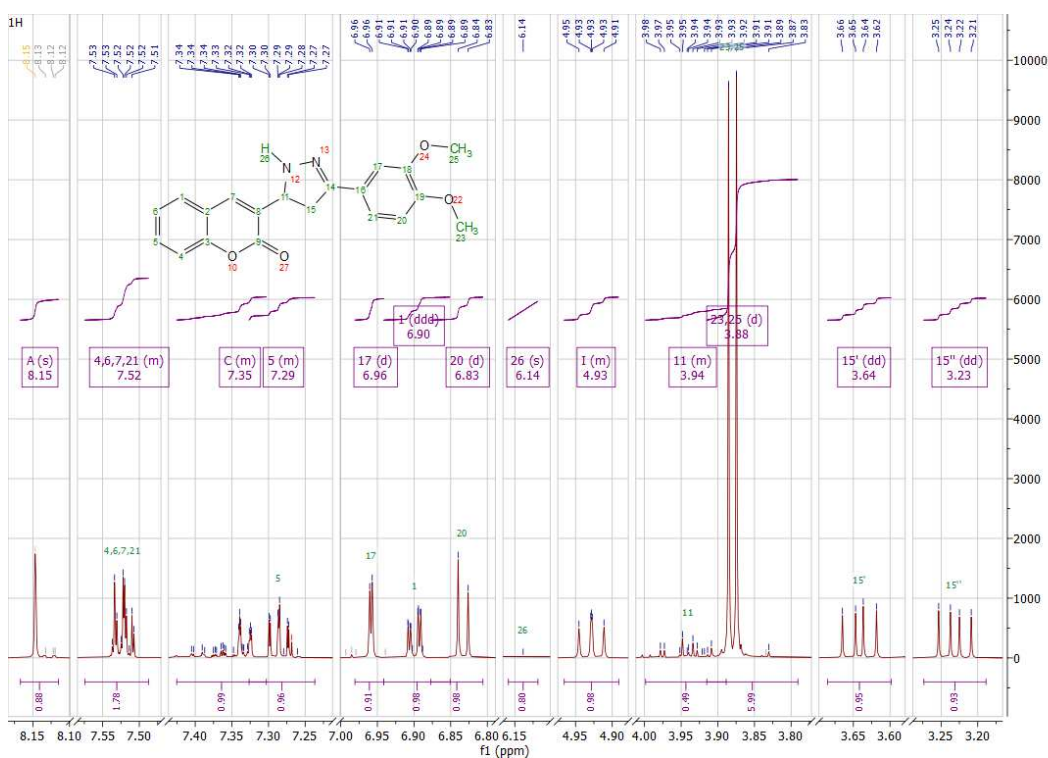
## Anexo 21. Espectro RMN $^1\text{H}$ del híbrido **2b**



## Anexo 22. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del híbrido **2b**

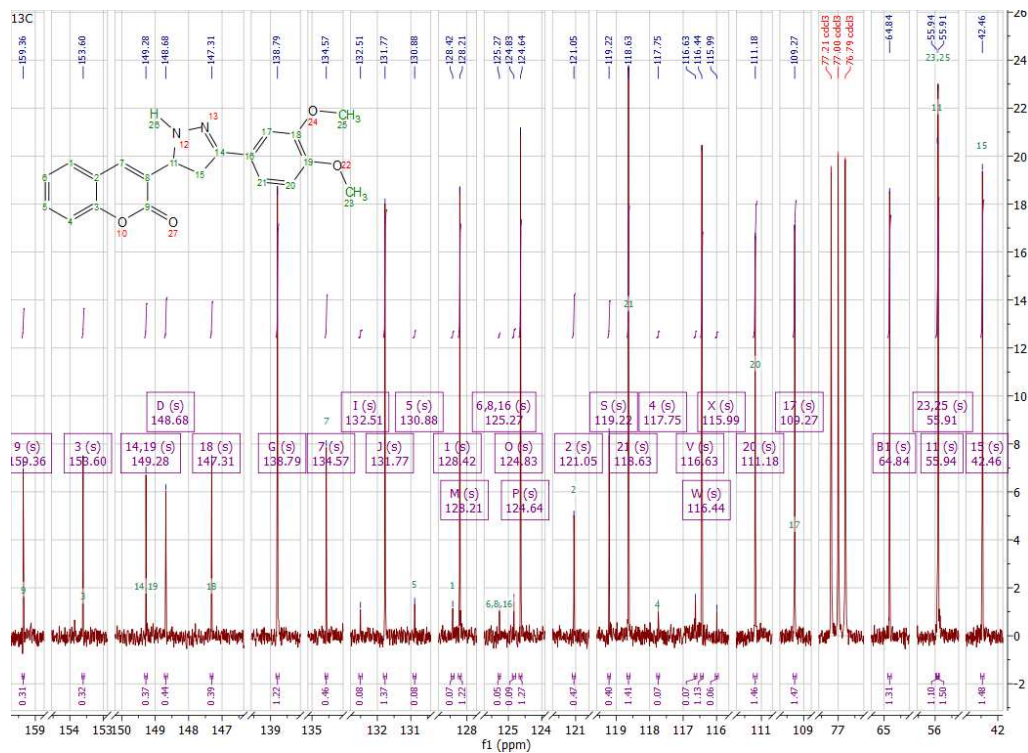


## Anexo 23. Espectro RMN $^1\text{H}$ del híbrido **2c**

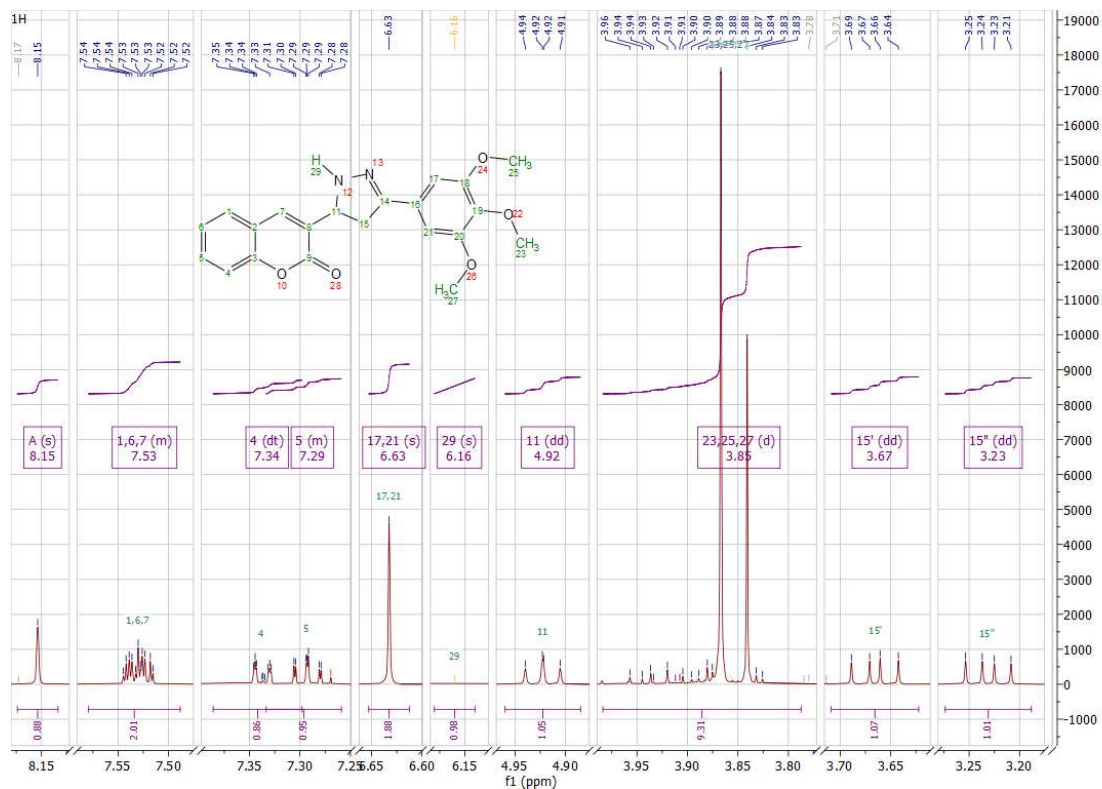


## Anexo 24. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del híbrido **2c**

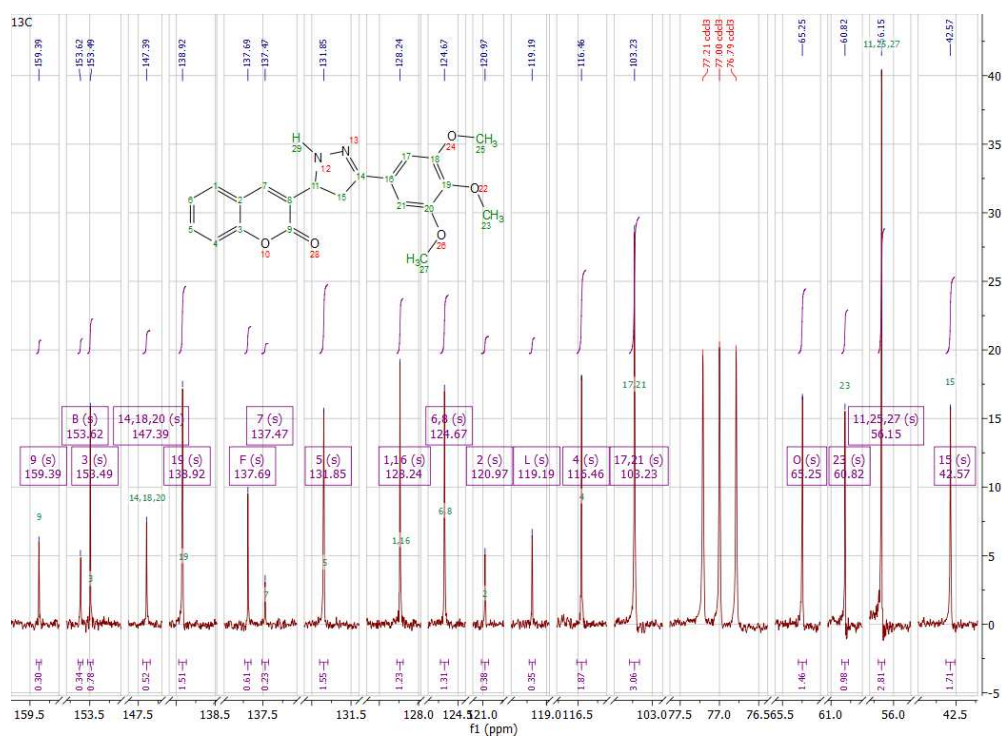




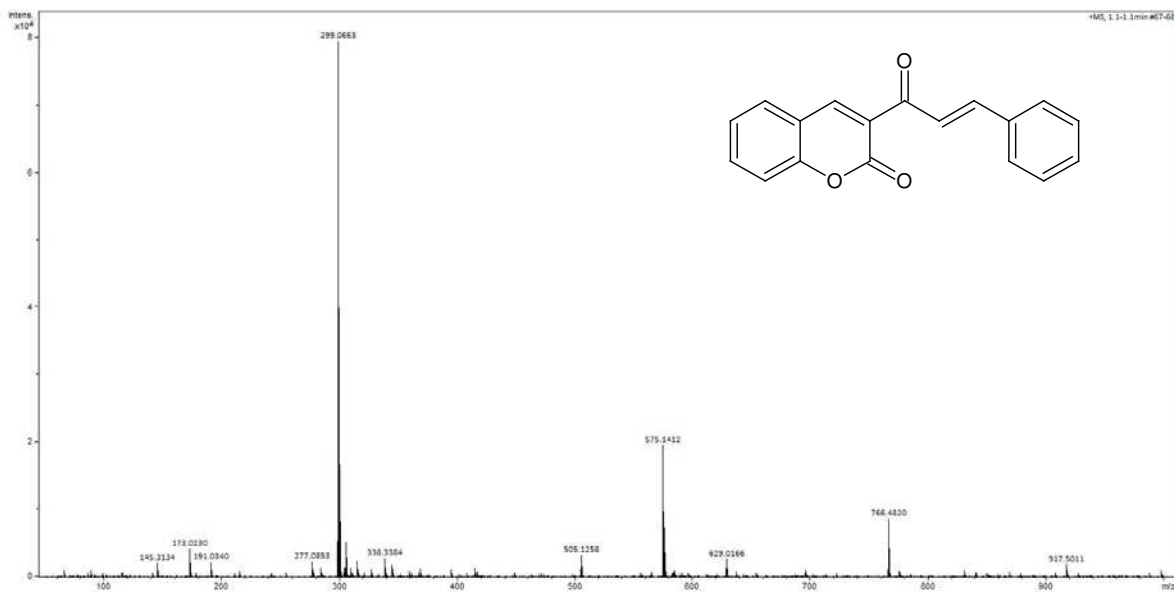
Anexo 25. Espectro RMN <sup>1</sup>H del híbrido 2d



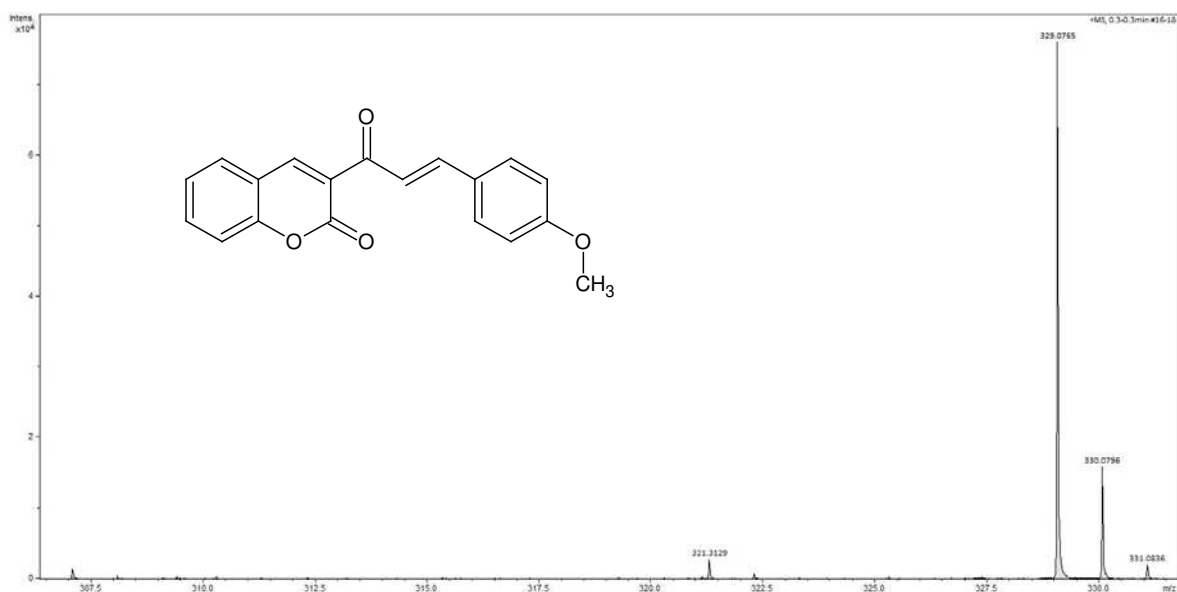
## Anexo 26. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del híbrido **2d**



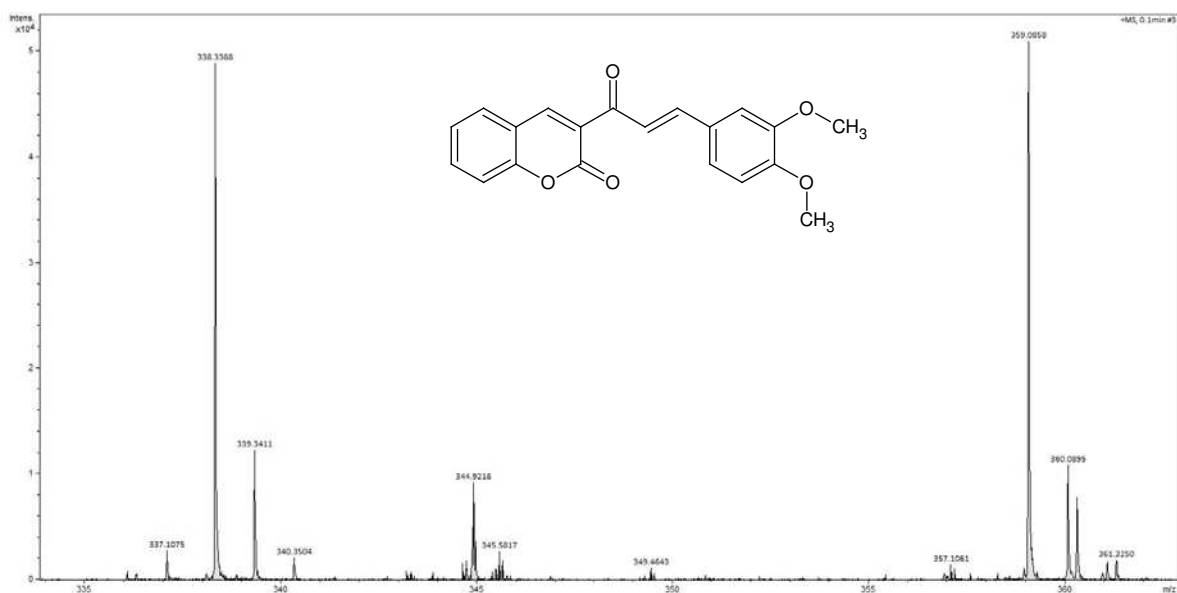
## Anexo 27. Espectroscopia de masas del híbrido **1a**



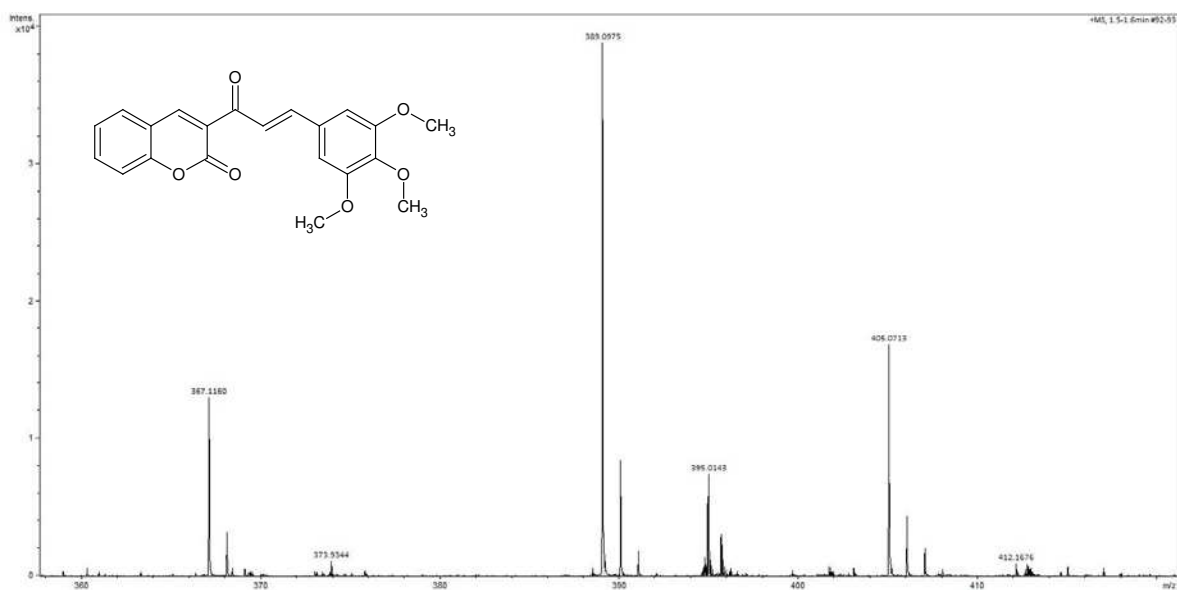
## Anexo 28. Espectroscopia de masas del híbrido **1b**



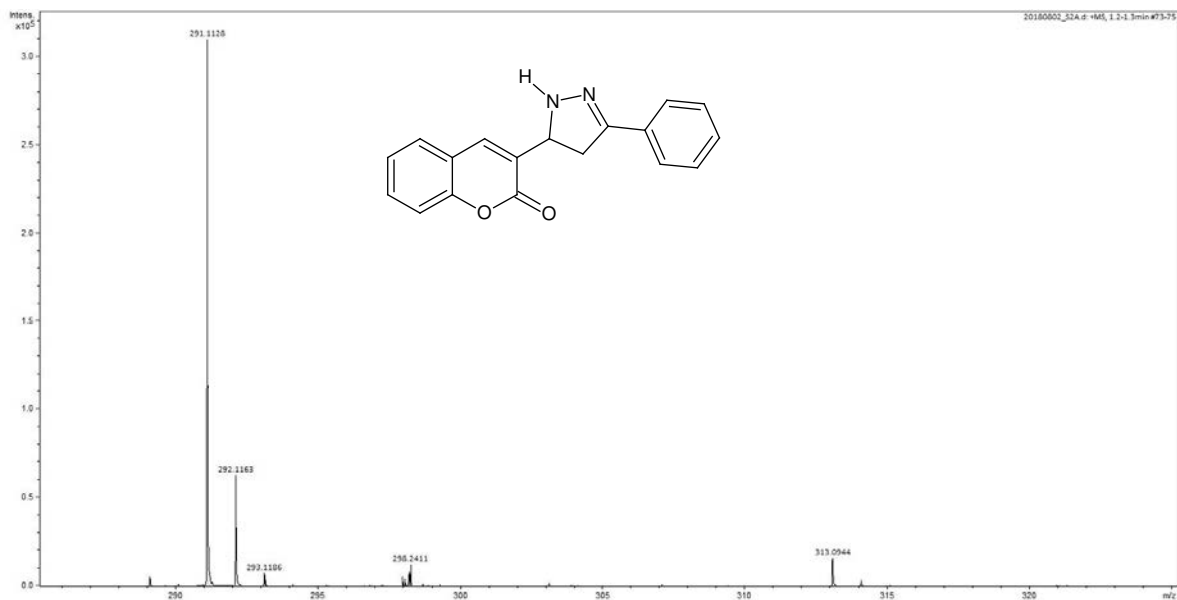
## Anexo 29. Espectroscopia de masas del híbrido **1c**



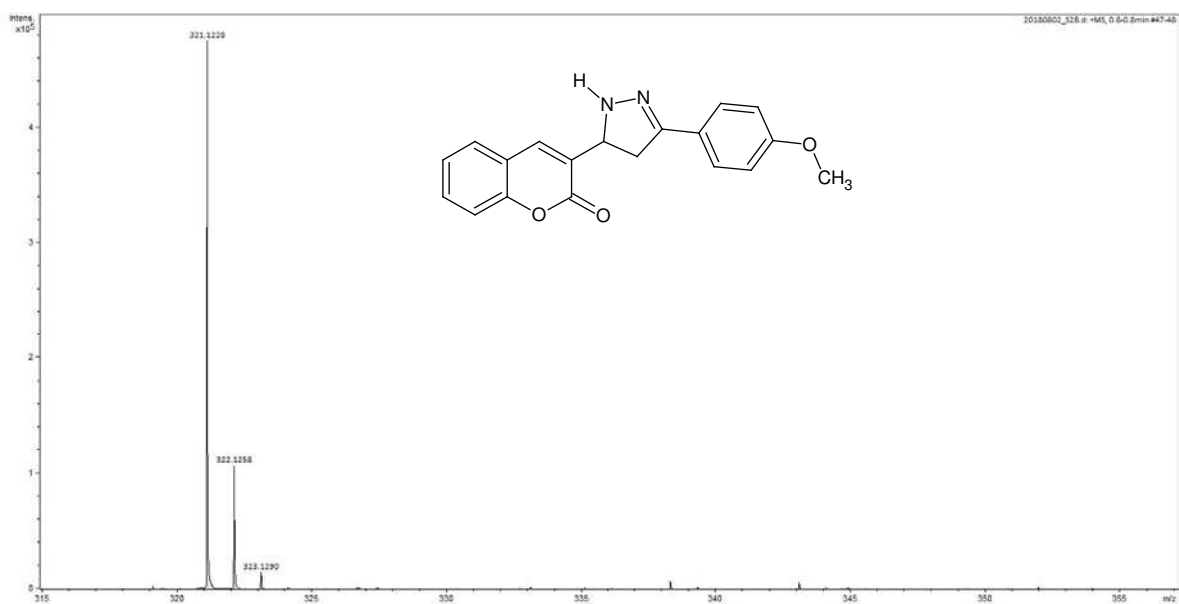
### Anexo 30. Espectroscopia de masas del híbrido **1d**



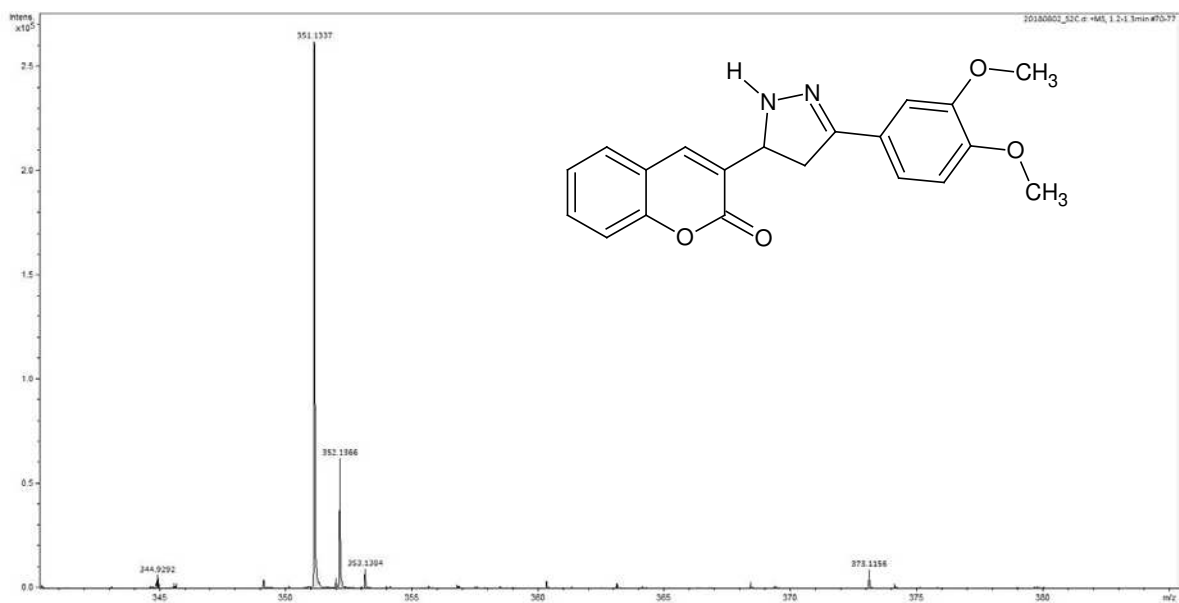
### Anexo 31. Espectroscopia de masas del híbrido **2a**.



### Anexo 32. Espectroscopia de masas del híbrido **2b**



Anexo 33. Espectroscopia de masas del híbrido **2c**



Anexo 34. Espectroscopia de masas del híbrido **2d**

