



**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

Informe final de servicio social

Síntesis de derivados de pirazol e indazol diseñados a partir de celecoxib y  
combretastatina A4.

**PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE**

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos  
biológicos.

Presenta:

Jovita Lucero Ruiz Garcia

Matricula: 2143074900

Asesores

Dr. Jaime Pérez Villanueva

Dr. Juan Francisco Cortés Benítez

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** UAM-Xochimilco, Edificio N (UIDIS), Laboratorio de  
Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas.

Fecha de inicio: 07 de enero de 2019  
Fecha de terminación: 07 de julio de 2019

## Resumen

El cáncer sigue siendo un problema de salud pública y es la segunda causa de muerte a nivel mundial según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se caracteriza por un proceso de crecimiento descontrolado y diseminación de células.

Los principales tratamientos contra el cáncer involucran: la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia, siendo esta última la más común.

En las últimas décadas, uno de los tratamientos en quimioterapia es el uso de fármacos antimitóticos, estos tienen como diana a la tubulina, proteína que forma a los microtúbulos. Estos son de gran importancia, debido a que participan en el proceso de mitosis, por lo que un descontrol en el proceso conlleva a la muerte celular. Sin embargo, el uso de estos fármacos trae consigo, diversos efectos secundarios, además, se han reportado diversos casos de resistencia frente a los fármacos convencionales. Por lo anterior, existe una necesidad constante de nuevas moléculas bioactivas que puedan ser una alternativa frente a los fármacos usados comúnmente en la clínica.

El presente trabajo tiene como objetivo sintetizar compuestos híbridos derivados de combretastatina A4, 2,3-difenil-2*H*-indazol y celecoxib, para ser evaluados sobre tubulina y líneas celulares de cáncer. Tres de los cuatro compuestos planteados originalmente, fueron sintetizados exitosamente: 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2*H*-indazol, 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-3-il) fenol y 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-2-il)fenol.

La síntesis, purificación y evaluación biológica de los compuestos, se realizó en el laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas (N-015) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

## **Agradecimientos**

A mi madre, gracias por todo el amor, dedicación y apoyo que me has brindado, gracias a tu esfuerzo, pude terminar esta etapa de mi vida. Nunca me alcanzará la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mi familia, por motivarme a dar siempre todo de mí y escucharme cuando más lo necesito, en especial a ti Mónica que más que una sobrina eres una hermana.

Al Doctor Jaime, por haberme abierto las puertas para entrar en su equipo de trabajo, así como todo el apoyo, la paciencia y la confianza que me ha brindado desde que llegué al laboratorio. Gracias por los conocimientos que me ha transmitido, pues además de ser un excelente profesional es también una gran persona, muchas gracias por todo.

Al Doctor Francisco Palacios y al Doctor Francisco Cortés, por su apoyo, las bromas y los conocimientos que me han transmitido.

A mis amigas, Marina y Mariana por su amistad sincera, hemos pasado por tantas cosas juntas; risas, tristezas, enojos, etc., sin embargo, siempre hemos sabido seguir adelante a pesar de las circunstancias, sin ustedes, mi vida en la universidad no hubiera sido tan hermosa como lo fue. Gracias por brindarme todo su apoyo y palabras de motivación y consuelo cuando más lo he necesitado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Edgar, Karen y Miguel por compartir su experiencia y sus conocimientos conmigo. Por siempre brindarme su atención y sus recomendaciones ante cualquier duda.

A la maestra Olivia, porque durante toda la carrera, no tuve a ningún profesor que dedicara tanto hacia sus alumnos, pues además de ser una excelente docente me hizo amar completamente la química orgánica.

# Índice

1. Introducción .....	5
2. Marco teórico .....	5
2.1 Cáncer .....	5
2.2 Quimioterapia.....	6
2.2.1 Dianas en quimioterapia.....	6
2.3 Tubulina y microtúbulos .....	7
2.4 Agentes dirigidos a microtúbulos (MTA).....	8
2.5 El sitio de unión a Colchicina.....	9
2.5.1 Compuestos derivados de combrestatina.....	9
2.6 Compuestos sintetizados en el laboratorio N-015.....	10
2.7 Diseño de los compuestos a sintetizar.....	12
2.8 Acoplamiento molecular de los compuestos híbridos.....	14
3. Planteamiento del problema.....	16
4. Objetivo .....	16
4.1 Objetivo general .....	16
4.2 Objetivos específicos .....	16
5. Desarrollo experimental .....	17
5.1 Ruta de síntesis para los compuestos <b>2</b> , <b>3</b> y <b>4</b> .....	17
5.1.1 Síntesis de intermediarios <b>a</b> y <b>b</b> : método de Cadogan.....	18
5.1.2 2-Fenil-6-(trifluorometil)-2 <i>H</i> -indazol ( <b>2b</b> ).....	19
5.1.3 6-(Trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2 <i>H</i> -indazol ( <b>3b</b> ).....	19
5.1.4 2-Metoxi-5-[6-(trifluorometil)-2 <i>H</i> -indazol-2-yl]fenol ( <b>4b</b> ).....	19
5.2 Síntesis de intermediarios <b>c</b> : bromación en C-3.....	20
5.3 Síntesis de los productos finales <b>2d-4d</b> mediante la reacción de acoplamiento de Suzuki .....	21
5.3.1 2,3-Difenil-6-(trifluorometil)-2 <i>H</i> -indazol ( <b>2d</b> ).....	21
5.3.2 2-Metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2 <i>H</i> -indazol-3-il) fenol ( <b>3d</b> ).....	22
5.3.3 2-Metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2 <i>H</i> -indazol-2-il) fenol ( <b>4d</b> ).....	22

5.4 Ensayo de polimerización de tubulina.....	23
5.5 Ensayo de actividad citotóxica .....	23
6. Resultados y discusión.....	24
6.1 Parte química .....	24
6.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) .....	26
6.3 Ensayo de polimerización de tubulina <i>in vitro</i> .....	27
6.4 Ensayo de evaluación citotóxica <i>in vitro</i> .....	28
7. Objetivos y metas alcanzadas.....	30
8. Conclusiones .....	30
9. Referencias .....	31
10. Anexos .....	35

## **1. Introducción**

El cáncer es actualmente una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es la segunda causa de muerte en el mundo ya que, en el 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones.<sup>47</sup> El cáncer se caracteriza por ser un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células.<sup>48</sup> Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo.

En las últimas décadas, ha quedado de manifiesto la importancia de los fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos, debido a que detienen o “pausan” la mitosis, por lo cual, se usan ampliamente en la quimioterapia contra el cáncer.<sup>26</sup>

Sin embargo, la mayoría de estos fármacos trae consigo varios efectos secundarios no favorables. En la actualidad, se buscan e investigan nuevos compuestos con actividad farmacológica, diseñados a partir de los ya conocidos, con mejores propiedades y que permitan descubrir a su vez fármacos con modo de acción diferente y con menores efectos adversos.

Por esta razón, es de suma importancia realizar investigación para desarrollar fármacos, que desde su diseño estén dirigidos a resolver este problema de salud, por lo que el presente trabajo está enfocado en la síntesis de derivados de híbridos de combretastatina A4, 2,3-difenil-2*H*-indazol y celecoxib con posible actividad anticancerígena.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Cáncer**

El término cáncer, indica un muy amplio y complejo grupo de enfermedades relacionadas, caracterizadas por mutaciones y/o alteraciones que conducen a la destrucción de procesos fisiológicos ordenados. La consecuencia es un descontrol que conlleva a una proliferación autónoma, irreversible, progresiva y finalmente, destructiva.<sup>1</sup>

La mayoría de los tumores malignos invaden a través de las vías linfáticas o hemáticas y los tejidos circundantes; se propagan en el organismo huésped en un proceso denominado metástasis, dando lugar a otros tumores malignos o formaciones neoplásicas secundarias,<sup>2</sup> los cuales se encuentran separados y alejados del tumor primario.<sup>3,4</sup> La metástasis representan la principal causa de muerte por cáncer.<sup>5</sup>

Dada la incidencia y gravedad del cáncer, se han hecho grandes esfuerzos para combatirlo. En la actualidad, los tratamientos más habituales son: la cirugía, la

radioterapia y la quimioterapia, siendo esta última la más utilizada y en la que se le dará enfoque en el presente trabajo.

## 2.2 Quimioterapia

La quimioterapia es una forma de intervención que se utiliza para combatir las formaciones neoplásicas mediante la administración de los llamados fármacos antitumorales (a veces referido como fármacos citotóxicos o antineoplásicos),<sup>6</sup> cuyo efecto consiste en bloquear la rápida replicación celular que caracteriza a los tumores malignos.<sup>4</sup>

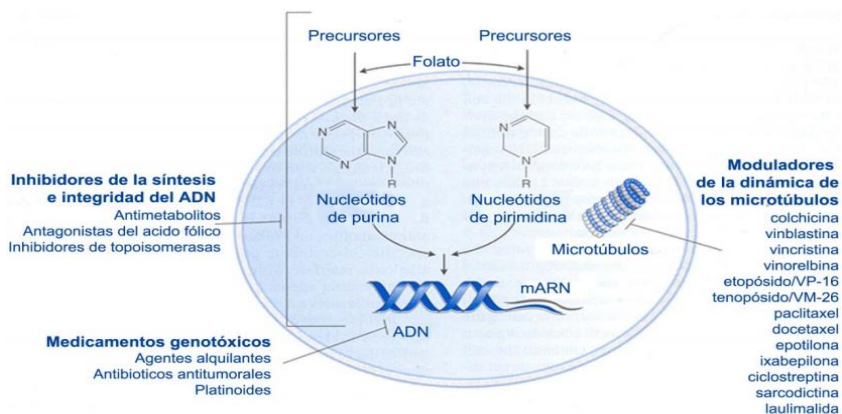
### 2.2.1 Dianas en la quimioterapia

La metástasis convierte al cáncer en una enfermedad sistémica, por lo tanto, los tratamientos locales como la cirugía y la radioterapia pueden no ser suficientes para atajarla, de ahí la necesidad de un tratamiento sistémico como la quimioterapia.

Hoy en día, existen al menos cien fármacos diferentes utilizados en la lucha contra el cáncer que actúan causando muerte celular de diversas maneras. El tratamiento utilizado varía, y depende de un gran número de factores que incluyen el tipo, la localización y la extensión de la enfermedad, al igual que el estado de salud del paciente.<sup>7</sup>

Algunos de estos fármacos, son compuestos naturales y otros son productos químicos sintéticos. La vía común por la que estos agentes ejercen su efecto citotóxico en la célula es la inducción de la apoptosis como respuesta a la aparición de daños irreparables en las células.<sup>8</sup>

Los fármacos quimioterapéuticos más comúnmente utilizados pueden dividirse principalmente en dos grandes grupos según sus dianas de acción; en el primer grupo se encuentran los agentes que interfieren en la biosíntesis del ADN, obstaculizando su síntesis o introduciendo alteraciones en él (Figura 1).<sup>9</sup>



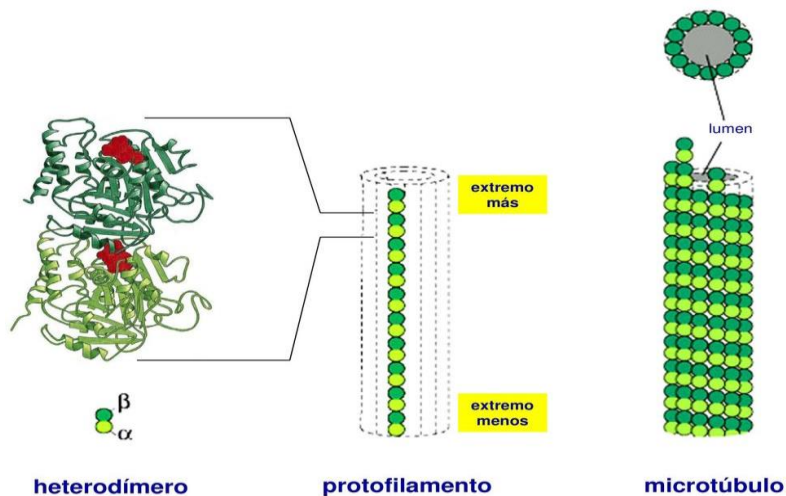
**Figura 1.** Diferentes niveles de actuación de compuestos antineoplásicos.<sup>10</sup>

El segundo grupo incluye una amplia gama de fármacos quimioterapéuticos cuyo objetivo es interferir en la división celular para inhibir la proliferación desmesurada de las células tumorales, induciendo mitosis aberrantes que conllevan a su detención y por lo tanto, se produce muerte celular.<sup>11</sup> Tradicionalmente, la diana de estos fármacos ha sido representada por proteínas que coordinan la formación del huso mitótico y la dinámica cromosómica, así como las que forman el huso en sí, siendo la más destacada de éstas últimas la tubulina (unidad fundamental de los microtúbulos del citoesqueleto).<sup>12</sup>

### 2.3 Tubulina y microtúbulos

Los microtúbulos son los componentes más importantes del citoesqueleto de las células eucariotas. Desempeñan papeles fundamentales en varias funciones biológicas, que van desde el tráfico intracelular y el posicionamiento de componentes celulares en la interfase, la formación del huso mitótico durante la división celular, así como el establecimiento y mantenimiento de la morfología y motilidad celular.<sup>13,14</sup>

Se componen de heterodímeros de  $\alpha\beta$ -tubulina que se asocian para formar protofilamentos, que posteriormente, se unen lateralmente para formar microtúbulos (Figura 2).<sup>15</sup>



**Figura 2.** Los microtúbulos se forman por polimerización de moléculas de la proteína tubulina.

Un aspecto esencial de los microtúbulos es que son estructuras muy dinámicas; esta dinámica viene definida por ciclos de crecimiento (ensamblaje) y acortamiento (desensamble), debido a la adición (polimerización) o eliminación (despolimerización) de dímeros de tubulina en los extremos. Además, el microtúbulo es una estructura polarizada, ya que sus extremos no son idénticos; el denominado extremo negativo (-) es menos dinámico, comparado con su opuesto el extremo



positivo (+), por lo que crece y se acorta más lentamente que el extremo (+) donde estos procesos suceden con mayor velocidad.<sup>16</sup>

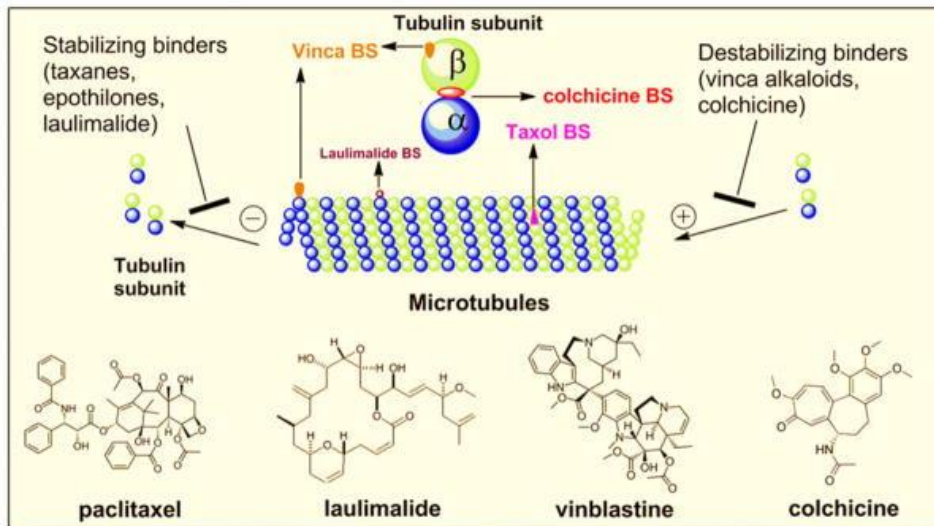
La dinámica de los microtúbulos es importante para una mitosis exitosa, particularmente para asegurar el rápido ensamblaje y desensamblaje de estos, en un adecuado funcionamiento del huso mitótico durante la alineación y separación de los cromosomas. Una dinámica inapropiada puede bloquear o ralentizar el proceso mitótico.<sup>12</sup>

Debido al importante papel que tienen los microtúbulos en el proceso de mitosis es normal el uso de antimitóticos que alteran su dinámica. Este mecanismo es clave para atacar la rápida y descontrolada proliferación de las células cancerosas en el organismo. Por ello, es totalmente entendible que el principal uso de los fármacos contra microtúbulos sea el de antineoplásicos.<sup>17</sup>

#### **2.4 Agentes dirigidos a microtúbulos (MTA)**

Los agentes dirigidos a los microtúbulos (MTA), como el paclitaxel, han sido parte importante de muchos regímenes de quimioterapia antitumoral.<sup>18,19</sup> Alguna vez se pensó que los MTA combaten el cáncer principalmente mediante la inhibición de la mitosis. Sin embargo, una gran cantidad de evidencia sugiere que los MTA también actúan sobre las células interfásicas, a través del cambio de la migración celular y la invasividad, el efecto inmunomodulador y la alteración vascular.<sup>20,21,22</sup> Los MTA, se describen como "quimioterapia dirigida".<sup>23</sup> Esta podría ser la razón por la cual el campo de investigación de MTA se ha mantenido activo. Se sabe que los MTA interactúan con la  $\beta$ -tubulina o la interfaz  $\alpha/\beta$ -tubulina,<sup>24</sup> estos se dividen clásicamente en dos grandes grupos: los desestabilizadores de microtúbulos, que inhiben su polimerización desestabilizándolos y disminuyendo su masa. Algunos ejemplos como son: los alcaloides de la vinca y colchicina;<sup>25</sup> y los estabilizadores de microtúbulos; que eliminan la inestabilidad dinámica, aumentando la masa del microtúbulo, como son; taxanos, epitolonas y laulimalida (Figura 3).<sup>26</sup>

Este trabajo se centra en los fármacos dirigidos al sitio de colchicina, más en concreto, los derivados de combretastatina como se describirá más adelante.



**Figura 3.** Sitios de unión a tubulina de agentes dirigidos a microtúbulos.<sup>17</sup>

## 2.5 El sitio de unión a Colchicina

La colchicina, extraída del azafrán silvestre (*Colchicum autumnale*), es el primer agente antimitótico descrito que además actúa como antiinflamatorio. A pesar de su actividad antimitótica, en la actualidad, no se utiliza en el tratamiento del cáncer debido a su gran toxicidad. En 2009, la FDA aprobó la colchicina como un medicamento en monoterapia para tratar la fiebre mediterránea familiar (FMF) y los brotes de gota aguda.<sup>26</sup>

El sitio de unión de la colchicina se encuentra en la interfaz de los monómeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 3). Cuando se produce la unión a la  $\beta$ -tubulina, da como resultado un dímero de tubulina curva que evita que esta adopte una estructura recta, debido a un choque estérico entre la colchicina y la  $\alpha$ -tubulina, esto, inhibe el ensamblaje de los microtúbulos.<sup>17</sup>

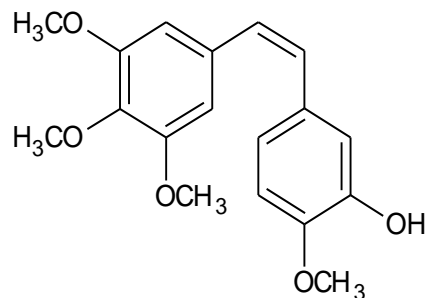
Aunque la colchicina no se usa como agente anticancerígeno, se han realizado múltiples esfuerzos para desarrollar clínicamente agentes del sitio de unión a colchicina (CBSI). Hoy en día existen diversos compuestos a este sitio de unión que siguen en estudio, tal es el caso de los derivados de combretastatina.<sup>18</sup>

### 2.5.1 Compuestos derivados de combretastatina

Son compuestos fenólicos aislados a partir del árbol sudafricano *Combretum caffrum* (Figura 4).

En los últimos años, el inhibidor del sitio de colchicina, combretastatina A-4 (CA-4), mostró perspectivas prometedoras debido a que inhibe la polimerización de la

tubulina y tiene propiedades citotóxicas. También es capaz de inhibir la angiogénesis de manera que reduce el aporte de oxígeno y nutrientes necesarios para el crecimiento y la proliferación de los tumores.<sup>26</sup> Esta combretastatina es la más potente que se conoce en cuanto a la capacidad de unión a la tubulina y a citotoxicidad, que, a diferencia de la colchicina, se une más rápidamente. Varios profármacos solubles en agua de CA-4 y sus análogos, han entrado en ensayos clínicos, como CA-4P (fosbretabulina), CA-1P (OXi4503) y AVE8062 (Ombrabulina).<sup>27,28,29</sup> Sin embargo, hasta la fecha no se han aprobado, pues su uso clínico se está viendo truncado por la alta toxicidad que ejerce sobre diversos órganos.<sup>30</sup>

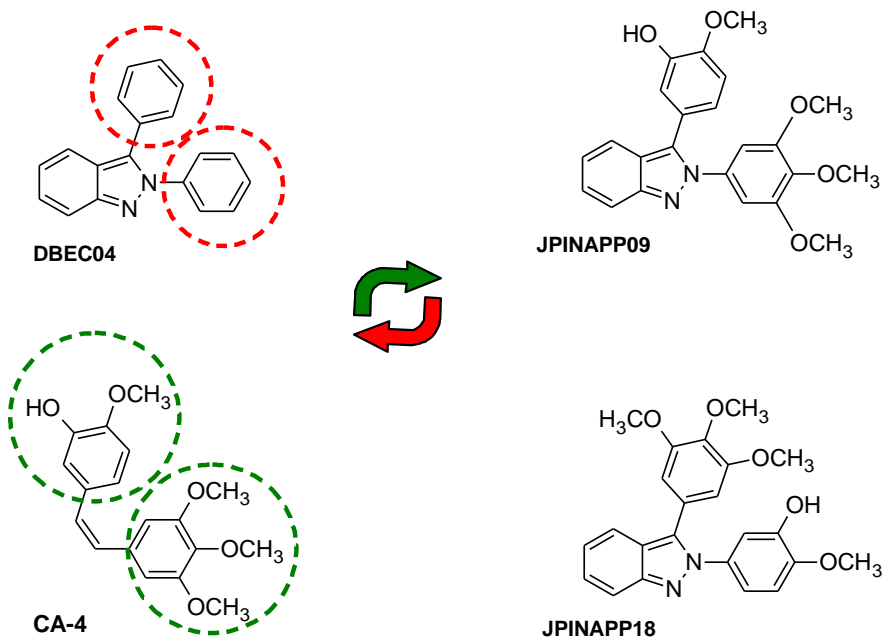


**Figura 4.** Molécula de combretastatina A-4.

## 2.6 Compuestos sintetizados en el laboratorio N-015

Actualmente, los investigadores siguen trabajando para el desarrollo de nuevos CBSI para evaluación como posibles agentes antitumorales. Como se ha descrito anteriormente, los compuestos derivados de combretastatina A-4 son potentes candidatos para el desarrollo de fármacos antitumorales, por otra parte, compuestos con el núcleo indazol poseen muchos tipos de actividades biológicas como antibacterianos, antiinflamatorios, anti-VIH, antiprotozoarios y antimaláricos.<sup>31-36</sup> Recientemente, se ha reportado que una serie de derivados de indazol estructuralmente novedosos, muestran importantes actividades anticancerígenas *in vitro* y/o *in vivo*.<sup>37</sup>

En un trabajo realizado en el laboratorio N-015 de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco, se sintetizaron dos compuestos híbridos basados en la estructura de Combretastatina A-4 y 2,3-Difenil-2*H*-indazol (DBEC04, Esquema 1). Este último, originalmente fue diseñado como un compuesto antiprotozoario, sin embargo, también exhibió actividad citotóxica contra células HeLa ( $CI_{50} = 125 \mu M$ ).<sup>38</sup> Aunque, la potencia de este compuesto es baja, generó un gran interés para desarrollar nuevos agentes citotóxicos, sintetizando derivados de este último con sustituyentes apropiados. Para esto, y con el enfoque de hibridación molecular, se diseñaron y sintetizaron dos compuestos híbridos (JPINAPP09 y JPINAPP18, Esquema 1). La hibridación de ambas moléculas en 2,3-difenil-2*H*-indazol trae consigo la mejora del efecto citotóxico de CA-4 y gana estabilidad al reemplazar el puente de etileno en C-A4, el cual puede isomerizarse fácilmente bajo la influencia del calor, la luz y los medios prácticos a la conformación *trans*, lo que conduce a un derivado menos potente.<sup>39</sup>



**Esquema 1.** Diseño molecular de compuestos híbridos.

A sí mismo, se realizaron estudios *in silico* e *in vitro* sobre tubulina con el propósito de explorar el posible mecanismo de inhibición de los compuestos diseñados. Para tener una idea general e investigar el modo de unión potencial de los derivados de indazol en el sitio de unión a colchicina, se realizaron simulaciones de acoplamiento utilizando Autodock 4.2<sup>40</sup> y la estructura de rayos X del complejo Tubulin-cis-CA-4 (PDB: 5LYJ).<sup>41</sup>

Como se esperaba, CA-4 y Colchicina se acoplaron en el sitio de unión con valores de  $\Delta G$  de -7.45 y -8.24 kcal/mol, respectivamente. Además, se encontró una mejor puntuación de acoplamiento para los compuestos JPINAPP09 (-9.90 kcal/mol) y JPINAPP18 (-9.60 kcal/mol), lo que sugirió una mejor afinidad.

Teniendo en cuenta estos datos, se llevó a cabo un ensayo de polimerización de tubulina *in vitro*, en donde evaluaron el efecto de los compuestos híbridos sobre la polimerización de tubulina usando CA-4 y paclitaxel como controles positivos.

Como se puede observar en la Figura 5, el valor de  $V_{max}$  de polimerización aumentó en presencia del fármaco antimitótico paclitaxel, con respecto al control (84 vs 31 mOD/min). Por otro lado, el fármaco desestabilizador de microtúbulos, combretastatina, redujo el valor de  $V_{max}$  en comparación con el control (31 frente a 9 mOD/min). Los compuestos JPINAPP09 y JPINAPP18 disminuyeron la  $V_{max}$  de polimerización en comparación con el control (8 y 24 frente a 31 mOD/min). Estos resultados sugieren que el compuesto híbrido JPINAPP09 es un inhibidor potencial de la polimerización de tubulina que muestra un efecto similar al de CA-4.

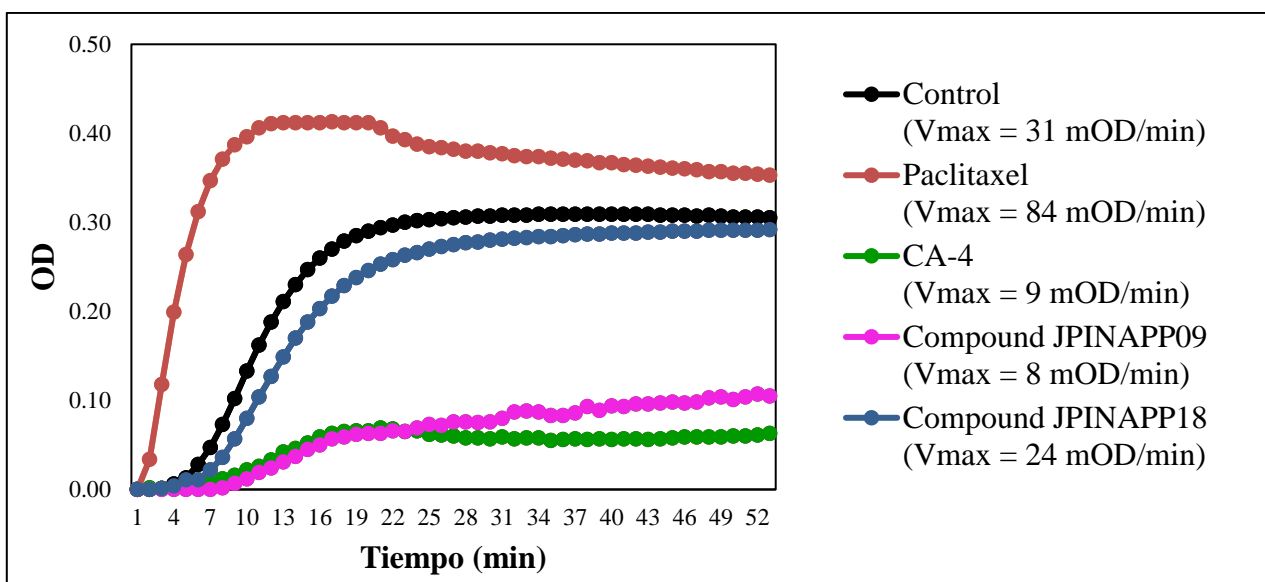


Figura 5. Efecto de los compuestos híbridos JPINAPP09 y JPINAPP18 sobre la polimerización de tubulina.

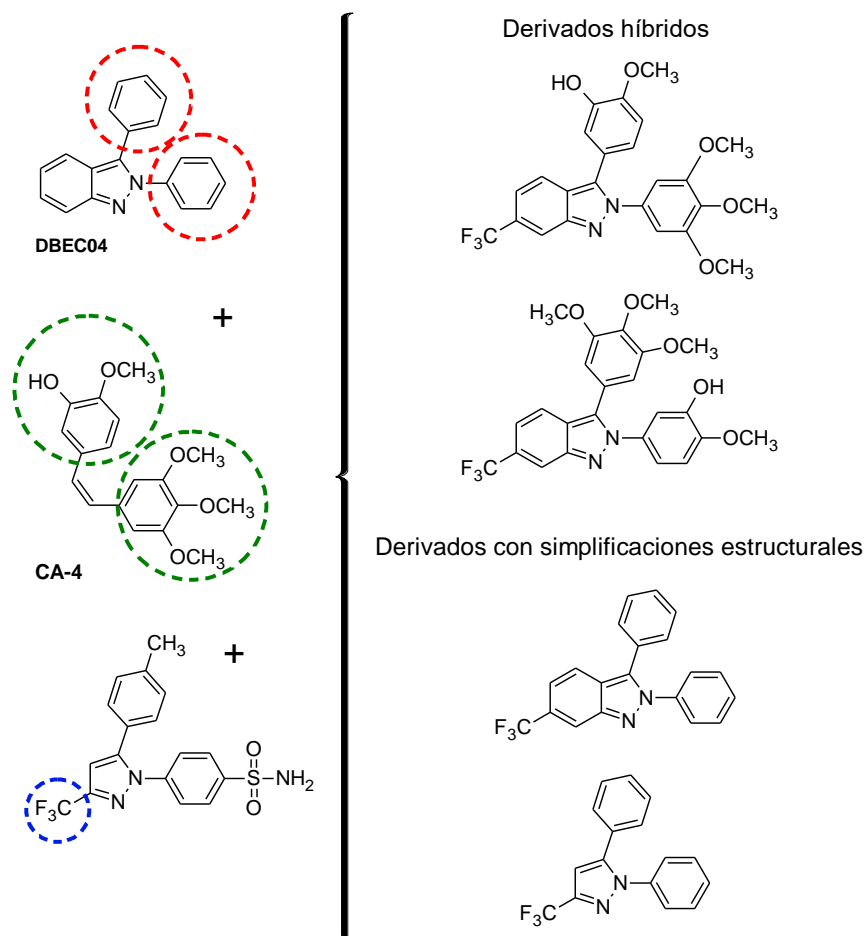
## 2.7 Diseño de los compuestos a sintetizar

Debido a los resultados positivos que arrojaron, los compuestos híbridos JPINAPP09 y JPINAPP18 en los estudios *in silico* e *in vitro*, se propusieron cuatro nuevos compuestos basados en las estructuras de DBCE04, CA-4 y celecoxib (Esquema 2).

Es conocido que los AINES actúan como antiinflamatorios inhibiendo la enzima ciclooxigenasa. Se conocen tres tipos de ciclooxigenasa 1–3, donde el tipo 2 (COX-2) juega un papel importante en el proceso inflamatorio agudo. Existen algunos antiinflamatorios como el celecoxib, cuyo efecto es selectivo contra la ciclooxigenasa 2 y otros que inhiben de manera similar a los tipos 1 y 2.<sup>42</sup> Se conoce que algunas líneas celulares sobreexpresan la COX-2 y algunos autores plantean que juega un papel importante en la proliferación de las células tumorales.

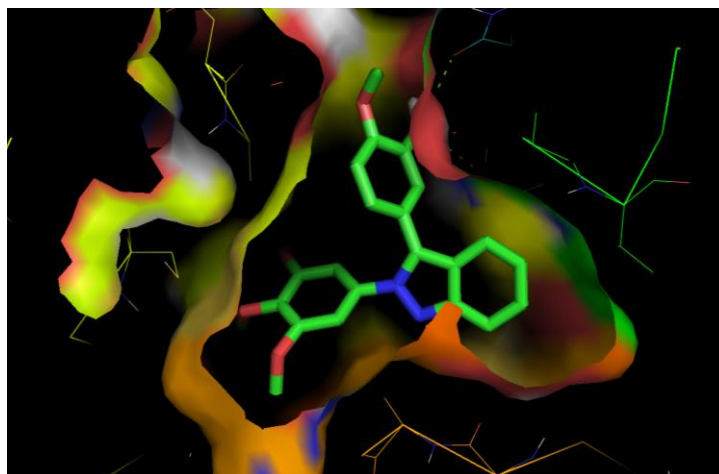
Se ha reportado un número importante de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que también poseen actividad citotóxica frente a líneas tumorales humanas de varios tipos de cáncer.<sup>43</sup> Uno de estos compuestos es el celecoxib, que además de los múltiples reportes de actividad citotóxica que se pueden encontrar,<sup>44</sup> se ha corroborado dicho efecto en el laboratorio N-015 sobre células de leucemia K-562. Los mecanismos por los cuales estos fármacos ejercen dicho efecto citotóxico no son muy claros, pero diversos estudios sugieren múltiples modos de acción.

El efecto antiinflamatorio inherente a los AINES, sumado a la actividad citotóxica observada en los mismos, la potente actividad citotóxica observada en combretastatina A4 y la actividad biológica del 2,3-difenil-2*H*-indazol como anticancerígeno, lleva a plantear que estos compuestos podrían tener un gran potencial como antiinflamatorios, citotóxicos y antimitóticos.



**Esquema 2.** Compuestos híbridos basados en las estructuras de DBCE04, CA-4 y celecoxib.

Una diferencia notable en el diseño de los compuestos híbridos mostrados en el esquema 2, con respecto a los compuestos DBCE04, JPINAPP09 y JPINAPP18 fue que estos dos últimos dejaban lugar a un pequeño espacio en la cavidad del sitio de unión de colchicina (Figura 6), por lo que se optó por agregar un grupo trifluorometilo en la posición 6 de estos.



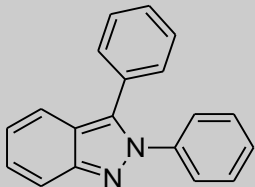
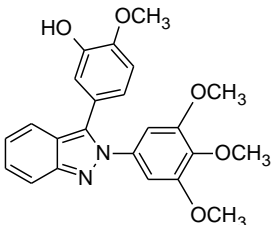
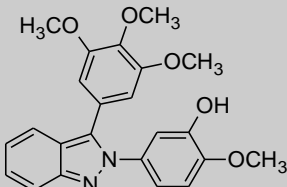
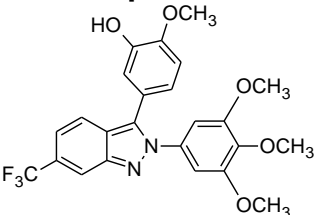
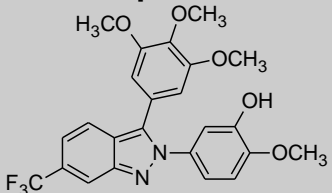
**Figura 6.** Imagen tridimensional del sitio de unión a colchicina acoplado con el compuesto JPINAPP09.

### **2.8 Acoplamiento molecular de los compuestos híbridos.**

Como se muestra en la Tabla 1, se llevó a cabo un acoplamiento molecular con la ayuda de Autodock 4 sobre tubulina en el sitio de unión a colchicina, con el fin de tener una predicción de la actividad esperada de los compuestos **3** y **4**.

Los valores de la energía de unión calculada indican que los compuestos híbridos **3** y **4** tienen una mejor puntuación de acoplamiento que los compuestos DBEC04, JPINAPP09 y JPINAPP18, lo que teóricamente sugiere que deberán tener una mejor afinidad al sitio de unión, pues termodinámicamente la unión se ve favorecida, al tener valores más bajos y, por lo tanto, en las pruebas *in vitro* deberían arrojar resultados favorables.

**Tabla 1.** Resultados de acoplamiento molecular con Autodock 4

Compuesto	Energía de unión calculada (kcal/mol)
<p style="text-align: center;"><b>DBEC04</b></p> 	-8.92
<p style="text-align: center;"><b>JPINAPP09</b></p> 	-9.92
<p style="text-align: center;"><b>JPINAPP18</b></p> 	-9.60
<p style="text-align: center;"><b>Compuesto 3</b></p> 	-10.69
<p style="text-align: center;"><b>Compuesto 4</b></p> 	-9.96



### 3. Planteamiento de problema

El cáncer, en sus diferentes localizaciones y variantes es un importante problema de salud pública a nivel mundial. Actualmente los fármacos antimitóticos, son usados para el tratamiento de este, sin embargo, a pesar de haber experimentado un progreso notable en las últimas décadas, el tratamiento farmacológico del cáncer dista de ser óptimo. El empleo de combinaciones de fármacos ha posibilitado la curación de varios tumores, pero por desgracia, genera diversos efectos secundarios dañinos para los pacientes en tratamiento. Además, se ha visto muchos fracasos en quimioterapia debido al desarrollo de resistencia a los fármacos.

Por estas razones, es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con actividad anticancerígena, que tengan menores efectos secundarios y sean más eficaces que los ya estudiados actualmente.

En el laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM–Xochimilco, se han diseñado nuevos compuestos como posibles agentes antimitóticos, por lo que la presente investigación tiene como objetivo la síntesis de híbridos derivados de 2,3-difenil-2*H*-indazol, combretastatina A4 y celecoxib.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo General

Sintetizar cuatro compuestos diseñados a partir de las estructuras de 2,3-difenil-2*H*-indazol, combretastatina A4 y celecoxib.

#### 4.2 Objetivos específicos

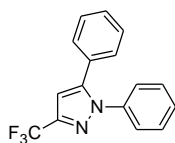
- Sintetizar cuatro derivados del núcleo indazol y pirazol, diseñados a partir de las estructuras de 2,3-difenil-2*H*-indazol, combretastatina A4 y celecoxib.
- Caracterizar la estructura de los productos empleando métodos espectroscópicos (IR y RMN).
- Determinar el efecto sobre la polimerización de la tubulina en un ensayo *in vitro*.
- Determinar el efecto *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer.

## 5. Desarrollo experimental

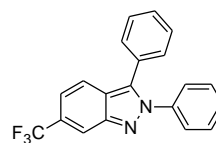
La síntesis y purificación de los compuestos **1–4** (Figura 7), así como sus intermediarios, se realizó en el laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas (N-015) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Para la síntesis de los compuestos, asistida por microondas se utilizó un equipo Anton Paar Monowave 300. Se utilizaron materias primas comerciales de la marca Sigma-Aldrich, además del empleo de disolventes orgánicos grado reactivo de la marca QUÍMICA RIQUE. Para el monitoreo del avance de la reacción, se llevó a cabo cromatografía en capa fina en placas de sílice-gel 60 F254 de la marca Merck. La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílice-gel 60 fase normal, con un tamaño de poro de 0.063-0.2 mm de la marca MACHERY-NAGEL. Para la determinación de los puntos de fusión se utilizó el equipo Melting Point M-565 de la marca BÜCHI. Los compuestos se caracterizaron mediante espectroscopía de infrarrojo, utilizando un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum RX, en pastilla de KBr. Los espectros de Resonancia magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H) y Carbono (RMN-<sup>13</sup>C) se determinaron en un equipo de 600 MHz marca Varian utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y CDCl<sub>3</sub> como disolvente. Dichos equipos están ubicados en el Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco.

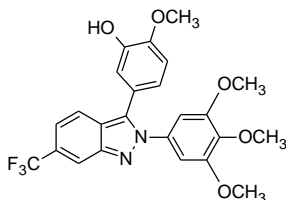
Se utilizó el programa *MestReNova* de Mestrelab Research S.L. para la edición e interpretación de los espectros de RMN.



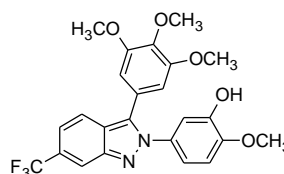
1) 1,5-difenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol



2) 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol



3) 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-3-il)fenol



4) 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-2-il)fenol

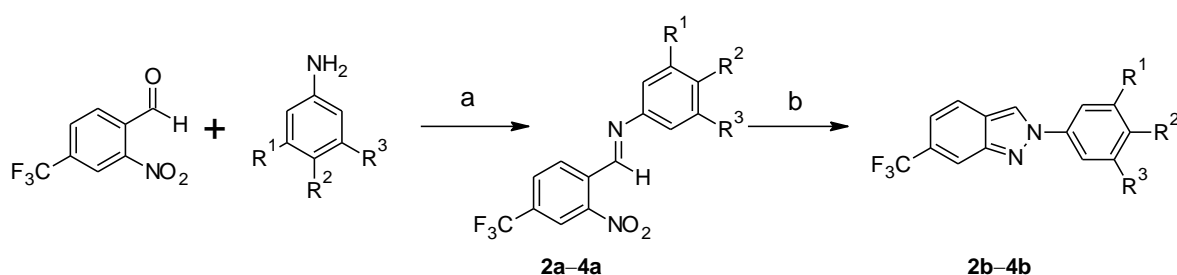
**Figura 7. Derivados híbridos propuestos**

## 5.1 Ruta de síntesis para los compuestos 2, 3 y 4

La síntesis general de los compuestos derivados de 2-fenil-2*H*-indazol **2**, **3** y **4** fue llevada a cabo empleando en primer lugar, el método de Cadogan con una ligera modificación. Posteriormente, se realizó una bromación sobre la posición 3 del núcleo de indazol y un acoplamiento de Suzuki para dar los compuestos finales (Esquema 4).

### 5.1.1 Síntesis de intermediarios a y b: método de Cadogan

En un vial para microondas de 10 mL se agregaron 2-nitro-4-trifluorometilbenzaldehído (1.114 mmol), la anilina con el patrón de sustitución deseado (1.114 mmol) y 3 mL de etanol grado reactivo. La mezcla fue calentada a 160°C bajo irradiación de microondas por 10 minutos. El producto se transfirió a un matraz bola y posteriormente se evaporó el disolvente. El residuo de la evaporación fue tratado con fosfito de trietilo y se calentó a reflujo a 150°C de 2 a 3 horas hasta observar el consumo total de la materia prima por cromatografía en capa fina. Posteriormente, el fosfito en exceso fue oxidado con 20 mL de peróxido de hidrógeno al 5%. El producto fue extraído con tres porciones de 20 mL de acetato de etilo, las fases orgánicas se juntaron, fueron lavadas con 10 mL de solución saturada de cloruro de sodio y se trataron con sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se filtró, se evaporó y finalmente el producto fue purificado usando cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria sílice-gel 60 fase normal y hexano-acetato de etilo como fase móvil 95:5 para el compuesto **2b** y 90:10 para los compuestos **3b** y **4b**.



**2a, 2b:**  $R^1 = R^2 = R^3 = H$

**3a, 3b:**  $R^1 = R^2 = R^3 = OCH_3$

**4a, 4b:**  $R^1 = OH$   $R^2 = OCH_3$   $R^3 = H$

Reactivos y condiciones. a) EtOH, microondas, 160 °C, 10 min.; b)  $P(OEt)_3$ , 150 °C, 2–3 h.

**Esquema 4.** Síntesis de intermediarios **2a-4a** y **2b-4b**.

### 5.1.2 2-fenil-6-(trifluorometil)-2*H*-indazol (2b)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.1.1 se obtuvo 79 de un polvo color blanco con punto de fusión de 123.1 °C.

IR (KBr) en  $\text{cm}^{-1}$ : 3132.21, 3067.45, 1595.99, 1465.13, 1363.81, 1340.08, 1264.58, 1249.81, 1139.48, 1042.64, 820.32, 761.72, 734.18.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.48 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 8.15 – 8.12 (m, 1H), 7.93 – 7.89 (m, 2H), 7.84 – 7.80 (m, 1H), 7.58 – 7.53 (m, 2H), 7.47 – 7.43 (m, 1H), 7.28 (dd,  $J = 8.8, 1.4$  Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.14 (s), 140.16 (s), 129.69 (s), 128.78 (q,  $J = 31.8$  Hz), 128.54 (s), 124.40 (q,  $J = 272.6$  Hz), 123.65 (s), 121.73 (s), 121.13 (s), 120.90 (s), 118.24 (q,  $J = 3.0$  Hz), 116.54 (q,  $J = 5.0$  Hz).

### 5.1.3 6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol (3b)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.1.1 se obtuvo 80% de un polvo color blanco con punto de fusión de 143.2 °C.

IR (KBr) en  $\text{cm}^{-1}$ : 3012.96, 2826.33, 1609.49, 1451.78, 1429.93, 1328.78, 1258.76, 1237.92, 1169.12, 816.52.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.45 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J = 8.8, 1.4$  Hz, 1H), 7.13 (s, 2H), 3.98 (s, 6H), 3.92 (s, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.87 (s), 147.99 (s), 138.21 (s), 136.14 (s), 128.80 (q,  $J = 31.9$  Hz), 124.39 (q,  $J = 271.9$  Hz), 123.58 (s), 121.68 (s), 121.19 (s), 118.31 (q,  $J = 3.0$  Hz), 116.38 (q,  $J = 5.0$  Hz), 61.11 (s), 56.43 (s).

### 5.1.4 2-metoxi-5-[6-(trifluorometil)-2*H*-indazol-2-yl]fenol (4b)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.1.1 se obtuvo 79% de un polvo color café claro, con punto de fusión de 121.0 °C.

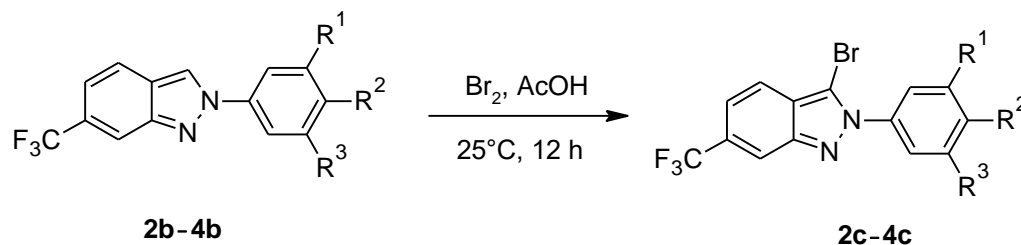
IR (KBr) en  $\text{cm}^{-1}$ : 3137.30, 1597.85, 1520.54, 1474.46, 1446.40, 1416.27, 1355.13, 1330.08, 1282.84, 1257.82, 1231.66, 1190.41, 1168.92, 1047.63, 1016.42, 820.13, 808.71, 761.89, 746.11, 642.08, 670.65.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.38 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.47 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 5.88 (s, 1H), 3.98 (s, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.91 (s), 146.79 (s), 146.37 (s), 134.21 (s), 128.53 (m), 124.44 (q,  $J = 272.3$ ), 123.56 (s), 121.57 (s), 120.85 (s), 118.05 (q,  $J = 2.9$  Hz), 116.35 (q,  $J = 5.0$  Hz), 112.85 (s), 110.89 (s), 108.12 (s), 56.23 (s).

## 5.2 Síntesis de intermediarios 2c-4c por medio de la bromación en C-3

El derivado apropiado de 2-fenil-2*H*-indazol **2b–4b** (0.95 mmol) se disolvió en 10 mL de ácido acético glacial. La solución formada fue tratada gota a gota con una segunda solución de bromo 1 M en ácido acético (1.1 equivalentes de  $\text{Br}_2$ ). Posteriormente, se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se vertió en un vaso de precipitados con agua fría y se agitó. El sólido obtenido se filtró al vacío y se secó. Esto último para obtener los intermediarios **2c** y **3c**. Para el intermediario **4c**, la mezcla obtenida de la reacción se neutralizó con una solución saturada de carbonato de sodio y posteriormente se extrajo con tres porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro y finalmente se concentró en el rotavapor. Los productos de las distintas reacciones mostraron una sola mancha por cromatografía en capa fina y se usaron de esta forma para la siguiente reacción.



**2c:**  $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$

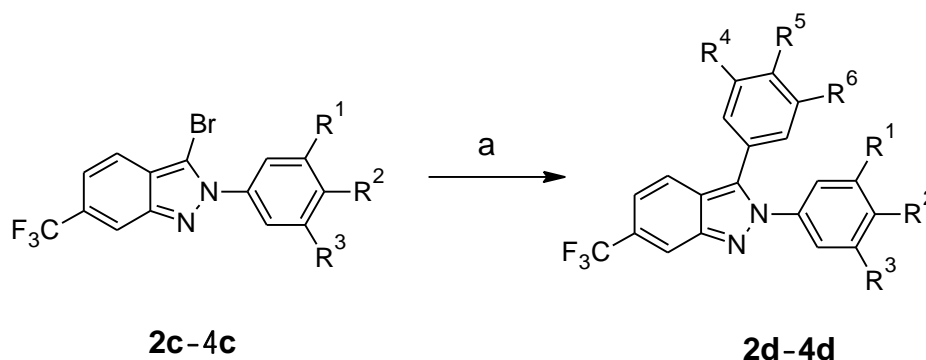
**3c:**  $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{OCH}_3$

**4c:**  $\text{R}^1 = \text{OH}$   $\text{R}^2 = \text{OCH}_3$   $\text{R}^3 = \text{H}$

**Esquema 5.** Síntesis de intermediarios **2c–4c**.

### 5.3 Síntesis de los productos finales 2d-4d mediante la reacción de acoplamiento de Suzuki

En un vial de microondas de 10 mL se añadió el 3-bromoindazol adecuadamente sustituido (compuestos **2c–4c**, 0.73 mmol), el ácido o éster fenil borónico sustituido (0.81 mmol), acetato de paladio II (0.0073 mmol), trifenilfosfina (0.022 mmol), carbonato de sodio (0.87 mmol), agua (0.6 mL) y *n*-propanol (3 mL). La mezcla fue calentada a 150 °C en un reactor de microondas por 20 minutos. Una vez terminada la reacción, se agregaron 15 mL de agua y posteriormente se extrajo tres veces con 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con solución saturada de cloruro de sodio (15 mL), secada con sulfato de sodio anhidro y finalmente se concentró al vacío en un rotavapor. El producto fue purificado por cromatografía en columna empleando como fase móvil hexano-acetato de etilo 80:20 para el compuesto **2** y **4**; y 75:25 para el compuesto **3**.



**2d:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H, R<sup>5</sup> = H, R<sup>6</sup> = H

**3d:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> = OH, R<sup>5</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = H

**4d:** R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>5</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = OCH<sub>3</sub>

*Reactivos y condiciones:* a) Ácido o éster fenilborónico sustituido, Pd(AcO)<sub>2</sub>, (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>P, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, *n*-propanol, agua, Microondas, 150 °C, 20 min.

#### **Esquema 6. Síntesis de los productos finales.**

#### 5.3.1 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2*H*-indazol (**2**)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3 se obtuvo 90 % de un polvo color blanco con punto de fusión de 120.6 °C.

IR (KBr) en cm<sup>-1</sup>: 3067.19, 2928.58, 1513.71, 1498.14, 1465.13, 1363.81, 1340.08, 1319.57, 1264.58, 1249.81, 1159.43, 1139.48, 820.32, 761.72.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.13 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 8H), 7.37 – 7.34 (m, 2H), 7.30 (dd,  $J = 8.8, 1.4$  Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.41 (s), 139.81 (s), 136.13 (s), 129.63 (s), 129.17 (s), 129.11 (s), 128.93 (s), 128.78 (s), 128.74 (s), 125.92 (s), 124.42 (m), 122.65 (s), 121.96 (s), 118.19 (q,  $J = 3.0$  Hz), 116.35 (q,  $J = 4.9$  Hz).

### 5.3.2 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-3-il) fenol (3)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3 se obtuvo 70 % de un polvo color blanco con punto de fusión de 177.5 °C.

IR (KBr) en  $\text{cm}^{-1}$ : 3448.05, 2938.12, 1602.33, 1522.54, 1362.85, 1330.23, 1262.73, 1238.88, 1228.08, 1176.70, 1139.61, 1041.60, 1015.22, 813.14, 668.73.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.10 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J = 8.8, 1.4$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.84 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1H), 6.68 (s, 2H), 5.80 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.73 (s, 6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.22 (s), 147.14 (s), 147.03 (s), 145.89 (s), 138.10 (s), 135.99 (s), 135.42 (s), 129.07 (q,  $J = 31.7$ ), 124.44 (q,  $J = 272.5$ ), 122.56 (s), 122.26 (s), 122.09 (s), 121.93 (s), 117.99 (q,  $J = 2.8$  Hz), 116.10 (q,  $J = 5.1$  Hz), 115.58 (s), 110.86 (s), 103.45 (s), 61.06 (s), 56.19 (s), 56.04 (s).

### 5.3.3 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-2-il) fenol (4)

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3 se obtuvo 27.50 % de un polvo color blanco con punto de fusión de 164.2 °C.

IR (KBr) en  $\text{cm}^{-1}$ : 3482.60, 2940.03, 1587.92, 1465.96, 1437.73, 1420.23, 1338.84, 1256.19, 1245.53, 1168.06, 1129.33, 1114.28, 1046.15, 1023.53, 763.88, 740.61, 694.12, 670.32.

RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11 (s, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J = 8.8, 1.3$  Hz, 1H), 7.10 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.91 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.56 (s, 2H), 5.92 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.74 (s, 6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.45 (s), 147.00 (d,  $J = 19.1$  Hz), 145.89 (s), 138.36 (s), 136.07 (s), 133.40 (s), 128.93 (q, 32.1), 124.43 (q, 272.2), 124.39 (s), 122.22 (s), 121.87 (s), 118.11 (q,  $J = 2.8$  Hz), 117.83 (s), 116.29 (q,  $J = 4.9$  Hz), 112.71 (s), 110.26 (s), 106.80 (s), 61.00 (s), 56.20 (s), 56.15 (s).

#### 5.4 Ensayo de polimerización de tubulina

Los compuestos **3** y **4** fueron evaluados como inhibidores de polimerización de tubulina. Los ensayos *in vitro* se realizaron utilizando el ensayo comercial fabricado por Cytoskeleton, Inc., número de catálogo BK006P (Denver, CO, EE. UU.). Los compuestos **3**, **4**; las referencias paclitaxel y CA-4 se probaron a 10  $\mu\text{M}$ . Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

#### 5.5 Ensayo de actividad citotóxica

Los compuestos fueron evaluados sobre dos líneas celulares de cáncer: HeLa (cervicouterino) y K562 (leucemia). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), manteniéndolas en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 95% de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ ). Las células se dejaron crecer a una densidad del 80% y luego se cosecharon usando PBS/EDTA estéril (pH 7.4) antes de comenzar cada experimento. Las células se sembraron en placas de 96 pozos (7 000 células/pozo). Después de 24 h, las células se expusieron a los compuestos de prueba disueltos en DMSO a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , para alcanzar 250  $\mu\text{L}$  en el pozo. El tiempo de exposición fue de 48 h, y luego se determinó la viabilidad mediante el ensayo de sulforrodamida B.



## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Parte química

De acuerdo con los resultados obtenidos, no fue posible obtener el compuesto **1**, pues el punto de fusión, así como las señales obtenidas en el espectro de resonancia magnética nuclear e infrarrojo no coinciden con los datos descritos en la literatura, pues el punto de fusión reportado para este compuesto es de 86–88<sup>45-46</sup> °C, muy diferente al obtenido (102.3 °C), por lo que se concluye que el producto final no corresponde al compuesto deseado.<sup>45</sup> Las señales del espectro infrarrojo conocidas para este compuesto, muestran la aparición de tres señales características en la frecuencia de vibración de 1496, 1236 y 1122 cm<sup>-1</sup>. Sin embargo, en el espectro que se obtuvo se observan señales en 3477.18, 3065.85, 1489.60, 1301.85, 1228.92 y 1161.58, muy parecidas a lo descrito, no obstante, la señal intensa a 3477.18 sugiere la presencia de una amina aromática secundaria que no debería aparecer.

Para los espectros de resonancia magnética nuclear, las señales reportadas en la literatura son: RMN <sup>1</sup>H δ 7.37–7.21 (m, 10H), 6.76 (s, 1H) y <sup>13</sup>C RMN δ 144.6, 143.1 (q, *J* = 38.1 Hz), 139.1, 129.1, 129.0 (2C), 129.0, 128.8 (2C), 128.7 (2C), 128.4, 125.4 (2C), 121.3 (q, *J* = 268.9 Hz), 105.5 (q, *J* = 1.9 Hz)<sup>45</sup> las cuales, no concuerdan con los espectros experimentales obtenidos. Estos resultados sugieren que la ciclación del anillo pirazol no se llevó a cabo.

Por otra parte, los compuestos **2–4** fueron sintetizados de manera exitosa mediante la metodología descrita anteriormente. Al pasar por varias etapas de reacción para llegar al producto final, los primeros intermediarios correspondientes a la metodología 5.1.1 (compuestos **2b**, **3b** y **4b**) fueron purificados por cromatografía en columna, por lo que también se determinó su estado físico, punto de fusión, infrarrojo, RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, todo esto con el fin de asegurar que el compuesto obtenido en la primera fase de la síntesis correspondiera al intermediario esperado y así continuar con la reacción siguiente. Para el caso de los intermediarios **3c**, **4c** y **5c**, no se obtuvieron estos datos debido a que no era necesaria la purificación para su uso en la siguiente reacción.

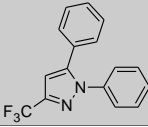
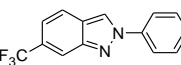
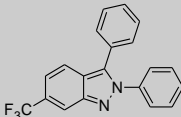
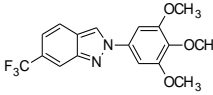
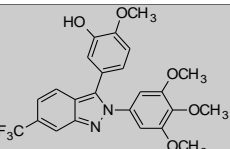
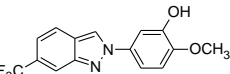
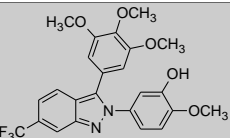
El rendimiento de los intermediarios **2b**, **3b** y **4b** fueron buenos (70-80%). Por otro lado, los rendimientos de los compuestos finales variaron pues los rendimientos obtenidos de **2** y **3** fueron altos (90 y 70 % respectivamente), sin embargo, no fue el caso para el compuesto **4** (**27%**).

De manera general, para los compuestos **4b**, **4c** y **4** se obtuvieron los rendimientos más bajos, esto se debió en gran parte a varios problemas durante el proceso de síntesis, pues en la reacción de ciclación con fosfito de trietilo una hora después

iniciada la reacción, se observó mediante el monitoreo en cromatografía en capa fina la formación de varios subproductos, por lo cual tuvo que ser detenida y tratada de esa forma. Debido a esta acción, no se logró consumir de manera total la materia prima. De manera similar, en la reacción de bromación, después de terminar el tiempo establecido se observó presencia de materia prima, sin embargo, se optó por tratar así el producto, pues de agregarle más solución de bromo, hubiera podido resultar en la bromación de otras posiciones, por lo que se tuvo que tratar una vez que el tiempo de reacción terminó. Finalmente, la reacción de acoplamiento de Suzuki presenta rendimientos bajos cuando el sustrato contiene donadores de hidrógeno como en este caso el hidroxilo. Teniendo en cuenta todos estos factores, se puede afirmar que todo esto tuvo un gran impacto en el rendimiento final y por tanto, se obtuvo muy poco producto.

La descripción y las propiedades de los compuestos se muestra en la Tabla 2.

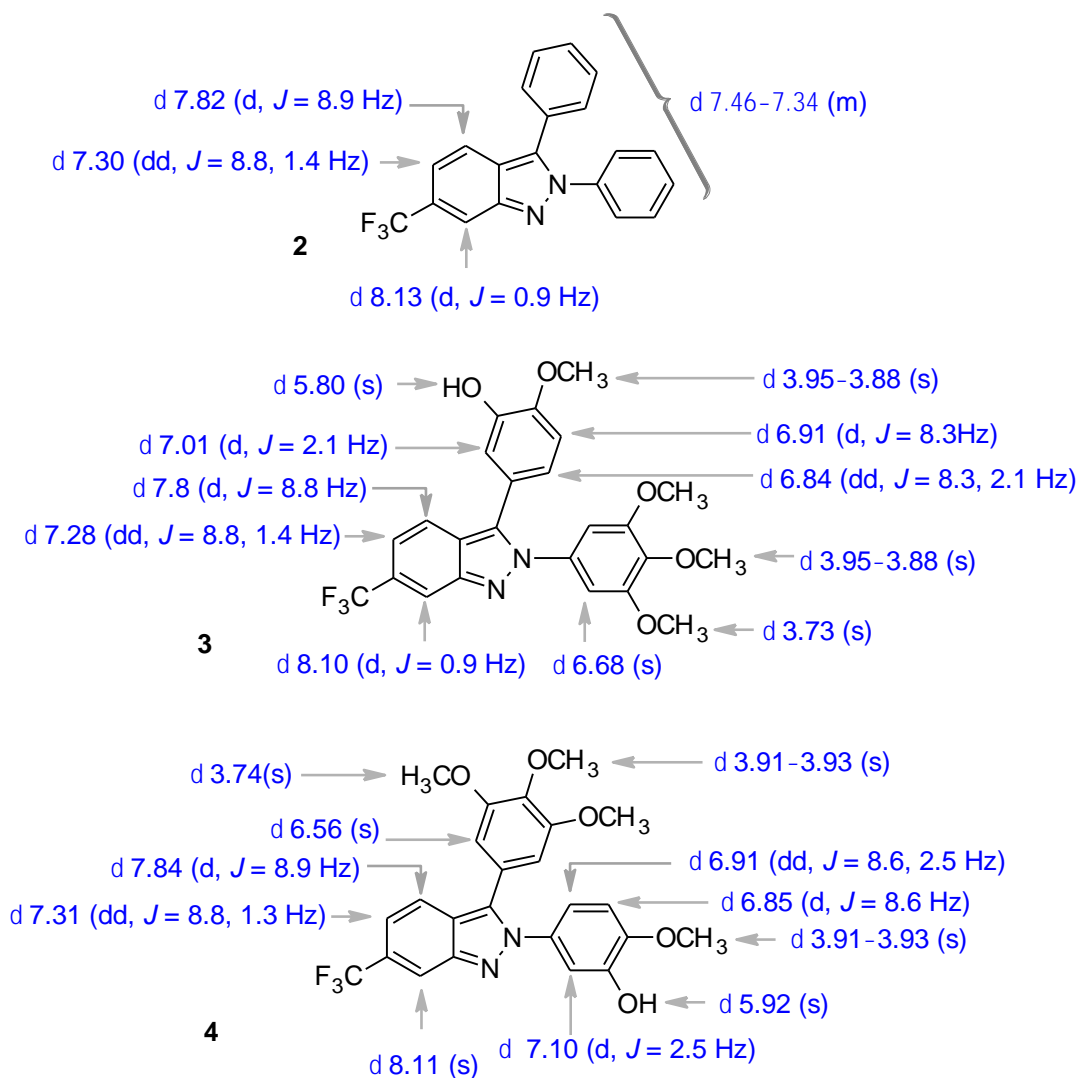
**Tabla 2.** Resultados de la síntesis química de los compuestos sintetizados

<b>Compuesto</b>	<b>PM (g/mol)</b>	<b>Estado físico</b>	<b>Punto de fusión (°C)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
	288.27	*	*	*
	262.22	Polvo blanco	122.1-123	79
	338.32	hojuelas blancas	117.7-120.6	90
	352.30	Polvo blanco	142-143.2	80
	474.42	Polvo blanco	176-177.5	70
	308.25	Polvo café	119.7-121	79
	474.42	Polvo blanco	163.1-164.2	27

\*Debido a que el producto final de la síntesis no coincidió con el compuesto de interés, se desconocen los datos.

## 6.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

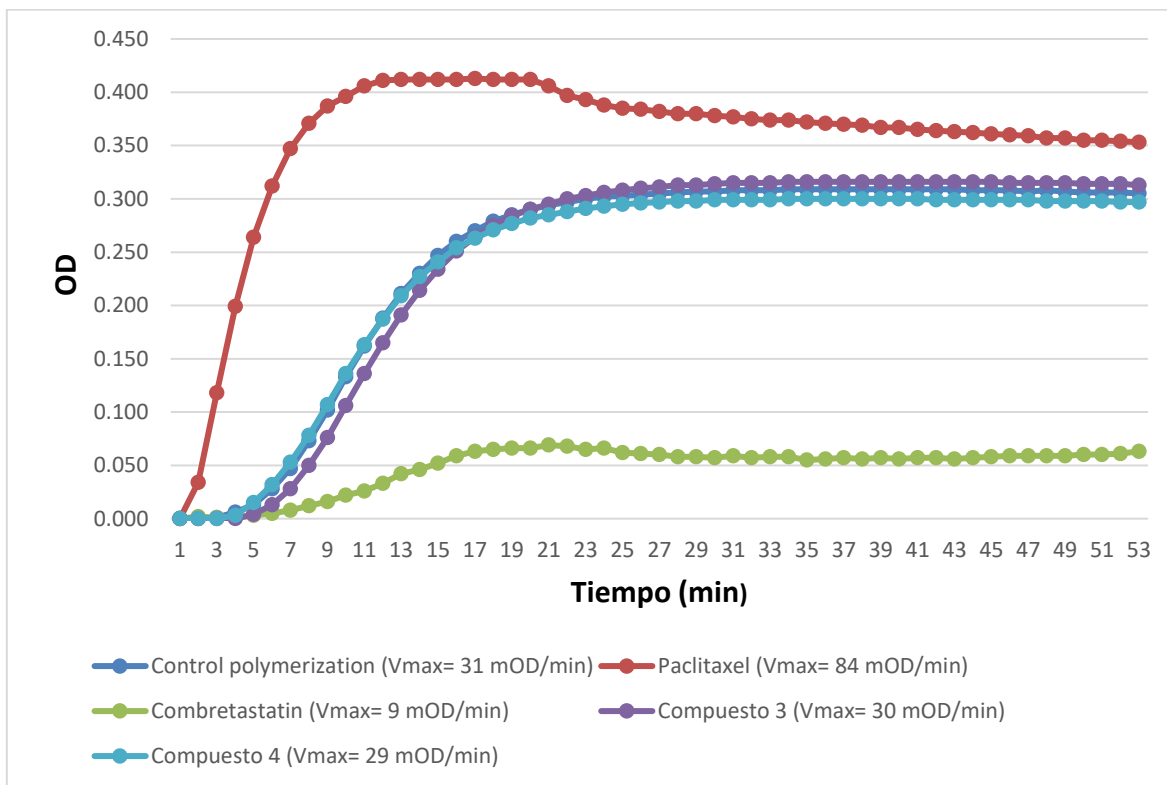
La asignación de las señales de resonancia magnética de hidrógeno se muestra en la Figura 8. Se pueden observar las señales típicas para los bencenos mono, tri y tetra sustituidos. De manera global, las señales observadas en los espectros de protón, su multiplicidad y su integración concuerdan con las estructuras propuestas. Por otra parte, el número de señales en los espectros de carbono concuerda con lo esperado para cada estructura. Es importante mencionar que se observan cuatro señales cuadruples con diferentes constantes de acoplamiento, que se deben a la presencia del grupo trifluorometilo, por ejemplo, para el compuesto **3**,  $\delta$  129.07 (q,  $J=31.7$ ), 124.44 (q,  $J=272.5$ ), 117.99 (q,  $J=2.8$  Hz), 116.10 (q,  $J=5.1$  Hz); aunque en algunos casos es difícil apreciar en su totalidad este tipo de señal, sobre todo en aquellas arriba de 120 ppm y con mayores constantes de acoplamiento, ya que parte de la señal se traslapa con otra o apenas se aprecia entre el ruido del espectro. Es importante mencionar que, aunque se puede sugerir a que carbono corresponde cada señal con base en su intensidad, multiplicidad y desplazamiento químico, para la asignación inequívoca es necesaria la adquisición de espectros bidimensionales.



**Figura 8.** Asignación de señales de los espectros RMN  $^1\text{H}$ .

### 6.3 Ensayo de polimerización de tubulina *in vitro*

La Figura 9 muestra las reacciones de polimerización de control solas o en presencia de paclitaxel, CA-4 y los compuestos **3** y **4**. El valor de  $V_{max}$  de polimerización aumentó 2.7 veces en presencia del paclitaxel con respecto al control (84 vs 31 mOD/min). Por otro lado, el fármaco desestabilizador de microtúbulos (CA-4) redujo 3.4 veces el valor de  $V_{max}$  en comparación con el control (31 frente a 9 mOD/min). Los compuestos **3** y **4** no disminuyeron la  $V_{max}$  de polimerización, pues solo se observó la disminución 1.03 y 1.06 veces, respectivamente en comparación con el control (30 y 29 frente a 31 mOD/min). Estos resultados muestran que los compuestos híbridos **3** y **4** no son inhibidores de la polimerización de la tubulina, al menos a la concentración evaluada.



**Figura 9.** Efecto de los compuestos híbridos **3** y **4** sobre la polimerización de tubulina. Todos los compuestos se incluyeron a una concentración final de 10  $\mu$ M.

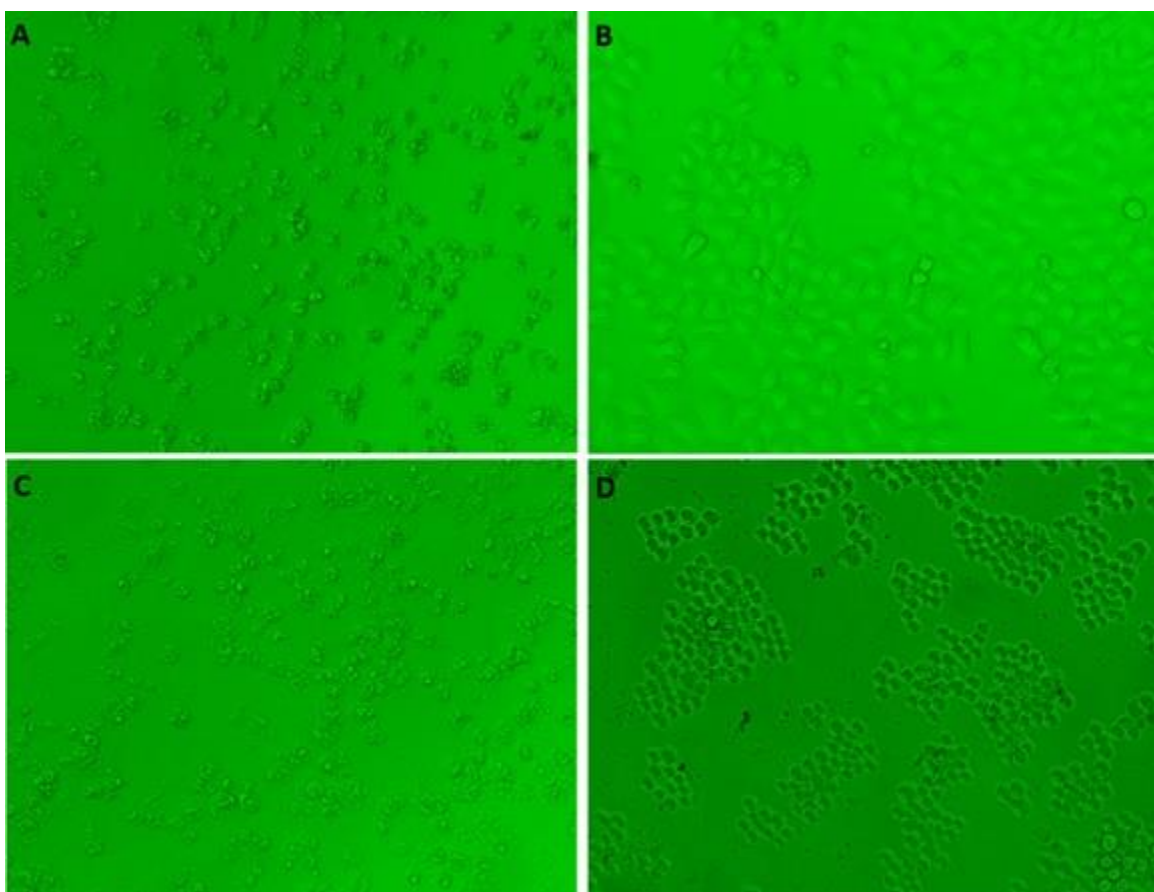
#### 6.4 Ensayos de evaluación citotóxica *in vitro*

Los compuestos fueron evaluados de manera preliminar a concentración de 50  $\mu$ M sobre células HeLa (cáncer cervicouterino) y K562 (leucemia). Los resultados muestran que los compuestos **3** y **4** tuvieron buen efecto a la concentración evaluada, presentando una viabilidad menor al 50% en ambos casos contra ambas líneas celulares (Tabla 3). Es importante mencionar que el efecto citotóxico disminuye en el compuesto **2**, por lo tanto, este resultado sugiere la importancia de los sustituyentes sobre los fenilos de las posiciones 2 y 3 del núcleo de indazol para presentar mejor efecto citotóxico, no obstante, no hay diferencia entre los resultados para **3** y **4** en este ensayo. Adicionalmente, el ensayo negativo sobre la tubulina sugiere que los compuestos deben ser evaluados a mayor concentración en el ensayo de polimerización y someterse a otros ensayos donde se pueda observar su interacción con tubulina. En este sentido, si los compuestos presentan actividad citotóxica y no tienen efecto en el ensayo de tubulina, es posible que esté involucrado un mecanismo de acción diferente.

**Tabla 3.** Viabilidad celular  $\pm$  error estándar de la media sobre células HeLa y K562 tratadas con los compuestos **2**, **3** y **4** a concentración de 50  $\mu$ M

Compuesto	HeLa	K562
<b>2</b>	78.42 $\pm$ 6.76	54.70 $\pm$ 0.84
<b>3</b>	35.72 $\pm$ 11.85	32.82 $\pm$ 13.37
<b>4</b>	23.23 $\pm$ 2.87	28.09 $\pm$ 5.64

Adicionalmente, las imágenes de microscopía de campo claro revelan que las células pierden su morfología clásica al ser tratadas con los compuestos. La Figura 10 muestra un ejemplo de células HeLa y K562 tratadas con el compuesto **4** a concentración de 50  $\mu$ M.



**Figura 10.** Microscopía de campo claro para células HeLa tratadas con compuesto **4** (A) y DMSO (B); células K562 tratadas con compuesto **4** (C) y DMSO (D).

## 7. Objetivos y metas alcanzadas

- Tres de los cuatro compuestos diseñados a partir de las estructuras de celecoxib, 2,3-difenil-2*H*-indazol (DBEC04) y combretastatina A4, se lograron sintetizar en la cantidad requerida para su caracterización y evaluación biológica.
- No se logró sintetizar el compuesto derivado con núcleo pirazol, diseñado a partir de las estructuras de celecoxib y DBEC04.
- Se caracterizaron tres de los cuatro compuestos planteados, empleando métodos espectroscópicos.
- Los compuestos **3** y **4** fueron evaluados *in vitro* frente a tubulina.
- Los compuestos **2**, **3** y **4** fueron evaluados *in vitro* frente a dos líneas celulares de cáncer.

## 8. Conclusión

En el presente trabajo se lograron sintetizar tres de los cuatro compuestos propuestos derivados de 2,3-difenil-2*H*-indazol, combretastatina y celecoxib. Al ser moléculas nuevas, marcaron un gran reto en todo el proceso de síntesis.

A pesar de no haber podido sintetizar el compuesto **1**, es posible que, aplicando otras condiciones sea posible conseguirlo, por lo que se necesita poner en práctica diversas metodologías.

Por otra parte, aunque los resultados que arrojaron los compuestos **3** y **4** en el estudio de polimerización fueron negativos, el efecto citotóxico sobre líneas celulares es alentador, pues disminuyen la viabilidad celular y dañan las células de manera clara a concentración de 50  $\mu\text{M}$ .

## 9. Referencias

1. Cotran, S.R., Robbins, S.L., and Kumar, V. (1999). Patología estructural y funcional. Editorial McGraw-Hill.
2. Stacker, S.A., Achen, M.G., Jussila, L., Baldwin, M.E., and Alitalo, K. (2002). Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2, 573-583.
3. Gomes, F.G., Nedel, F., Alves, A.M., Nor, J.E., and Tarquinio, S.B. (2012). Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life sciences*.
4. Jordan, A., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., and McGown, A.T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 18, 259-296.
5. Organización mundial de la salud. Cáncer. Citada 10 de noviembre del 2019 en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
6. Dorland, (2003) Dorland Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. Madrid.
7. Lake, R.A., and Robinson, B.W. (2005). Immunotherapy and chemotherapy-- a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 5, 397-405.
8. Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-885.
9. Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 790-803.
10. Taylor, M., and Reide, P. (2001). Lo esencial en farmacología. Harcourt.
11. Morris, P.G., and Fornier, M.N. (2008). Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res* 14, 7167-7172.
12. Mukhtar, E., V.M. Adhami, H. Mukhtar (2014) Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 13(2): 275-284.
13. Field, J.J., J.F. Diaz, J.H. Miller (2013). The binding sites of microtubule-stabilizing agents. *Chem Biol* 20(3): 301-315.
14. Akhmanova, A., Steinmetz, M.O. (2015) Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 711-726.
15. Parker, A. L., Teo, W. S., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2017). An Emerging Role for Tubulin Isoforms in Modulating Cancer Biology and Chemotherapy Resistance. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1434. doi:10.3390/ijms18071434
16. Ferrer J, Sanchez-Lamar A. (2015). Blancos mitóticos de drogas naturales y nuevas estrategias para la terapia anti-cáncer. *Rev Cuba Cienc Biol* 4(2):3-15.
17. Steinmetz, M. O., & Protá, A. E. (2018). Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends in cell biology*, 28(10), 776-792.
18. Tangutur, D. Kumar, K.V. Krishna, S. Kantevari. (2017). Microtubule targeting agents as cancer chemotherapeutics: an overview of molecular

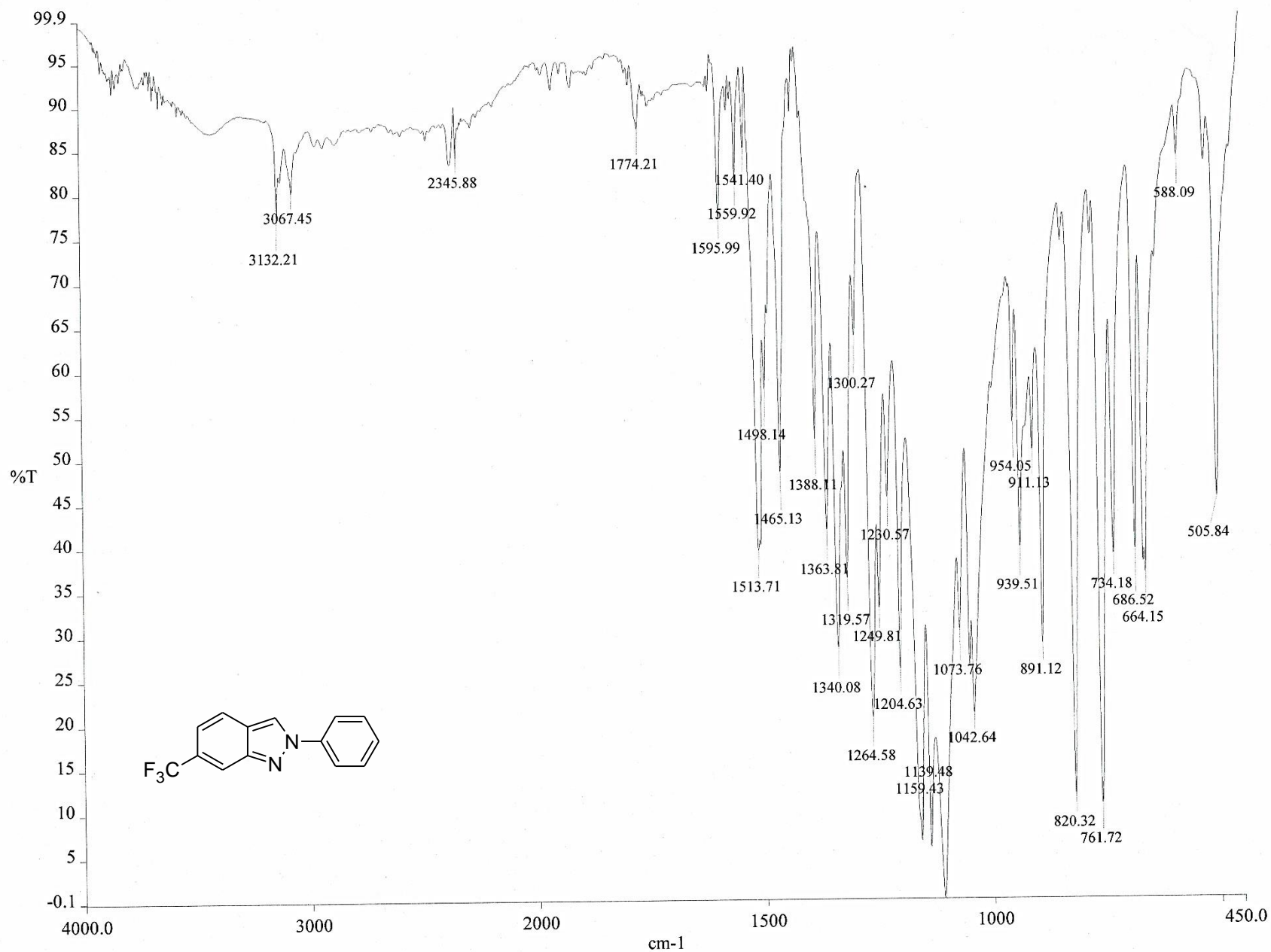


- hybrids as stabilizing and destabilizing agents *Curr. Top. Med. Chem.*, 17 pp. 2523-2537
19. A. Vicente, Blazquez, M. Gonzalez, R. Alvarez, S. DelMazo, M. Medarde, R. Pelae. (2019). Antitubulin sulfonamides: the successful combination of an established drug class and a multifaceted target *Med. Res. Rev.*, 39, pp. 5-830
  20. Bates, D., & Eastman, A. (2017). Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *British journal of clinical pharmacology*, 83(2), 255-268.
  21. Ogden, A., Rida, P. C., Reid, M. D., & Aneja, R. (2014). Interphase microtubules: chief casualties in the war on cancer?. *Drug discovery today*, 19(7), 824-829.
  22. Fürst, R., & Vollmar, A. M. (2013). A new perspective on old drugs: non-mitotic actions of tubulin-binding drugs play a major role in cancer treatment. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(7), 478-483.
  23. Seligmann, J., & Twelves, C. (2013). Tubulin: an example of targeted chemotherapy. *Future medicinal chemistry*, 5(3), 339-352.
  24. Florian S, Mitchison TJ. Anti-microtubule drugs. En: Chang P, Ohi R, editores. *The Mitotic Spindle: Methods in molecular biology*, vol 1413. *Humana Pre. New York*; 2017. p. 403-21.
  25. Tigrili C. Estudio y caracterización del mecanismo de acción bioquímico y celular de compuestos antitumorales dirigidos contra el citoesqueleto [Tesis doctoral Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2013. [citado el 12 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/22847/>
  26. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W., & Miller, D. D. (2012). An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical research*, 29(11), 2943–2971. doi:10.1007/s11095-012-0828-z
  27. Li, L., Jiang, S., Li, X., Liu, Y., Su, J., & Chen, J. (2018). Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *European journal of medicinal chemistry*, 151, 482-494.
  28. Garon, E. B., Neidhart, J. D., Gabrail, N. Y., de Oliveira, M. R., Balkissoon, J., & Kabbinar, F. (2016). A randomized Phase II trial of the tumor vascular disrupting agent CA4P (fosbretabulin tromethamine) with carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy*, 9, 7275.
  29. J.Y. Blay, Z. Papai, A.W. Tolcher, A. Italiano, D. Cupissol, A. Lopez-Pousa, S.P. Chawla, E. Bompas, N. Babovic, N. Penel, N. Isambert, A.P. Staddon, E. Saada-Bouzid, A. Santoro, F.A. Franke, P. Cohen, S., G.D. (2015). Demetri. Ombrabulin plus cisplatin versus placebo plus cisplatin in patients with advanced soft-tissue sarcomas after failure of anthracycline and ifosfamide chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial *Lancet Oncol.*, 16, pp. 531-540
  30. Zhou, P., Liu, Y., Zhou, L., Zhu, K., Feng, K., Zhang, H., ... & Wang, Y. (2016). Potent antitumor activities and structure basis of the chiral  $\beta$ -lactam bridged

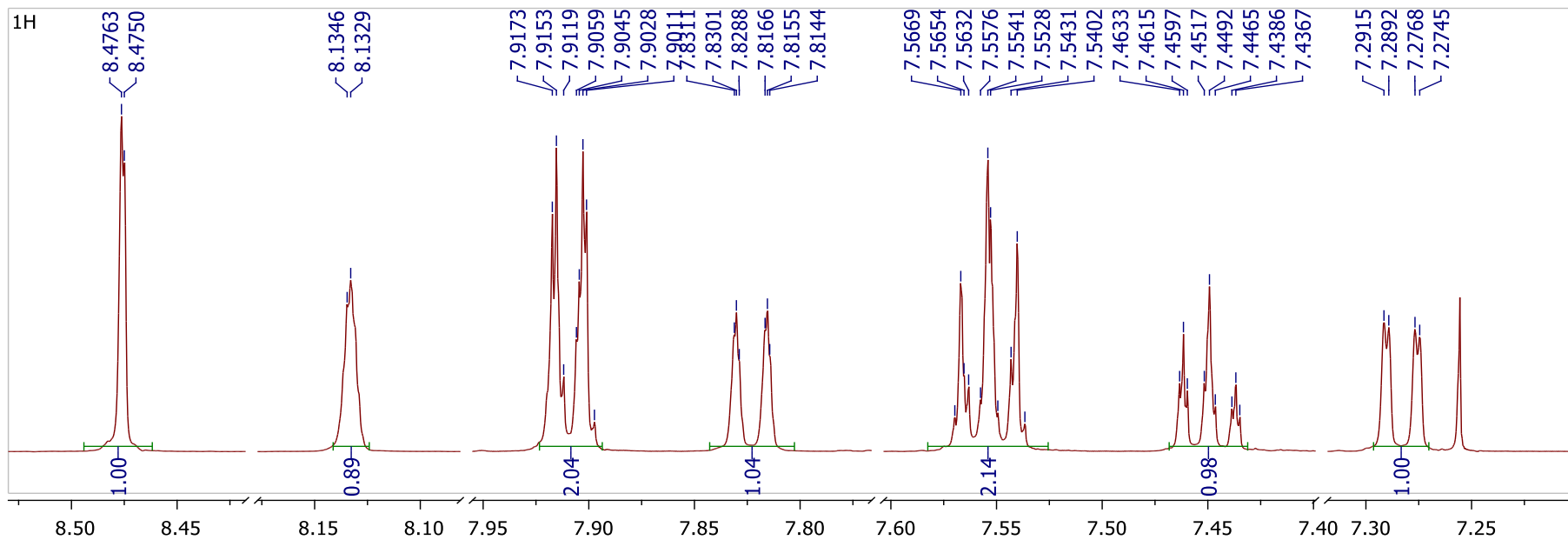
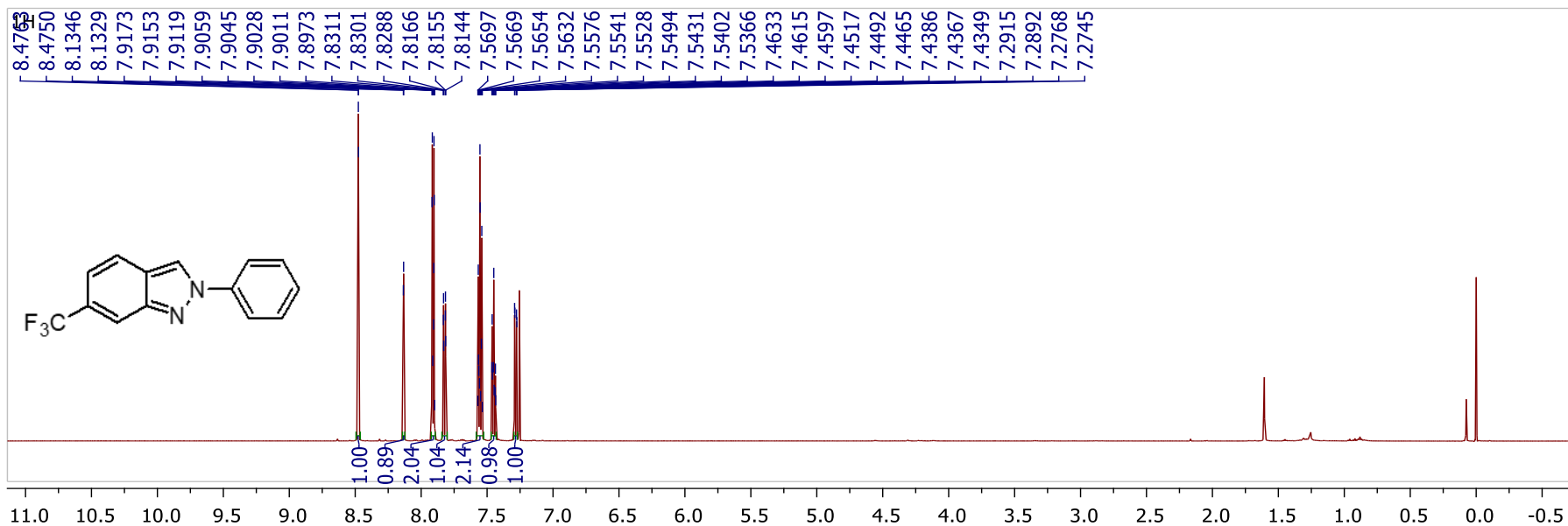
- analogue of combretastatin A-4 binding to tubulin. *Journal of medicinal chemistry*, 59(22), 10329-10334.
31. H. Cerecetto, A. Gerpe, M. González, VJ Arán, CO de Ocariz. (2005). Pharmacological Properties of Indazole Derivatives: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5: 869. <https://doi.org/10.2174/138955705774329564>
32. Thangadurai, A., Minu, M., Wakode, S., Agrawal, S., & Narasimhan, B. (2012). Indazole: A medicinally important heterocyclic moiety. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7), 1509-1523.
33. D.D. Gaikwad, A.D. Chapolikar, C.G. Devkate, K.D. Warad, A.P. Tayade, R.P. Pawar, A.J. Domb. (2015). Synthesis of indazole motifs and their medicinal importance: An overview, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90 707-731.
34. J. Dong, Q. Zhang, Z. Wang, G. Huang, S. Li. (2018). Recent Advances in the Development of Indazole-based Anticancer Agents, *ChemMedChem*, 13 1490-1507.
35. S.-G. Zhang, C.-G. Liang, W.-H. Zhang. (2018). Recent Advances in Indazole-Containing Derivatives: Synthesis and Biological Perspectives, *Molecules*, 23 2783.
36. Y. Dai , K. Hartandi , Z. Ji , AA Ahmed et, al. ( 2007 ). Discovery of N-(4-(3-Amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-Aminoindazole-Based Orally Active Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *J. Med. Chem* , 50, págs. 1584 – 1597
37. Abbassi, N., Chicha, H., Rakib, E. M., Hannioui, A., Alaoui, M., Hajjaji, A., ... & Viale, M. (2012). Synthesis, antiproliferative and apoptotic activities of N-(6-(4-indazolyl)-benzenesulfonamide derivatives as potential anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 57, 240-249.
38. Pérez-Villanueva, J., Yépez-Mulia, L., González-Sánchez, I., Palacios-Espinosa, J., Soria-Arteche, O., Sainz-Espuñes, T., ... & Custodio-Galván, Z. (2017). Synthesis and biological evaluation of 2H-indazole derivatives: Towards antimicrobial and anti-inflammatory dual agents. *Molecules*, 22(11), 1864.
39. Tron, G. C., Piralí, T., Sorba, G., Pagliai, F., Busacca, S., & Genazzani, A. A. (2006). Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *Journal of medicinal chemistry*, 49(11), 3033-3044.
40. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.

41. Gaspari, R., Protá, A. E., Bargsten, K., Cavalli, A., & Steinmetz, M. O. (2017). Structural basis of cis-and trans-combretastatin binding to tubulin. *Chem*, 2(1), 102-113.
42. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., & Diederich, M. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology*, 2010.
43. Cheng, H. H., Chou, C. T., Lu, Y. C., Lu, T., Chi, C. C., Tseng, L. L., ... & Jan, C. R. (2014). Celecoxib-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and apoptosis in HA59T human hepatoma cells. *Human & experimental toxicology*, 33(11), 1089-1098.
44. Yoshinaka, R., Shibata, M. A., Morimoto, J., Tanigawa, N., & Otsuki, Y. (2006). COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer research*, 26(6B), 4245-4254.
45. Sano, K., & Hara, S. (2010). Regioselective synthesis of trifluoromethyl group substituted pyrazole derivatives from 1-aryl-3, 4, 4, 4-tetrafluoro-2-buten-1-ones. *Heterocycles*, 80(1), 349-357.
46. Tanaka, K., Maeno, S., & Mitsuhashi, K. (1982). Preparation of trifluoroacetonitrile phenylimine and its reactions with some dipolarophiles. *Chemistry Letters*, 11(4), 543-546.
47. OMS Nota descriptiva. Cáncer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (acceso 10 de Diciembre 2019)
48. «What is the cancer?» [Definición del cáncer]. cancer.gov (en inglés). Washington D. C.: National Cancer Institute. Consultado el 10 de diciembre del 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?redirect=true>

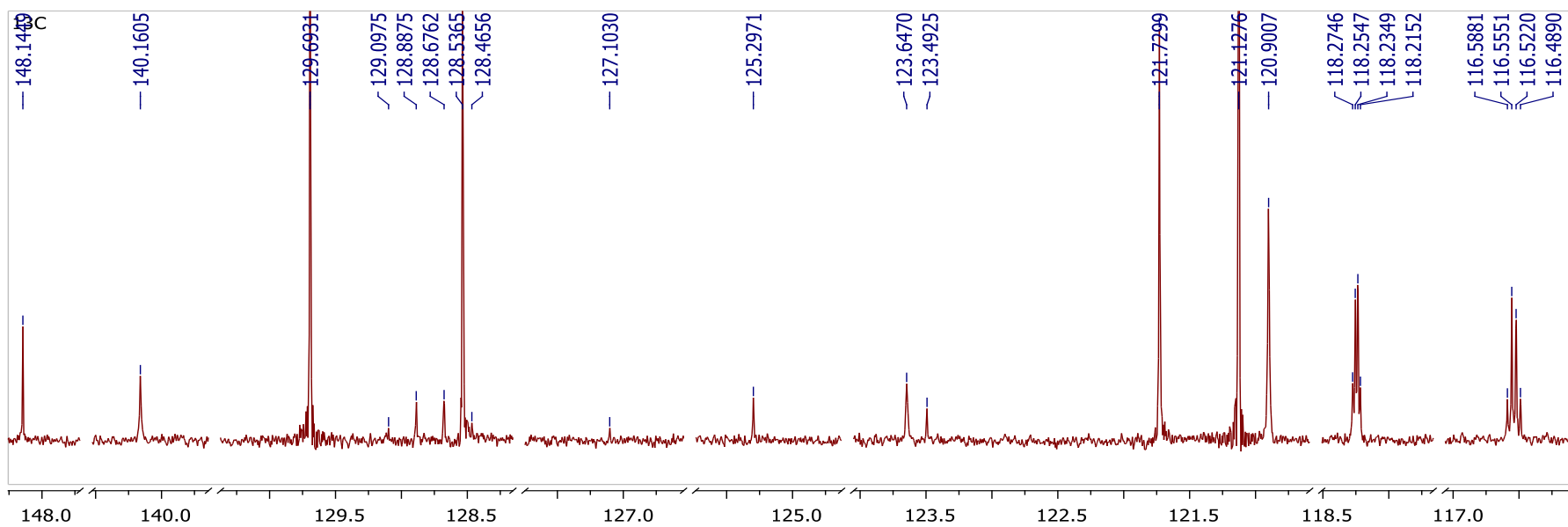
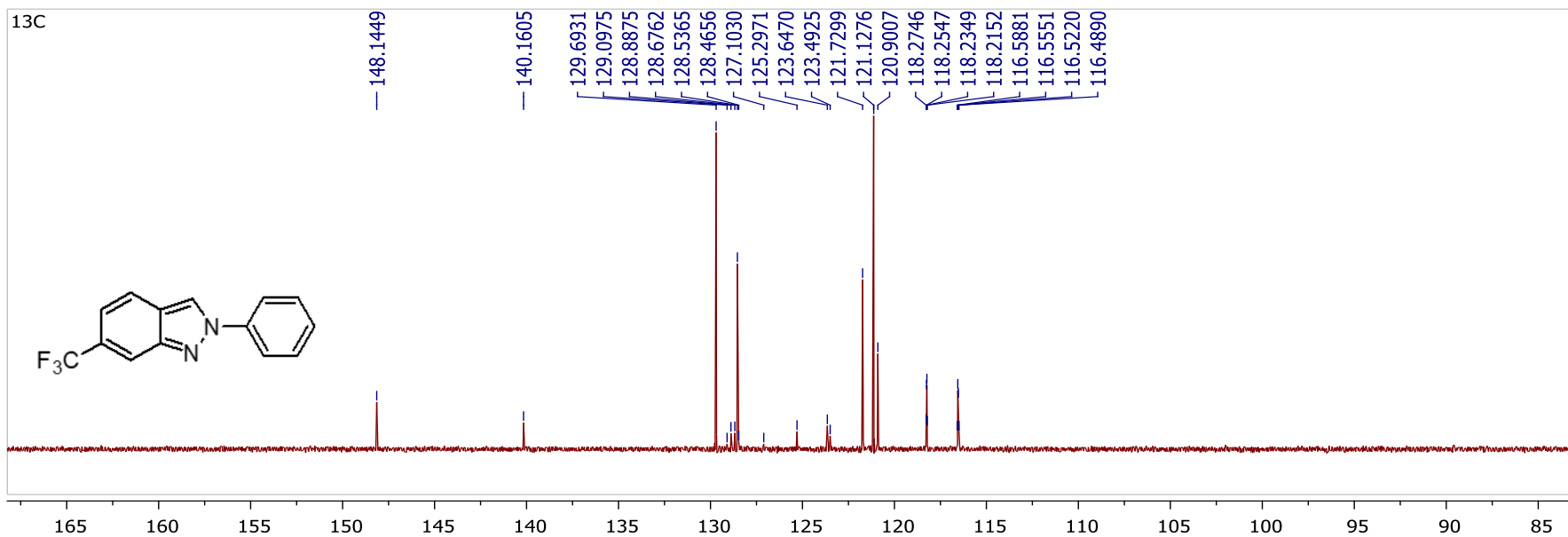
# 10. Anexos



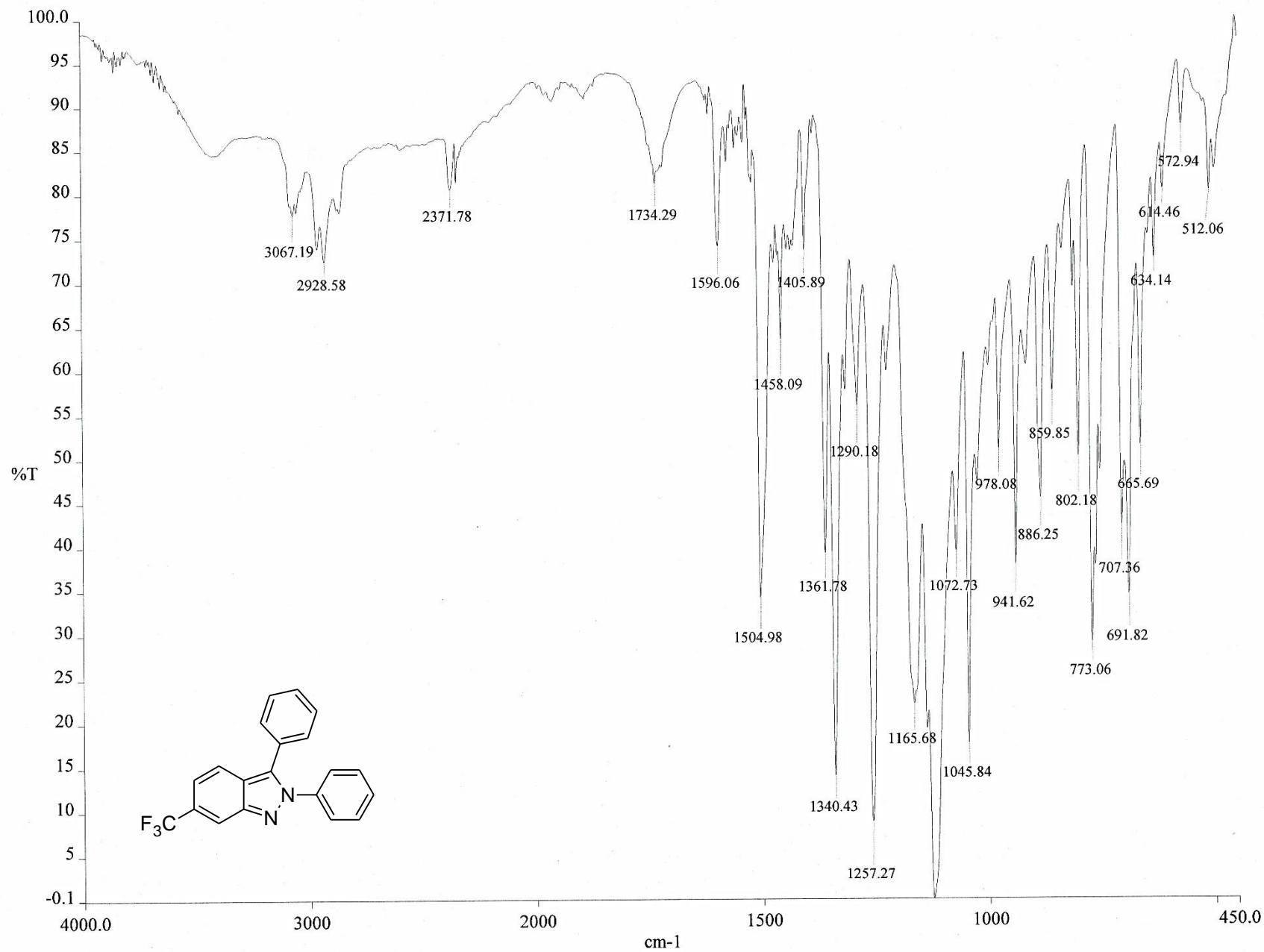
**Espectro 1. IR 2-fenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2b)**



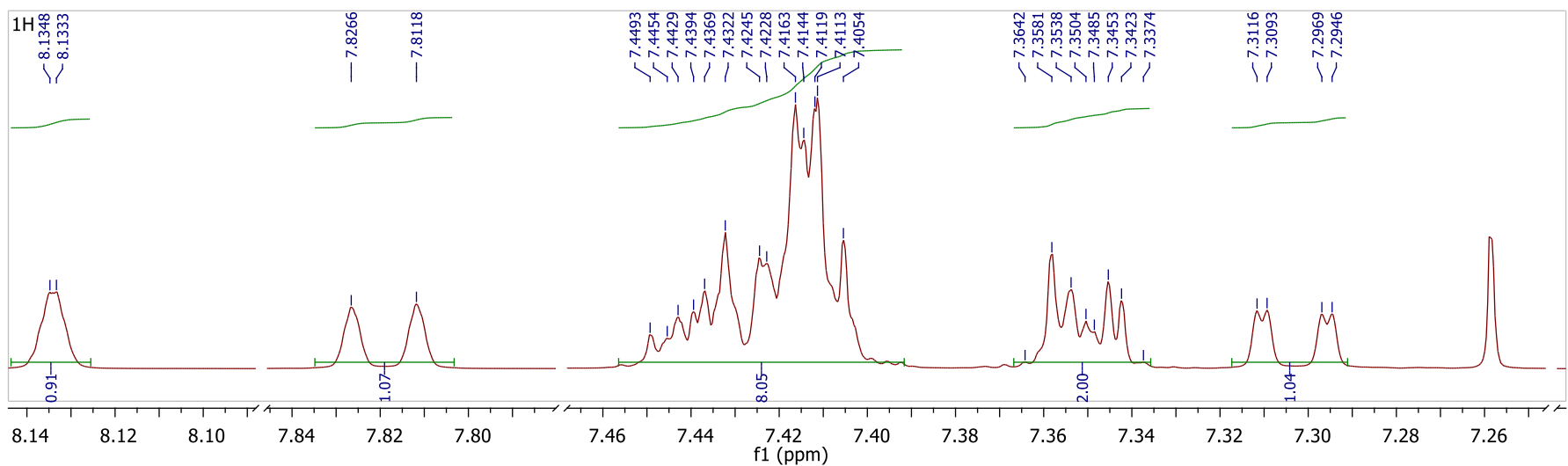
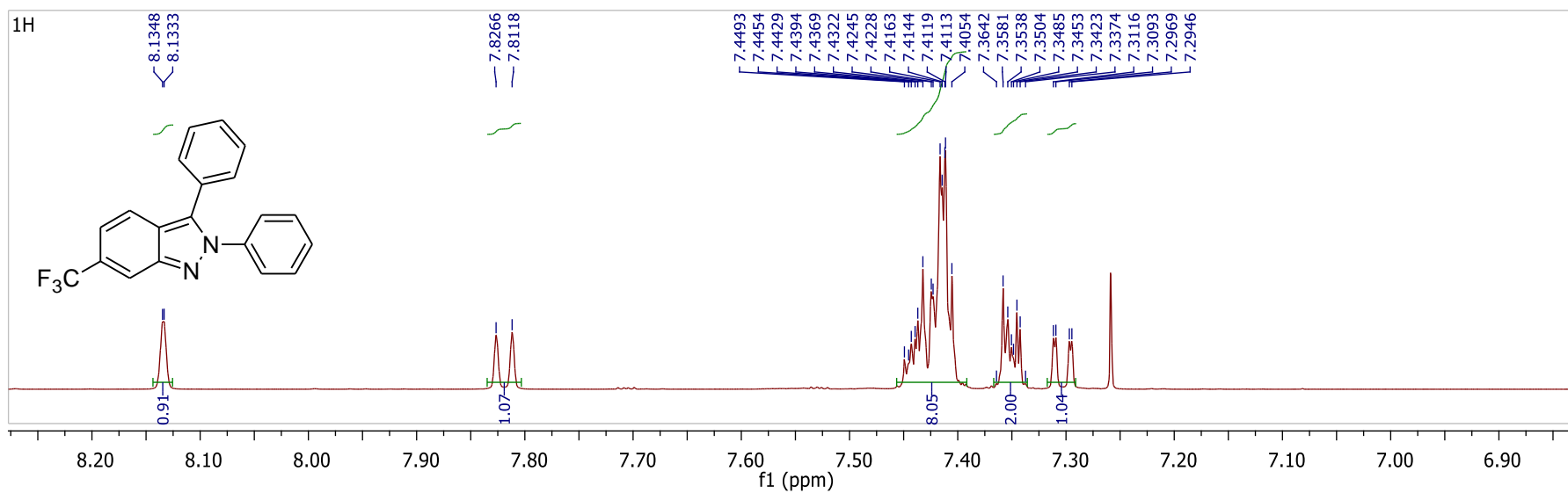
**Espectro 2. Espectro RMN <sup>1</sup>H 2-fenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2b)**



**Espectro 3. Espectro RMN 13C 2-fenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2b)**

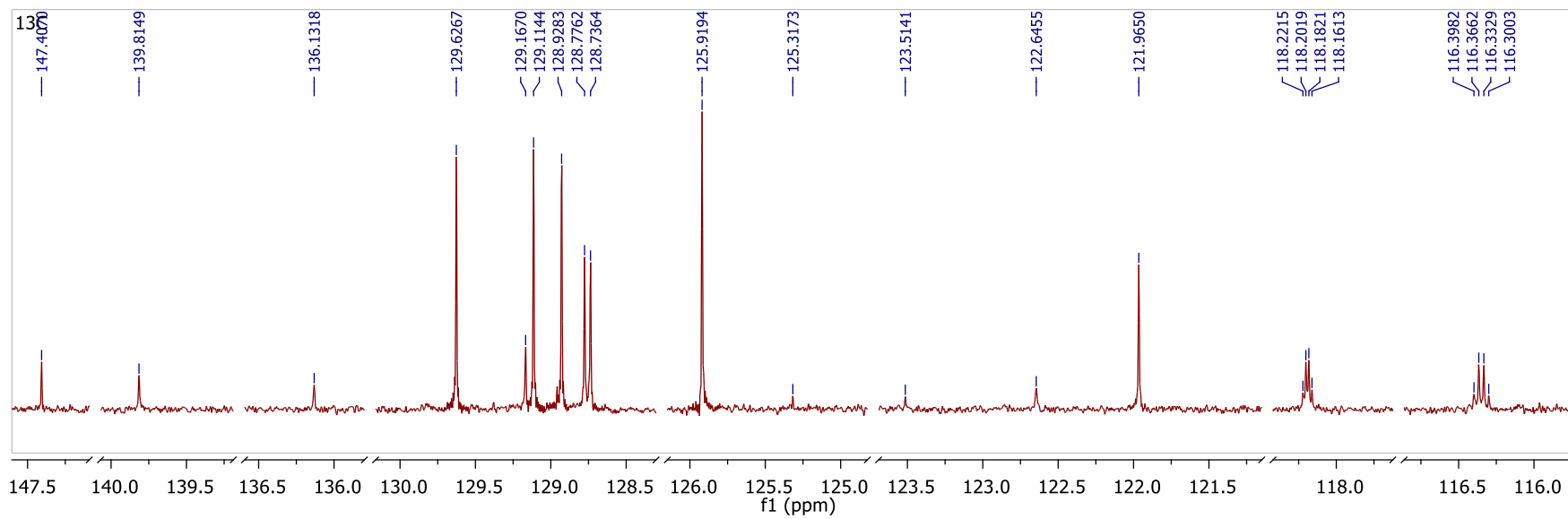
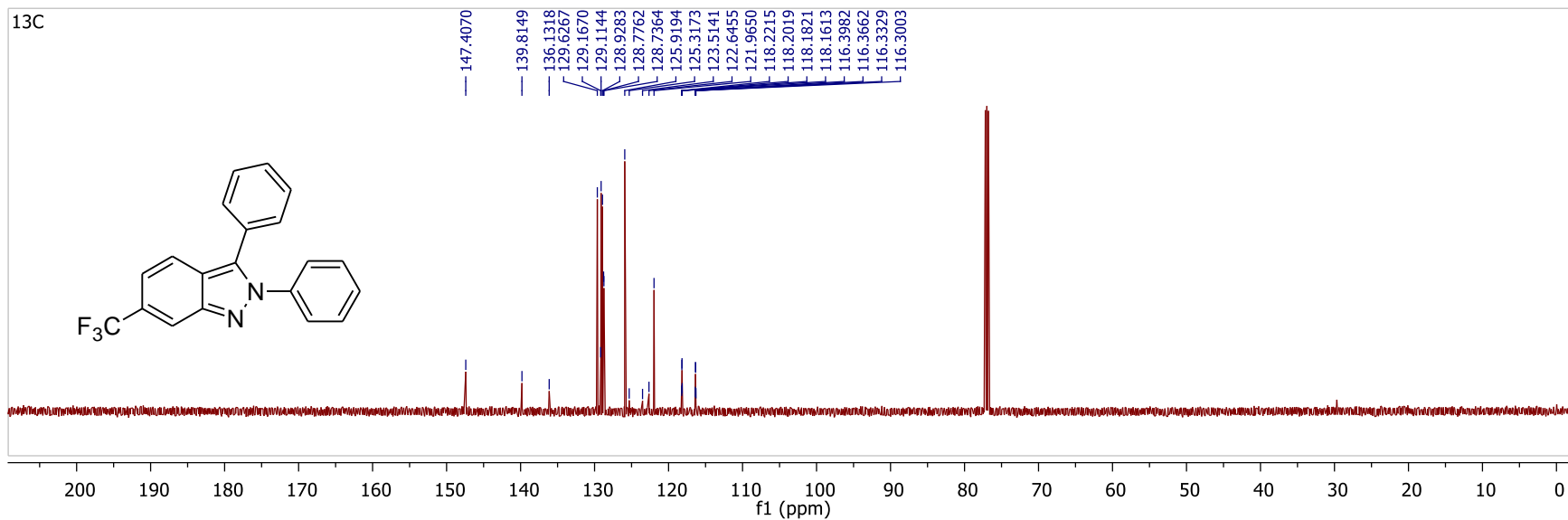


**Espectro 4. IR 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2d)**

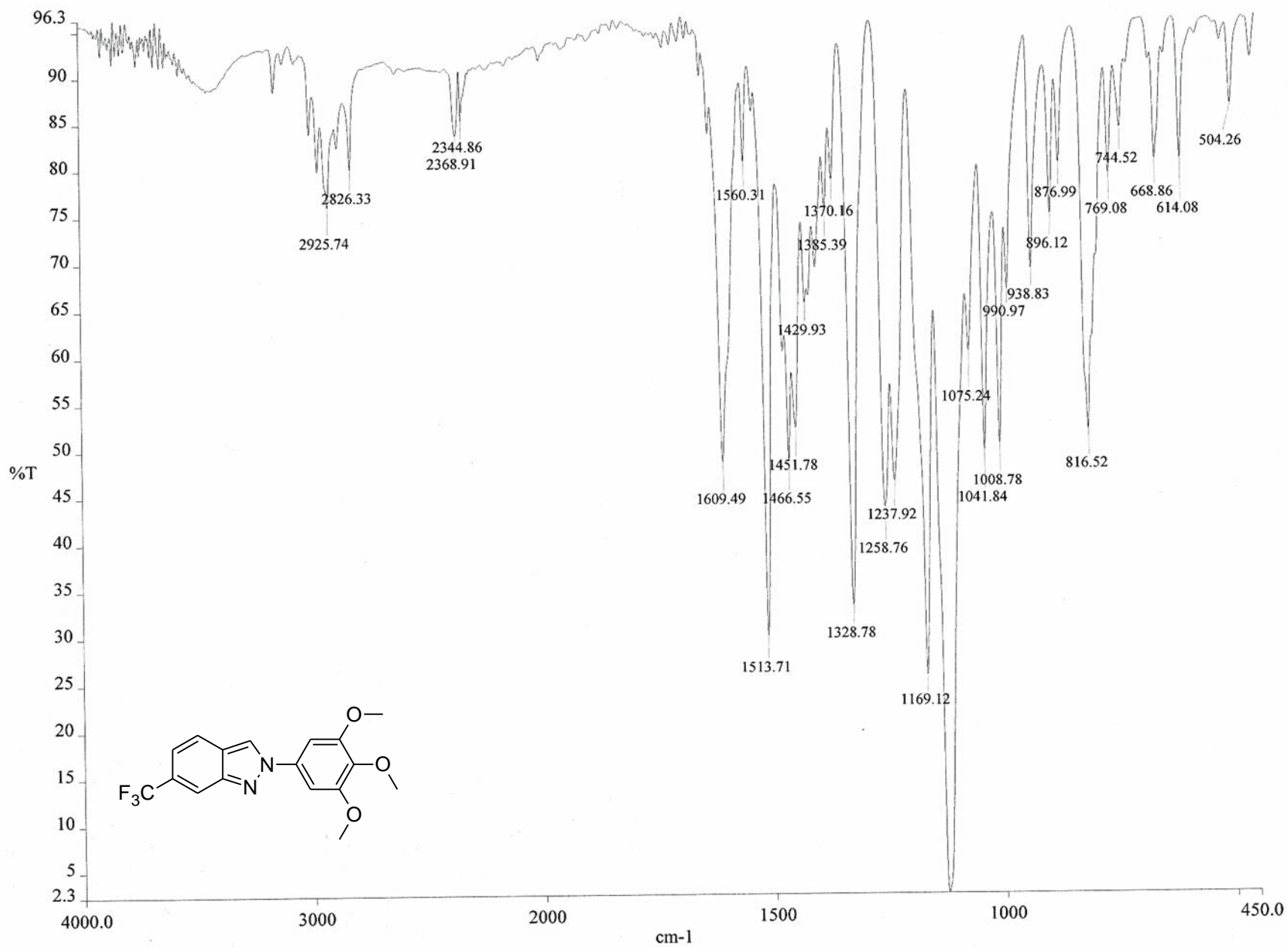


**Espectro 5. RMN <sup>1</sup>H 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2d)**

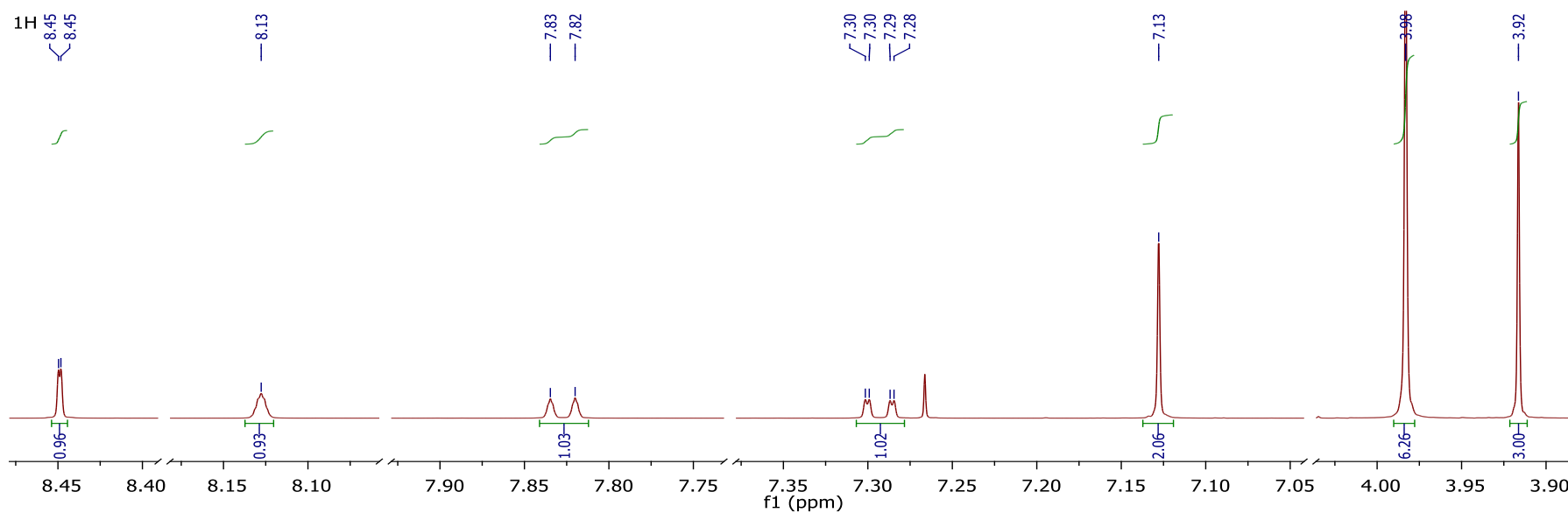
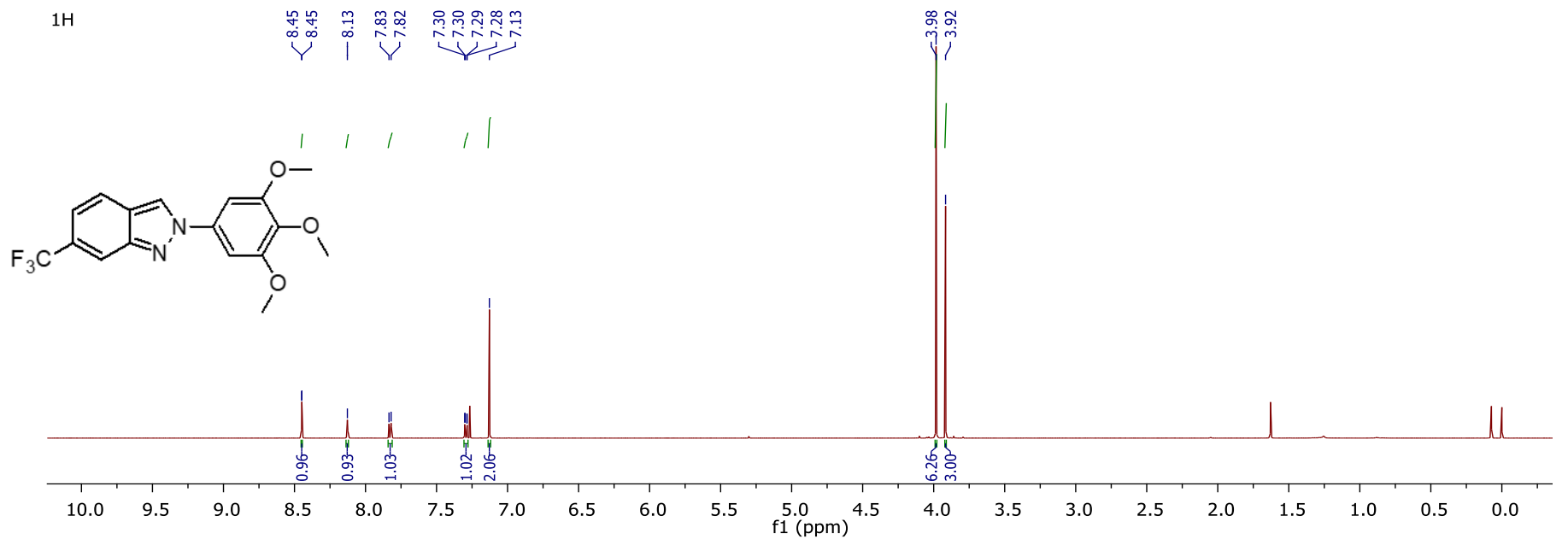




**Espectro 6. RMN <sup>13</sup>C 2,3-difenil-6-(trifluorometil)-2H-indazol (2d)**

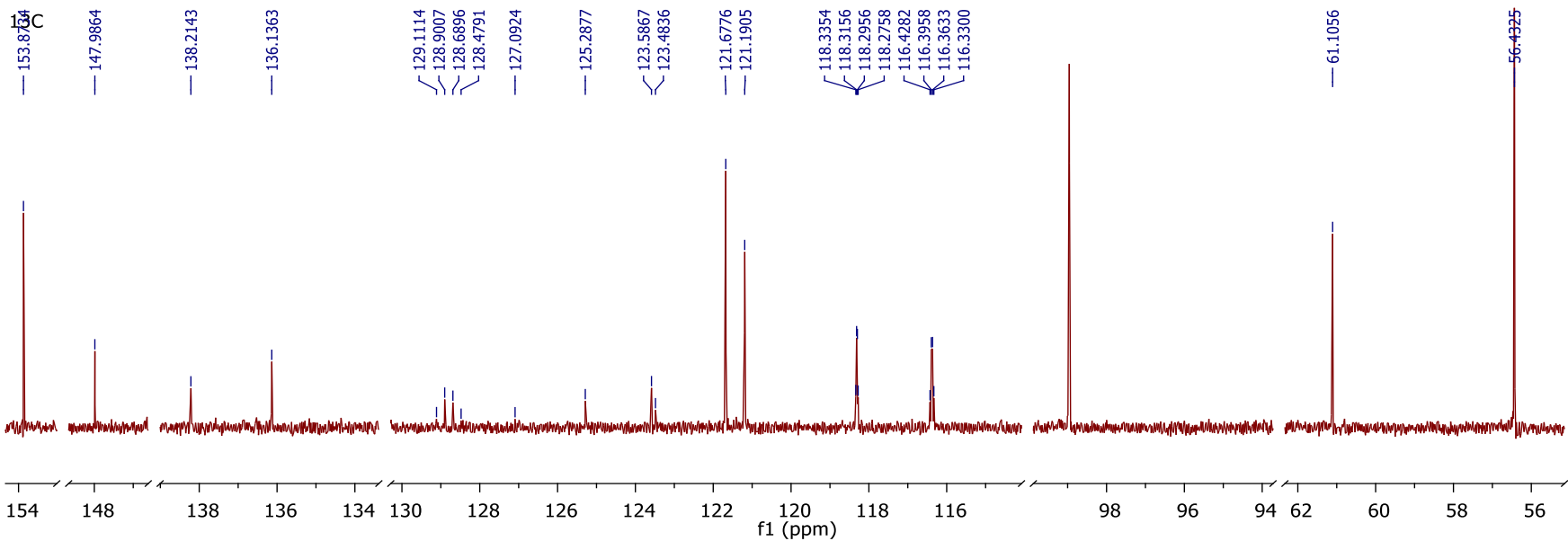
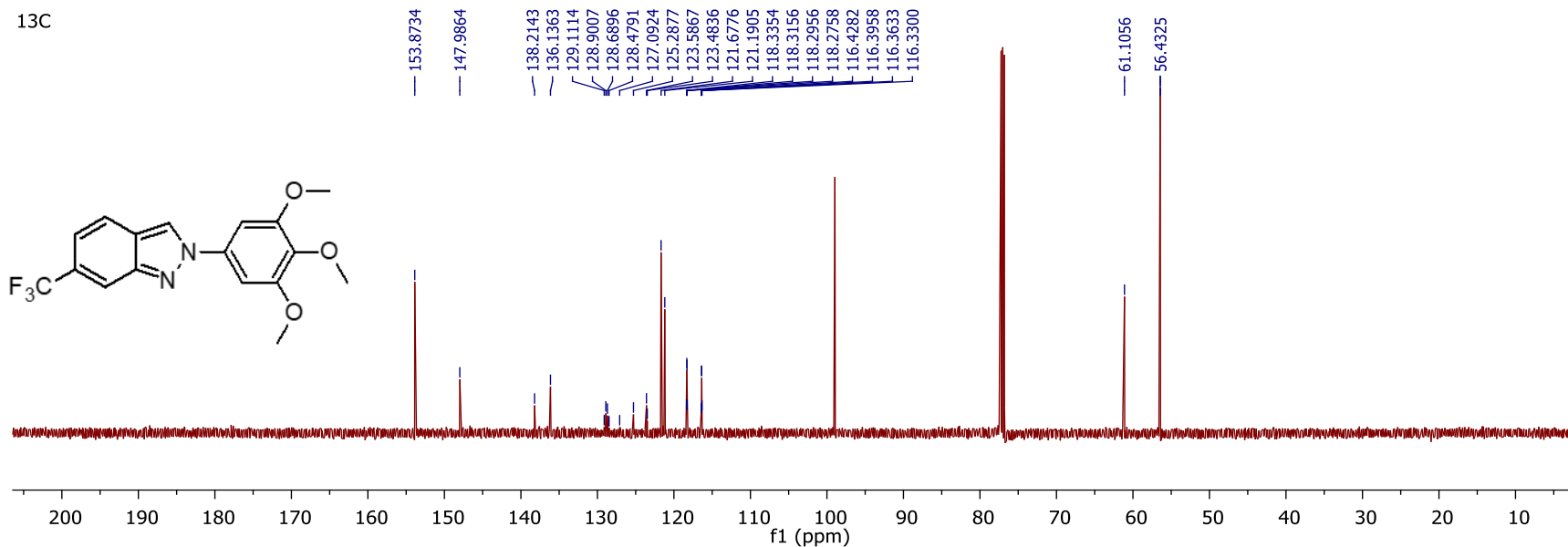


**Espectro 7. IR 6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol (3b)**

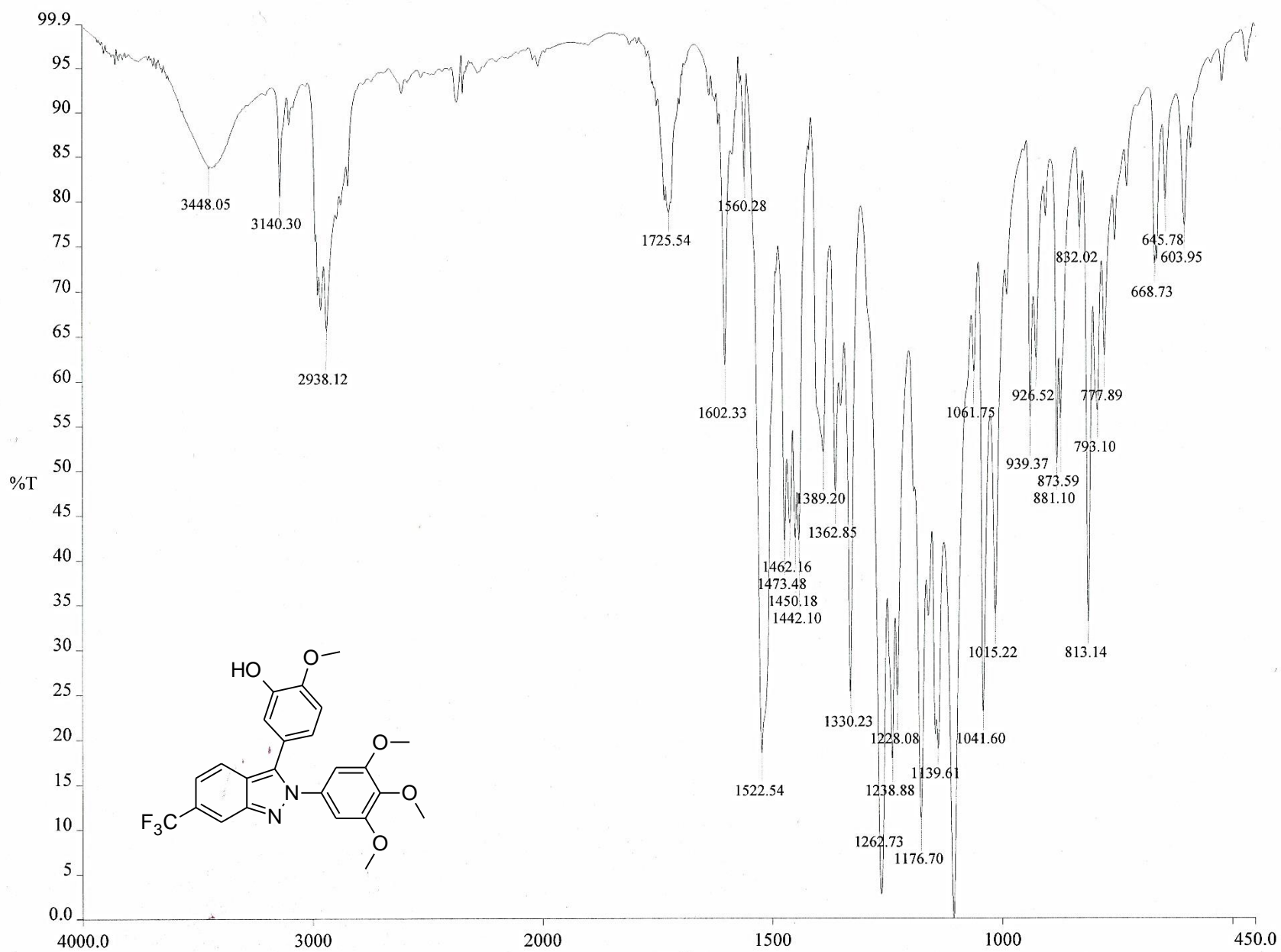


**Espectro 8. RMN <sup>1</sup>H 6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol (3b)**

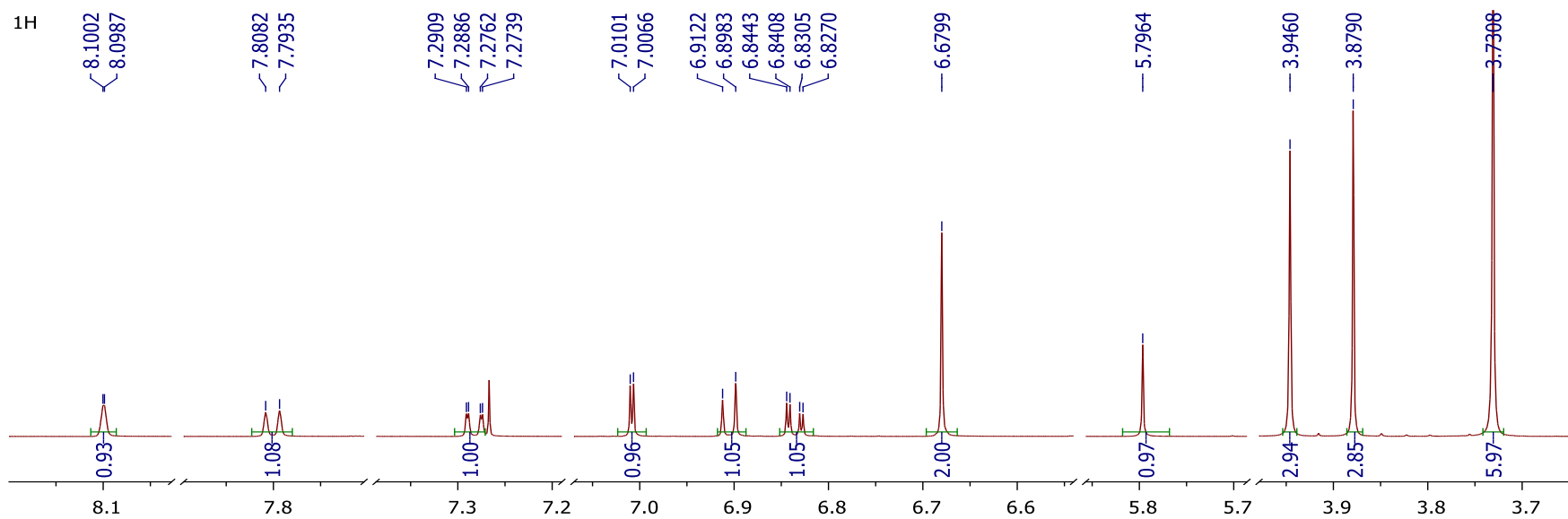
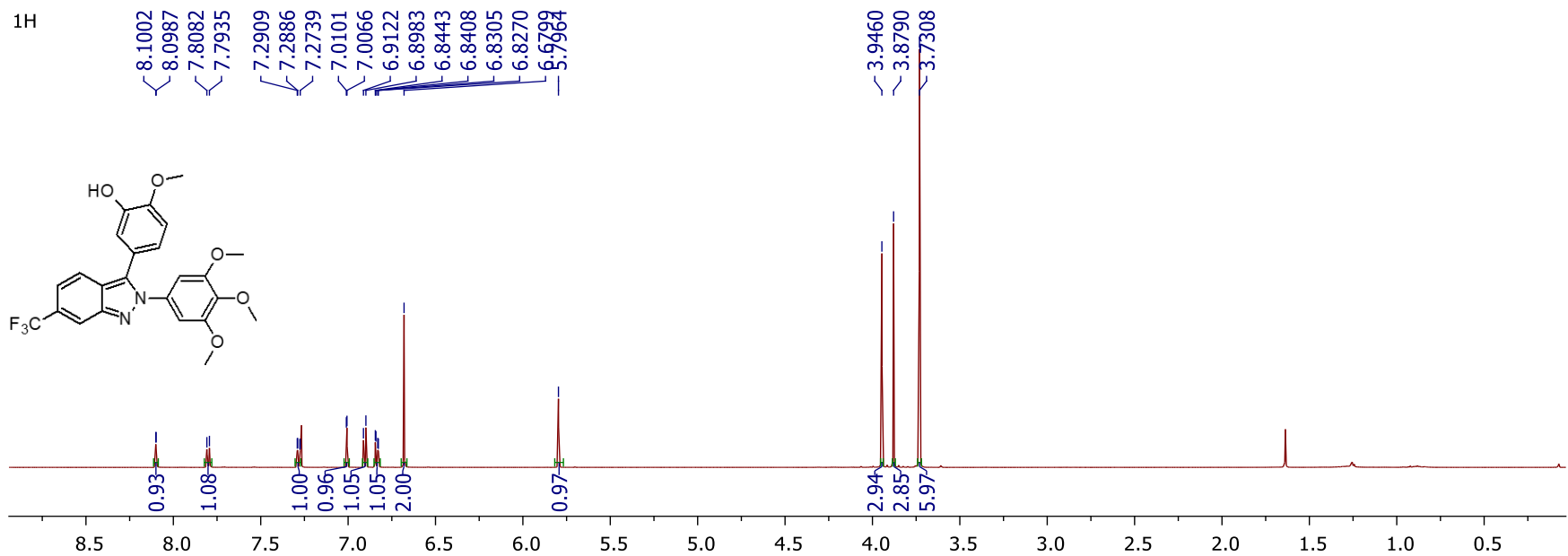
13C



**Espectro 9. RMN <sup>13</sup>C 6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol (3b)**

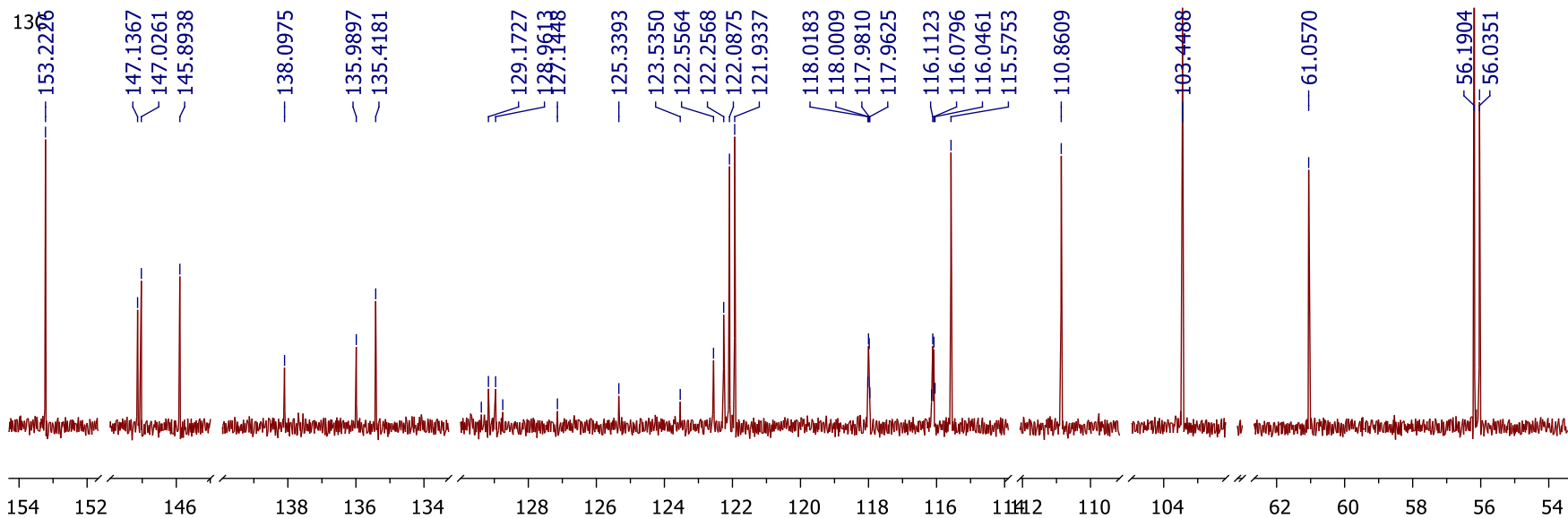
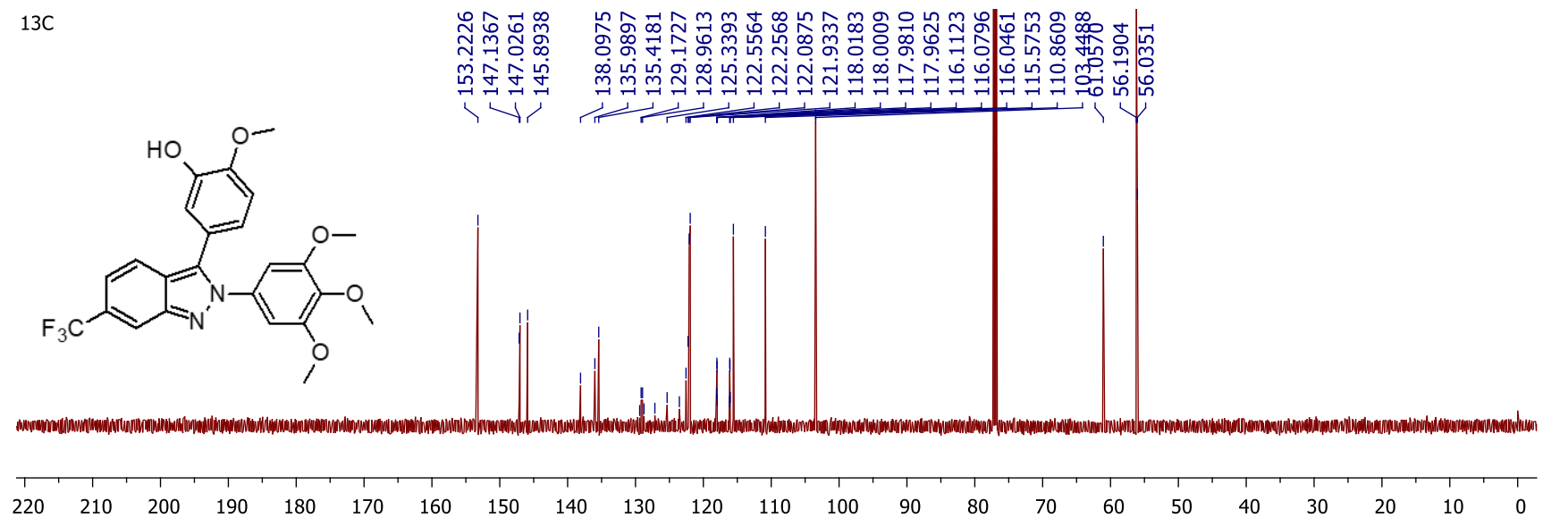


**Espectro 10. IR 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-3-il) fenol (3d)**

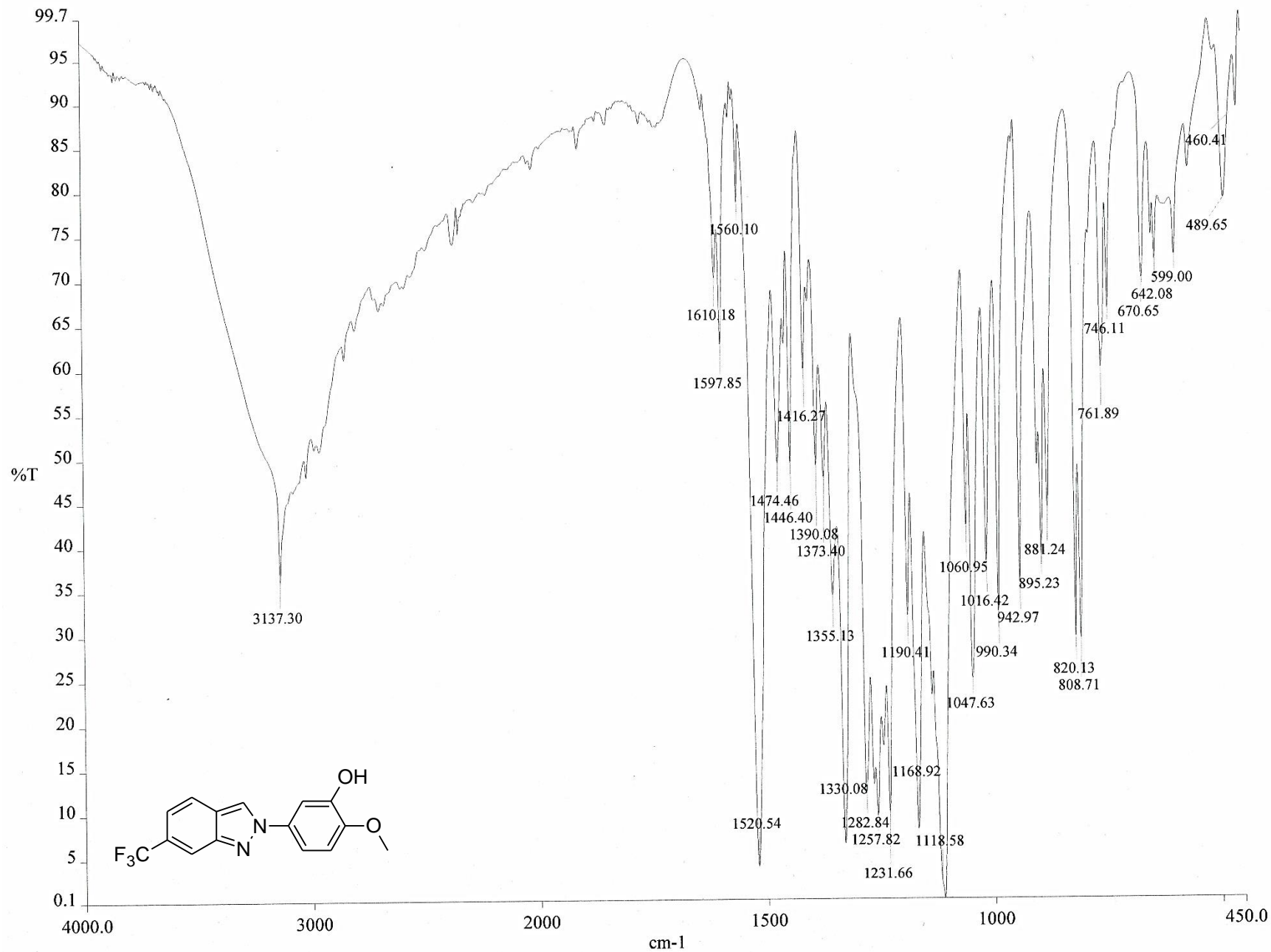


**Espectro 11. RMN <sup>1</sup>H 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-3-il) fenol (3d)**

13C

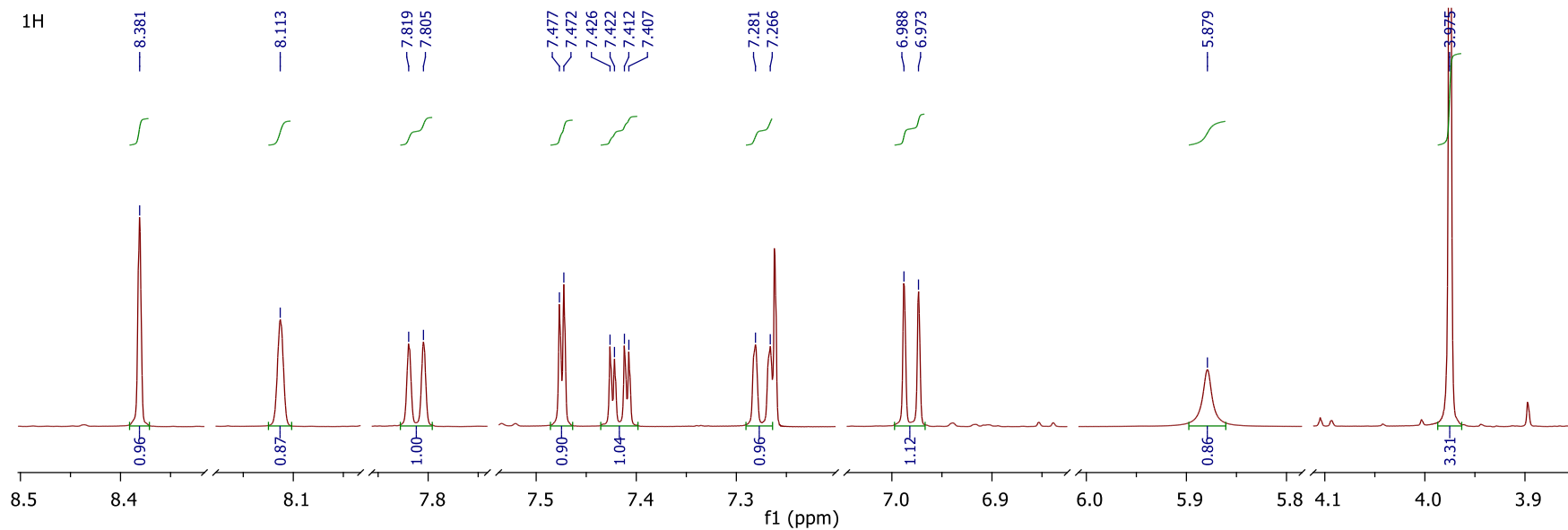
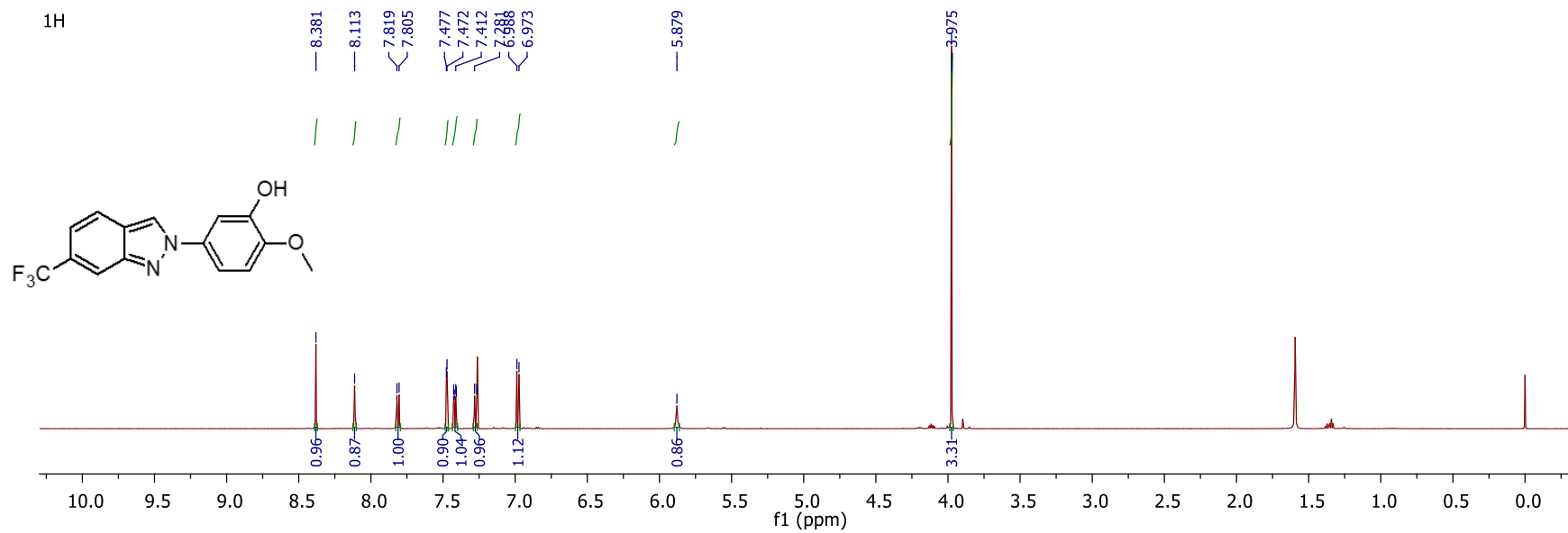


Espectro 12. RMN  $^{13}\text{C}$  2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-3-il) fenol (3d)



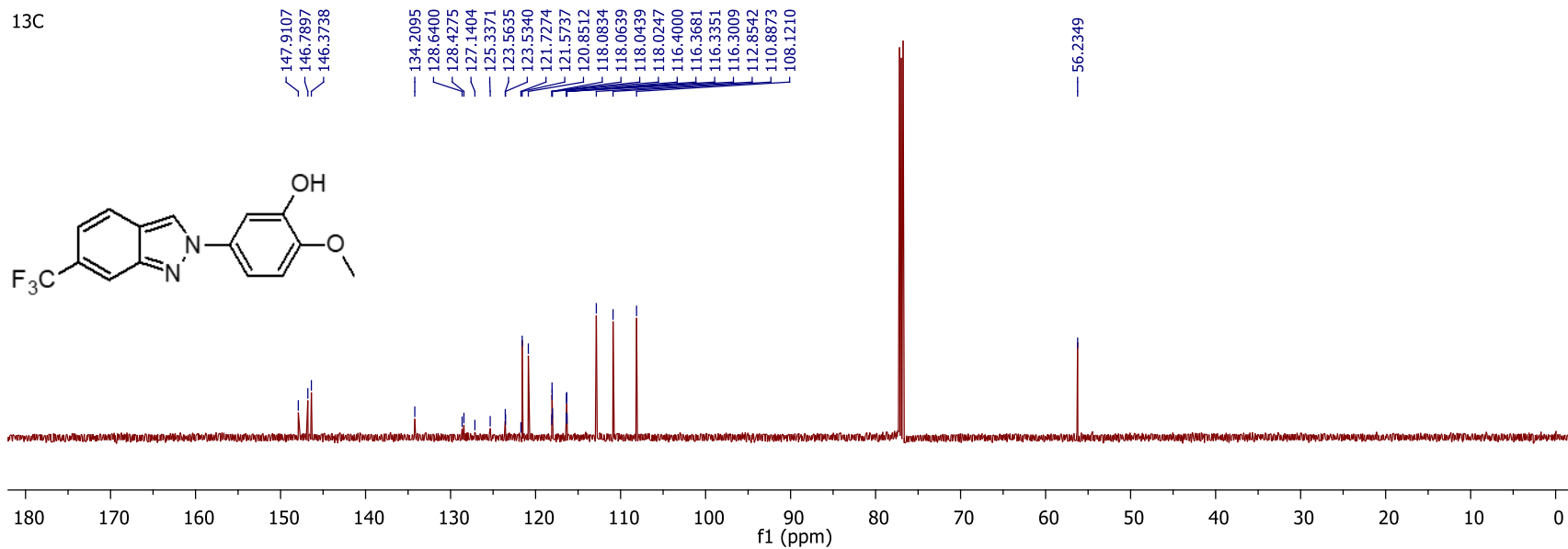
**Espectro 13. IR 2-metoxi-5-[6-(trifluorometil)-2H-indazol-2-yl]fenol (4b)**



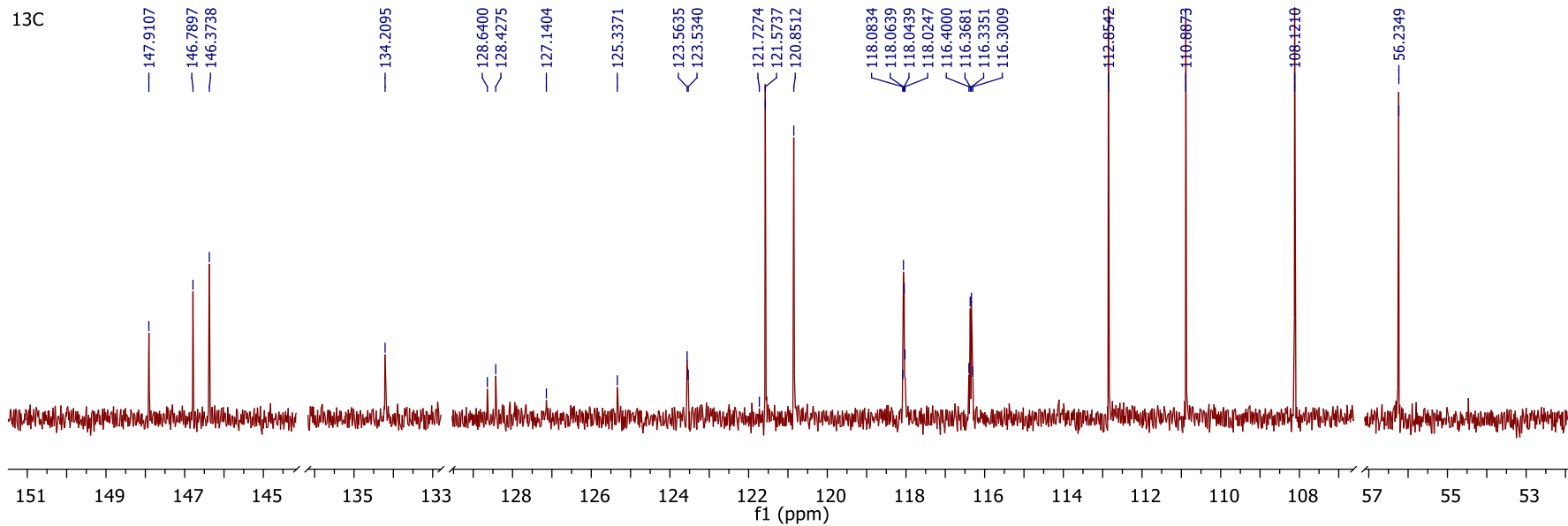


**Espectro 14. RMN <sup>1</sup>H 18 2-metoxi-5-[6-(trifluorometil)-2H-indazol-2-yl]fenol (4b)**

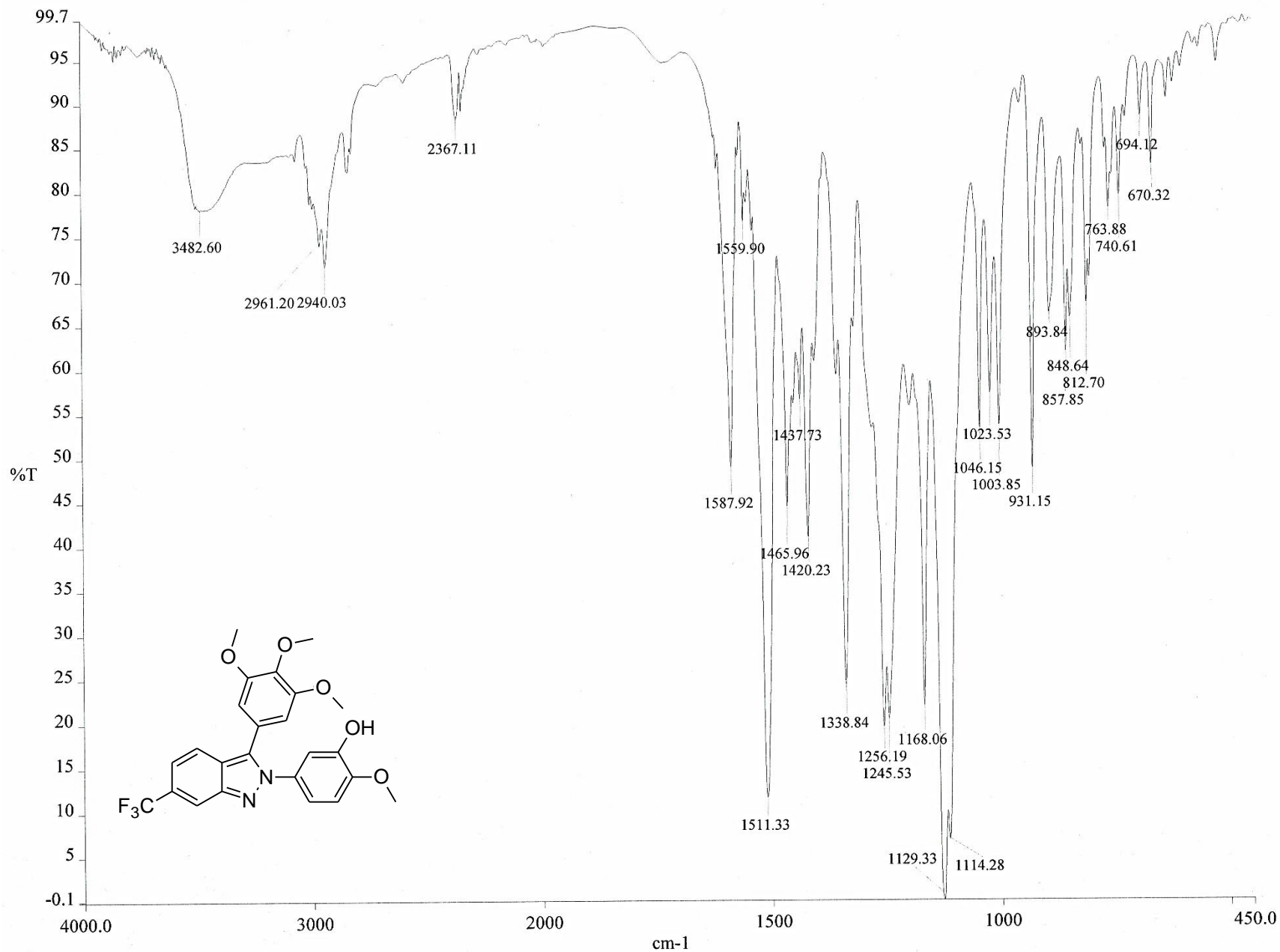
13C



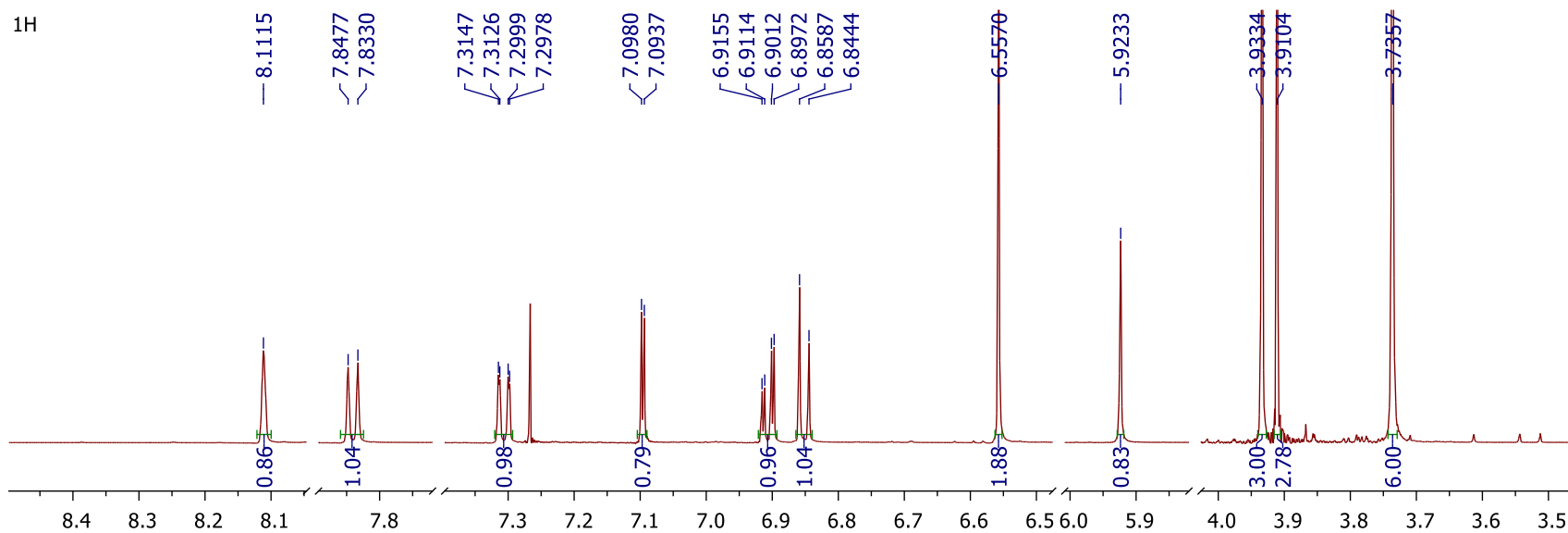
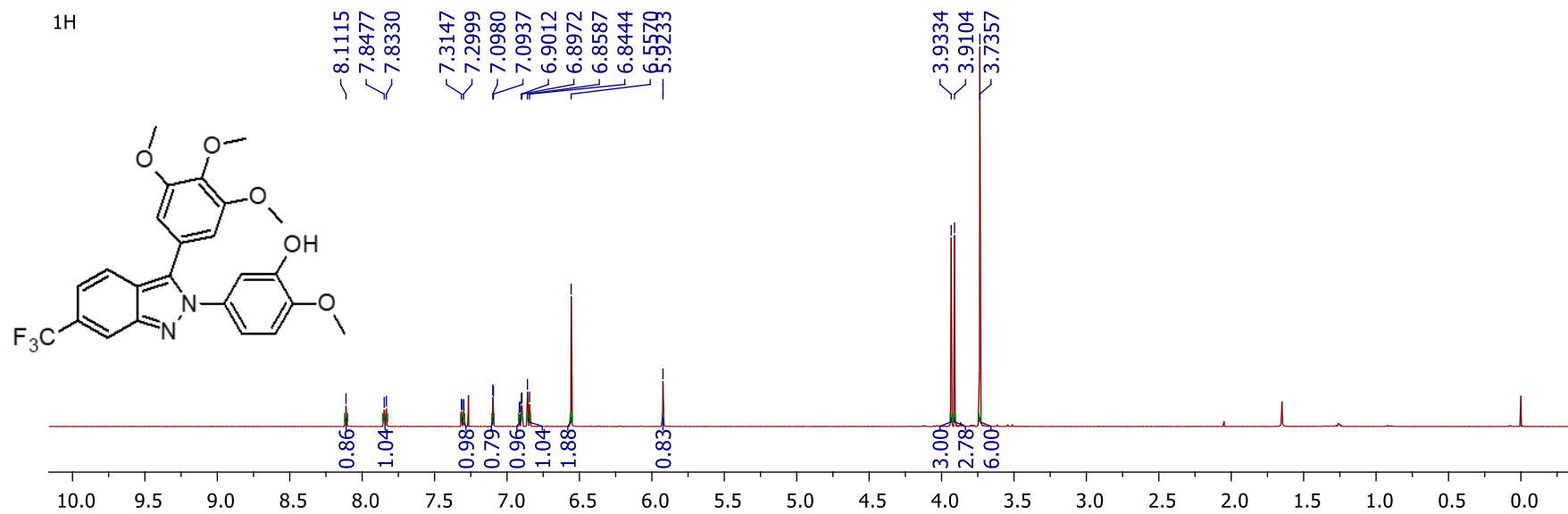
13C



**Espectro 15. RMN <sup>13</sup>C 2-metoxi-5-[6-(trifluorometil)-2H-indazol-2-yl]fenol (4b)**

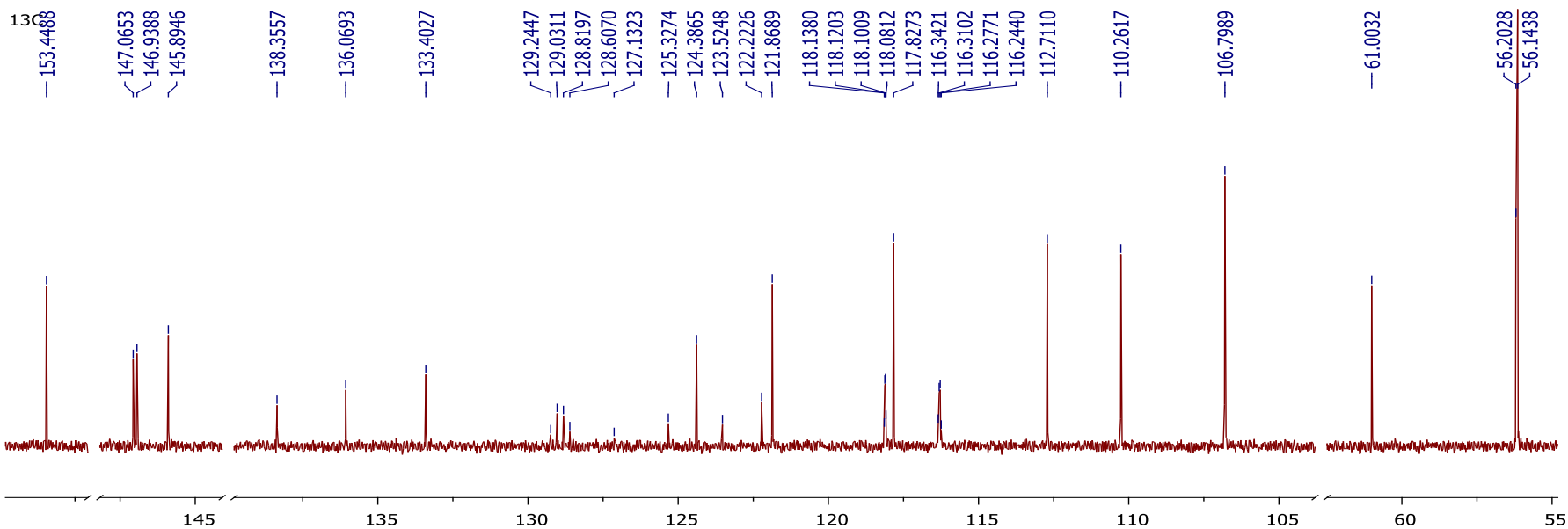
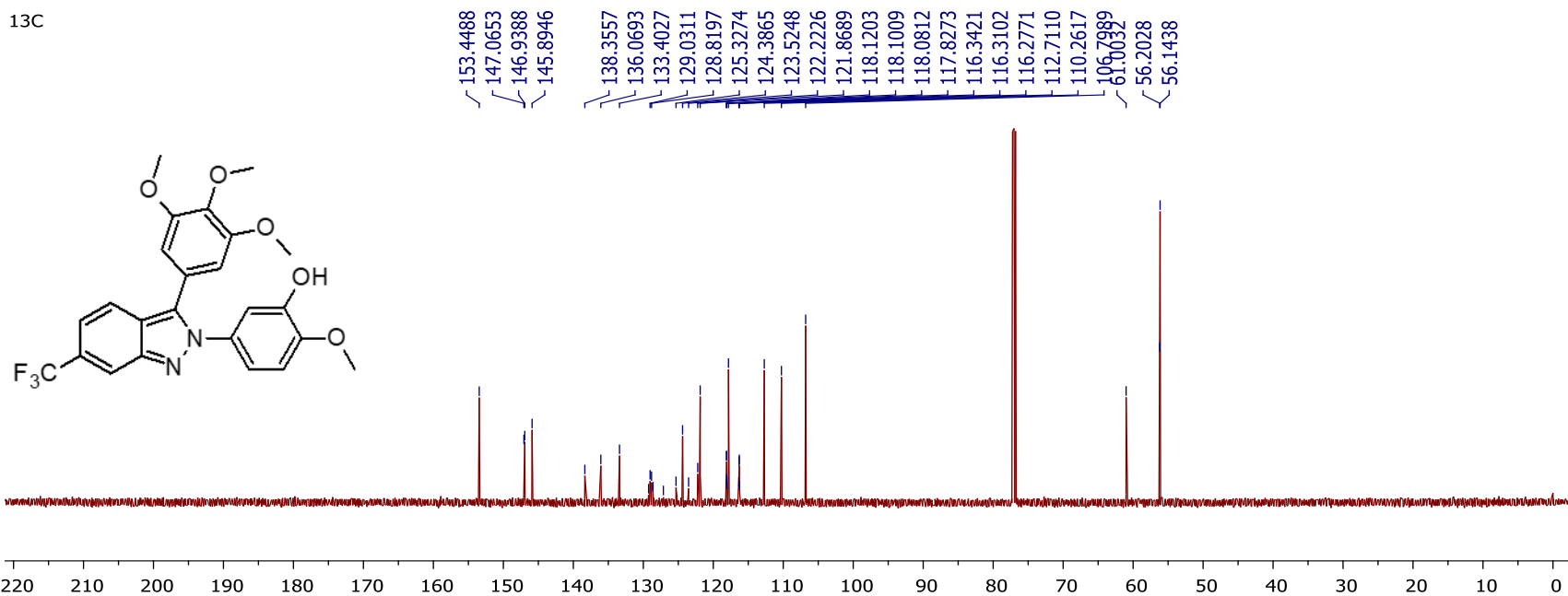


**Espectro 16. IR 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-2-il) fenol (4d)**



**Espectro 17. RMN <sup>1</sup>H 2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-2-il) fenol (4d)**

13C



Espectro 18. RMN  $^{13}\text{C}$  2-metoxi-5-(6-(trifluorometil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-indazol-2-il) fenol (4d).