

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS α -AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LOS
ALCALOIDES ENCONTRADOS EN LAS PLANTAS *Nicotiana tabacum* (Fam.
Solanaceae) Y *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopoidaceae), Y SU
EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera.
Culicidae)**

ANDRÉS GILBERTO RUEDA JAIMES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2018

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS α -AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LOS
ALCALOIDES ENCONTRADOS EN LAS PLANTAS *Nicotiana tabacum* (Fam.
Solanaceae) Y *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopoidaceae), Y SU
EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera.
Culicidae)**

ANDRÉS GILBERTO RUEDA JAIMES

Trabajo de investigación para optar al título de:

Magister en Química

Director del trabajo de investigación:

VLADIMIR V. KOUZNETSOV

Doctor en Química

Codirector del trabajo de investigación:

JONNY EDWARD DUQUE LUNA

Doctor en Entomología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2018

A Dios, mi patrocinador y quien me dio la sabiduría en todo este proceso y le debo todo. “Te haré entender, y te enseñaré el camino en que debes andar; Sobre tí fijaré mis ojos”.

A mi padre Gilberto, quien me enseñó que siempre amara el estudio y me formó como el hombre que soy ahora.

A los amores de mi vida, mi madre Cristina y mi abuela Amelia, no me cansare de agradecer a Dios por tener dos mamás, gracias por todo.

A mi abuelo Gilberto, quien me acompaña desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Durante el proceso de este trabajo de investigación hubo personas que con su ayuda y compañía contribuyeron en gran manera, a las cuales quisiera hacer este reconocimiento:

Primeramente a mi familia, que me apoyaron en este gran paso, a mis padres Gilberto y Cristina, quienes me motivaron a buscar siempre lo mejor; a mi abuela Amelia, mi segunda madre, quien me apoyó en gran manera en todas las decisiones importantes en mi vida; a mi abuelo Vicente por su apoyo económico y moral en este trabajo y a mis tios y mi abuela Nubia por sus oraciones y su compañía en este proceso.

A mi director de proyecto, Vladimir V. Kouznetsov, PhD., D. Sc., por creer en mi trabajo, apoyarme desde el inicio de la maestría, por su paciencia y comprensión; gracias por haber tenido la oportunidad de trabajar en el LQOBio, un laboratorio de calidad científica y humana, donde aprendí la perseverancia y la humildad en el trabajo.

A mi codirector, Jonny Edward Duque L., PhD., por sus grandes enseñanzas, por motivarme a no perder mí fe, confiar en mis capacidades, y enseñarme a buscar siempre lo mejor, que haciendo las cosas de la mejor manera se logran los sueños, gracias por permitirme trabajar en el Centro de Investigaciones en enfermedades tropicales Cintrop, donde aprendí mucho más del mundo de los insectos.

A la profesora Stelia Carolina Mendez, PhD., por su paciencia y comprensión enseñándome las pruebas bioquímicas, gracias porque su ayuda aportó mucho a poder finalizar este proyecto de la mejor manera.

A mi madre académica, Aurora Carreño, gracias porque aportaste a este proyecto gran parte de tu ayuda, sin esperar nada a cambio, gracias por formarme como un buen científico, luchar por mis sueños, desafiarme a amar mi carrera, y lo más importante, formarme como ser humano, siempre estare agradecido contigo, para

mi eres una mujer de gran ejemplo, y siempre lo he dicho, alguna vez quiero llegar a ser como tu.

A mis amigos de siempre, la distancia no es impedimento a seguir dejando huellas, gracias a Andrea Garzón, van sumando los años de una gran amistad, gracias por estar pendiente de mi; a Jhony, Natalia, Luz, Lina, porque a pesar de sus ocupaciones y las mias, me siguen ofreciendo una amistad sincera.

Hay personas que en poco tiempo dejan enseñanzas grandes, gracias a Sarely Gómez, eres toda una guerrera, gracias por estar siempre dando fuerzas en los momentos difíciles; a Eliza, Ana María y Yelicsa, por estar en todo momento, en las buenas y en las malas y porque siempre habrá un motivo para celebrar.

A los profesores Juan Manuel Urbina, Dr. rer. nat., y Herminsul de Jesus Cano PhD., por su ayuda en la calificación de este trabajo de maestría, gracias por su tiempo para revisarlo, por cada una de sus sugerencias, que hacen de este trabajo cada vez mejor.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular LQOBio por instruirme con sus sugerencias durante el trabajo experimental, gracias a Karime Luna por ser mi apoyo y mi guía en el laboratorio, gracias por tus consejos. Al Centro de Investigaciones en enfermedades Tropicales Cintrop y sus integrantes por seguirme instruyendo en el área de la Biología, de la cual voy aprendiendo cada vez más, gracias a Ruth, Juliana, Gustavo, Natalia y Mayra por toda su ayuda.

A cada persona que me estuvo acompañando en la maestría, que tienen la misma pasión por la Química, viviré siempre agradecido ocn Dios por poner personas tan especiales en mi vida.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	21
1. ESTADO DEL ARTE.....	25
1.1. Enfermedades transmitidas por <i>Aedes aegypti</i>	25
1.2. Insecticidas naturales y sus análogos sintéticos.....	27
1.3. Síntesis de α -aminonitrilos, desarrollo de la reacción de Strecker	38
1.3.1. Diseño racional de nuevos α -aminonitrilos híbridos con fragmentos de interés biológico.....	46
1.3.2. Cicloadición 1,3–dipolar: síntesis de 1,2,3–triazoles	48
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	51
3. JUSTIFICACIÓN	53
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	54
5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	54
6. OBJETIVO GENERAL.....	55
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	56
8.1. Consideraciones generales	56
8.2. Síntesis de precursores.....	58
8.2.1. Preparación de los precursores 3a y 3b: Reacción de propargilación.	58
8.2.2. Preparación de bencilazidas.....	59
8.2.3. Preparación de los precursores 4a-4d: cicloadición 1,3-dipolar para síntesis de 1,2,3-triazoles	60
8.3. Preparación del catalizador de ácido soportado en gel de sílice (SSA).....	63
8.4. Obtención de los α -aminonitrilos análogos de la girsensohnina y nicotina.....	64
8.5. Ensayos de actividad biológica.....	74
8.5.1. Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa comercial (extraída de <i>Electrophorus electricus</i>) y la extraída de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	74
8.5.2. Evaluación de la actividad larvívica de los productos finales.....	77
8.5.3. Inhibición de las enzimas mitocondriales en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	79
8.5.4. Ensayo de daño en el ADN por fragmentación o degradación.	83
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES	85

9.1. Síntesis de triazoles precursores de los α – aminonitrilos.....	85
9.2. Síntesis de los compuestos α – aminonitrilos análogos de girsensohnina y nicotina.....	94
9.3. Ensayos de actividad biológica.....	121
9.3.1. Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) comercial (Extraída de <i>Electrophorus electricus</i>).....	121
9.3.2. Ensayo <i>in vivo</i> de actividad larvívica en <i>Aedes aegypti</i>	124
9.3.3. Inhibición de enzimas mitocondriales en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	125
9.3.4. Ensayo de daño en el ADN por fragmentación o degradación.	128
10. CONCLUSIONES.....	130
BIBLIOGRAFÍA.....	132
ANEXOS.....	140

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes de cianuro utilizadas en la reacción de Strecker.....	40
Tabla 2. Catalizadores quirales utilizados en la reacción de Strecker.....	43
Tabla 3. Catalizadores que aumentan el rendimiento en la reacción de Strecker.....	43
Tabla 4. Parámetros del tratamiento de larvas de <i>Aedes aegypti</i> para el ensayo de inhibición de la AChE.....	76
Tabla 5. Rendimientos y propiedades de los precursores obtenidos en la propargilación.....	85
Tabla 6. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los precursores sintetizados en la propargilación 3a – 3b.....	88
Tabla 7. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los precursores sintetizados en la propargilación 3a – 3b.....	88
Tabla 8. Rendimientos y propiedades de los triazoles sintetizados en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.....	90
Tabla 9. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los triazoles precursores sintetizados 4a – 4d.....	92
Tabla 10. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los triazoles precursores sintetizados 4a – 4d.....	93
Tabla 11. Compuestos cabeza de serie para la síntesis de los α -aminonitrilos.....	94
Tabla 12. Compuestos α -aminonitrílicos propuestos para la serie A.....	97
Tabla 13. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie A.....	97
Tabla 14. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los productos sintetizados en la serie A. 5b, 5d.....	101
Tabla 15. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie A. 5b, 5d.....	101
Tabla 16. Compuestos α – aminonitrílicos propuestos para la serie B.....	102
Tabla 17. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie B.....	103
Tabla 18. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los productos sintetizados en la serie B. 6b – 6h.....	108
Tabla 19. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie B. 6b - 6h.....	109
Tabla 20. Compuestos α -aminonitrílicos de la serie C.....	110
Tabla 21. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie C.....	112
Tabla 22. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los productos sintetizados en la serie C. 7a – 7p.....	118

Tabla 23. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los productos sintetizados en la serie C. 7a – 7p (continuación).	119
Tabla 24. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie C. 7a – 7p.....	120
Tabla 25. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie C. 7a – 7p (continuación).....	120
Tabla 26. Porcentajes de mortalidad en el ensayo larvicida para los compuestos sintetizados.....	124
Tabla 27. Resultados del análisis de Probit para las moléculas 7a y 7b.	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evidencia de la enfermedad del dengue a nivel mundial, tomado de Bhatt et al. (2013). ¹⁵	25
Figura 2. Evidencia de la enfermedad del chikungunya a nivel mundial para el año 2016, (tomado de Centers for disease control and prevention CDC) (https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html)	26
Figura 3. Evidencia del Zika a nivel mundial para el año 2016., (Tomado de Centers for disease control and prevention CDC) (https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika)	27
Figura 4. A. Esquema de las neuronas, células involucradas en la sinapsis colinérgica, B. Proceso de sinapsis colinérgica entre dos neuronas, C. Triada catalítica en la enzima AChE. Fuente: Autor.	30
Figura 5. Flujo de electrones y protones a través de los complejos de la cadena respiratoria, Fuente: Autor.	31
Figura 6. Nicotina y alcaloides análogos encontrados en las plantas de tabaco.	34
Figura 7. Estructura de los compuestos neonicotinoides y nicotinoides (análogos de la nicotina), Fuente: modificación del autor.	35
Figura 8. Compuestos cianogénicos presentes en plantas como metabolitos secundarios.	36
Figura 9. α -Aminonitrilos sintetizados con actividad biológica.	38
Figura 10. Comparación de los mecanismos de activación de guanidina quiral y el líquido iónico.	45
Figura 11. Compuestos de interés biológico con fragmentos de aminas cíclicas como piperidina, pirrolidina y isoquinolina.	46
Figura 12. Triazoles de interés biológico como fungicidas y plaguicidas.	47
Figura 13. Generalidades de la reacción de cicloadición 1,3 – dipolar.	48
Figura 14. Reacciones de cicloadición 1,3–dipolar entre azida y alquino.	49
Figura 15. Montaje de calentamiento en reflujo para la síntesis de bencilazidas. Fuente: Autor.	60
Figura 16. Montaje para la preparación del catalizador SSA. Fuente: Autor.	64
Figura 17. Modelo de microplaca utilizada para el ensayo de inhibición de la AChE.	75
Figura 18. Preparación de las réplicas para el ensayo de dosis exploratorias.	78
Figura 19. Procedimiento de centrifugación diferencial para aislamiento de larvas.	80
Figura 20. Montaje de electroforesis para la fragmentación de ADN. Fuente: Autor.	84
Figura 21. Espectro ^1H -RMN con CDCl_3 como disolvente para el compuesto 3a.	86
Figura 22. Espectro de ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente para el compuesto 3a.	87
Figura 23. Espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente del triazol 4a.	91
Figura 24. Espectro ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente del triazol 4a.	91
Figura 25. Variaciones de la reacción de Strecker para la obtención de α -aminonitrilos. ...	95

Figura 26. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo 5b.....	98
Figura 27. Región de campos altos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo 5b.....	99
Figura 28. Espectro ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente del α -aminonitrilo 5b.....	100
Figura 29. Campos bajos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo 6e.....	104
Figura 30. Campos altos espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo 6e.....	105
Figura 31. Espectro bidimensional COSY – RMN para el compuesto 6e.....	106
Figura 32. Espectro bidimensional HSQC – RMN para el compuesto 6e.....	106
Figura 33. Comparación espectros ^{13}C – RMN y DEPT – 135 para el compuesto 6e.....	107
Figura 34. Espectro infrarrojo (IR) para el α -aminonitrilo híbrido 7a de la serie C.	113
Figura 35. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido 7a.....	114
Figura 36. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido 7a.....	115
Figura 37. Espectro bidimensional COSY – RMN para el α -aminonitrilo híbrido 7a.	115
Figura 38. Espectro bidimensional HSQC – RMN para el α -aminonitrilo híbrido 7a.....	116
Figura 39. Comparación espectros ^{13}C – RMN y DEPT–135 para el α -aminonitrilo híbrido 7a.....	116
Figura 40. Región de campos altos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido 7i.	117
Figura 41. Valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los productos más activos en el ensayo de inhibición de la AChE comercial.	121
Figura 42. Gráfico de comparación de las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) en acetilcolinesterasa comercial para los compuestos analizados.....	122
Figura 43. Gráfico de porcentaje de actividad en acetilcolinesterasa extraída de larvas tratadas con la molécula 7a, comparando con el valor de CL_{50} en larvas y el valor de CI_{50} en AChE comercial.	123
Figura 44. Resultados del ensayo de inhibición de las oxidasas en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	126
Figura 45. Resultados del ensayo de inhibición de las deshidrogenasas en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	127
Figura 46. Resultados del ensayo de inhibición de la enzima ATPasa en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	127
Figura 47. Revelación del gel de agarosa en electroforesis de ADN extraído de larvas y adultos de <i>Aedes aegypti</i>	129

TABLA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de hidrólisis de la acetilcolina realizada por la acetilcolinesterasa.	29
Esquema 2. Reacciones de carbarilación y fosforilación de la serina.	30
Esquema 3. Reacción desarrollada por Adolph Strecker para la síntesis de alanina.	38
Esquema 4. Mecanismo de reacción de la síntesis de la girgensohnina.	39
Esquema 5. Mecanismos de la reacción de Strecker con cianuro de trimetilsililo (TMSCN).	40
Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Strecker con ferrocianuro de potasio.	42
Esquema 7. Mecanismo de activación del catalizador ácido soportado en gel de sílice. ..	45
Esquema 8. Rutas de reacción propuestas para la síntesis de 1, 2, 3 – triazoles.	50
Esquema 9. Reacción de O-propargilación para la obtención de 3a y 3b.	58
Esquema 10. Reacción de formación de bencilazidas.	59
Esquema 11. Cicloadición 1,3-dipolar para la síntesis de 1,2,3-triazoles.	60
Esquema 12. Reacción general de síntesis del catalizador SSA.	63
Esquema 13. Reacción de la acetilcolinesterasa sobre la acetiltiocolina en el ensayo de Ellman.	75
Esquema 14. Reacción de propargilación para los compuestos 3a y 3b.	85
Esquema 15. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar para la obtención de los triazoles 4a-4d.	89
Esquema 16. Reacción de Strecker promovida por cloruro de benzoilo.	96
Esquema 17. Reacción de Strecker catalizada por L-Prolina.	96
Esquema 18. Reacción de Strecker catalizada por ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA)	97
Esquema 19. Reacción de Strecker para la obtención de los α -aminonitrilos de la serie B.	103
Esquema 20. Reacción de Strecker para la obtención de los α -aminonitrilos de la serie C.	111

TABLA DE ANEXOS

Anexo I

Anexo 1. 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a).....	140
Anexo 2. 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).....	140
Anexo 3. 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (4a).....	141
Anexo 4. 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c).....	141
Anexo 5. 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4d).....	142
Anexo 6. 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetónitrilo (5b).....	142
Anexo 7. 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetónitrilo (5d).....	143
Anexo 8. 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetónitrilo (6b).....	143
Anexo 9. 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetónitrilo (6e).....	144
Anexo 10. 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetónitrilo (6f).....	144
Anexo 11. 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetónitrilo (6g).....	145
Anexo 12. 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetónitrilo (6h).....	145
Anexo 13. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetónitrilo (7a).....	146
Anexo 14. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetónitrilo (7b).....	146
Anexo 15. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetónitrilo (7e).....	147
Anexo 16. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il) acetónitrilo (7f).....	147
Anexo 17. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetónitrilo (7i).....	148
Anexo 18. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetónitrilo (7j).....	148
Anexo 19. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetónitrilo (7m).....	149
Anexo 20. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetónitrilo (7m).....	149
Anexo 21. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetónitrilo (7p).....	150

Anexo II

Anexo 1. Espectro ¹ H – RMN del compuesto 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a)....	151
Anexo 2. Espectro ¹³ C – RMN del compuesto 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a).....	151
Anexo 3. Espectro ¹ H – RMN del compuesto 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).....	152

Anexo 4. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).	152
Anexo 5. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (4a).	153
Anexo 6. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (4a).	153
Anexo 7. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4b).	154
Anexo 8. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4b).	154
Anexo 9. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c).	155
Anexo 10. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c).	155
Anexo 11. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4d).	156
Anexo 12. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4d).	156
Anexo 13. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (5b).	157
Anexo 14. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (5b).	157
Anexo 15. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (5d).	158
Anexo 16. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (5d).	158
Anexo 17. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (6b).	159
Anexo 18. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (6b).	159
Anexo 19. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).	160
Anexo 20. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).	160
Anexo 21. Espectro DEPT – 135 RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).	161
Anexo 22. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).	161
Anexo 23. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).	162
Anexo 24. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetonitrilo (6f).	162

Anexo 25. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetonitrilo (6f).	163
Anexo 26. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetonitrilo (6g).	163
Anexo 27. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetonitrilo (6g).	164
Anexo 28. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6h).	164
Anexo 29. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6h).	165
Anexo 30. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7a).	165
Anexo 31. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7a).	166
Anexo 32. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7a).	166
Anexo 33. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7a).	167
Anexo 34. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7a).	167
Anexo 35. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7b).	168
Anexo 36. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (7b).	168
Anexo 37. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (7e).	169
Anexo 38. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (7e).	169
Anexo 39. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (7f).	170
Anexo 40. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (7f).	170
Anexo 41. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo (7i).	171
Anexo 42. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo (7i).	171
Anexo 43. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j).	172
Anexo 44. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j).	172
Anexo 45. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j).	173

Anexo 46. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j).	173
Anexo 47. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j).	174
Anexo 48. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (7m).....	174
Anexo 49. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (7m).....	175
Anexo 50. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il) acetonitrilo (7n).....	175
Anexo 51. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il) acetonitrilo (7n).....	176
Anexo 52. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il) acetonitrilo (7n).	176
Anexo 53. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il) acetonitrilo (7n).....	177
Anexo 54. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il) acetonitrilo (7n).....	177
Anexo 55. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (7p).	178
Anexo 56. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (7p).	178

RESUMEN

TÍTULO: Diseño y síntesis de nuevos α -aminonitrilos análogos de los alcaloides encontrados en las plantas *Nicotiana tabacum* (Fam. Solanaceae) y *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopoidaceae), y su evaluación biológica en el mosquito *Aedes aegypti* (Diptera. Culicidae).*

Autor: Andrés Gilberto Rueda Jaimes**

Palabras clave: *Aedes aegypti*, insecticidas, nicotina, girgensohnina, α -aminonitrilos

Enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*, como el dengue, chikungunya y Zika, son clasificadas como problemas de salud pública en Colombia. Debido a la ausencia de medicamentos o una vacuna contra estos virus, el enfoque se ha realizado en la erradicación del vector mediante el control químico con carbamatos, organofosforados y piretroides. Poblaciones de este vector han adquirido resistencia a estos debido a su uso excesivo; por esta razón, la química sintética ha trabajado en obtener compuestos con actividad biológica sobre el insecto y que disminuyan la toxicidad en el ser humano.

En la naturaleza existen plantas utilizadas como plaguicidas: La planta *Nicotiana tabacum*, que contiene el alcaloide nicotina; ha mostrado actividad sobre *Culex pipiens*. Otro caso es la *Girgensohnia oppositiflora*, de la cual hace parte el alcaloide girgensohnina, sintetizado en el LQOBio, que inhibió la actividad de la acetilcolinesterasa. Estudios posteriores de sus análogos reveló actividad sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Buscando obtener nuevos compuestos con acción insecticida, una nueva serie de 16 α -aminonitrilos análogos de nicotina y de girgensohnina fueron sintetizados mediante la reacción de Strecker catalizada por ácido sulfúrico soportado en gel de sílice, usando KCN como fuente de cianuro; estos compuestos se obtuvieron con rendimientos considerables, confirmando su estructura por técnicas RMN e IR. La evaluación biológica de estos compuestos sobre las larvas de *Aedes aegypti* mostró mortalidad inferior a 100 ppm, sobresaliendo las moléculas **7a** y **7b** con valores de concentración letal media de 56.95 ppm y 67.53 ppm respectivamente. En el ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa sobresalió la molécula **7a**, presentando la mayor inhibición, con un valor de concentración inhibitoria media $IC_{50} = 9.78 \pm 2.09$ ppm. Finalmente, para esta misma molécula se observó inhibición del complejo III en la cadena mitocondrial, siendo un posible candidato para el desarrollo de insecticidas de *Aedes aegypti*.

*Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Química

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Vladimir V. Kouznetsov, PhD, DSc. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio). Codirector: Jonny E. Duque, PhD. Centro de investigaciones en enfermedades tropicales (Cintrop), Universidad Industrial de Santander.

ABSTRACT

TITLE: Design and synthesis of new α – aminonitriles analogues of alkaloids found in *Nicotiana tabacum* (Fam. solanaceae) and *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. chenopoidaceae) plants, and its biological evaluation in *Aedes aegypti* (Diptera. culicidae) mosquito.*

Author: Andrés Gilberto Rueda Jaimes**

Key words: *Aedes aegypti*, insecticides, nicotine, girgensohnine, α -aminonitriles

Diseases transmitted by *Aedes aegypti*, such as dengue, chikungunya and zika, are classified as public health concern in Colombia. Because of the absence of drugs or vaccines against the viruses, the focus have been done in the vector eradication through the chemical control with carbamates, organophosphates and pyrethroids. Populations of *Aedes aegypti* mosquito have acquired resistance to these compounds due to their excessive use; for this reason, synthetic chemistry have worked in obtaining compounds with biological activity in the insect, and decreasing toxicity in the human being.

In nature, are plants used as pesticides: *Nicotiana tabacum* plant, containing the alkaloid nicotine; has shown biological activity in *Culex pipiens*. Another case is *Girgensohnia oppositiflora* plant, on which the alkaloid girgensohnine is part, synthesized in LQOBio, which inhibited the activity of acetylcholinesterase enzyme. The subsequent study of its analogs revealed activity in *Aedes aegypti* larvae.

Looking for the obtention of new compounds with insecticide action, a new series of 16 α -aminonitriles, analogs of nicotine and girgensohnine, were synthesized through silica supported sulfuric acid catalyzed Strecker reaction, using KCN as cyanide source; these compounds were obtained with considerable yields, confirming their structures with NMR and IR techniques. Biological evaluation of these compounds in *Aedes aegypti* larvae showed activity below 100 ppm, revealing molecules **7a** and **7b** as the most actives with medium lethal concentration values of 56.95 ppm and 67.53 ppm respectively. In commercial AChE inhibition assay, molecule **7a** highlighted revealing the highest inhibitory action whit a medium inhibitory concentration value $IC_{50} = 9.78 \text{ ppm} \pm 2.09 \text{ ppm}$. Finally, for the same molecule was observed the inhibition of complex III in mitochondrial chain, being a possible candidate for the development of *Aedes aegypti* vector insecticides.

*Master degree project to obtain the tittle of Magister in Chemistry

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Vladimir V. Kouznetsov, PhD, DSc. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio). Codirector: Jonny E. Duque, PhD. Centro de investigaciones en enfermedades tropicales (Cintrop), Universidad Industrial de Santander.

INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es un insecto perteneciente a la familia Culicidae, originario del África y el vector de los virus del dengue, chikungunya y Zika en todo el mundo. Para la enfermedad del dengue, en el 2016, se estimaron 390 millones de casos con riesgo de infección en todo el mundo cada año,¹ reportándose más casos en regiones tropicales y subtropicales de África, Asia suroriental, el Pacífico y las Américas, considerándose una enfermedad de gran riesgo en todo el mundo.

2

En el caso de Colombia, desde el año 2011 los reportes del dengue ha estado en aumento, donde para el año 2017 se han reportado hasta el momento 16200 casos.³ En el caso del chikungunya los primeros casos fueron reportados en nuestro país en el 2014, manteniéndose hasta el donde hasta el 2017 se cuentan 710 nuevos casos.^{3, 4} Para el año 2015 se reportaron en Colombia y Brasil los primeros casos del virus del Zika, con 1505 casos en 2017.³ Con base en estas estadísticas y en sus altas tasas de morbilidad, las que suponen un alto costo para los sistemas de salud,⁵ se puede entender por qué estos son problemas de salud pública en todas las regiones donde se presentan.

-
1. BENELLI, G. & MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitol. Res.* 2016, **115**, p. 1747–1754.
 2. GUZMAN, M. G. & HARRIS, E. Dengue. *Lancet.* 2015, **385**, p. 453–465.
 3. Instituto Nacional de Salud (INS). Boletín epidemiológico semana 34-2017. Colombia, 2017, p. 14-24.
 4. RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S. & KELLER, P. A. Chikungunya Virus : Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 2014, **57**, p. 1147–1166.
 5. CASTRO, Raúl. Costos del dengue en Colombia (2010-2012), Impacto en salud pública. 2014, Bogota D.C., Universidad de los Andes, p. 1–45.

Debido a que en el caso del virus del dengue este se presenta con diferentes serotipos, su vacuna aún está en investigación,⁶ y a que para el chikungunya y el Zika no se han reportado vacunas ni medicamentos para erradicarlos, el enfoque de la investigación en estas enfermedades se ha centrado en el control de *Aedes aegypti*.

Estas actividades involucran desde campañas sociales para la eliminación de criaderos en las casas hasta el control químico, el cual ha mostrado ser el más efectivo.⁷ Este control se centra en el uso de insecticidas sintéticos pertenecientes a las familias de los carbamatos, como el Propoxur, organofosforados como el Malatión, y piretroides como la Deltametrina. Estos compuestos actúan en el organismo del insecto a través de diferentes mecanismos, especialmente a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, causando una sobre-estimulación neuromuscular que lleva a la parálisis del insecto y su posterior muerte.⁸ Debido a que estos compuestos se han usado frecuentemente desde la segunda guerra mundial, y a errores en la dosificación y en las concentraciones empleadas, poblaciones del vector han presentado alteraciones en las proteínas diana, desarrollando resistencia frente a estos tipos de compuestos, reduciendo su efectividad.⁹

6. STEVENS, A. J., *et. al.* The Medicinal Chemistry of Dengue Fever. *J. Med. Chem.* 2009, **52**, p. 7911–7926.

7. MANRIQUE-SAIDE, P. *et al.* Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, **21**, p. 308–311.

8. BRAGA, I. A. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. e Serviços Saúde.* 2007, **16**, p. 279–293.

9. HEMINGWAY, J., *et. al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2004, **34**, p. 653–65.

Las plantas han desarrollado mecanismos químicos de defensa como la producción de diferentes metabolitos secundarios,¹⁰ esta propiedad de las plantas se ha aprovechado durante mucho tiempo para la protección de cultivos. Además, se ha reportado actividad larvívica sobre *Aedes aegypti* por parte de aceites esenciales de diferentes plantas.¹¹ Esto, sumado a que muchas plantas son usadas por sus propiedades medicinales, han permitido su categorización como moléculas de gran interés sintético. Uno de los enfoques de la química orgánica sintética es la obtención de nuevos compuestos análogos de compuestos naturales, buscando potenciar sus actividades biológicas, para el diseño y la síntesis de candidatos a insecticidas, como por ejemplo en el caso que nos involucra.

Previamente, en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) se obtuvo el alcaloide α -aminonitrílico girsensohnina con un rendimiento de 76%, a través de la reacción de Strecker catalizada por tricloruro de Indio (InCl_3).¹² El estudio de su actividad biológica mostró como resultado una inhibición de la acetilcolinesterasa comercial de 20.1 ppm en su concentración inhibitoria media (IC_{50}). A partir de este compuesto, se ha sintetizado una serie de nuevos análogos los cuales brindaron menores concentraciones inhibitorias y además de esto, mostraron una actividad larvívica sobre *Aedes aegypti*.¹³

10. RYAN, M. F. & BYRNE, O. Plant - insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 1988, **14**, p. 1965–1975.

11. DIAS, C. N. & MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitol. Res.* 2013, **113**, p. 565–592.

12. VARGAS, L. Y. & KOUZNETSOV, V. V. First Girsensohnine Analogs Prepared Through InCl_3 - catalyzed Strecker Reaction and their Bioprospection. *Curr. Org. Synth.* 2013, **10**, p. 969–973.

13. CARREÑO, A. L., *et. al.* Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **78**, p. 392–400.

Debido a lo previamente expuesto, el enfoque de este trabajo de maestría estuvo orientado a la síntesis de una nueva serie de compuestos α -aminonitrilos, análogos de la girsensohnina y de la nicotina, con el objetivo de potenciar la actividad insecticida sobre el mosquito *Aedes aegypti*, además de investigar el mecanismo de acción de estos productos usando ensayos biológicos sobre la acetilcolinesterasa y la cadena respiratoria, y evaluar su capacidad para fragmentar el ADN del mosquito. Esta investigación que involucró la síntesis de nuevos α -aminonitrilos y la búsqueda de moléculas con acción insecticida sobre el mosquito *Aedes aegypti*, vector principal de la enfermedad del dengue, fue realizado en el marco del proyecto 8727 Contrato RC-624-2014, financiado por COLCIENCIAS.

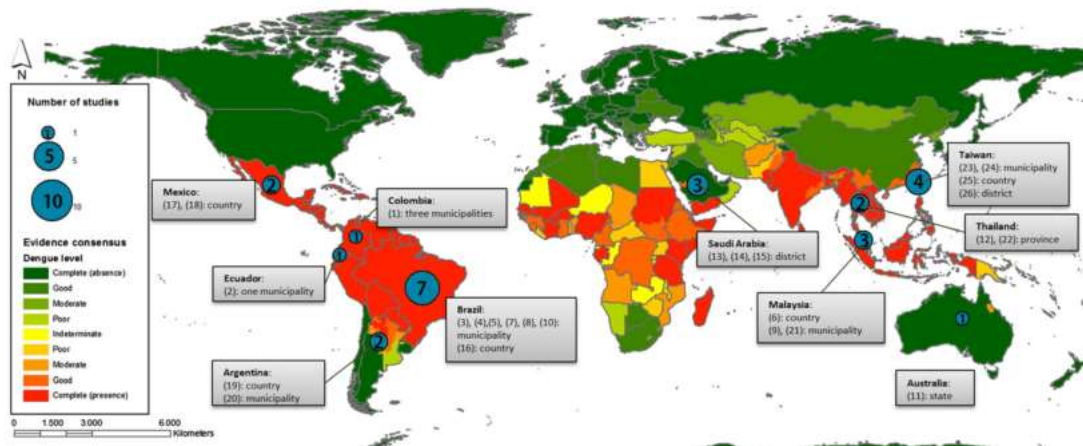
Como producto del presente trabajo se realizó una presentación en la categoría de ponencia oral titulada “Design and synthesis of new nicotine and girsensohnine analogs based on the α -amino nitrile backbone and their biological evaluation on *Aedes aegypti* mosquitoes” en el 46th World Chemistry Congress of International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC, realizado en Sao Paulo, Brasil, del 7 al 14 de julio de 2017.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), insecto encontrado en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, es el vector de diferentes enfermedades virales de gran interés para la salud pública a nivel mundial. Una de ellas, el dengue, es un problema creciente en todo el mundo y se estima que anualmente se presentan 390 millones de infecciones. Para el año 2010 se registraron cerca de 1'713.000 casos de dengue y 1194 muertes por su causa en todo el continente americano.¹⁴ El virus del dengue pertenece al grupo de los arbovirus del género *Flavivirus* (Fam. *Flaviviridae*) ya que es transmitido por artrópodos hematófagos. En la región de Latinoamérica se registra la circulación de los cuatro serotipos de este virus y, tal como se muestra en la Figura 1, los casos para esta enfermedad se han reportado para las regiones subtropicales.

Figura 1. Evidencia de la enfermedad del dengue a nivel mundial



FUENTE: Bhatt et al. (2013).¹⁵

14. Tapia-Conyer, R. Dengue: an escalating public health problem in Latin America. *Paediatr. Int. Child Health*. 2012, **32 Suppl 1**, p. 14–17.

15. Bhatt, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013, **496**, p. 504–507.

El chikungunya es un virus que pertenece a la familia Togaviridae del genero Alfavirus. Esta enfermedad fue descubierta en África y el sureste de Asia en 1952, desde entonces se han documentado brotes en América y Europa.⁴ El Instituto Nacional de Salud de Colombia reportó para el chikungunya 106.763 casos en 2014 y 359.728 casos;¹⁶ el virus del chikungunya ha causado brotes de enfermedades como la artritis, y debido a que no hay una vacuna para este virus, el tratamiento se centra en el alivio de los síntomas.

Figura 2. Evidencia de la enfermedad del chikungunya a nivel mundial para el año 2016.



FUENTE: Centers for disease control and prevention (CDC) (<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>).

Al igual que el virus del dengue, el virus del Zika pertenece al género Flavivirus y se identificó por primera vez en 1947 en macacos del bosque Zika, Uganda a través de un monitoreo de fiebre amarilla selvática.¹⁷

4. RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S. & KELLER, P. A. Chikungunya Virus : Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 2014, **57**, p. 1147–1166.

16. Instituto Nacional de Salud INS. Boletín epidemiológico semana 43 de 2017. Colombia. 2017, p. 14-27.

17. IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med. Mal. Infect.* 2014, **44**, p. 302–307.

Sin embargo, en 2015 se reportó el brote de esta enfermedad en países de Latinoamérica como Brasil y Colombia. En ese mismo año se observó en Brasil un aumento en el número de recién nacidos con microcefalia; investigaciones relacionaron al virus con estos hallazgos debido a que muchas de las madres, en su periodo gestacional, contrajeron este virus.¹⁸

Figura 3. Evidencia del Zika a nivel mundial para el año 2016.



FUENTE: Centers for disease control and prevention CDC (<https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>).

Dadas estas estadísticas y debido a que no se cuenta con vacunas ni medicamentos efectivos y selectivos para estas enfermedades, el enfoque del control de estos virus se ha centrado en la eliminación del vector, el mosquito *Aedes aegypti*.

1.2. Insecticidas naturales y sus análogos sintéticos

La alternativa más eficiente para el control de *A. aegypti* en los estados larvales y adultos es el uso de insecticidas sintéticos y/o semi-sintéticos como los piretroides, carbamatos y compuestos organofosforados.¹⁹

18. CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016, **387**, p. 1531–1539.

19. AGUIRRE-OBANDO, O. A., *et al.* Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera : Culicidae) from Colombia. *Zoologia*. 2015, **32**, p. 14–22.

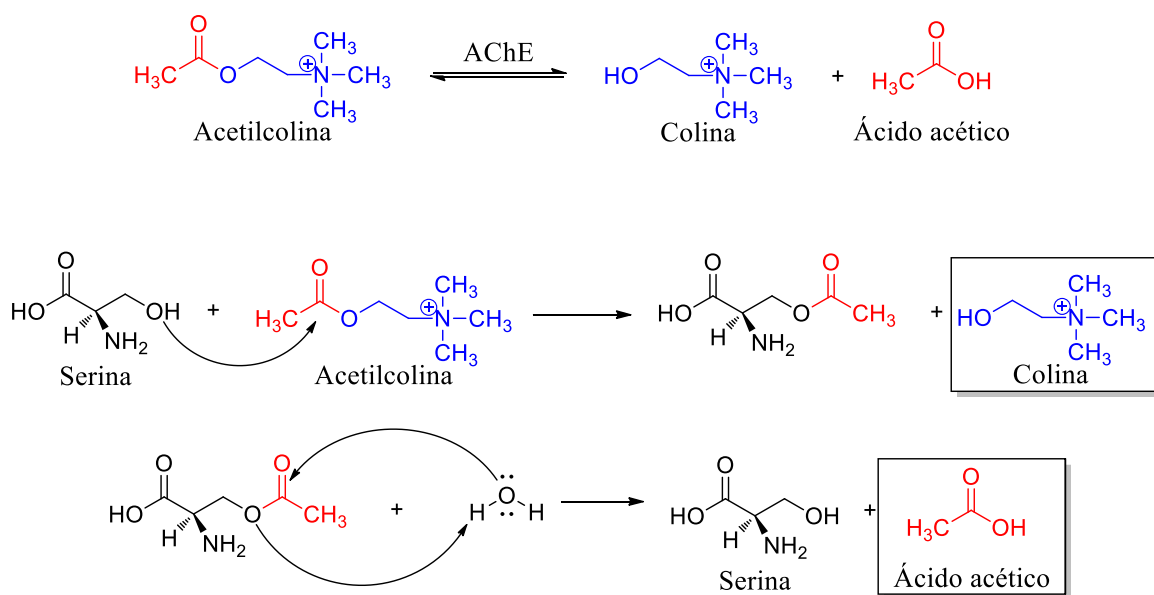
Los insectos metabolizan estos insecticidas tóxicos para eliminarlos a través de reacciones de biotransformación realizadas por las enzimas detoxificantes en dos fases principales. En la primera fase participan aquellas enzimas que transforman estos insecticidas en compuestos más polares mediante reacciones de hidrólisis y oxidación, como las monooxigenasas,²⁰ entre ellas la citocromo P-450, y las esterasas,²¹ como es el caso de la acetilcolinesterasa. En la segunda fase, los compuestos transformados en la fase I son combinados con agentes conjugantes para obtener moléculas más polares que luego son eliminadas por el organismo; las enzimas que participan en esta fase son las esterasas,²² entre ellas la glutathion-S-transferasa. Se ha reportado que cada una de estas enzimas es selectiva para cada tipo de insecticida;²³ además de esto, se ha estudiado el efecto de nuevos compuestos sobre estas enzimas detoxificantes.²⁴

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) pertenece a la familia de las carboxilesterasas y actúa como un regulador de la producción de acetilcolina en el espacio sináptico a través de la hidrólisis de la acetilcolina para formar como compuestos secundarios colina y acetato. Esta enzima hidroliza los enlaces éster o amida en las moléculas usadas como insecticidas para formar compuestos más solubles como alcoholes y ácidos carboxílicos (Esq. 1).

-
20. BERGÉ, J.; FEYEREISEN, R. & AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1998, **353**, p. 1701–1706.
 21. MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R. & VALLE, D. The classification of esterasas: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012, **107**, p. 437–449.
 22. LUMJUAN, N. *et al.* The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007, **37**, p. 1026–1035.
 23. HEMINGWAY, J. & RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 2000, **45**, p. 371–391.
 24. CARREÑO OTERO, A. L., *et al.* Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girsengsohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 2018, **204**, p. 14–25.

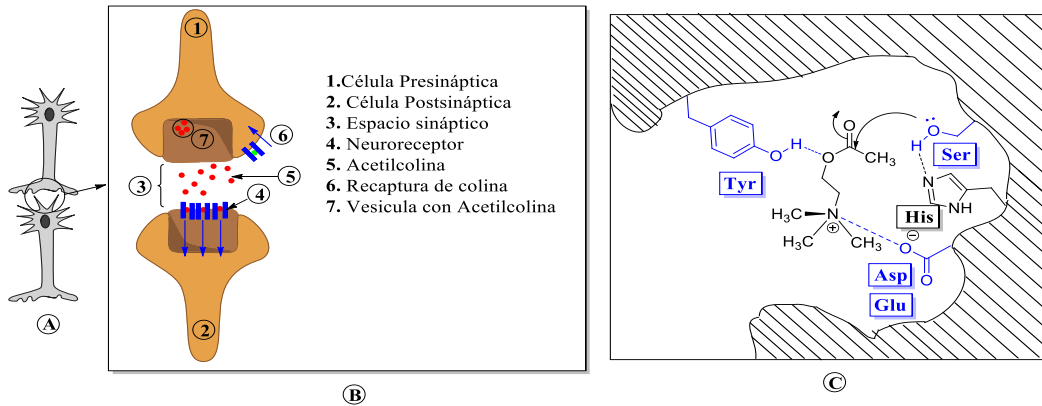
Cada carboxilesterasa tiene selectividad por un tipo de sustrato y la triada catalítica que predomina en estas enzimas son los residuos peptídicos de Serina, Histidina y Aspartato (Fig. 4); el residuo Serina realiza un ataque nucleofílico en el carbono electrodeficiente del enlace éster, y la afinidad de la histidina por el agua del medio promueve la liberación de los productos de la hidrólisis para que de esta manera la enzima vuelva a su estado inicial.²¹

Esquema 1. Mecanismo de hidrólisis de la acetilcolina realizada por la acetilcolinesterasa.



21. MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R. & VALLE, D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012, **107**, p. 437–449.

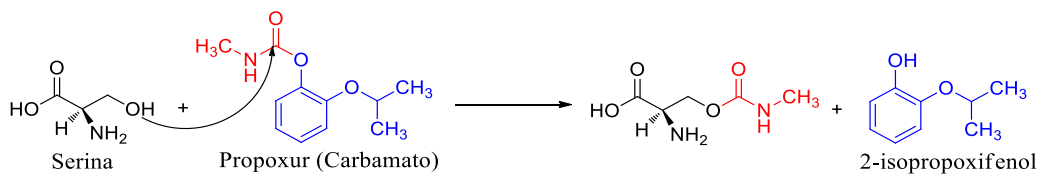
Figura 4. A. Esquema de las neuronas, células involucradas en la sinapsis colinérgica, B. Proceso de sinapsis colinérgica entre dos neuronas, C. Triada catalítica en la enzima AChE.



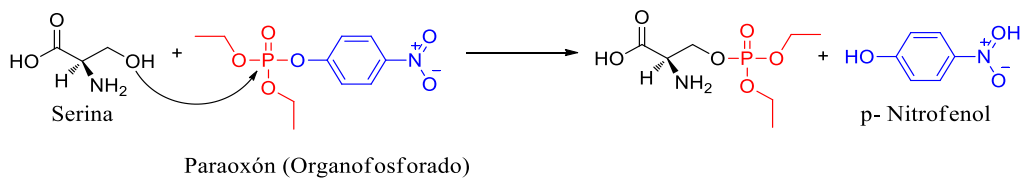
La acción de los inhibidores organofosforados y carbamatos sobre la acetilcolinesterasa se debe a la formación de un enlace más fuerte entre el aminoácido serina y el fragmento que se hidroliza, llevando a una fosforilación o carbarilación del aminoácido, impidiendo que la enzima vuelva a su estado inicial (Esq. 2); esto produce una acumulación del neurotransmisor acetilcolina en los neuroreceptores y posteriormente la muerte del insecto.²⁵

Esquema 2. Reacciones de carbarilación y fosforilación de la serina.

Carbarilación de serina con el uso de Propoxur



Fosforilación de serina con el uso de Paraoxón

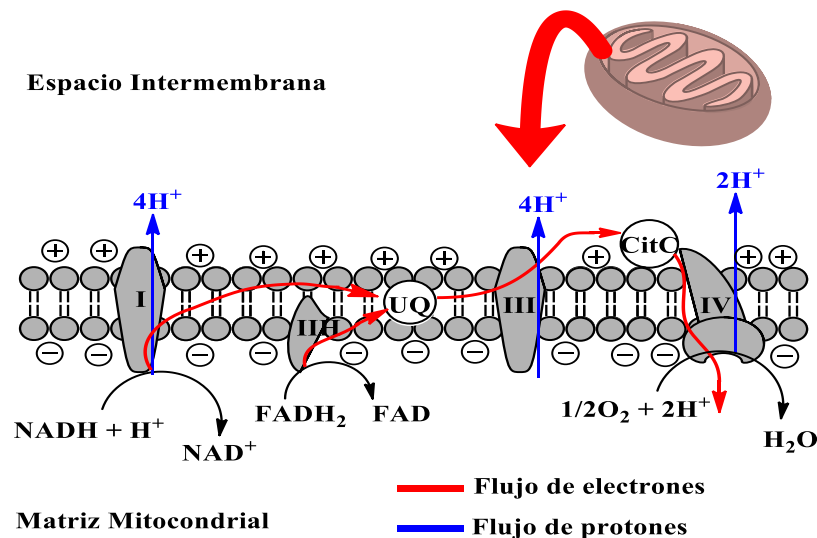


25. RUSSELL, R. J. *et al.* Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2004, **79**, p. 84–93.

A pesar de la efectividad de estos compuestos, su uso frecuente ha llevado a alteraciones en las actividades de las enzimas detoxificantes, incluyendo a la acetilcolinesterasa, causando en los mosquitos la resistencia a estos insecticidas.^{9,25}

Otro mecanismo de acción involucra la cadena respiratoria celular del mosquito. La mitocondria juega un papel importante en el metabolismo celular al mantener los niveles de ATP dando la energía necesaria para el funcionamiento de la célula, a su vez regula los niveles de mensajeros secundarios como Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno al citoplasma; este organelo también se destaca por su participación en los procesos de inducción de muerte celular, la cual está relacionada con el aumento de la permeabilidad de sus membranas.²⁶

Figura 5. Flujo de electrones y protones a través de los complejos de la cadena respiratoria



-
9. HEMINGWAY, J., *et al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2004, **34**, p. 653–65.
25. RUSSELL, R. J. *et al.* Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2004, **79**, p. 84–93.
26. DEBATIN, K.-M., PONCET, D. & KROEMER, G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002, **21**, p. 8786–8803.

El flujo de los electrones a través de la cadena mitocondrial se produce por la acción de deshidrogenasas que toman los electrones de procesos del metabolismo celular, como el ciclo del ácido cítrico, la β -oxidación y el catabolismo de aminoácidos (Fig. 5); estos transportadores de electrones son cuatro complejos enzimáticos pertenecientes a las flavoproteínas que catalizan la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena.²⁷

Este proceso conocido como fosforilación oxidativa inicia con la transferencia de electrones hacia la ubiquinona (UQ) desde los complejos I (NADH-Q reductasa) y II (Succinato-Q reductasa) a partir de los dadores electrónicos NADH (Complejo I) y succinato (Complejo II) provenientes del ciclo del ácido cítrico.²⁸

Los electrones fluyen desde la ubiquinona al citocromo C a través del complejo III (citocromo C reductasa), el cual es la segunda bomba de protones de la cadena respiratoria; la función de la citocromo C reductasa es catalizar la transferencia de los electrones a la citocromo C oxidasa (complejo IV). Este flujo de electrones provoca el transporte de dos protones (H^+) hacia el espacio intermembranal. Finalmente el último de los complejos que bombea protones, la citocromo oxidasa, es la encargada de catalizar la transferencia de los electrones del citocromo C al O_2 para formar agua cediendo 4 electrones al oxígeno.²⁹

Debido a la resistencia adquirida por poblaciones de mosquitos a los insecticidas, y a los diferentes mecanismos de acción de estos compuestos en el organismo del insecto, el enfoque de la síntesis química ha avanzado a la búsqueda y obtención de nuevos compuestos que sean selectivos para el insecto, sin ser tóxicos para el ser humano, además de ser amigables con el ambiente.

27. NILSSON, M. I. *et al.* Redox state and mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of LGMD2A patients. *PLoS One* 2014, **9**, p. 1-11.

28. KHUTORNENKO, A. A., *et al.* The role of dihydroorotate dehydrogenase in apoptosis induction in response to inhibition of the mitochondrial respiratory Chain complex III. *Acta Naturae* 2014, **6**, p. 69–75.

29. VAAMONDE GARCÍA, C. *et al.* Oligomycin, an inhibitor of complex V of mitochondrial respiratory chain, induces an inflammatory response in rat knee joint. *Osteoarthr. Cartil.* 2013, **21**, p. S70.

Se sabe que como mecanismo de defensa las plantas producen metabolitos secundarios tóxicos para los insectos.^{30,31} El uso de estos metabolitos, principalmente los alcaloides, han generado interés en ciencias como la medicina y la agricultura, ya que muchos de estos compuestos naturales son utilizados para el tratamiento de muchas enfermedades y como agentes agroquímicos. El nombre alcaloide fue utilizado por primera vez en 1819 por el químico alemán Carl Friedrich Wilhelm Meissner debido a que las propiedades observadas en la morfina, brucina y cafeína, entre otros, eran semejantes a los álcalis. Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados básicos con actividad biológica y de bajo peso molecular (<500 Da).³²

Desde el siglo XVII se ha conocido la propiedad insecticida de la planta de tabaco *Nicotiana tabacum* (Fam. Solanaceae) llegando a ser usada como extracto en agua para controlar los insectos. Su principio activo es el alcaloide nicotina (Fig. 6), presente en sus hojas en un 94.8%, aislado por Posselt y Reimann en 1828. La nicotina pura es un líquido transparente que al exponerse a la luz y al aire llega a ser más viscoso y de color más oscuro.³³

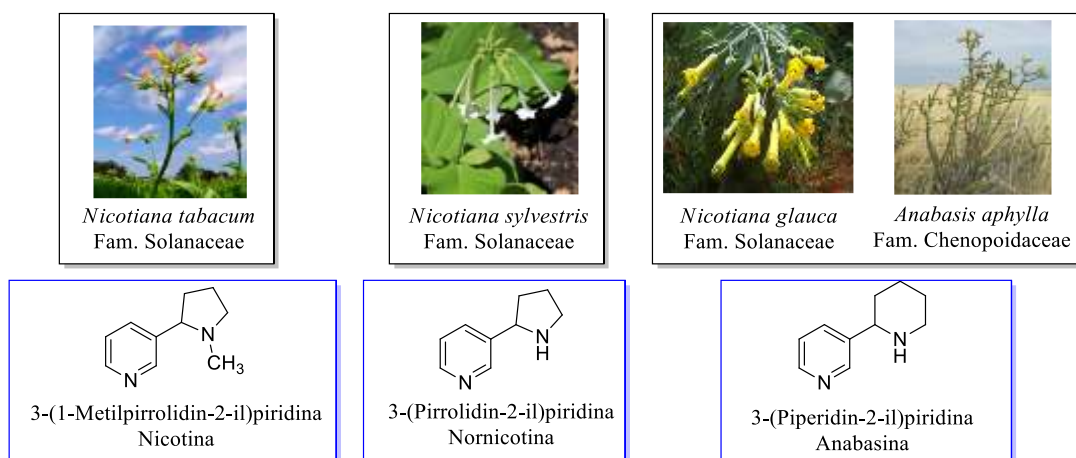
30. RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 2010, **29**, p. 913–920.

31. LIU, X. C. *et al.* Bioactivities of a new pyrrolidine alkaloid from the root barks of *Orixa japonica*. *Molecules.* 2016, **21**, p. 1–8.

32. ANISZEWSKI, T. *Alkaloids - Secrets of Life.* Amsterdam. *Elsevier* 2007.

Durante muchos años la nicotina fue considerada como el único alcaloide con actividad biológica; estudios posteriores analizaron las propiedades insecticidas de diferentes alcaloides: La nornicotina, alcaloide principal de la *Nicotiana glauca* (Fam. Solanaceae) presente en las hojas en un 19.1%, se asemeja a la nicotina en sus propiedades físicas y químicas, además de presentar aproximadamente la misma toxicidad en insectos que la nicotina; la anabasina, alcaloide de la planta *Anabasis aphylla* (Fam. Chenopodiaceae) presente en un 2% y en la *Nicotiana glauca* (Fam. Solanaceae), presente en un 85.1% y con una toxicidad en los insectos mayor que la nicotina (Fig. 6).^{33,34}

Figura 6. Nicotina y alcaloides análogos encontrados en las plantas de tabaco.



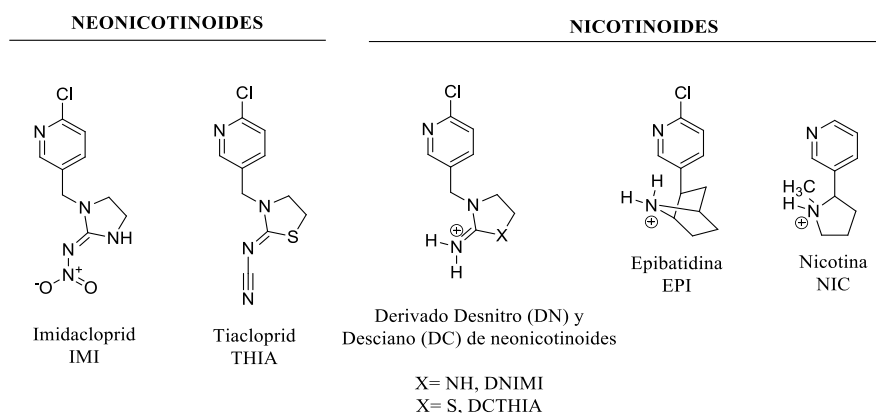
Uno de los problemas al usar la nicotina como insecticida es la falta de selectividad hacia los insectos, ya que también es tóxica para los mamíferos, incluyendo a los seres humanos. Debido a esto, la química orgánica sintética se ha enfocado en la obtención de nuevos compuestos análogos a la nicotina que sean más seguros para el ser humano. Estos compuestos son denominados neonicotinoides y nicotinoides, debido a su similitud estructural con el alcaloide, con la ventaja de ser selectivos sólo para los insectos.

33. SEIFERLE, E. J. & Frear, D. E. H. Insecticides derived from plants. *Ind. Eng Chem.* 1948, **40**, p. 683–691.

34. SAITOH, F., Noma, M. & Kawashima, N. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry.* 1985, **24**, p. 477–480.

En el caso de los neonicotinoides imidacloprid y tiacloprid, análogos sintéticos clorados de la nicotina, poseen en su estructura un grupo nitro o ciano en el anillo pirrolidínico. Otro ejemplo se encuentra en la epibatidina, alcaloide natural clorado, análogo de la nicotina (Fig. 7).

Figura 7. Estructura de los compuestos neonicotinoides y nicotinoides (análogos de la nicotina)



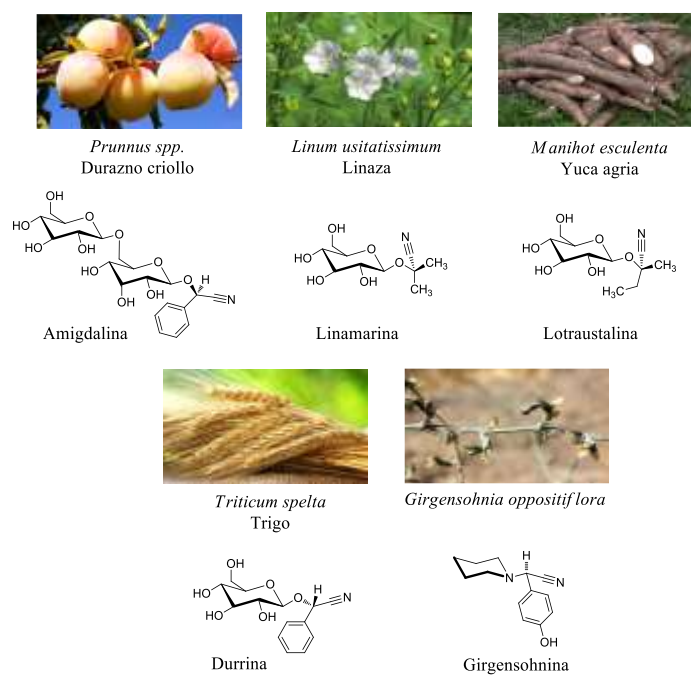
Se ha logrado determinar que para una misma especie animal hay diferente afinidad farmacológica frente a los neonicotinoides y nicotinoides.³⁵ Estudios realizados de etiquetado de fotoafinidad y cristalografía para analizar la selectividad en la toxicidad general contra la actividad insecticida de estos compuestos en diferentes sitios activos, comparada con las proteínas de enlace a la acetilcolinesterasa del molusco de agua salada *Aplysia californica* y el caracol de estanque *Lymnaea stagnalis*, mostraron que el molusco *A. californica* es altamente sensible a los dos tipos de compuestos, mientras que el caracol *L. stagnalis* tiene menor afinidad a los neonicotinoides. En estudios anteriores del mismo autor se observó que los compuestos neonicotinoides son selectivos para insectos, mientras que los nicotinoides lo son para los vertebrados.³⁶

35. TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: The determinants of life or death. *Acc. Chem. Res.* 2009, **42**, 260–269.

36. TOMIZAWA, M., LEE, D. L. & CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, p. 6016–6024.

Otros metabolitos tóxicos de las plantas son los cianogénicos; estos son derivados de la glucosa y poseen un grupo nitrilo (CN) en el fragmento cianhidrina en su estructura, como la amigdalina, durrina, prunasina y linamarina, entre otros compuestos; la girgensohnina es un compuesto cianogénico particular que no posee un fragmento de glucosa en su estructura, este alcaloide pertenece al grupo de compuestos α -aminonitrílicos (Fig. 8).

Figura 8. Compuestos cianogénicos presentes en plantas como metabolitos secundarios.



Aunque todos los productos de las plantas presentadas en la Figura 8 son comestibles, cabe destacar que los glucósidos cianogénicos generalmente están presentes en partes no comestibles de la planta, como las raíces, las semillas y el tallo. En un estudio para cuantificar la cantidad de durrina en el sorgo y el pasto Sudán se determinó mayor cantidad de durrina en la parte epigelial de la planta que en las raíces y las semillas, resaltando su utilidad como biofumigantes para el control de las plagas en el sorgo.³⁷

37. DE NICOLA, L., *et. al.* A simple analytical method for dhurrin content evaluation in cyanogenic plants for their utilization in fodder and biofumigation. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 8065–8069.

Otro aspecto a tomar en cuenta es la concentración a la que el compuesto llega a ser tóxico. En un reporte médico se estudió el caso de una paciente de 67 años y 60 Kg con ingreso a sala de emergencias después de haber consumido una mezcla de doce almendras amargas con agua. En la cuantificación del contenido de cianuro en las almendras se reportó un valor de 6.2 mg por cada almendra amarga y una dosis letal mínima de 0.5 mg de cianuro por kilogramo de peso corporal, en el caso de esta paciente el consumo fue de 74.4 mg de cianuro, lo cual fue la causa de la intoxicación que llevó a su posterior muerte.³⁸

Para el caso de los insectos, estos compuestos cianogénicos resultan ser aún más tóxicos, por lo que su uso ha sido propuesto como plaguicidas.³⁷ La *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopodiaceae) es un arbusto que se encuentra al sur de Rusia e Irán, que como metabolito secundario produce la girgensohnina; este alcaloide se obtiene de la planta con un rendimiento menor al 0.05%. En el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) de la UIS se sintetizó este alcaloide con un rendimiento del 76% usando la reacción de Strecker y en el estudio de su actividad enzimática se reportó un valor de $IC_{50} = 20.1$ ppm sobre la acetilcolinesterasa.¹² Con el propósito de potenciar la actividad insecticida de este alcaloide, estudios llevaron a la obtención de nuevos análogos y su evaluación biológica, demostrando que al realizar modificaciones estructurales se lograba mejorar la actividad enzimática cuando se evaluaron sobre la enzima acetilcolinesterasa comercial,¹³ mostrando también una inhibición de las enzimas mitocondriales e induciendo un posible estrés oxidativo,³⁹ además de reportar actividad insecticida sobre larvas y adultos de *Aedes aegypti* (Fig. 9).

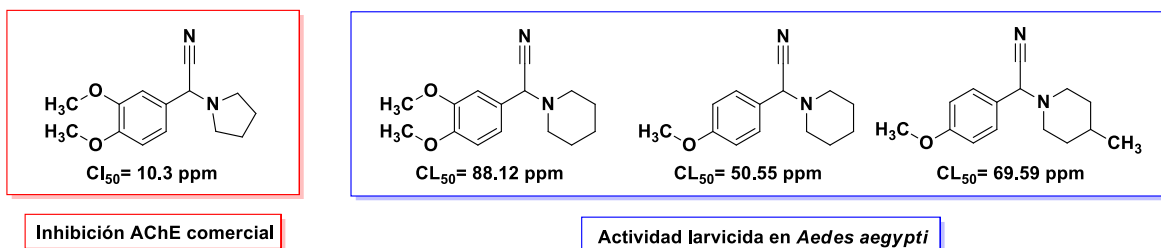
12. VARGAS, L. Y. & KOUZNETSOV, V. V. First Girgensohnine Analogs Prepared Through $InCl_3$ - catalyzed Strecker Reaction and their Bioprospection. *Curr. Org. Synth.* 2013, **10**, p. 969–973.

37. DE NICOLA, L., *et. al.* A simple analytical method for dhurrin content evaluation in cyanogenic plants for their utilization in fodder and biofumigation. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 8065–8069.

38. SHRAGG, T. A. & ALBERTSON, T. E. Cyanide Poisoning After Bitter Almond Ingestion. *West. J. Med.* 1982, **136**, 65–69.

39. BORRERO LANDAZABAL, M. A., *et. al.* Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2017, p. 1-7.

Figura 9. α -Aminonitrilos sintetizados con actividad biológica.

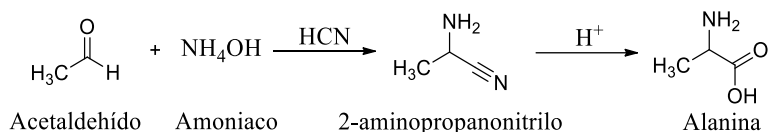


1.3. Síntesis de α -aminonitrilos, desarrollo de la reacción de Strecker

Tal como se mencionó en la sección anterior, los compuestos cianogénicos son metabolitos secundarios de diferentes plantas y debido a su acción tóxica sobre insectos, han sido propuestos como plaguicidas. Alcaloides α -aminonitrilos, como la girgensohnina, son compuestos de gran interés sintético ya sus características estructurales permiten la obtención de moléculas como aminoácidos, diaminas y compuestos heterocíclicos.^{40, 41}

Para la obtención de los α -aminonitrilos, el químico alemán Adolph Strecker realizó en 1850 la síntesis del aminoácido alanina, iniciando con la obtención del 2-aminopropanonitrilo a partir de la condensación de tres componentes; acetaldehído, amoníaco y cianuro de hidrógeno (Esq. 3).⁴²

Esquema 3. Reacción desarrollada por Adolph Strecker para la síntesis de alanina.



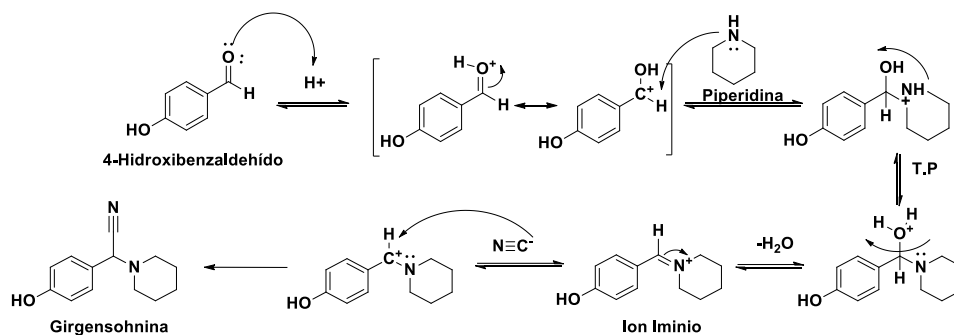
40. BAHRAMI, K., MEHDI, M. & ROOSTAEI, M. Sodium azide as a catalyst for the hydration of nitriles to primary amides in water. *J. Chem. Res.* 2015, **39**, p. 267–269.

41. HU, X., MA, Y. & LI, Z. Eco-friendly synthesis of α -aminonitriles from ketones in PEG-400 medium using potassium Hexacyanoferrate (II) as cyanide source. *J. Organomet. Chem.* 2012, **705**, p. 70–74.

42. STRECKER, A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper; *Eur. J. Org. Chem.* 1850, **75**, p. 27–45.

El mecanismo de sustitución nucleofílica de la reacción de Strecker involucra dos adiciones secuenciales generando en primer lugar el ion iminio, producto de la adición de la amina primaria o secundaria al compuesto carbonílico, para luego dar lugar a la adición nucleofílica del ion cianuro para la formación *in situ* del α -aminonitrilo esperado (Esq. 4).⁴³

Esquema 4. Mecanismo de reacción de la síntesis de la girgensohnina.



Gracias a la diversidad de aminas y compuestos carbonílicos utilizados en la condensación, la reacción de Strecker aún continúa ocupando un lugar destacado entre las metodologías empleadas en la síntesis orgánica. En la primera reacción realizada por Adolph Strecker se utilizó el cianuro de hidrógeno (HCN) requiriéndose cuidados en su manejo debido a que este gas es altamente tóxico. En estudios posteriores se emplearon fuentes de cianuro sólidas como el cianuro de potasio (KCN) y cianuro de sodio (NaCN) que facilitaron su manejo en la reacción. Se han estudiado diferentes fuentes de cianuro que buscan aumentar el rendimiento de los productos y disminuir los riesgos potenciales del uso de gases o sales inorgánicas solubles en agua (Tabla 1).

43. LI, J. J. *Name Reactions, a Collection of Detailed Reaction Mechanisms*. Germany, Springer, 2006, p. 579-581.

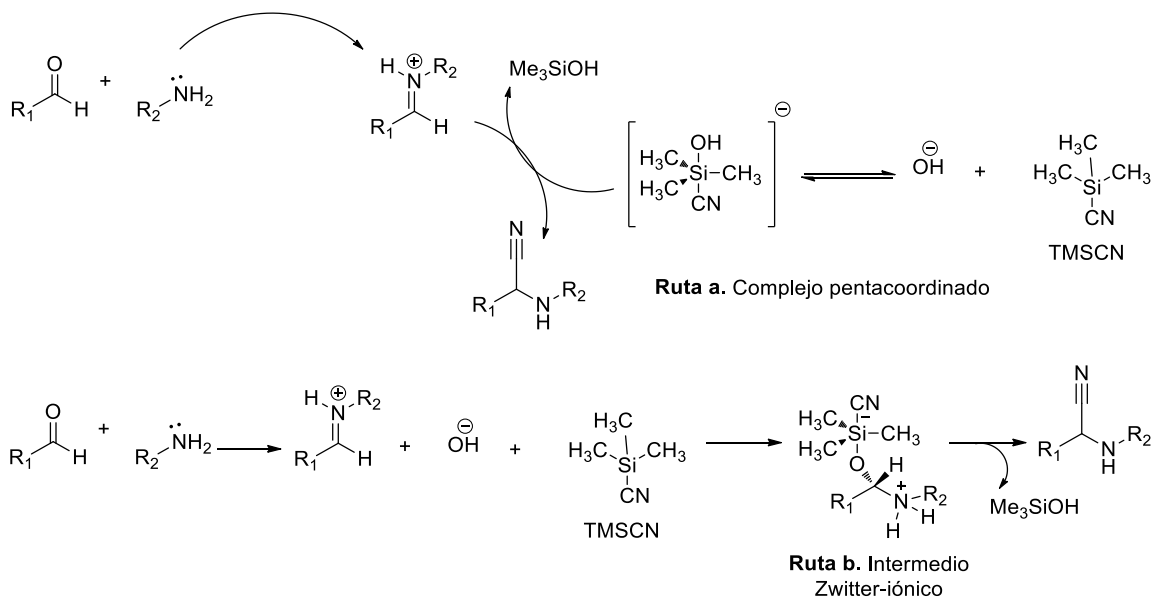
Tabla 1. Fuentes de cianuro utilizadas en la reacción de Strecker.

Fuente de cianuro	Rendimiento (%)	Referencia
Dietilfosforocianidato (DEPC) ((EtO) ₂ P(O)CN)	67 - 86	44
HCN, NaCN, KCN	90 - 97	45
Cianuro de tributilestano (Bu ₃ SnCN)	70 - 97	
Cianuro de dietilaluminio (Et ₂ AlCN)	30 - 99	46
Cianuro de trimetilsilil (TMSCN) (Me ₃ SiCN)	75 - 99	47
Ferrocianuro de potasio / cloruro de benzoilo K ₄ [Fe(CN) ₆] / PhCOCl	75-88	41

Debido a los altos rendimientos de reacción, la fuente de cianuro más utilizada es el cianuro de trimetilsililo (TMSCN) para el cual se han propuesto dos rutas para la formación del α -aminonitrilo (Esq. 5).⁴⁷ La ruta **a** lleva a la formación de un complejo pentacoordinado con el hidroxilo liberado, el cual es atraído por el silicio oxofílico, reaccionando con el ion iminio intermedio, y la ruta **b** mediante la formación de un intermedio zwitter-iónico entre el TMSCN y la imina debido a la alta electrofilicidad del TMSCN, seguida por una transferencia intramolecular de protón y el fragmento nitrílico.

-
41. HU, X., MA, Y. & LI, Z. Eco-friendly synthesis of α -aminonitriles from ketones in PEG-400 medium using potassium Hexacyanoferrate (II) as cyanide source. *J. Organomet. Chem.* 2012, **705**, p. 70–74.
44. LEE, K.-S., AN, H.-S. & HWANG, C.-Y. An Efficient Synthesis of Nitriles from Aldoximes Using Diethyl Phosphorocyanidate under Mild Conditions. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012, **33**, p. 3173–3174.
45. KOBAYASHI, S. & ISHITANI, H. Catalytic enantioselective addition to imines. *Chem. Rev.* 1999, **99**, p. 1069–94.
46. NAKAMURA, S., *et. al.* A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et₂AlCN. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2004, **15**, p. 1513–1516.
47. MARTÍNEZ, R., Ramón, D. J. & Yus, M. Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Lett.* 2005, **46**, p. 8471–8474.

Esquema 5. Mecanismos de la reacción de Strecker con cianuro de trimetilsililo (TMSCN).

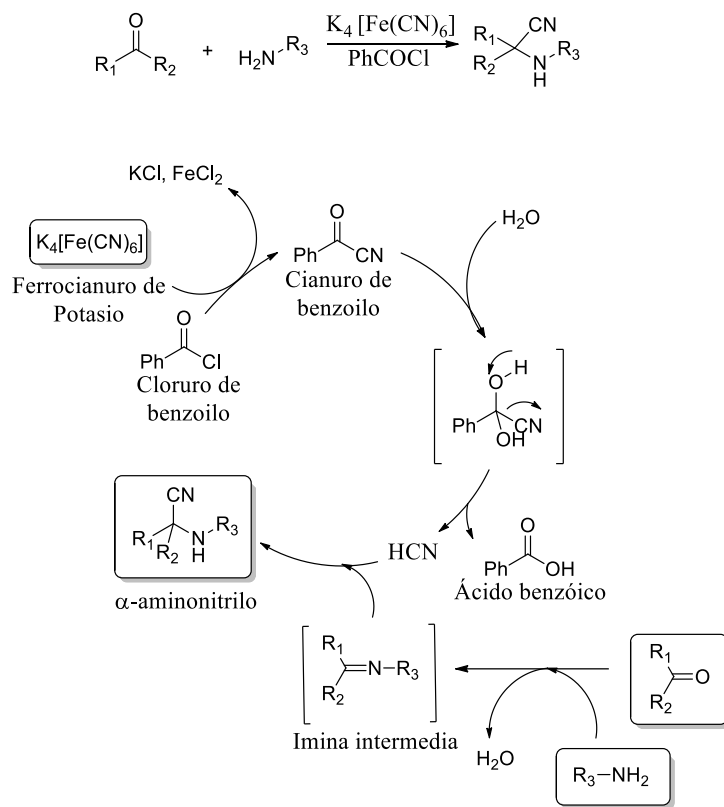


Hu, Li y colaboradores ^{41,48} han propuesto una modificación de la reacción de Strecker, amigable con el ambiente, utilizando el ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6]$) como fuente de cianuro (Esq. 6). El mecanismo de este proceso involucra al cloruro de benzoilo como promotor de la reacción activando al ferrocianuro de potasio; al comparar el proceso utilizando como disolventes etanol y PEG-400 se observó la obtención de rendimientos similares (70-90%), sin embargo, al utilizar PEG-400 la reacción se lleva a cabo entre 5 y 8 horas, mientras que al usar etanol la duración es de 10 horas.

41. HU, X., MA, Y. & LI, Z. Eco-friendly synthesis of α -aminonitriles from ketones in PEG-400 medium using potassium Hexacyanoferrate (II) as cyanide source. *J. Organomet. Chem.* 2012, **705**, p. 70–74.

48. LI, Z., *et al.* One-pot three-component synthesis of α -aminonitriles using potassium hexacyanoferrate(II) as an eco-friendly cyanide source. *Tetrahedron Lett.* 2010, **51**, p. 3922–3926.

Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Strecker con ferrocianuro de potasio.



Con el objetivo de mejorar el rendimiento de los productos en la síntesis, disminuir los tiempos de reacción y llevar a cabo síntesis enantioselectivas, se han propuesto diferentes catalizadores para la reacción de Strecker,⁴⁹ entre los cuales se encuentran catalizadores quirales (Tabla 2), líquidos iónicos y ácidos de Lewis (Tabla 3).

49. WANG, J., LIU, X. & FENG, X. Asymmetric Strecker Reactions. *Chem. Rev.* 2011, 111, p. 6947–6983.

50. TAKAMURA, M., *et. al.* A catalytic asymmetric strecker-type reaction promoted by Lewis acid-Lewis base bifunctional catalyst. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2000, **48**, p. 1586–1592.

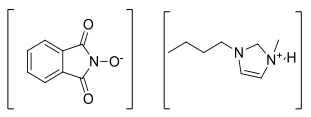
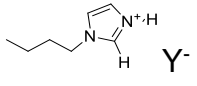
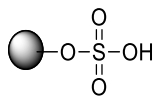
51. COREY, E. J. & GROGAN, M. J. Enantioselective synthesis of alpha-amino nitriles from N-benzhydryl imines and HCN with a chiral bicyclic guanidine as catalyst. *Org. Lett.* 1999, **1**, p. 157–160.

Tabla 2. Catalizadores quirales utilizados en la reacción de Strecker.

Ent.	Estructura	Nombre	Rend. (%)	Tiempo Reacción (h)	Ref.
1	<p>X = P(O)Ph₂ X = CHPh₂</p>	Catalizador Bifuncional ácido de Lewis/Base de Lewis	67-99	13-192	50
2		Guanidina bicíclica quiral	88-99	8-72	51
3		Catalizador libre de metales	80-99	--	52
4		L-Prolina	72-95	2-5	53

Tabla 3. Catalizadores que aumentan el rendimiento en la reacción de Strecker.

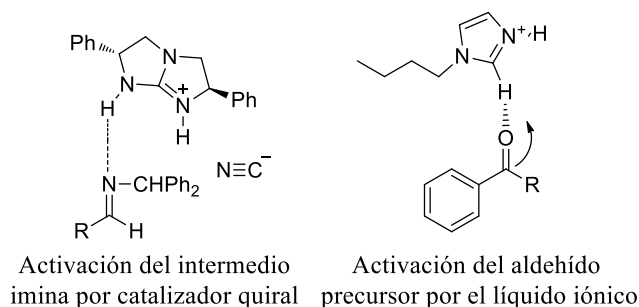
Ent.	Estructura	Nombre	Rend. (%)	Tiempo Reacción (h)	Ref.
5	I ₂	Yodo (Yoduro de trimetilsililo in situ)	96-99	--	54
6	<p>Ti(O-iPr)₄</p>	Complejo Titanio(IV) con chinchonina	61-99	--	49
7	<p>La(OPh)₃</p>	Complejo Lantano (III) con BINSO ₃ H	28-99	20-96	49
8	InCl ₃	Tricloruro de Indio	47-93	4-14	55
9	<p>ZnCl₃⁻</p>	Complejo cloruro de colina y ZnCl ₂	70-99	0.5-180 min	56

10		Complejo [Ftalimida-N-Oxido][BMIM]	85-98	1-24 min.	57
11		Complejos [Hbim+][ClO ₄ ⁻] [Hbim+][Cl ⁻] [Hbim+][Br ⁻]	85-96	25-400 min	58
12		Ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA)	85-97	45-80 min	59,60

Los efectos que realizan estos catalizadores en la reacción de Strecker involucran la activación del aldehído o la amina precursora a través de un enlace de hidrógeno para aumentar su electrofilicidad o nucleofilicidad (Fig. 10).

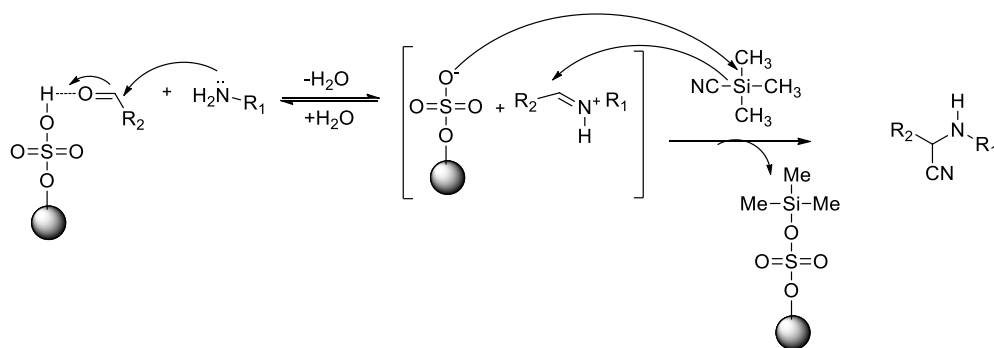
52. VACHAL, P. & JACOBSEN, E. N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**, p. 10012–10014.
53. NASREEN, A. I-Proline catalyzed one pot synthesis of α -aminonitriles. *Tetrahedron Lett.* 2013, **54**, p. 3797–3800.
54. SAIDI, M. R. & AZIZI, N. A Novel and Efficient Method for the Synthesis of α – Aminonitriles by the Reaction of Aminals with Trimethylsilyl Cyanide Catalyzed by Iodine. *J. Iran. Chem. Soc.* 2004, **1**, p. 136–140.
55. RANU, B., SUVENDU, S. D. & ALAKANANDA, H. Indium Trichloride Catalyzed One-Step Synthesis of α -Aminonitriles by a Three-Component Condensation of Carbonyl Compounds, Amines and Potassium Cyanide.pdf. *Tetrahedron.* 2002, **58**, p. 2529–2532.
56. HAJIPOUR, A. R. & DEHBANE, I. M. An efficient one-pot synthesis of α -amino nitriles using ecofriendly Lewis-acidic ionic liquid choline chloride. *2ZnCl₂. Iran. J. Catal.* 2012, **2**, p. 147–151.
57. DEKAMIN, *et. al.* Facile and One-Pot Synthesis of α -Aminonitriles by Strecker Reaction Catalyzed by [BMIM][PINO] as a New Ionic Liquid. *Int. Elec. Conf. Synt. Org. Chem.* 2011, p. 2–7.
58. KATHIRAVAN, M. K. *et al.* A Rapid and Facile Synthesis of α -Amino Nitrile Employing Ionic Liquid. *Chem. J.* 2012, **2**, p. 199–205.
59. ALI, M. Silica sulfuric acid / NaNO₂ as a novel heterogeneous system for production of thionitriles and disulfides under mild conditions. *Tetrahedron.* 2001, **57**, p. 9509–9511.
60. SHAABANI, A. & MALEKI, A. Cellulose sulfuric acid as a bio-supported and recyclable solid acid catalyst for the one-pot three-component synthesis of α -amino nitriles. *Appl. Catal. A Gen.* 2007, **331**, p. 149–151.

Figura 10. Comparación de los mecanismos de activación de guanidina quiral y el líquido iónico.



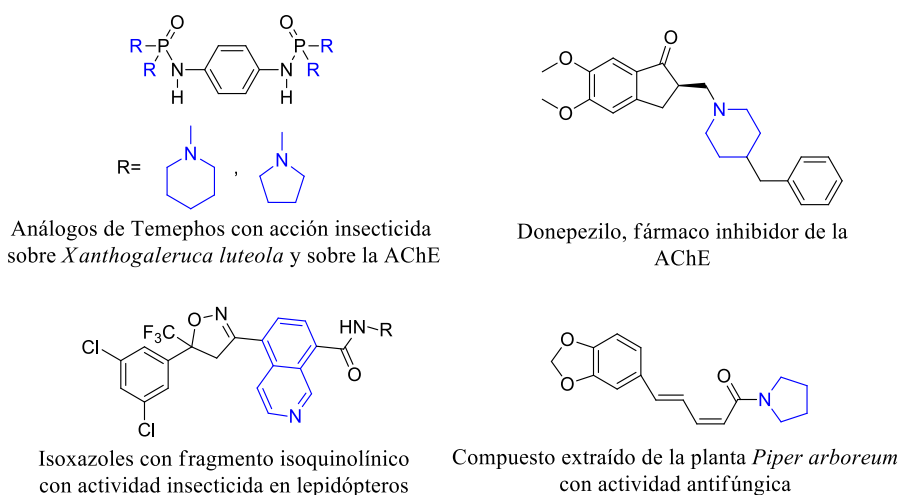
Con el objetivo de reducir los desechos en la síntesis de estos compuestos, se han propuesto catalizadores recuperables: entre ellos se encuentran los catalizadores ácidos soportados en celulosa o gel de sílice. En el caso del catalizador de ácido sulfúrico soportado en gel de sílice, este es efectivo para la formación de α -aminonitrilos, además de los altos rendimientos, condiciones suaves y cortos tiempos de reacción, este catalizador es recuperable (Esquema 7).

Esquema 7. Mecanismo de activación del catalizador ácido soportado en gel de sílice.



1.3.1. Diseño racional de nuevos α -aminonitrilos híbridos con fragmentos de interés biológico. Partiendo de los alcaloides base, nicotina y gircensohnina, y en la búsqueda para obtener análogos con nuevos sustituyentes que incrementen la actividad sobre el mosquito, se han reportado diferentes estudios en donde compuestos con fragmentos de aminas cíclicas como la piperidina y la pirrolidina tienen actividad biológica como compuestos plaguicidas,⁶¹ fungicidas,⁶² inhibidores de enzimas⁶³ y como medicamentos. Adicionalmente, en la obtención de nuevos compuestos con derivados de quinolina e isoquinolina se ha observado actividad insecticida en lepidópteros como la polilla de col (*Plutella xylostella*)⁶⁴ (Fig. 11). La ventaja de estos fragmentos es que sus precursores están disponibles como reactivos comerciales y algunos de ellos son de bajo costo.

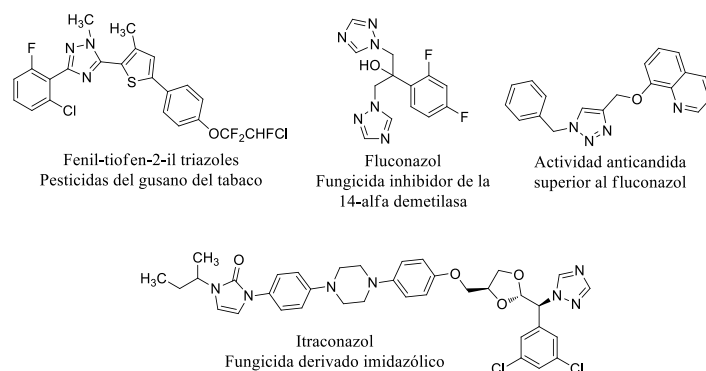
Figura 11. Compuestos de interés biológico con fragmentos de aminas cíclicas como piperidina, pirrolidina y isoquinolina.



61. SHARIFI, M., *et al.* Characterization of acetylcholinesterase from elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* and QSAR of temephos derivatives against its activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2017, **136**, p. 12–22.
62. VASQUES DA SILVA, R. *et al.* Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2002, **59**, p. 521–527.
63. MOHAMMAD, D., *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017, **16**, p. 1009–1019.
64. XU, M. *et al.* Insecticidal quinoline and isoquinoline isoxazolines. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2014, **24**, p. 4026–4030.

Los triazoles son anillos de 5 miembros con átomos de nitrógeno en su estructura; estos compuestos han tenido gran interés medicinal en los tratamientos antifúngicos desde su descubrimiento en 1970. La segunda generación de triazoles, como el caso del fluconazol y el itraconazol (Fig. 12), ha sido empleada como alternativas terapéuticas frecuentes para el tratamiento de los hongos, aunque se ha reportado resistencia en la cepa de *Candida albicans*.⁶⁵ Recientemente, Irfan y colaboradores sintetizaron una serie de 1,2,3-triazoles y evaluaron su actividad antifúngica contra *C. albicans*, sobresaliendo los compuestos 8-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)quinolina y 4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído.⁶⁶

Figura 12. Triazoles de interés biológico como fungicidas y plaguicidas.



Para el caso de triazoles con actividad insecticida, Hull y colaboradores sintetizaron, en cuatro pasos con buen rendimiento y alta pureza, el compuesto 5-(4-bromo-3-metiltiofen-2-il)-3-(2-cloro-6-fluorofenil)-1-metil-1*H*-1,2,4-triazol,⁶⁷ además de una serie de compuestos 1,2,4 – triazoles dihalogenados, mostrando actividad plaguicida en diferentes insectos como el áfido del algodón (*Aphis gossypii*) y el gusano del tabaco (*Heliothis virescens*).⁶⁸

65. LAGUNA, F., RODRÍGUEZ-TUDELA, J. & MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis*. 1997, **24**, p. 124–130.

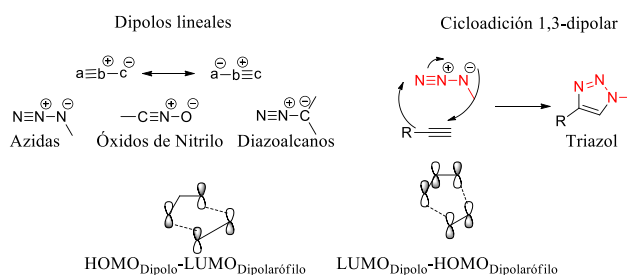
66. IRFAN, M. *et al.* Synthesis, QSAR and anticandidal evaluation of 1,2,3-triazoles derived from naturally bioactive scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, **93**, p. 246–254.

67. HULL, J. W., *et al.* Development of Manufacturing Processes for a New Family of 2, 6-Dihaloaryl 1, 2, 4-Triazole Insecticides Abstract : *Org. Proc. Res. Dev.* 2009, **13**, 1125–1129.

1.3.2. Cicloadición 1,3-dipolar: síntesis de 1,2,3-triazoles Entre las reacciones usadas en química orgánica se encuentran las reacciones concertadas, en donde el rompimiento y la formación de enlaces ocurren al mismo tiempo, y en vez de existir un intermedio de reacción, los mecanismos concertados implican la presencia de un estado de transición. Entre estos mecanismos, las reacciones pericíclicas se caracterizan por una reorganización de los electrones a través de estructuras de transición cíclicas.

Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar son cicloadiciones concertadas [$\pi 4_s + \pi 2_s$], en donde las especies que actúan son un 1,3-dipolo y un dipolarófilo. El 1,3-dipolo contiene un sistema de electrones π que consiste en dos orbitales llenos y uno vacío y generalmente son análogos del anión alilo o propargilo; entre ellos se encuentran las azidas, los óxidos de nitrilo y los diazoalcanos. El dipolarófilo generalmente es un alqueno o alquino sustituido, aunque también se utilizan grupos funcionales de enlaces múltiples, como iminas, grupos carbonilo, azo y nitroso, destacándose en el dipolarófilo la presencia de un enlace π .⁶⁹ Dependiendo de las energías orbitales de las dos especies que participan en la reacción, la interacción más fuerte puede involucrar el orbital HOMO del dipolo y el LUMO del dipolarófilo (Fig. 13).⁷⁰

Figura 13. Generalidades de la reacción de cicloadición 1,3 – dipolar.



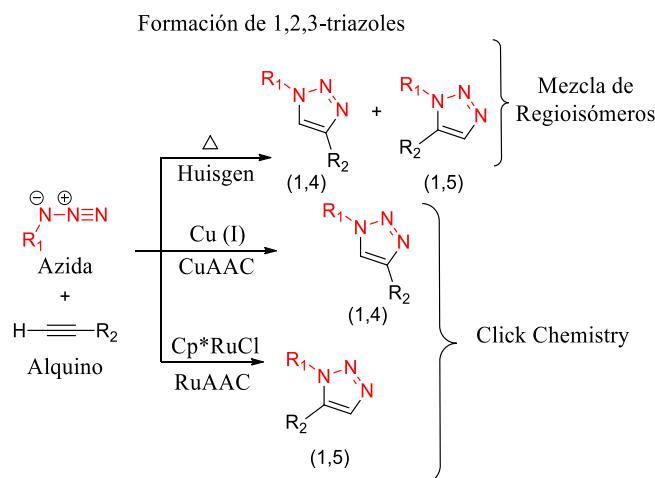
68. CUDWORTH, D. P. *et al.* Structure-activity relationship development of dihaloaryl triazole compounds as insecticides and acaricides. 1. Phenyl thiophen-2-yl triazoles. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, p. 7517–7526.

69. CAREY, F. A. & SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and mechanism.* Virginia, Springer, 5th ed. 2007.

70. CAREY, F. A. & SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reaction and Synthesis.* Virginia, Springer, 5th ed. 2007.

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azida de sodio y diferentes alquinos fue realizada en 1960 por R. Huisgen;⁷¹ para esta reacción requerían temperaturas elevadas y normalmente al utilizarse alquinos asimétricos se producía una mezcla entre dos regioisómeros, los compuestos 1,4- y 1,5-disustituidos (Fig. 14). Debido a la naturaleza de este tipo de reacciones, Sharpless acuñó en 2001 el término “Click Chemistry” refiriéndose a aquellas reacciones que brinden altos rendimientos, siendo estereoespecíficas, sencillas de ejecutar empleando disolventes de baja toxicidad y en las cuales sus subproductos se eliminen fácilmente por cromatografía.

Figura 14. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolar entre azida y alquino.



En el caso de las reacciones de cicloadición entre azida y alquinos, se estudiaron varias modificaciones de la reacción original de Huisgen y se propuso el uso de diferentes catalizadores de cobre y rutenio dando como resultado una reacción regioespecífica al producirse los triazoles 1,4-disustituidos con cobre y los 1,5-disustituidos con rutenio, clasificando este tipo de reacciones en las incluidas en “Click Chemistry”.^{72, 73}

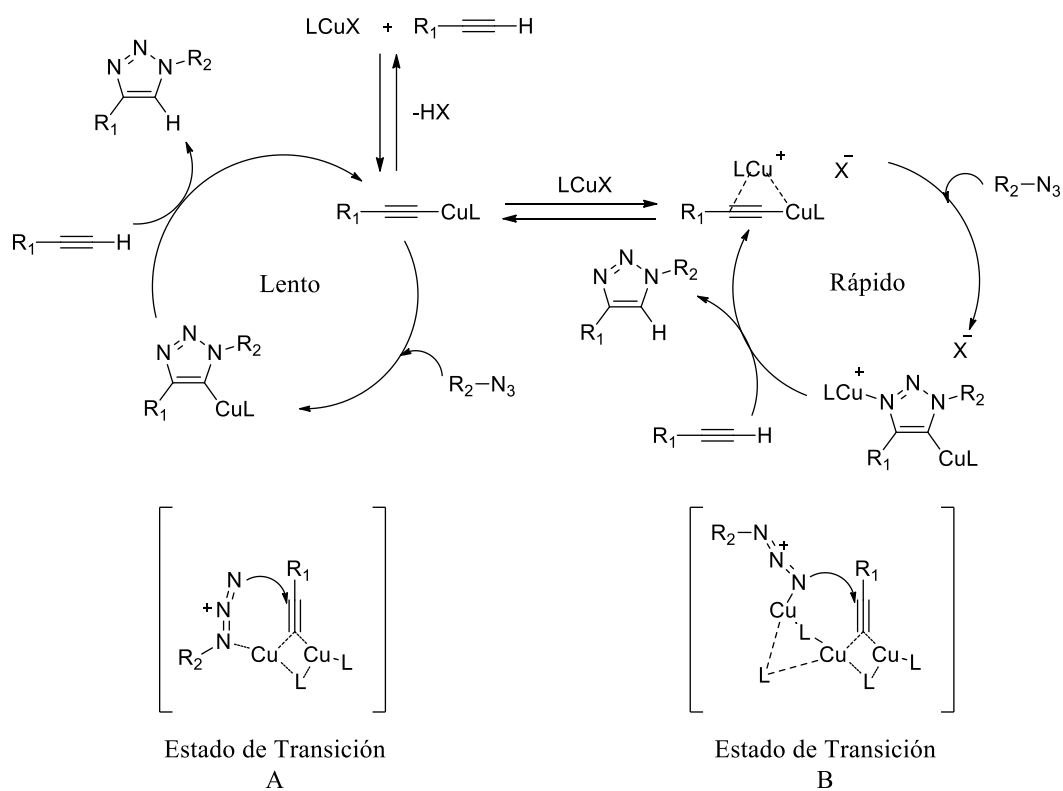
71. HUISGEN, R. & WEBERNDÖRFER, V. 1,3-Dipolare Additionen der Thioketocarbene. *Tetrahedron Lett.* 1960, **12**, p. 5–8.

72. MELDAL, M. & TORNOE, C. W. Cu-catalyzed azide - Alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* 2008, **108**, p. 2952–3015.

73. BOREN, B. C. *et al.* Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, p. 8923–8930.

Meldal y Tornøe propusieron dos mecanismos de formación del triazol en la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre (CuAAC), con la formación de dos estados de transición diferentes; el complejo A que se representa como una ruta de reacción lenta, en donde se forma un complejo entre dos átomos de cobre y el triple enlace del alquino para luego unirse a la azida, y el complejo B, en donde se forman complejos de los átomos de cobre con la azida y el alquino, ruta que involucra un control cinético de la reacción formándose el triazol de manera más rápida (Esquema 8).⁷²

Esquema 8. Rutas de reacción propuestas para la síntesis de 1, 2, 3 – triazoles.



72. MELDAL, M. & TORNOE, C. W. Cu-catalyzed azide - Alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* 2008, **108**, p. 2952–3015.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mosquito *Aedes aegypti*, vector transmisor de enfermedades como el dengue, chikungunya y el Zika, es un culícido de gran interés en los países tropicales y subtropicales alrededor del mundo. En el caso de Colombia los índices de casos reportados de estas enfermedades se han incrementado en los últimos años debido a la ausencia de tratamientos efectivos para prevenir o tratar estas enfermedades. El enfoque actual en el control de estas enfermedades se centra en la reducción de las poblaciones del vector mediante el empleo de insecticidas químicos.

Debido al uso excesivo e inadecuado de compuestos organofosforados, carbamatos y piretroides como insecticidas, donde cada uno de estos productos puede desencadenar la selección de uno o más mecanismos de resistencia, poblaciones de mosquitos han logrado adaptarse y tolerar dosis antes tóxicas, llevando al fracaso a los programas de erradicación estatales. Se han desarrollado investigaciones que buscan encontrar compuestos efectivos que afecten específicamente a insectos vectores, muchos de los cuales se han dirigido al uso de metabolitos secundarios de plantas, algunos de los cuales han sido ampliamente estudiados e incluso usados como repelentes e insecticidas. Los inconvenientes encontrados al usar estos metabolitos como insecticidas son regularmente las mismas desventajas observadas en otros campos de acción, que van desde la medicina hasta su uso en preparaciones cosméticas, su bajo rendimiento al extraerlos directamente de la planta, además de no ser selectivos en algunos casos, siendo tóxicos para otros seres vivos, entre ellos el ser humano. Debido a estos inconvenientes, la química orgánica sintética se ha enfocado en la obtención de nuevos compuestos activos, análogos a productos naturales, con el fin de aumentar la cantidad de producto obtenida y la selectividad sobre el insecto.

En el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) se han sintetizado compuestos α -aminonitrílicos con actividad insecticida sobre *Aedes aegypti*, como

la girsensohnina y una serie de análogos de esta molécula que, debido a modificaciones en su estructura, han aumentado su actividad insecticida. Por esto es necesaria la obtención de nuevos α -aminonitrilos más selectivos y eficaces contra el vector *Aedes aegypti*, además de analizar el efecto de estos compuestos en diferentes sistemas biológicos del insecto con el fin de obtener información acerca del mecanismo de acción de estas moléculas.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti* se han incrementado en los últimos años, llegando a zonas tropicales enfermedades como el chikungunya y el Zika.

Debido a que:

- 3.1. El mosquito *Aedes aegypti*, transmisor de enfermedades como el dengue, chikungunya y Zika ha adquirido resistencia a los insecticidas convencionales debido a alteraciones de sus enzimas detoxificantes como la acetilcolinesterasa, además de las enzimas de la cadena mitocondrial.
- 3.2. Se ha reportado actividad sobre el mosquito en compuestos extraídos de la naturaleza, pero se han encontrado dificultades como la falta de selectividad en su actividad llevando a la toxicidad de estos compuestos en el ser humano, además de la poca cantidad que se obtiene al extraerlos.
- 3.3. En el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) se han obtenido sintéticamente alcaloides con buen rendimiento utilizando catalizadores recuperables y condiciones amigables con el ambiente (siendo parte de la química verde), además de observar la actividad biológica de estos nuevos compuestos α -aminonitrílicos en larvas y mosquitos de *Aedes aegypti*.

Es necesaria la obtención de nuevas moléculas, análogas de alcaloides encontrados en las plantas, que reporten actividad insecticida en *Aedes aegypti*, además de dar una idea de su ruta metabólica con el estudio de sus interacciones con las proteínas diana en el insecto.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible sintetizar nuevas moléculas análogas de la nicotina, anabasina y girsensohnina, que actúen como insecticidas sobre el mosquito *Aedes aegypti*, y además estudiar su ruta metabólica en el insecto?

5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Mediante una síntesis one-pot con parámetros de la química verde se sintetizará una serie de nuevos compuestos análogos de los alcaloides nicotina, anabasina y girsensohnina, que sean candidatos a insecticidas, dilucidando su ruta metabólica sobre diferentes sistemas biológicos del *Aedes aegypti*.

6. OBJETIVO GENERAL

Obtener una serie de nuevos compuestos α -aminonitrílicos con actividad insecticida sobre el mosquito *Aedes aegypti*, y estudiar su mecanismo de acción a través de ensayos enzimáticos *in vitro*.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7.1. Sintetizar una serie de α -aminonitrilos a través de la reacción de Strecker modificada y transformarlos en las respectivas α -aminoamidas.
- 7.2. Elucidar las estructuras de los compuestos obtenidos con el uso de técnicas de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- 7.3. Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la enzima acetilcolinesterasa del insecto e identificar los más activos.
- 7.4. Evaluar la acción de los compuestos más activos en la bioenergética mitocondrial y en daño en el ADN debido a su fragmentación o degradación.
- 7.5. Realizar ensayos *in vivo* de acción insecticida en larvas y adultos de *Aedes aegypti* con los compuestos más activos en el ensayo *in vitro*.

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

8.1. Consideraciones generales

Para la obtención de los productos finales, se utilizaron precursores (aldehídos y aminas) de las marcas Merck®, Sigma Aldrich® y J.T. Baker® grado síntesis utilizándolos sin previa purificación. Los disolventes utilizados para la purificación de los productos fueron previamente destilados.

Para controlar el transcurso de la reacción, confirmar la pureza del producto y observar los componentes en las mezclas de reacción se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography TLC), utilizando cromatofolios de Silufol UV254; las manchas en los controles de la reacción se observaron con luz ultravioleta de 254 nm y se revelaron con vapor de yodo.

La purificación de los productos se realizó por separación cromatográfica en columna de silica gel esférica (Premium Rf, 70 A, 70 – 75 μm), y óxido de aluminio neutro como soporte sólido (Al_2O_3 90 activo neutro, 70-230 mesh Merck®), dependiendo del compuesto; como eluyentes de las columnas se usaron mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo en diferentes relaciones dependiendo del resultado observado en las placas cromatográficas.

Los equipos utilizados para la identificación de las propiedades y la estructura de los compuestos sintetizados se muestran a continuación:

Determinación del punto de fusión: Los puntos de fusión fueron medidos utilizando un fusiómetro Fischer-Jhons. Los valores obtenidos no fueron corregidos y se reportaron como un promedio de tres mediciones para cada molécula sintetizada.

Espectroscopía infrarroja (IR): Los espectros IR de los compuestos fueron obtenidos utilizando un espectrómetro ALPHA FT-IR para los compuestos sólidos y líquidos, en los resultados solo se reportan las bandas absorción características expresadas en cm^{-1} .

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): la obtención de los espectros de ^1H , ^{13}C y bidimensionales se realizó con un espectrómetro Bruker AM-400 (400 MHz ^1H RMN y 100 MHz ^{13}C RMN); dependiendo de la solubilidad de la molécula se utilizaron los respectivos solventes deuterados, cloroformo (CDCl_3) y dimetilsulfóxido (DMSO-d_6). Los valores del corrimiento químico (δ) se expresaron en ppm, la referencia interna utilizada fue el tetrametilsilano (TMS), referido a la señal del disolvente utilizado. Las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hertz (Hz) y las abreviaturas para indicar la multiplicidad de la señal son las siguientes: (s) = singulete, (d) = doblete, (t) = triplete, (q) = cuartete, (dd) = doblete de dobletes, (dt) = doblete de tripletes, (td) = triplete de dobletes, (qd) = cuartete de dobletes, (ddd) = doblete de dobletes, (m) = multiplete. En el caso del espectro DEPT – 135, el signo positivo en la intensidad indica carbonos primarios y terciarios, el signo negativo para los secundarios y la ausencia de señal para los cuaternarios.

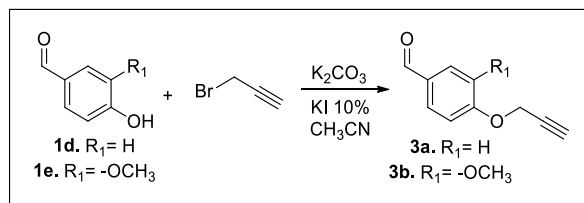
Inhibición enzimática: La lectura de la absorbancia en las microplacas utilizadas para ensayos enzimáticos se realizó con un espectrofotómetro Multiscan Go (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para la obtención de los resultados se utilizó el software SkanIt Research Edition, versión 4.1 (Thermo Scientific).

Bioenergética mitocondrial: Para la lectura de la concentración de oxígeno en los complejos mitocondriales se empleó el método polarográfico empleando un oxígrafo (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) para las determinaciones.

8.2. Síntesis de precursores.

8.2.1. Preparación de los precursores 3a y 3b: Reacción de propargilación.

Esquema 9. Reacción de O-propargilación para la obtención de **3a** y **3b**.



En un balón provisto de un agitador magnético, en porciones pequeñas se disolvió 1 mmol del aldehído precursor en acetonitrilo. Se agregaron cantidades determinadas de carbonato de potasio y se mantuvo en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se agregaron 10% mol de yoduro de potasio (KI) y se transfirió el balón de la mezcla de reacción a un baño de hielo. Utilizando un embudo de adición, se agregó gota a gota a la mezcla de reacción la cantidad determinada del bromuro de propargilo y al terminar la adición se mantuvo la reacción en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Al confirmar la presencia del producto por cromatografía en capa fina se agregó agua al balón de reacción y se realizó la extracción con solución salina acuosa y acetato de etilo. La fase orgánica se adicionó a un Erlenmeyer con sulfato de sodio, se filtró y se concentró el producto en un rotaevaporador y el compuesto se purificó utilizando cromatografía en columna de sílica esférica y como eluyente una mezcla de éter de petróleo:acetato de etilo acorde con la utilizada en el control de capa fina. Al finalizar la purificación el producto se obtuvo como un sólido blanco.

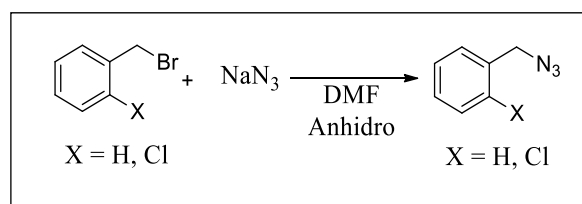
8.2.1.1. 4-(Prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3a) (AG15) A partir de 0.91 g (7.48 mmol) de 4-hidroxibenzaldehído, 1.72 g (12.48 mmol) de K₂CO₃, 0.103 g (0.62 mmol) de KI y 0.74 g (6.24 mmol) de bromuro de propargilo, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 76%; C₁₀H₈O₂ (160,17 g/mol) m.p. 80 – 81 °C. IR (KBr): 3203 cm⁻¹ (ν HC≡C—), 1676 cm⁻¹ (ν C=O), 826 cm⁻¹ (ν_{Ar}), 2120 cm⁻¹

(ν $\text{—C}\equiv\text{C—}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 9.88 (1H, s, 1-H), 7.84 (2H, dt, $J = 8.9, 4.8$ Hz, 3, 4- H_{Ar}), 7.06 (2H, dt, $J = 8.9, 4.8$ Hz 5,6- H_{Ar}), 4.76 (2H, d, $^4J = 2.4$ Hz, 8- CH_2), 2.57 (1H, t, $J = 2.4$, 10-CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 190.8 (1-CHO), 162.4 (7- C_{Ar}), 131.9 (3,4-C), 130.8 (2- C_{Ar}), 115.2 (5,6- C_{Ar}), 77.6 (9-C), 76.5 (10-CH), 56.04 (8- CH_2).

8.2.1.2. 3-Metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3b) (AG16). A partir de 0.959 g (6.30 mmol) de vainillina, 1.451 g (10.5 mmol) de K_2CO_3 , 0.087 g (0.52 mmol) de KI y 0.624 g (5.25 mmol) de bromuro de propargilo, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 75%; $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (190,20 g/mol) m.p. 91 – 92 °C. IR (KBr): 3247 cm^{-1} (ν $\text{HC}\equiv\text{C—}$), 1268 cm^{-1} (ν C-OCH_3), 1684 cm^{-1} (ν C=O), 810 cm^{-1} (ν_{Ar}), 2120 cm^{-1} (ν $\text{—C}\equiv\text{C—}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 9.85 (1H, s, 1-H), 7.45 (1H, dd, $J = 6.3, 1.9$ Hz, 3- H_{Ar}), 7.41 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, 4- H_{Ar}), 7.13 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, 6- H_{Ar}), 4.84 (2H, d, $J = 2.4$ Hz, 8- CH_2), 3.92 (3H, s, 11-O- CH_3), 2.56 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, 10-CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 191.02 (1-CHO), 152.2 (7- C_{Ar}), 150.1 (6- C_{Ar}), 131.01 (2- C_{Ar}), 126.3 (3- C_{Ar}), 112.7 (5- C_{Ar}), 109.6 (4- C_{Ar}), 77.5 (9-C), 76.8 (10-CH), 56.7 (8- CH_2), 56.1 (11-O- CH_3).

8.2.2. Preparación de bencilazidas

Esquema 10. Reacción de formación de bencilazidas



En un balón provisto de agitador magnético y de montaje de reflujo (Fig. 15) se adicionaron 20 mL de dimetilformamida (DMF anhidro), la azida de sodio y el precursor, el cual dependiendo del producto que se buscó obtener fue bromuro de bencilo o bromuro de clorobencilo. Esta mezcla se mantuvo en agitación y reflujo a 80 °C hasta el otro día y después de confirmar la presencia del producto en capa fina se retiró el calentamiento (Esq. 10). Cuando estuvo a temperatura ambiente, se

de sodio (0.4 moles) y se adicionaron poco a poco a la mezcla de reacción; esta mezcla se mantuvo en agitación hasta confirmar la presencia del producto en capa fina. Al terminar la reacción se adicionó agua a la mezcla y se realizó la extracción con solución salina acuosa y acetato de etilo, la fase orgánica se adicionó a un Erlenmeyer con sulfato de sodio. Se filtró y concentró el producto en un rotaevaporador y el compuesto se purificó utilizando cromatografía flash en columna de sílica esférica y como eluyente una mezcla de éter de petróleo:acetato de etilo acorde con la utilizada en el control de capa fina, o mediante recristalización con mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo. Al finalizar la purificación el producto se obtuvo como un sólido blanco.

8.2.3.1. 4-((1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (4a) (AG23). A partir de 0.750 g (4.7 mmol) del precursor 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3a), 0.81 g (6.11 mmol) de bencilazida, 0.058 g (0.23 mmol) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.732 g (1.88 mmol) de ascorbato de sodio, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 78%; $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (293,32 g/mol) m.p. 102 – 103 °C. IR (KBr): 2340 cm^{-1} ($\nu_{\text{N}=\text{N}}$), 1678 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 810 cm^{-1} (ν_{Ar}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 9.77 (1H, s, 1-H), 7.71 (2H, dt, $J = 8.9, 4.8\text{ Hz}$, 3, 4- H_{Ar}), 7.46 (1H, s, 10- H_{Ar}), 7.28 (2H, m, 15,16- H_{Ar}), 7.25 (1H, m, 17- CH_2), 7.17 (2H, m, 13,14- H_{Ar}), 6.98 (2H, dt, $J = 8.7, 5.0\text{ Hz}$, 5,6- H_{Ar}), 5.43 (2H, s, 8- CH_2), 5.15 (2H, s, 11- CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 190.8 (1-CHO), 163.2 (7- C_{Ar}), 143.7 (9-C), 134.4 (12- C_{Ar}), 132.08 (3,4- C_{Ar}), 130.4 (2- C_{Ar}), 129.2 (15,16- C_{Ar}), 129.00 (13,14- C_{Ar}), 128.2 (17- C_{Ar}), 122.9 (10-CH), 115.1 (5,6- C_{Ar}), 62.2 (8- CH_2), 54.4 (11- CH_2).

8.2.3.2. 4-((1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4b) (AG22) A partir de 0.500 g (2.6 mmol) del precursor 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3b), 0.455 g (3.42 mmol) de bencilazida, 0.032 g (0.13 mmol) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.207 g (1.04 mmol) de ascorbato de sodio, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 50%; $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ (323,35 g/mol) m.p. 104 – 105 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 9.70 (1H, s, 1-H), 7.45 (1H, s, 10- H_{Ar}), 7.29 (1H, m, 3- H_{Ar}), 7.27 (1H, m, 4- H_{Ar}), 7.24 (1H, m, 17- H_{Ar}), 7.22 (2H, m,

15,16-H_{Ar}), 7.13 (2H, m, 13,14-H_{Ar}), 7.07 (1H, d, J = 8.1 Hz, 5-H_{Ar}), 5.38 (2H, s, 8-CH₂), 5.21 (2H, s, 11-CH₂), 3.75 (3H, s, 18-O-CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 191.02 (1-CHO), 153.1 (7-C_{Ar}), 150.01 (6-C_{Ar}), 143.6 (9-C), 134.3 (12-C_{Ar}), 130.7 (2-C_{Ar}), 129.2 (15,16-C_{Ar}), 128.9 (13,14-C_{Ar}), 128.2 (17-C_{Ar}), 126.8 (4-C_{Ar}), 123.2 (10-CH), 112.7 (5-C_{Ar}), 109.3 (3-C_{Ar}), 63.06 (8-CH₂), 56.08 (11-CH₂), 54.40 (18-O-CH₃).

8.2.3.3. 4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c) (AG50). A partir de 0.698 g (4.77 mmol) del precursor 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3a), 1.03 g (6.20 mmol) de 2-clorobencilazida, 0.059 g (0.23 mmol) de CuSO₄·5H₂O y 0.370 g (1.90 mmol) de ascorbato de sodio, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 86%; C₁₇H₁₄ClN₃O₂ (327,76 g/mol) m.p. 89 – 90 °C. IR (KBr): 2337 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 1685 cm⁻¹ (ν_{C=O}), 811 cm⁻¹ (ν_{Ar}), 755 cm⁻¹ (ν_{C-Cl}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 9.91 (1H, s, 1-H), 7.86 (1H, d, J = 8.3 Hz, 3,4-H_{Ar}), 7.79 (1H, s, 10-CH), 7.47 (1H, d, J = 8.1 Hz, 16-H_{Ar}), 7.35 (1H, m, 15-H_{Ar}), 7.30 (1H, m, 13-H_{Ar}), 7.24 (1H, m, 17-H_{Ar}), 7.12 (2H, d, J = 8.1 Hz, 5,6-H_{Ar}), 5.71 (1H, s, 8-CH₂), 5.30 (1H, s, 11-CH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 190.9 (1-CHO), 163.2 (7-C_{Ar}), 133.7 (9-C), 132.2 (12-C_{Ar}), 132.1 (14-C_{Ar}), 131.3 (3, 4-C_{Ar}), 130.6 (2-C_{Ar}), 130.5 (16-C_{Ar}), 130.4 (13-C_{Ar}), 130.1 (17-C_{Ar}), 127.7 (15-C_{Ar}), 123.3 (10-CH), 115.1 (5,6-C_{Ar}), 62.2 (8-CH₂), 51.8 (11-CH₂).

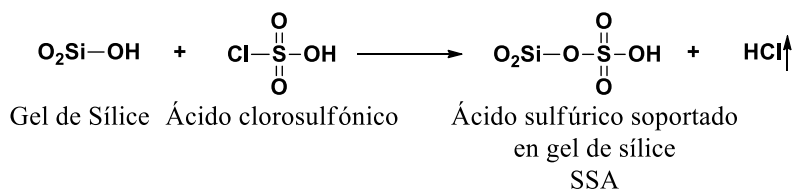
8.2.3.4. 4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4d) (AG47). A partir de 0.530 g (2.79 mmol) del precursor 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído (3b), 0.55 g (3.62 mmol) de 2-clorobencilazida, 0.034 g (0.13 mmol) de CuSO₄·5H₂O y 0.221 g (1.11 mmol) de ascorbato de sodio, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 98%; C₁₈H₁₆ClN₃O₃ (357,79 g/mol) m.p. 126 – 127 °C. IR (KBr): 2337 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 1685 cm⁻¹ (ν_{C=O}), 811 cm⁻¹ (ν_{Ar}), 755 cm⁻¹ (ν_{C-Cl}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 9.83 (1H, s, 1-H), 7.70 (1H, s, 10-CH), 7.43 (1H, d, J = 1.4 Hz, 5-H_{Ar}), 7.40 (2H, dd, J = 6.3, 1.4 Hz, 3,4-H_{Ar}), 7.31 (1H, td, J = 7.6, 1.7 Hz, 16-H_{Ar}), 7.25 (1H, td, J = 6.2, 1.2 Hz, 15-H_{Ar}), 7.21 (1H, m, 13-H_{Ar}), 7.19 (1H, m, 17-H_{Ar}), 5.65 (2H, s, 8-CH₂), 5.35 (2H, s, 11-CH₂), 3.89 (3H, s, 18-OCH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 191.1 (1-CHO), 153.1 (7-C_{Ar}), 149.9 (6-C_{Ar}), 133.7 (9-C), 132.2 (12-C_{Ar}),

130.7 (2-C_{Ar}), 130.7 (14-C_{Ar}), 130.5 (16-C_{Ar}), 130.1 (13-C_{Ar}), 127.7 (17-C_{Ar}), 126.9 (15-C_{Ar}), 123.6 (4-C_{Ar}), 112.6 (10-CH), 110.8 (5-C_{Ar}), 109.2 (3-C_{Ar}), 63.01 (8-CH₂), 56.1 (11-CH₂), 51.68 (18-O-CH₃).

8.3. Preparación del catalizador de ácido soportado en gel de sílice (SSA).

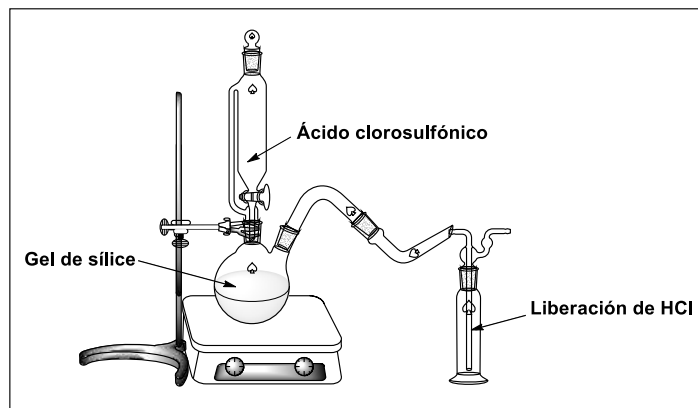
El siguiente esquema de reacción muestra la preparación del catalizador soportado en gel de sílice:

Esquema 12. Reacción general de síntesis del catalizador SSA.



En un balón de dos bocas de 250 mL provisto de un agitador magnético se adicionó gel de sílice y se realizó el montaje presentado en la Figura 16. Utilizando un embudo de adición y a temperatura ambiente, se agregó gota a gota el ácido clorosulfónico manteniendo el gel de sílice en agitación hasta que no se observó el desprendimiento de HCl en la trampa de gases. El balón se mantiene en agitación durante 30 minutos obteniéndose de esta manera el catalizador como un sólido de color blanco el cual se almacenó a temperatura ambiente. La cantidad de H⁺ se determinó mediante la liberación de iones H₃O⁺, la cual se tituló con una solución estándar de NaOH.

Figura 16. Montaje para la preparación del catalizador SSA.

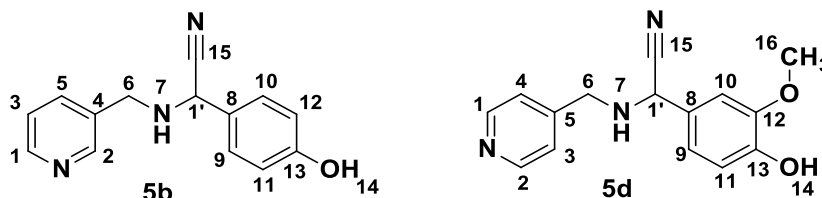


8.4. Obtención de los α -aminonitrilos análogos de la girgensohnina y nicotina.

Para obtener los productos, en un balón fondo redondo de 50 mL provisto de agitador magnético se adicionaron 10 mL de una mezcla 1:1 acetonitrilo: agua desionizada y se agregaron pequeñas porciones los precursores en una relación molar 1:1.3 (aldehído: amina). Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se adicionó el KCN en una relación 1:1.5 (aldehído: KCN) y una cantidad de catalizador SSA. Al transcurrir entre 18 y 24 horas de reacción y confirmar la presencia del producto con cromatografía en capa fina se detiene la agitación y se retiró el catalizador y el exceso de KCN por filtración con acetato de etilo, el filtrado obtenido se extrajo con solución salina acuosa (salmuera) y acetato de etilo, la fase orgánica obtenida se transfirió a un Erlenmeyer con sulfato de sodio con el fin de eliminar el agua, el líquido obtenido se filtró y concentró en un rotaevaporador para eliminar el disolvente y el producto concentrado se purificó empleando una columna cromatográfica de óxido de aluminio con una mezcla de diferentes relaciones de éter de petróleo: acetato de etilo como eluyente. Finalmente, se obtuvo el producto sin impurezas. La purificación también se realizó por recristalización disolviendo el producto en acetato de etilo y agregando posteriormente unas gotas de éter de petróleo con el fin de causar la precipitación de los cristales puros del producto. Para confirmar la estructura del producto final se realizaron análisis espectroscópicos de infrarrojo (IR)

y resonancia magnética nuclear (RMN) para todos los compuestos. De los productos finales propuestos, se obtuvieron 17 compuestos y sus estructuras y caracterización estructural se presentan a continuación.

Serie A. α -aminonitrilos basados en aminas primarias (β,γ -picolilamina)

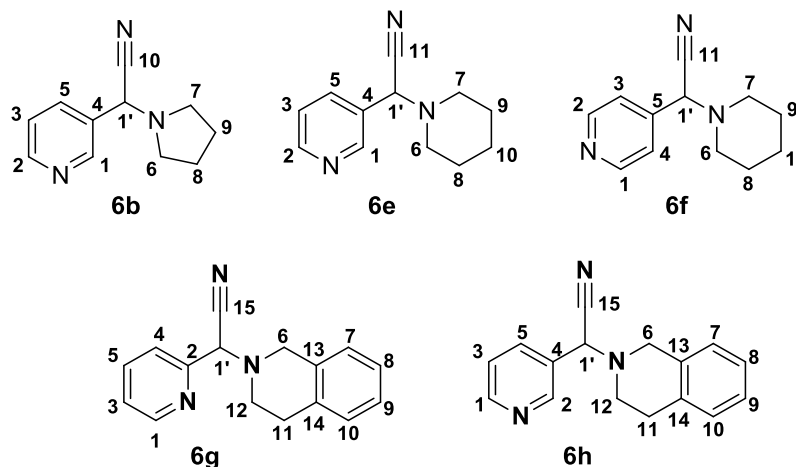


8.4.1. 2-(4-Hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (5b) (AG27). A partir de 0.51 g (4.18 mmol) de p-hidroxibenzaldehído, 0.58 g (5.40 mmol) de 3-picolilamina, 0.580 g del catalizador SSA y 0.408 g (6.27 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido beige con un rendimiento del 40%; $C_{14}H_{13}N_3O$ (239,27 g/mol), m.p. 94 – 95 °C. IR (KBr): 3295 cm^{-1} (ν_{NH}), 1382 cm^{-1} (ν_{OH}), 2220 cm^{-1} (ν_{CN}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-D_6): δ (ppm): 7.62 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 2- H_{Ar}), 7.55 (1H, td, $J = 3.3, 1.4$ Hz, 1- H_{Ar}), 6.84 (1H, dd, $J = 7.9, 5$ - H_{Ar}), 6.44 (1H, m, 3- H_{Ar}), 6.41 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 9,10- H_{Ar}), 5.90 (2H, d, $J = 8.6$ Hz 11, 12- H_{Ar}), 4.00 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, 1'-H), 2.88 (2H, m, 6-H), 2.69 (1H, m, 14-OH), 1.60 (1H, t, $J = 1.7$ Hz 7-NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-D_6 , 100 MHz): δ (ppm): 157.6 (13- C_{Ar}), 149.3 (2- C_{Ar}), 148.2 (1- C_{Ar}), 135.8 (5- C_{Ar}), 134.9 (4- C_{Ar}), 128.6 (9,10- C_{Ar}), 125.9 (3- C_{Ar}), 123.4 (8- C_{Ar}), 119.9 (15-CN), 115.4 (11,12- C_{Ar}), 52.3 (6-C), 47.78 (1'-C).

8.4.2. 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (5d) (AG29). A partir de 0.564 g (3.71 mmol) de vainillina, 1.596 g (4.80 mmol) de 4-picolilamina, 0.520 g del catalizador SSA y 0.36 g (5.50 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido naranja con un rendimiento del 62%; $C_{15}H_{15}N_3O_2$ (269,30 g/mol), m.p. 89 - 90 °C. IR (KBr): 3301 cm^{-1} (ν_{NH}), 1213 cm^{-1} (ν_{OH}), 2220 cm^{-1} (ν_{CN}), 1367 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=N}}$). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-D_6): δ (ppm): 7.55 (2H, dd, $J = 4.5, 1.5$ Hz, 1,2- H_{Ar}), 6.42 (2H, d, $J = 5.8$ Hz, 3,4- H_{Ar}), 6.14 (1H, d, $J = 1.9, 10$ - H_{Ar}), 5.98 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz 9- H_{Ar}), 5.86 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, 11-H), 3.95 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, 1'-H), 2.88 (1H, m, 14-OH), 2.83 (3H, s, 15-O- CH_3), 2.76 (2H, m, 6- CH_2), 1.56 (1H, t, J

= 1.7 Hz 7-NH). ^{13}C -NMR (DMSO- D_6 , 100 MHz): δ (ppm): 149.51 (1,2- C_{Ar}), 148.6 (5- C_{Ar}), 147.8 (12- C_{Ar}), 146.9 (13- C_{Ar}), 126.4 (8- C_{Ar}), 123.06 (3,4- C_{Ar}), 120.05 (9- C_{Ar}), 119.9 (15-CN), 115.4 (11- C_{Ar}), 111.4 (10-C), 55.7 (16- OCH_3), 52.6 (6-C), 50.49 (1'-H).

Serie B. α -aminonitrilos basados en aminas secundarias (pirrolidina, piperidina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)



8.4.3. 2-(Piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (6b) (AG39). A partir de 0.571 g (5.34 mmol) de 3-piridincarbaldéido, 0.193 g (8.01 mmol) de pirrolidina, 0.520 g del catalizador SSA y 0.520 g (8.01 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 50%; $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3$ (187.24 g/mol) m.p. 157 – 158 °C. IR (KBr): 3381 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 2912 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}-\text{H}}$), 2100 cm^{-1} (ν_{CN}), 808 cm^{-1} (ν_{Ar}). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.68 (1H, d, $J = 2.1\text{ Hz}$, 1- H_{Ar}), 8.51 (1H, dt, $J = 4.8, 1.6\text{ Hz}$, 2- H_{Ar}), 7.71 (1H, dt, $J = 7.9, 1.9\text{ Hz}$, 5- H_{Ar}), 7.24 (1H, m, 3- H_{Ar}), 3.81 (1H, s, 1'-H), 2.54 (2H, m, 6- H_{Pip}), 2.41 (2H, m, 7- H_{Pip}), 1.74 (4H, m, 8, 9- H_{Pip}). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 174.1 (1- C_{Ar}), 149.7 (2-C), 149.5 (5- C_{Ar}), 135.8 (3- C_{Ar}), 133.3 (4- C_{Ar}), 123.5 (10-CN), 72.7 (1'-C), 52.6 (6, 7- C_{Pirr}), 23.4 (8,9- C_{Pirr}).

8.4.4. 2-(Piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e) (AG36). A partir de 0.265 g (2.48 mmol) de 3-piridincarbaldéido, 0.316 g (3.72 mmol) de piperidina, 0.520 g del catalizador SSA y 0.242 g (3.72 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 69%; $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3$ (201.27 g/mol) m.p. 147 – 148

°C. IR (KBr): 3388.34 ($\nu_{\text{C=N}}$), 2797 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$), 2341 cm^{-1} (ν_{CN}), 650.96 cm^{-1} (ν_{Ar}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.55 (1H, dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 2- H_{Ar}), 8.52 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 1- H_{Ar}), 7.62 (1H, dt, $J = 7.9, 4.2, 1.8$ Hz, 5- H_{Ar}), 7.28 (1H, m, 3- H_{Ar}), 3.99 (1H, s, 1'-H), 2.38 (4H, m, 6,7- H_{Pip}), 1.58 (4H, m, 8,9- H_{Pip}), 1.40 (2H, m, 10- H_{Pip}). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 174.2 (4- C_{Ar}), 150.6 (1- C_{Ar}), 149.3 (2- C_{Ar}), 136.8 (5- C_{Ar}), 130.7 (11-CN), 123.2 (3- C_{Ar}), 73.4 (1'-C), 52.4 (6,7- C_{Pip}), 26.2 (8,9- C_{Pip}), 23.9 (10- C_{Pip}).

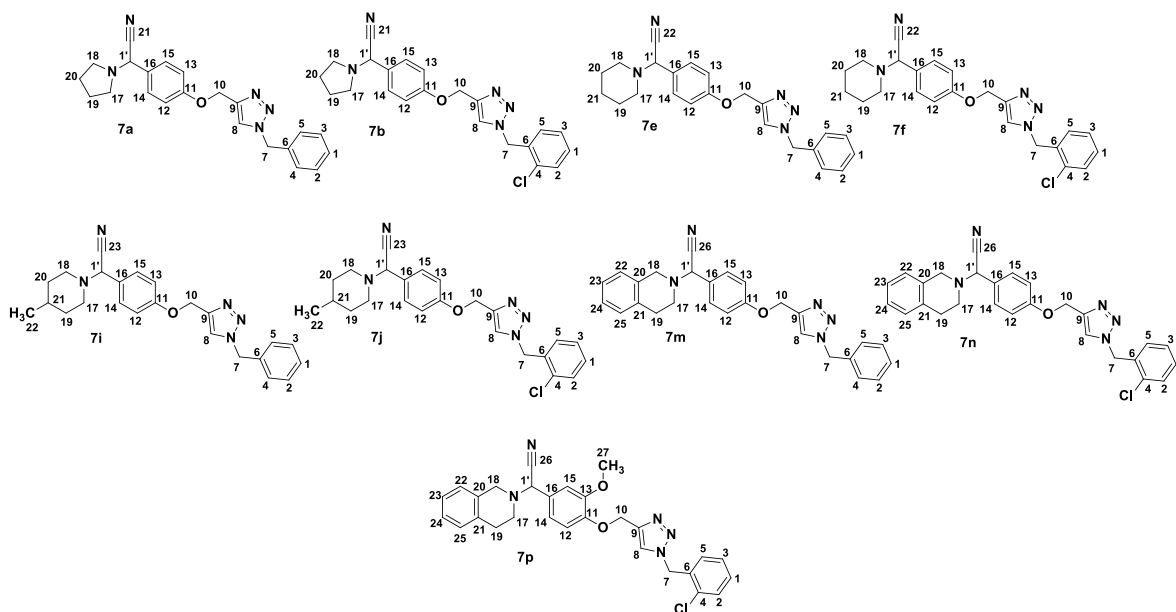
8.4.5. 2-(Piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetoniitrilo (6f) (AG42). A partir de 0.531 g (2.48 mmol) de 4-piridincarbaldéido, 0.633 g (7.44 mmol) de piperidina, 0.520 g del catalizador SSA y 0.484 g (7.44 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 39%; $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3$ (201.27 g/mol) m.p. 155 – 156 °C. IR (KBr): 3294.31 ($\nu_{\text{C=N}}$), 2754 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$), 2200 cm^{-1} (ν_{CN}), 806 cm^{-1} (ν_{Ar}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.65 (2H, dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 1,2- H_{Ar}), 7.49 (2H, m, 3,4- H_{Ar}), 4.80 (1H, s, 1'-H), 2.50 (4H, t, $J = 2.50$, 6,7- H_{Pip}), 1.61 (4H, m, 8,9- H_{Pip}), 1.49 (2H, m, 10- H_{Pip}). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 150.4 (1,2- C_{Ar}), 142.8 (5- C_{Ar}), 122.5 (3,4- C_{Ar}), 114.53 (11-CN), 62.4 (1'-C), 51.2 (6,7- C_{Pip}), 25.8 (8,9- C_{Pip}), 22.8 (10- C_{Pip}).

8.4.6. 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetoniitrilo (6g) (AG12). A partir de 1.274 g (11.9 mmol) de 3-piridincarbaldéido, 1.596 g (11.9 mmol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 0.840 g del catalizador SSA y 1.10 g (17 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido naranja con un rendimiento del 27%; $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3$ (249,31 g/mol) m.p. 128 – 129 °C. IR (KBr): 3062 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=N}}$), 2792 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$), 2226 cm^{-1} (ν_{CN}), 736 cm^{-1} (ν_{Ar}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.82 (1H, dq, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 1- H_{Ar}), 7.90 (1H, td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 5- H_{Ar}), 7.77 (1H, dd, $J = 7.9$ Hz, 4- H_{Ar}), 7.47 (1H, qq, $J = 7.5, 4.9$ Hz, 3- H_{Ar}), 7.29 (1H, m, 9- H_{Ar}), 7.28 (1H, m, 10- H_{Ar}), 7.25 (1H, m, 7- H_{Ar}), 7.13 (1H, m, 8- H_{Ar}), 5.33 (1H, s, 1'-H), 3.97 (1H, d, $J = 14.8$ Hz 6- $\text{H}_{1\text{Pip}}$), 3.97 (1H, d, $J = 14.2$ Hz 6- $\text{H}_{2\text{Pip}}$), 3.14 (2H, m, 12- H_{Pip}), 3.07 (2H, m, 11- H_{Pip}). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 153.1 (2- C_{Ar}), 149.8 (1- C_{Ar}), 137.3 (5-C), 133.5 (14- C_{Ar}), 133.2 (13-C), 128.8 (10- C_{Ar}), 126.6 (7- C_{Ar}), 126.5 (8- C_{Ar}), 125.9 (9- C_{Ar}), 123.9 (3- C_{Ar}), 122.5 (4- C_{Ar}), 115 (15-CN), 64.6 (1'-C), 52.6 (6- C_{Pip}), 48 (12- C_{Pip}), 29.3 (11- C_{Pip}).

8.4.7. 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6h) (AG11)

A partir de 0.428 g (4 mmol) de 3-piridincarbaldéido, 0.690 g (5.2 mmol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 0.690 g del catalizador SSA y 0.390 g (4 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 18%; $C_{16}H_{15}N_3$ (249,31 g/mol) m.p. 167 – 168 °C. IR (KBr): 3401 cm^{-1} ($\nu_{C=N}$), 2924 cm^{-1} (ν_{C-H}), 2250 cm^{-1} (ν_{CN}), 742 cm^{-1} (ν_{Ar}). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.85 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, 2- H_{Ar}), 8.66 (1H, dd, $J = 4.9, 1.3$ Hz, 1- H_{Ar}), 7.92 (1H, m, 5- H_{Ar}), 7.37 (1H, m, 3- H_{Ar}), 7.16 (1H, m, 10- H_{Ar}), 7.14 (1H, m, 9- H_{Ar}), 7.10 (1H, m, 8- H_{Ar}), 5.09 (1H, s, 1'-H), 3.79 (1H, d, $J = 14.8$ Hz 6- H_{1Pip}), 3.79 (1H, d, $J = 14.2$ Hz 6- H_{2Pip}), 2.95 (2H, m, 12- H_{Pip}), 2.85 (2H, m, 11- H_{Pip}). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm): 150.5 (2- C_{Ar}), 149.3 (1- C_{Ar}), 135.5 (14-C), 133.5 (5- C_{Ar}), 133.2 (13-C), 129.1 (10- C_{Ar}), 128.8 (8- C_{Ar}), 126.6 (7- C_{Ar}), 126.5 (4- C_{Ar}), 126 (9- C_{Ar}), 123.6 (3- C_{Ar}), 114.4 (15-CN), 60.1 (1'-C), 52.5 (6- C_{Pip}), 47.6 (12- C_{Pip}), 29.24 (11- C_{Pip}).

Serie C. α - aminonitrilos híbridos con fragmentos 1,2,3 - triazol



8.4.8. 2-(4-((1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (7a) (AG38). A partir de 0.400 g (1.36 mmol) del precursor 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4a), 0.145 g (2.04 mmol) de pirrolidina, y 0.132 g (2.04 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 90%; C₂₂H₂₃N₅O (373.45 g/mol), m.p. 98 – 99 °C. IR (KBr): 2972 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2340 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2250 (ν_{CN}), 700 cm⁻¹ (ν_{Ar}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.53 (1H, s, 8-CH), 7.42 (2H, m, 2,3-H_{Ar}), 7.38 (2H, m, 4,5-H_{Ar}), 7.36 (1H, m, 1-H_{Ar}), 7.28 (2H, d, J = 2.5 Hz, 14,15-H_{Ar}), 6.97 (2H, dt, J = 8.7, 2.9 Hz, 12,13-H), 5.53 (2H, s, 7-CH₂), 5.18 (2H, s, 10-CH₂), 4.96 (1H, s, 1'-H), 2.62 (4H, m, 17,18-H_{Pirr}), 1.81 (4H, m, 19,20-H_{Pirr}). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.4 (9-C), 134.5 (6-C_{Ar}), 129.2 (2,3-C_{Ar}), 129.1 (4,5-C_{Ar}), 128.9 (1-C_{Ar}), 128.2 (14,15-C_{Ar}), 127.34 (16-C_{Ar}), 122.75 (8-C), 116.4 (21-CN), 115.0 (12,13-C_{Ar}), 62.2 (10-CH₂), 58.7 (1'-CH), 54.3 (7-CH₂), 50.3 (17,18-C_{Pirr}), 23.5 (19,20-C_{Pirr}).

8.4.9. 2-(4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (7b) (AG53). A partir de 0.401 g (1.22 mmol) del precursor 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c), 0.130 g (1.83 mmol) de pirrolidina, 0.130 g del catalizador SSA y 0.119 g (1.83 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 86%; C₂₂H₂₂ClN₅O (407.90 g/mol), m.p. 86 – 87 °C. IR (KBr): 3069 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2360 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2250 (ν_{CN}), 761 cm⁻¹ (ν_{C-Cl}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.64 (1H, s, 8-CH), 7.43 (1H, m, 2-H_{Ar}), 7.40 (2H, m, 14,15-H_{Ar}), 7.31 (1H, td, J = 7.6, 1.9 Hz, 5-H_{Ar}), 7.26 (1H, td, J = 7.6, 1.4 Hz, 3-H_{Ar}), 7.20 (1H, dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1-H_{Ar}), 6.97 (2H, dt, J = 8.7, 4.7, 2.9 Hz, 12,13-H), 5.66 (2H, s, 7-CH₂), 5.19 (2H, s, 10-CH₂), 4.96 (1H, s, 1'-H), 2.62 (4H, m, 17,18-H_{Pirr}), 1.81 (4H, m, 19,20-H_{Pirr}). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.2 (9-C), 133.6 (6-C_{Ar}), 132.38 (4-C_{Ar}), 130.5 (1-C_{Ar}), 130.4 (14, 15-C_{Ar}), 130.07 (2-C_{Ar}), 129.06 (3-C_{Ar}), 127.7 (5-C_{Ar}), 127.1 (16-C_{Ar}), 123.1 (8-C), 116.3 (21-CN), 115.05 (12,13-C_{Ar}), 62.2 (1'-H), 58.7 (10-H), 51.6 (7-CH₂), 50.2 (17, 18-C_{Pirr}), 23.5 (19,20-C_{Pip}).

8.4.10. 2-(4-((1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (7e) (AG34). A partir de 0.756 g (2.58 mmol) del precursor 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4a), 0.329 g (3.87 mmol) de piperidina, 0.690 g del catalizador SSA y 0.252 g (3.87 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 87%; C₂₃H₂₅N₅O (387.48 g/mol), m.p. 135 – 136 °C. IR (KBr): 2941 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2360 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2220 (ν_{CN}), 701 cm⁻¹ (ν_{Ar}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.53 (1H, s, 8-CH), 7.42 (2H, m, 2,3-H_{Ar}), 7.38 (2H, m, 4,5-H_{Ar}), 7.36 (1H, m, 1-H_{Ar}), 7.28 (2H, d, J = 2.5 Hz, 14,15-H_{Ar}), 6.97 (2H, dt, J = 8.7, 2.9 Hz, 12,13-H), 5.53 (2H, s, 7-CH₂), 5.18 (2H, s, 10-CH₂), 4.74 (1H, s, 1'-H), 2.47 (4H, m, 17,18-H_{Pip}), 1.58 (4H, m, 19,20-H_{Pip}), 1.47 (2H, m, 21-H_{Pip}). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.4 (9-C), 134.5 (6-C_{Ar}), 129.2 (2,3-C_{Ar}), 129.3 (4,5-C_{Ar}), 128.9 (1-C_{Ar}), 128.2 (14,15-C_{Ar}), 126.3 (16-C_{Ar}), 122.7 (8-C), 115.9 (22-CN), 114.9 (12,13-C_{Ar}), 62.5 (1'-CH), 62.2 (10-CH₂), 54.3 (7-CH₂), 50.9 (17,18-C_{Pip}), 25.8 (19,20-C_{Pip}), 24.07 (21-C_{Pip}).

8.4.11. 2-(4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (7f) (AG54). A partir de 0.386 g (1.18 mmol) del precursor 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c), 0.150g (1.77 mmol) de piperidina, 0.150 g del catalizador SSA y 0.115 g (1.77 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 85%; C₂₃H₂₄ClN₅O (421.92 g/mol), m.p. 126 – 127 °C. IR (KBr): 2806.63 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2360 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2230 (ν_{CN}), 744 cm⁻¹ (ν_{C-Cl}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.64 (1H, s, 8-CH), 7.43 (1H, m, 2-H_{Ar}), 7.41 (2H, m, 14,15-H_{Ar}), 7.32 (1H, td, J = 7.5, 1.7 Hz, 5-H_{Ar}), 7.26 (1H, td, J = 6.2, 1.4 Hz, 3-H_{Ar}), 7.20 (1H, dd, J = 7.5, 1.9 Hz, 1-H_{Ar}), 6.98 (2H, dt, J = 8.7, 5.0, 2.9 Hz, 12,13-H_{Ar}), 5.67 (2H, s, 7-CH₂), 5.19 (2H, s, 10-H), 4.74 (1H, s, 1'-H), 2.48 (4H, m, 17,18-H_{Pip}), 1.58 (4H, m, 19,20-H_{Pip}), 1.46 (2H, m, 21-H_{Pip}). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.3 (9-C), 133.6 (6-C_{Ar}), 132.3 (4-C_{Ar}), 130.5 (1-C_{Ar}), 130.4 (14,15-C_{Ar}), 130.09 (2-C_{Ar}), 129.2 (5-C_{Ar}), 127.7 (3-C_{Ar}), 126.3 (16-C_{Ar}), 123.1 (8-CH), 115.9 (22-CN), 114.98 (12,13-C_{Ar}), 62.5 (1'-CH), 62.2 (10-CH₂), 51.6 (17,18-C_{Pip}), 50.9 (7-CH₂), 25.9 (19,20-C_{Pip}), 24.08 (21-C_{Pip}).

8.4.12. 2-(4-((1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7i) (AG56). A partir de 0.365 g (1.24 mmol) del precursor 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (**4a**), 0.185 g (1.86 mmol) de 4-metilpiperidina, 0.185 g del catalizador SSA y 0.121 g (1.86 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 90%; C₂₄H₂₇N₅O (401.50 g/mol) m.p. 120 – 121 °C. IR (KBr): 2760.75 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2349 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2221 (ν_{CN}), 704 cm⁻¹ (ν_{Ar}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.53 (1H, s, 8-CH), 7.42 (2H, m, 14,15-H_{Ar}), 7.37 (2H, m, 2,3-H_{Ar}), 7.35 (1H, m, 1-H_{Ar}), 7.28 (2H, m, 4,5-H_{Ar}), 6.97 (2H, dt, J = 8.8, 4.9, 3.0 Hz, 12,13-H_{Ar}), 5.53 (2H, s, 7-CH₂), 5.18 (2H, s, 10-H), 4.76 (1H, s, 1'-H), 2.87 (1H, m, 17-H_{Pip-ex}), 2.53 (1H, m, 18-H_{Pip-ec}), 2.48 (1H, dd, J = 11.1, 2.5 Hz, 17-H_{Pip-ax}), 2.06 (1H, td, J = 11.4, 2.6 Hz, 18-H_{Pip-ax}), 1.71 (1H, m, 19-H_{Pip-ec}), 1.57 (1H, ddd, J = 13.0, 7.6, 2.5 Hz, 20-H_{Pip-ec}), 1.42 (1H, m, 21-H_{Pip-ax}), 1.32 (1H, ddd, J = 8.4, 7.6, 4.0 Hz, 19-H_{Pip-ax}), 1.08 (1H, ddd, J = 8.6, 7.9, 4.1 Hz, 20-H_{Pip-ax}), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, 22-CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.4 (9-C), 134.5 (6-C_{Ar}), 129.3 (2,3-C_{Ar}), 129.2 (4,5-C_{Ar}), 128.9 (14,15-C_{Ar}), 126.3 (1-C_{Ar}), 128.2 (16-C_{Ar}), 122.7 (8-C_{Ar}), 115.8 (23-CN), 114.98 (12,13-C_{Ar}), 62.2 (1'-CH), 62.1 (10-CH₂), 54.4 (17-C_{Pip}), 53.3 (7-CH₂), 47.3 (18-C_{Pip}), 34.4 (19-C_{Pip}), 33.9 (20-C_{Pip}), 30.5 (21-C_{Pip}), 21.8 (22-CH₃).

8.4.13. 2-(4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (7j) (AG52). A partir de 0.383 g (1.07 mmol) del precursor 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (**4c**), 0.159 g (1.60 mmol) de 4-metilpiperidina, y 0.104 g (1.60 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 82%; C₂₄H₂₈ClN₅O (465.98 g/mol), m.p. 136 – 137 °C. IR (KBr): 2828 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2338 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2219 (ν_{CN}), 747 cm⁻¹ (ν_{C-Cl}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.65 (1H, s, 8-CH), 7.44 (2H, m, 14,15-H_{Ar}), 7.41 (1H, m, 2-H_{Ar}), 7.32 (1H, td, J = 7.6, 1.9 Hz, 5-H_{Ar}), 7.27 (1H, td, J = 6.0, 1.5 Hz, 3-H_{Ar}), 7.21 (1H, dd, J = 7.6, 1.8 Hz, 1-H_{Ar}), 6.97 (2H, dt, J = 8.8, 4.7, 3.0 Hz, 12,13-H_{Ar}), 5.67 (2H, s, 7-CH₂), 5.19 (2H, s, 10-H), 4.77 (1H, s, 1'-H), 2.88 (1H, m, 17-H_{Pip-ec}), 2.52 (1H, m, 18-H_{Pip-ec}), 2.48 (1H, dd, J = 11.1, 2.6 Hz, 17-H_{Pip-ax}), 2.05 (1H, td, J = 11.5, 2.6 Hz, 18-H_{Pip-ax}), 1.70 (1H, dt, J =

12.4, 7.1, 2.7 Hz, 19-H_{Pip-ec}), 1.56 (1H, dt, J = 13.0, 7.4, 2.7 Hz, 20-H_{Pip-ec}), 1.41 (1H, m, 21-H_{Pip-ax}), 1.32 (1H, ddd, J = 8.5, 7.7, 3.9 Hz, 19-H_{Pip-ax}) 1.08 (1H, ddd, J = 8.9, 7.7, 4.1 Hz, 20-H_{Pip-ax}), 0.91 (3H, d, J = 6.4 Hz, 22-CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.5 (11-C_{Ar}), 144.3 (9-C), 133.6 (6-C_{Ar}), 132.3 (4-C_{Ar}), 130.5 (1-C_{Ar}), 130.4 (5-C_{Ar}), 130.08 (14,15-C_{Ar}), 129.2 (2-C_{Ar}), 127.7 (3-C_{Ar}), 126.3 (16-C_{Ar}), 123.1 (8-CH), 115.9 (23-CN), 114.98 (12,13-C_{Ar}), 62.17 (1'-CH), 62.15 (10-CH₂), 53.3 (17-C_{Pip}), 51.6 (7-CH₂), 47.2 (18-C_{Pip}), 34.40 (19-C_{Pip}), 33.87 (20-C_{Pip}), 30.51 (21-C_{Pip}) 21.85 (22-CH₃).

8.4.14. 2-(4-((1-Bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H-il)acetonitrilo (7m) (AG55). A partir de 0.334 g (1.14 mmol) del precursor 4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (**4a**), 0.193 g (1.71 mmol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 0.193 g del catalizador SSA y 0.111 g (1.71 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 51%; C₂₇H₂₅N₅O (435,52 g/mol) m.p. 169 – 170 °C. IR (KBr): 2753 cm⁻¹ (ν_{C-H}), 2336 cm⁻¹ (ν_{N=N}), 2220.79 (ν_{CN}), 701 cm⁻¹ (ν_{Ar}). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.54 (1H, s, 8-CH), 7.50 (2H, dt, J = 8.6, 2.8 Hz, 14,15-H_{Ar}), 7.38 (2H, m, 2,3-H_{Ar}), 7.37 (1H, m, 1-H_{Ar}), 7.28 (2H, m, 4,5-H_{Ar}), 7.15 (1H, m, 24-H_{Ar}), 7.13 (1H, m, 25-H_{Ar}), 7.11 (1H, m, 22-H_{Ar}), 7.00 (2H, dt, J = 8.8, 3.0 Hz, 12,13-H_{Ar}), 6.97 (1H, d, J = 1.9 Hz, 23-H_{Ar}), 5.54 (2H, s, 7-CH₂), 5.20 (2H, s, 10-CH₂), 4.99 (1H, s, 1'-H), 3.74 (2H, t, J = 15.9, 18-H_{Pip}), 2.88 (2H, m, 19-H_{Pip}), 2.82 (2H, m, 17-H_{Pip}). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm): 158.8 (11-C_{Ar}), 144.3 (9-C), 134.5 (6-C_{Ar}), 133.8 (21-C_{Ar}), 133.7 (20-C_{Ar}), 129.3 (23-C_{Ar}), 129.2 (24-C_{Ar}), 128.9 (22-C_{Ar}), 128.8 (25-C_{Ar}), 128.2 (14,15-C_{Ar}), 126.7 (1-C_{Ar}), 126.5 (2,3-C_{Ar}), 125.9 (16-C_{Ar}), 125.7 (3,4-C_{Ar}), 122.7 (8-CH), 115.6 (26-CN), 115.2 (12,13-C_{Ar}), 62.2 (10-CH₂), 61.6 (1'-CH), 54.39 (7-CH₂), 52.3 (18-C_{Pip}), 47.5 (17-C_{Pip}), 29.3 (19-C_{Pip}).

8.4.15. 2-(4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H-il)acetonitrilo (7n) (AG51). A partir de 0.357 g (1.09 mmol) del precursor 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (**4c**), 0.217 g (1.63 mmol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina y 0.106 g (1.63 mmol) de

KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 95%; $C_{27}H_{24}ClN_5O$ (469,97 g/mol), m.p. 124 – 125 °C. IR (KBr): 2923.72 cm^{-1} (ν_{C-H}), 2339 cm^{-1} ($\nu_{N=N}$), 2230 (ν_{CN}), 752 cm^{-1} (ν_{C-Cl}). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.66 (1H, s, 8-CH), 7.50 (2H, d, J = 8.5 Hz, 14,15- H_{Ar}), 7.44 (1H, dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 22- H_{Ar}), 7.32 (1H, td, J = 7.7, 1.9, 24- H_{Ar}), 7.27 (1H, td, J = 6.0, 1.6 Hz, 5- H_{Ar}), 7.22 (1H, dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 23- H_{Ar}), 7.15 (1H, m, 2- H_{Ar}), 7.13 (1H, m, 3- H_{Ar}), 7.10 (1H, m, 25- H_{Ar}), 7.01 (2H, dt, J = 8.8, 4.9, 2.9 Hz, 12,13- H_{Ar}), 6.97 (1H, d, J = 1.9 Hz, 1- H_{Ar}), 5.68 (2H, s, 7- CH_2), 5.21 (2H, s, 10- CH_2), 5.00 (1H, s, 1'-H), 3.74 (2H, q, J = 14.7, 2.3 Hz, 18- H_{Pip}), 2.94 (2H, m, 19- H_{Pip}), 2.81 (2H, m, 17- H_{Pip}). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ (ppm): 158.7 (11- C_{Ar}), 144.2 (9-C), 133.8 (6- C_{Ar}), 133.7 (21- C_{Ar}), 133.6 (20- C_{Ar}), 132.3 (4- C_{Ar}), 130.5 (23- C_{Ar}), 130.4 (24- C_{Ar}), 130.09 (22- C_{Ar}), 129.3 (14,15- C_{Ar}), 128.8 (25- C_{Ar}), 127.7 (5- C_{Ar}), 126.7 (1- C_{Ar}), 126.5 (2- C_{Ar}), 125.9 (16- C_{Ar}), 125.7 (3- C_{Ar}), 123.1 (8-CH), 115.6 (26-CN), 115.1 (12,13- C_{Ar}), 62.2 (10- CH_2), 61.6 (1'-CH), 52.3 (18- C_{Pip}), 51.6 (7- CH_2), 47.5 (17- C_{Pip}), 29.3 (19- C_{Pip}).

8.4.16. 2-(4-((1-(2-Clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (7p) (AG49). A partir de 0.357 g (1.00 mmol) del precursor 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehido (**4d**), 0.199 g (1.5 mmol) de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina y 0.097 g (1.5 mmol) de KCN, el producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 95%; $C_{28}H_{26}ClN_5O_2$ (499,99 g/mol) m.p. 155 – 156 °C. IR (KBr): 2936 cm^{-1} (ν_{C-H}), 2337 cm^{-1} ($\nu_{N=N}$), 2221 (ν_{CN}), 1272 cm^{-1} (ν_{OCH_3}), 739 cm^{-1} (ν_{Ar}). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 7.68 (1H, s, 8-CH), 7.43 (1H, dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 22- H_{Ar}), 7.31 (1H, td, J = 7.6, 1.9 Hz, 24- H_{Ar}), 7.28 (1H, m, 5- H_{Ar}), 7.19 (1H, dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 23- H_{Ar}), 7.16 (1H, m, 2- H_{Ar}), 7.14 (1H, m, 3- H_{Ar}), 7.13 (1H, m, 1- H_{Ar}), 7.10 (1H, m, 25- H_{Ar}), 7.08 (1H, m, 14- H_{Ar}), 7.05 (1H, m, 15- H_{Ar}), 7.00 (1H, m, 12- H_{Ar}), 5.66 (2H, s, 7- CH_2), 5.29 (2H, s, 10- CH_2), 4.99 (1H, s, 1'-H), 3.84 (3H, s, 27- OCH_3), 3.77 (2H, m, 18- H_{Pip}), 2.93 (2H, m, 19- H_{Pip}), 2.80 (2H, m, 17- H_{Pip}). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ (ppm): 149.9 (12- C_{Ar}), 148.1 (11- C_{Ar}), 144.3 (9-C), 133.8 (6- C_{Ar}), 133.7 (21- C_{Ar}), 133.6 (20- C_{Ar}), 132.3 (4- C_{Ar}), 130.5 (23- C_{Ar}), 130.4 (24- C_{Ar}), 130.1 (22- C_{Ar}), 128.8 (25- C_{Ar}), 127.7 (5- C_{Ar}), 126.7 (1- C_{Ar}), 126.5 (2- C_{Ar}),

126.5 (3-C_{Ar}), 125.9 (16-C_{Ar}), 123.4 (8-CH), 120.3 (15-C_{Ar}), 115.5 (26-CN), 113.9 (13-C_{Ar}), 111.02 (14-C_{Ar}), 63.2 (10-CH₂), 61.9 (1'-CH), 56.1 (27-OCH₃), 52.6 (18-C_{Pip}), 51.6 (7-CH₂), 47.3 (17-C_{Pip}), 29.4 (19-C_{Pip}).

8.5. Ensayos de actividad biológica

8.5.1. Ensayo *in vitro* de inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa comercial (extraída de *Electrophorus electricus*) y la extraída de larvas de *Aedes aegypti*. Los ensayos de inhibición de la acetilcolinesterasa se basaron en el protocolo reportado por Ellman.⁷⁴ Usando microplacas de 96 pozos y un lector de absorbancia MultiScan Go, para cada molécula sintetizada se pesaron cantidades cercanas a 1 mg y se registró el peso exacto para calcular las concentraciones en pozo, se preparó una solución matriz disuelta en dimetilsulfóxido de 65 ppm (mg/L), a partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones en la microplaca con el fin de evaluar diferentes concentraciones y calcular la concentración inhibitoria media (CI50). Cada molécula se evaluó por triplicado y para cada concentración se evaluó un blanco y un control de la enzima comercial. Para que la reacción en el ensayo se lleve a cabo se incubó la enzima con cada uno de los compuestos por 30 minutos y posteriormente se adicionó a cada pozo la acetiltiocolina como sustrato de la enzima y el ácido ditionitrobenzoico para producir la coloración amarilla (Esq. 13), el orden de las moléculas y los controles en la placa se muestran en la figura 17.

74. ELLMAN, G., *et. al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**, p. 88–95.

Esquema 13. Reacción de la acetilcolinesterasa sobre la acetiltiocolina en el ensayo de Ellman.

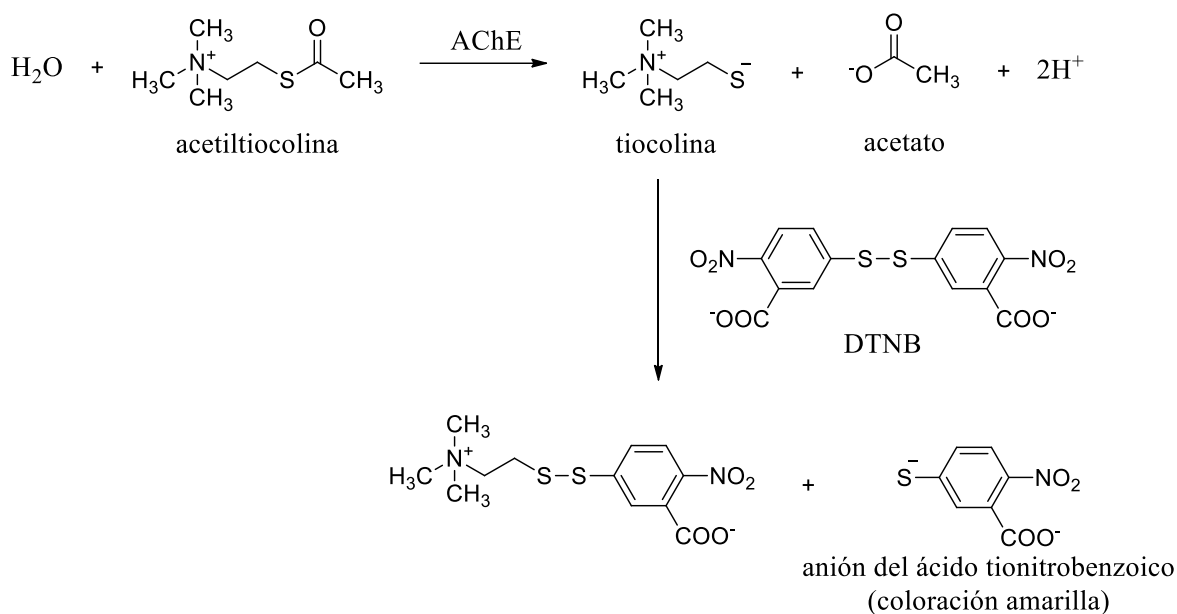


Figura 17. Modelo de microplaca utilizada para el ensayo de inhibición de la AChE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
B	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
C	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		
E	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
F	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
G	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5		
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		

<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: white;"></div>	Blanco ensayo	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: blue;"></div>	Molécula 1	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: orange;"></div>	Molécula 3	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: lightblue;"></div>	Blanco Moléculas
<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: yellow;"></div>	Control ensayo	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: orange;"></div>	Molécula 2	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; background-color: green;"></div>	Molécula 4		

El ensayo *in vitro* de inhibición de la AChE extraída de larvas se realizó con la molécula más activa en el ensayo de actividad larvicida de la siguiente manera.

Previamente al ensayo de inhibición (24 horas antes) se usaron larvas tratadas con las concentraciones CL₂₀, CL₅₀ y CL₇₀, calculados en el ensayo larvicida de dosis múltiples con el análisis de Probit, además de un control negativo con DMSO; estos valores y los parámetros utilizados para el tratamiento de las larvas se registra en la tabla 4. Cumplidas las 24 horas del ensayo se separaron los individuos vivos y se almacenaron en *ependorf* marcados (5 larvas por cada *ependorf*) y se colocaron en una cava con hielo para evitar la degradación de la enzima; a cada *ependorf* se adicionaron 30 µL de agua Milli-Q fría y se procedió a homogenizar cada *ependorf*, después de homogenizar se adicionaron 370 µL más de agua Milli-Q.

Para este ensayo se utilizaron tres placas, una de ellas llamada AChE en donde se llevó a cabo la reacción enzimática, la otra llamada AChI, donde se evaluó el efecto del Propoxur, inhibidor comercial de la acetilcolinesterasa, para de esta manera comparar la actividad de las dos microplacas, y una placa llamada PTN, donde se realizó el ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas. Del homogenizado obtenido se tomaron tres alícuotas de 25 µL cada una y se adicionan a cada pozo de las microplacas AChE y AChI; para llevar a cabo la reacción de la enzima se utilizan los mismos sustratos de el ensayo de inhibición de la AChE comercial, el yoduro de acetiltiocolina y el ácido ditionitrobenzólico.

Tabla 4. *Parámetros del tratamiento de larvas de Aedes aegypti para el ensayo de inhibición de la AChE.*

CL	Concentración (ppm)	Número de replicas	Larvas por réplica
CL ₂₀	22.78	4	10
CL ₅₀	56.95	4	10
CL ₇₀	79.73	4	10

8.5.2. Evaluación de la actividad larvica de los productos finales

8.5.2.1. Mantenimiento de una colonia de *Aedes aegypti*

El material biológico fue obtenido del insectario del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (Cintrop) con las condiciones apropiadas para la cría de mosquitos (temperatura (24 – 26 °C), humedad (80 ±5) y fotoperiodo).

- a. **Adultos:** Las hembras de mosquito se alimentaron usando ratas de laboratorio (Wistar) descubriendo su abdomen durante 20 minutos para que los mosquitos se alimentaran de su sangre para la posterior oviposición, los machos fueron alimentados con solución acuosa de miel entre el 10-20% en un recipiente de vidrio en el cual se introdujo un trozo de papel filtro con el fin de que la solución ascienda por capilaridad.
- b. **Huevos:** Posterior a la oviposición, se recolectaron los huevos en recipientes plásticos de 100 mL con agua y cubiertos con papel filtro. Para estimular la oviposición de las hembras, se adicionaron a los recipientes porciones de alimento para peces (Nutrafin Basix®). Estos recipientes se mantienen en la jaula durante una semana para permitir la maduración de los embriones.
- c. **Larvas:** Al eclosionar los huevos, se transfirieron las larvas a recipientes plásticos con agua de filtro de 40 cm de largo, 20 cm de ancho y 6 cm de alto y se alimentaron con Nutrafin Basix® cada 6 días, después de alcanzar el estado de pupa (6 – 8 días después de la eclosión), estas se introdujeron en un recipiente con agua en la jaula hasta alcanzar el desarrollo a adulto.

8.5.2.2. Ensayo *in vivo* de actividad larvica en larvas de *Aedes aegypti*

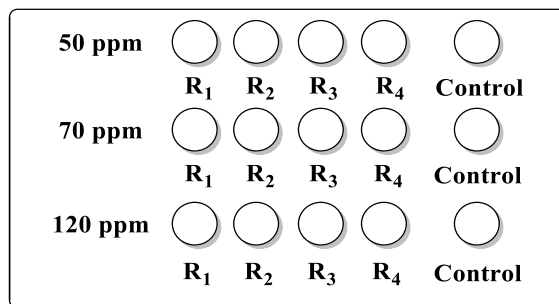
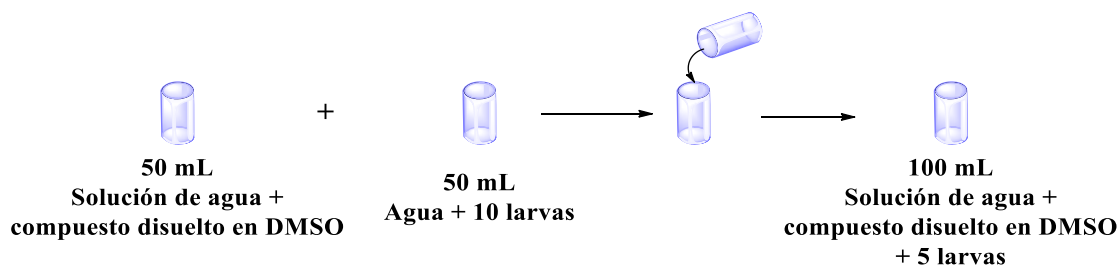
Para el ensayo de actividad larvica se realizó una modificación del protocolo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁷⁵

75. HEMINGWAY, J. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. World Health Organization, 2005.

Usando larvas entre tercer y cuarto estadio, se inició con un ensayo preliminar de dosis exploratorias utilizando concentraciones 50 ppm, 70 ppm y 120 ppm, utilizando cuatro réplicas para cada concentración, un blanco con DMSO y 10 larvas entre tercer y cuarto estadio en cada uno de los recipientes. Para aquellas moléculas más activas en este ensayo se realizaron nuevas evaluaciones con concentraciones múltiples para de esta manera determinar la concentración letal media (CL₅₀).

Dosis exploratorias: A partir de una solución matriz del compuesto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de DMSO menor al 1%, se evaluó la mortalidad en larvas a 50, 70 y 120 ppm. Para este ensayo biológico se realizaron tres réplicas y un blanco con DMSO para cada concentración a evaluar, el ensayo se llevó a cabo en recipientes plásticos con 5 larvas por cada recipiente. Para la preparación de cada replica se agregaron las larvas a cada recipiente con 25 mL de agua, en otro recipiente con 25 mL de agua se adicionó una concentración tal de compuesto que permitiera alcanzar la concentración final a evaluar al mezclar estos dos recipientes y obtener un volumen final de 50 mL (Fig. 18). Se realizó control de mortalidad a las 2, 24 y 48 horas después de iniciar el ensayo.

Figura 18. Preparación de las réplicas para el ensayo de dosis exploratorias.



Concentraciones múltiples: Aquellas moléculas con mayor actividad larvicida en las dosis exploratorias se evaluaron en concentraciones múltiples con seis diferentes concentraciones determinadas a partir del rango de mortalidad de las dosis exploratorias. Para este ensayo se utilizaron 10 larvas por cada recipiente, las cuales se transfirieron a un recipiente con 50 mL de agua, mientras que en otro recipiente plástico se adicionó la disolución matriz de la molécula a evaluar en 50 mL de agua, para obtener un volumen final de 100 mL en cada réplica. Para este ensayo se evaluaron 3 réplicas y un control por cada concentración y la mortalidad se registró a las 2, 24 y 48 horas después de iniciar el ensayo. Después de obtener los resultados de mortalidad, se determinó la concentración letal media (CL₅₀) mediante análisis de Probit.⁷⁶

8.5.3. Inhibición de las enzimas mitocondriales en larvas de *Aedes aegypti*

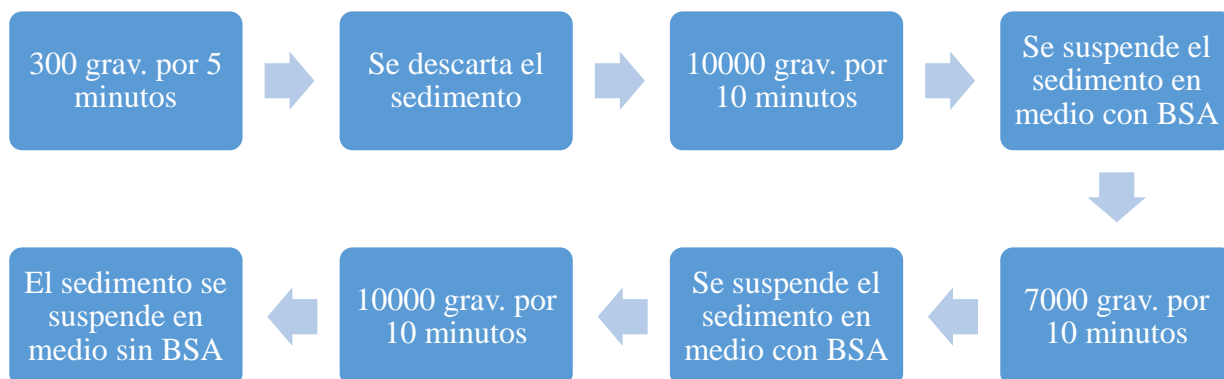
8.5.3.1. Aislamiento y fragmentación de mitocondrias de larvas de *Aedes aegypti*. Con el fin de evaluar el mecanismo de los compuestos en el proceso de fosforilación oxidativa, se realizaron ensayos de inhibición de los complejos enzimáticos en mitocondrias fragmentadas de larvas de *Aedes aegypti*; con el fin de obtener estas enzimas, se aislaron mitocondrias de larvas entre tercer y cuarto estadio de la siguiente manera:

Se escogieron aproximadamente mil larvas entre tercer y cuarto estadio y se filtraron en gasa quirúrgica, posteriormente estas se transfirieron a un medio de aislamiento compuesto de Sacarosa 250 mM, HEPES 10mM, a un pH = 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0.1%; estas larvas fueron procesadas en un homogenizador Potter-Elvehjem (WHEATON, Millville, NJ, EE.UU) y filtradas con ayuda de una jeringa con lana de vidrio para eliminar el exoesqueleto.

76. ASHFORD, J. . & SOWDEN, R. R. Multi-Variate Probit Analysis. *Biometrics*. 1970, **26**, p. 535–546.

Para separar las mitocondrias de los demás organelos se realizó centrifugación diferencial a diferentes revoluciones con el fin de aislar las mitocondrias. Se tuvo en cuenta que todo el proceso de aislamiento se realizó a baja temperatura (4 °C).

Figura 19. Procedimiento de centrifugación diferencial para aislamiento de larvas.



El sedimento suspendido en este medio contiene las mitocondrias aisladas, estas fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de uso en los ensayos; la fragmentación de estas mitocondrias se realizó por choque térmico (congelamiento y descongelamiento). La cuantificación de proteínas mitocondriales se realizó preparando diferentes diluciones de las mitocondrias y obteniendo el valor de absorbancia por el método de Bradford a 595 nm.

8.5.3.2. Ensayos de inhibición de enzimas mitocondriales. Usando las mitocondrias fragmentadas, se realizaron los siguientes ensayos de inhibición de las enzimas de la cadena mitocondrial, estos ensayos fueron basados en los ensayos de Singer,⁷⁷ Somlo,⁷⁸ Mason⁷⁹ y Pullman.⁸⁰

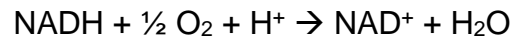
77. SINGER, T. . Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* 1974, **22**, 123–175.

78. SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1965, **97**, p. 183–201.

79. MASON, T. L., POYTON, R. & WHARTON, D. C. Cytochrome C Oxidase from Bakers' Yeast. *J. Biol. Chem.* 1973, **248**, p. 1346–1354.

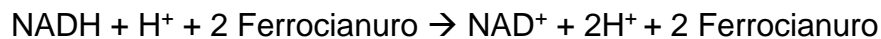
80. PULLMAN, M. E., *et. al.* Partial Resolution Oxidative of the Enzymes Phosphorylation Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1960, **235**, p. 3322–3329.

- NADH Oxidasa: En este ensayo se determinó la velocidad de oxidación del NADH, que se observó mediante la velocidad de consumo de oxígeno polarográficamente.



Para llevar a cabo la reacción, en el medio se agregó buffer fosfato 80 mM (pH = 7.4), EDTA 50 μM , 0.1 mg de proteína mitocondrial y la reacción se inició por la adición de NADH 0.17 mM. La temperatura se mantuvo controlada a 28 °C.

- NADH Deshidrogenasa: Para el ensayo se usó el ferrocianuro de potasio como receptor de electrones en presencia de rotenona, la actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente monitoreándose durante 1 minuto a 420 nm.



Para la reacción se utilizó buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4), EDTA 2 mM, 0.1 mg de proteína mitocondrial, NADH 0.17 mM, rotenona 1 μM , KCN 1 mM y la reacción se inició al adicionar ferrocianuro de potasio 6 mM después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

- NADH citocromo C reductasa: La actividad de la enzima se determinó a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo C a 550 nm; para este ensayo se utilizó buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4), EDTA 2 mM, NADH 50 μM , KCN 1 mM, y 0.1 mg de proteína mitocondrial, la reacción se inició por la adición de citocromo C (oxidado) 40 μM después de incubar 2 minutos a temperatura ambiente, el monitoreo de la reacción se realizó durante 2 minutos a 550 nm.
- Succinato oxidasa: La actividad de la enzima se obtuvo a través de la velocidad de consumo oxígeno polarográficamente, el medio de reacción se

compuso de buffer fosfato 80 mM (pH = 7.4), succinato 10 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial, la reacción se inició por la adición de succinato.

- Succinato deshidrogenasa: para el ensayo se utilizó fenazina metosulfato (PMS) como receptor artificial de electrones y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP); en la reacción se monitoreó la reducción del DCPIP a 600 nm y el sistema de reacción contenía buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 Mm, KCN 1 mM, rotenona 1 μ M, PMS 1 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. Estos reactivos fueron incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente y la reacción se inició por la adición de DCPIP 60 μ M.
- Succinato citocromo C reductasa: La actividad de la enzima se determinó a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo C a 550 nm; para este ensayo se utilizó buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4), EDTA 2 mM, rotenona 1 μ M, succinato 5 mM, KCN 1 mM, y 0.1 mg de proteína mitocondrial; la reacción se inició por la adición de citocromo C (oxidado) 40 μ M después de incubar 2 minutos a temperatura ambiente, el monitoreo de la reacción se realizó durante 2 minutos a 550 nm.
- Citocromo C oxidasa: la reacción monitoreó la velocidad de oxidación del citocromo C reducido a 550 nm; la reducción del citocromo C se realizó con ditionito de sodio y el sistema de reacción contiene buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4), EDTA 2 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició por la adición de citocromo C reducido 40 μ M.
- ATPasa: El ensayo de actividad cuantificó el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis del ATP; para poder cuantificar el fosfato inorgánico se adicionó reactivo acomplejante compuesto por ácido ascórbico al 10%, molibdato de amonio 2.5% y ácido sulfúrico 6 N; el sistema de reacción contenía buffer Tris – HCl 50 mM, sulfato de magnesio (MgSO₄) 3 mM, 1 mg de proteína

mitocondrial, fosfoenol piruvato (PEP) 2.5 mM y 10 unidades de piruvato quinasa. Este sistema se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se adicionó ATP 4 mM; se realizó una segunda incubación durante 10 minutos y se detuvo la reacción con la adición de ácido tricloroacético al 5%. Estas muestras fueron centrifugadas a 10000 G durante 1 minuto y el sobrenadante se incubó con el reactivo acomplejante durante 1 hora a 37 °C, la lectura de cada muestra se realizó a 820 nm.

8.5.4. Ensayo de daño en el ADN por fragmentación o degradación. Para el ensayo se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa, el cual separa los fragmentos de ADN por su tamaño y carga a través de una diferencia de voltaje debido a la carga negativa otorgada por los grupos fosfato en la estructura del ADN,⁸¹ para realizar el ensayo se extrajo el ADN de larvas entre tercer y cuarto estadio, y adultos de *Aedes aegypti* de la siguiente manera.

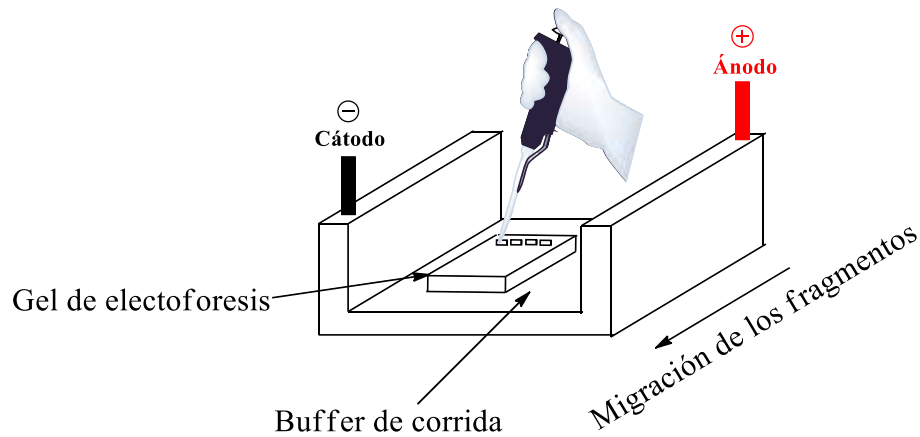
- Se transfirieron las larvas y los adultos a diferentes tubos van-Potter.
- Se adicionó a cada tubo van-Potter 200 µL de la solución TD1 del kit de extracción y se homogenizaron los individuos en un homogeneizador Potter-Elvehjem (WHEATON, Millville, NJ, EE.UU); después de homogenizar se adicionó a cada eppendorf 400 µL más de la solución TD1.
- A las soluciones obtenidas se adicionaron 20 µL de proteinasa K con el fin de inactivar las DNAsas y RNAsas y se incubó esta solución a 60 °C durante 30 minutos y finalmente se centrifugó a 10000 G durante 1 minuto.
- Con el objetivo de filtrar el ADN, se transfirió el contenido a un *spin filter* del kit de extracción y se centrifugó a 10000 G durante 30 segundos descartando el sobrenadante que pasa por el filtro.
- Para lavar el ADN que queda en el filtro, se adicionó al *spin filter* 400 µL de la solución TD2 del kit y se centrifugó a 10000 G durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 10000 G durante 1 minuto para remover los residuos de la solución TD2.

81. STELLWAGEN, N. C. DNA Gel Electrophoresis. *Nuc. Ac. Electroph.* 1998, p. 1–53.

- Para la elusión del ADN se tomó el *spin filter* utilizado en el lavado y se transfirió a un eppendorf de 2 mL, se adicionaron 50 μ L de la solución TD3 del kit y se centrifugó a 10000 G durante 30 segundos, se descartó el *spin filter* y en el eppendorf está el ADN listo para análisis.

Para el gel de electroforesis, se preparó una solución de agarosa al 1% en 40 mL de buffer TBE, esta buffer estuvo compuesta por Tris – HCl, ácido bórico y EDTA, esta solución se calentó a 60 °C con el fin de disolver la agarosa sin que la solución alcanzara el punto de ebullición, a esta solución se agregaron 4 μ L de SYBR Green con el fin de teñir el gel para que se observara la fragmentación.

Figura 20. Montaje de electroforesis para la fragmentación de ADN.



Al estar listo el gel de agarosa, se realizó el montaje de electroforesis que consistió en una fuente de voltaje y dos electrodos en donde van a migrar los fragmentos, para la migración se utilizó una buffer de corrida (TBE) que estuvo compuesta por Trizma base, ácido bórico y EDTA, para esta buffer se confirmó un pH = 8.0. La migración de los fragmentos fue iniciada por la fuente de voltaje, la cual utiliza una potencia de 100 Volts y una corriente de 8 mA, la duración del ensayo de electroforesis fue de 70 minutos. En cada pozo se agregó el ADN extraído de las larvas para cada concentración, además de la buffer de carga, que proporcionó densidad a la muestra con el fin que esta misma este en el fondo del pozo; generalmente esta buffer contiene azul de bromofenol, el cual permite visualizar el

frente de corrida a través del gel. Para el ensayo se realizó un control con camptotecina y se utilizó uno de los pozos para el marcador de peso molecular.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

9.1. Síntesis de triazoles precursores de los α – aminonitrilos

Para la obtención de los precursores 1,2,3-triazoles se inició con la propargilación de los aldehídos 4-hidroxibenzaldehído y vainillina con bromuro de propargilo; las relaciones utilizadas para esta reacción fueron (1.2:1) (aldehído: bromuro de propargilo) (Esq. 14). Los datos de rendimiento y propiedades de los productos se registran en la Tabla 5.

Esquema 14. Reacción de propargilación para los compuestos **3a** y **3b**.

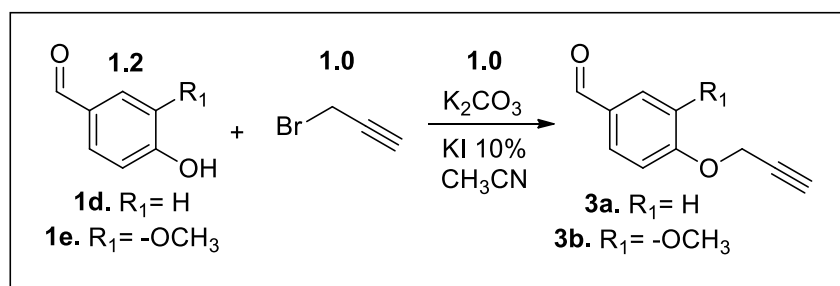


Tabla 5. Rendimientos y propiedades de los precursores obtenidos en la propargilación.

Molécula	Rendimiento (%)	Color	P.F (°C)
Productos reacción de propargilación			
3a	76	Blanco	80 – 81
3b	75	Crema	91 – 92

La estructura de los productos de propargilación se confirmó en los experimentos de resonancia magnética nuclear. La señal del protón perteneciente al aldehído se observó a campos bajos con un corrimiento químico de 9.88 ppm, seguido a esta señal se encuentran los protones correspondientes al anillo aromático como dobletes de tripletes, confirmando esta asignación con los valores de la constante

de acoplamiento para los protones en *orto* ($^3J = 6 - 9$ Hz) y *meta* ($^4J = 1 - 4$ Hz) (Fig. 21).

A campos altos se observó la señal de los protones metilénicos como un doblete a 4.76 ppm, y seguido a este la señal del protón del triple enlace como un triplete a 2.57 ppm (Fig. 21); la cantidad de protones registrada en el espectro de protones correspondió a los de la estructura del producto y a través del experimento de ^{13}C -RMN se observaron las señales de los carbonos pertenecientes a la estructura del compuesto obtenido (Fig. 22).

Figura 21. Espectro ^1H -RMN con CDCl_3 como disolvente para el compuesto **3a**.

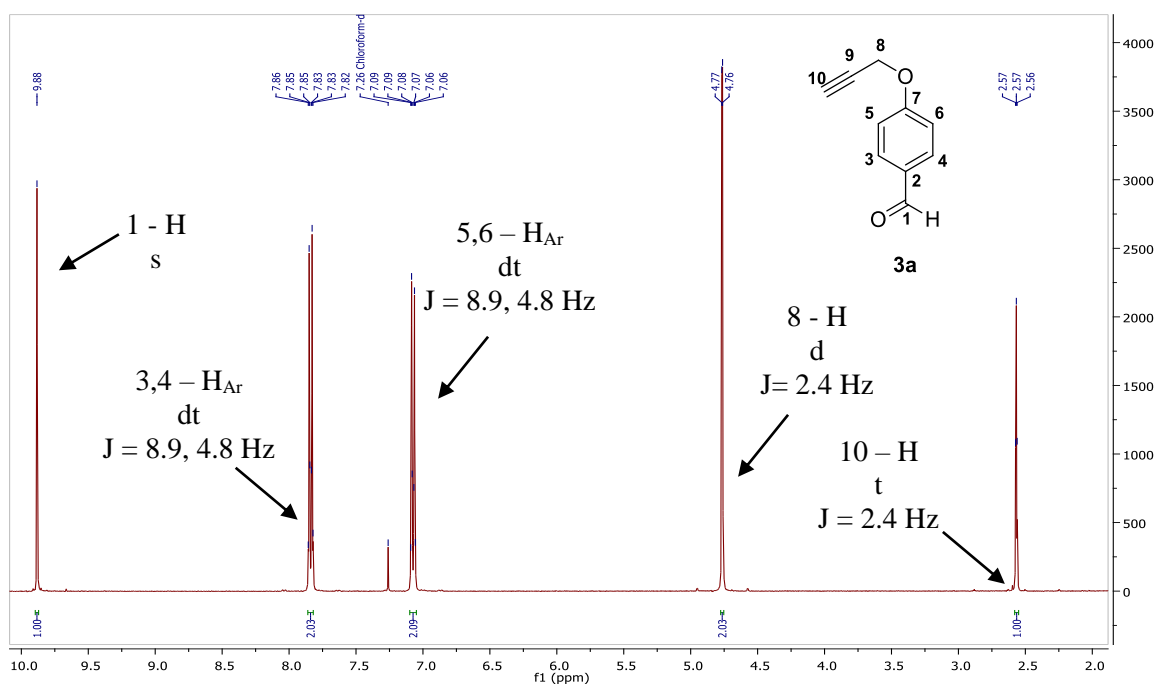


Figura 22. Espectro de ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente para el compuesto **3a**.

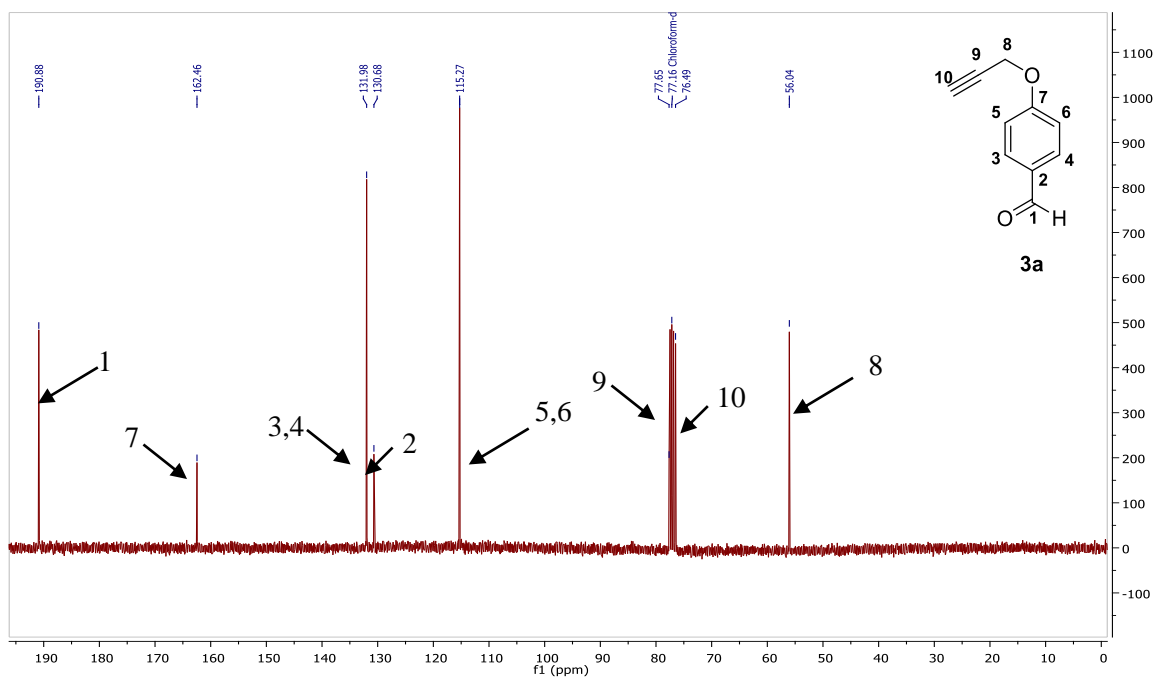


Tabla 6. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los precursores sintetizados en la propargilación **3a** – **3b**.

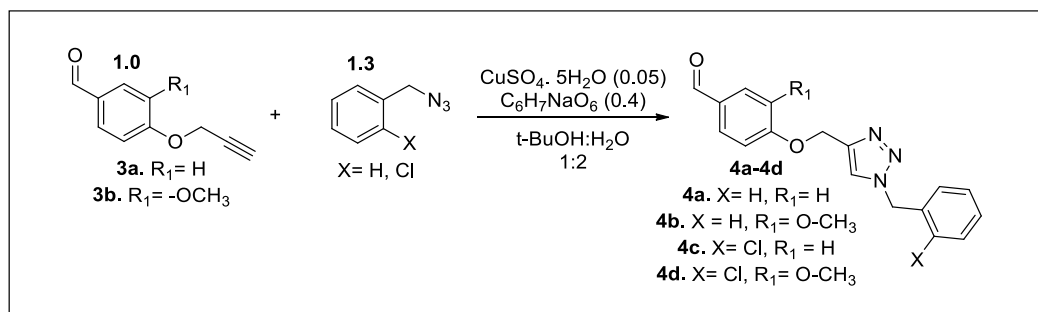
N	Protones Aromáticos				Sustituyentes			Aldehído
	3 - H	4 - H	5 - H	6 - H	8 - H	10 - H	11 - O-CH ₃	1 - H
3a	7.84 dt J = 8.9, 4.8, 2.6		7.92 dt J = 8.9, 4.8, 2.6		4.76 d J = 2.4	2.57 t J = 2.4	-	9.88 s
3b	7.45 dd J = 6.3, 1.9	7.41 d J = 1.8	-	7.13 d J = 8.2	4.84 d J = 2.4	2.56 t J = 2.4	3.92 s	9.85 s

Tabla 7. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los precursores sintetizados en la propargilación **3a** – **3b**.

N	Protones Aromáticos						Sustituyentes				Aldehído
	2 - C	3 - C	4 - C	5 - C	6 - C	7 - C	8 - C	9 - C	10 - C	11 - O-CH ₃	1 - C
3a	130.8	131.9		115.2		162.4	56.04	77.6	76.5	-	190.8
3b	131.01	126.3	109.6	112.7	150.1	152.2	56.7	77.5	76.8	56.1	191.0

Posterior a la reacción de propargilación, se llevó a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre entre los precursores obtenidos anteriormente y la bencilazida sintetizada en el laboratorio, en una relación molar de 1: 1.3 (aldehído: bencilazida) (Esq. 15). El tiempo de reacción para los 1,2,3 – triazoles fue de 24 horas; después de confirmar la presencia del producto, se realizó la extracción con acetato de etilo y la purificación se realizó por el método de recristalización con mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo. Para algunos de los compuestos fue necesario realizar una columna flash con mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo debido a que estos compuestos son retenidos por el soporte empleado en la columna. Los rendimientos de la reacción y las propiedades de los compuestos se registran en la Tabla 8.

Esquema 15. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar para la obtención de los triazoles **4a-4d**.



Al obtener altos porcentajes de rendimiento en la reacción, se puede observar que las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar son de tipo “Click Chemistry”, debido a las características mencionadas en el marco teórico, ya que en su preparación no se necesitaron condiciones fuertes de reacción como altas temperaturas o presiones, además de la facilidad en su purificación al usar cromatografía en columna flash, y los pocos tiempos de reacción empleados.

Tabla 8. Rendimientos y propiedades de los triazoles sintetizados en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

Molécula	Rendimiento (%)	Color	P.F (°C)
Productos reacción de cicloadición			
4a	78	Blanco	102 – 103
4b	50	Blanco	104 – 105
4c	86	Blanco	89 – 90
4d	98	Blanco	126 – 127

La estructura de los 1,2,3-triazoles precursores se confirmó por técnicas de espectroscopia ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. Para el compuesto **4a** se observó en la región aromática un multiplete a 7.28 ppm y un doblete de tripletes a 6.98 ppm, encontrando que estas señales pertenecen al anillo aromático unido al anillo triazólico; además de esto, se observó un singulete a 7.46 ppm correspondiente al protón del anillo triazólico (Fig. 23).

A campos altos se observaron dos singuletes a 5.43 ppm y 5.15 ppm, pertenecientes a los protones metilénicos unidos al fragmento triazol (Fig. 23). La cantidad de protones registrados en el espectro coinciden con los protones de la estructura del compuesto. Con ayuda del espectro ^{13}C -RMN se identificaron los carbonos de la estructura del producto (Fig. 24).

Figura 23. Espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente del triazol **4a**.

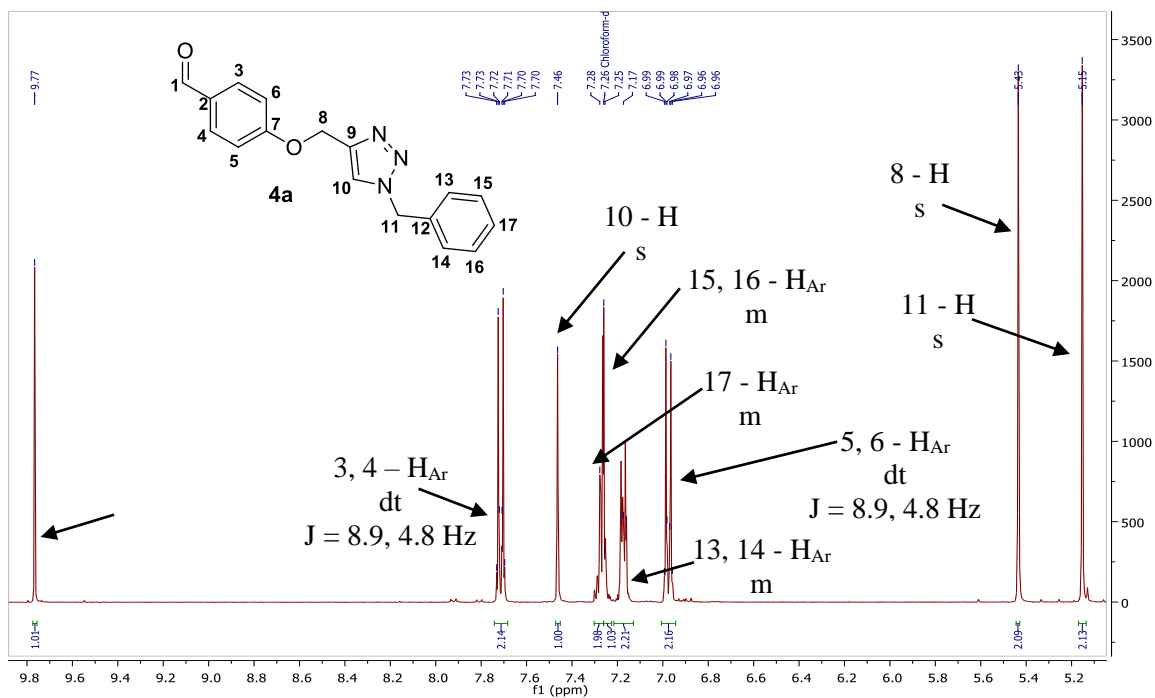


Figura 24. Espectro ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente del triazol **4a**.

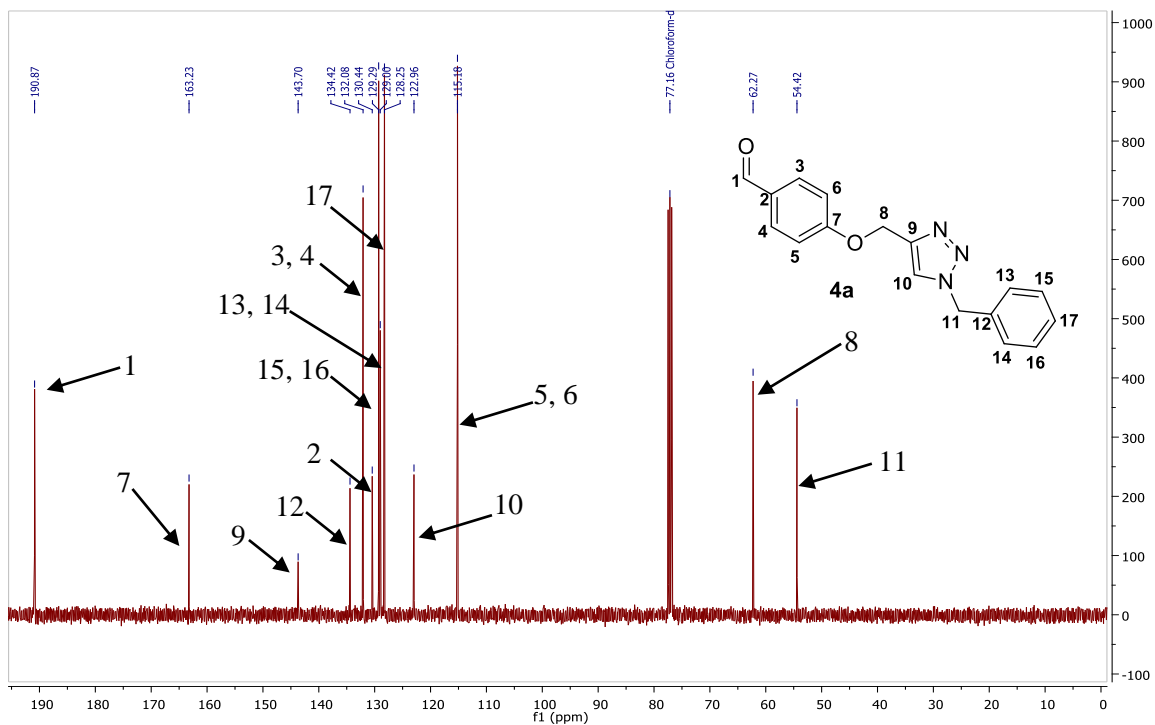


Tabla 9. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ¹H – RMN para los triazoles precursores sintetizados **4a – 4d**.

N	Aromáticos									Triazol			Sustituyente	Aldehído
	3-H	4-H	5-H	6-H	13-H	14-H	15-H	16-H	17-H	8-H	10-H	11-H	18-O-CH ₃	1-H
4a	7.71 dt J= 8.9, 4.8		6.98 dt J= 8.9, 4.8		7.17 m		7.28 m		7.25 m	5.43 s	7.46 s	5.15 s	-	9.77 s
4b	7.29 m	7.27 m	-	7.07 d J= 8.1	7.13 m		7.22 m		7.24 m	5.38 s	7.45 s	5.21 s	3.75 s	9.70 s
4c	7.86 d J= 8.1		7.12 d J= 8.1		7.30 m	-	7.35 m	7.47 d J= 8.1	7.24 m	5.71 s	7.79 s	5.30 s	-	9.91 s
4d	7.40 dd J= 6.3, 1.4		-	7.43 d J= 1.4	7.21 m	-	7.25 td J= 6.2, 1.2	7.31 td J= 7.6, 1.7	7.19 m	5.65 s	7.70 s	5.35 s	3.89 s	9.83 s

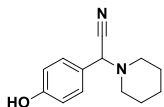
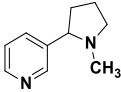
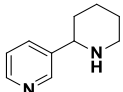
Tabla 10. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los triazoles precursores sintetizados **4a – 4d**.

N	Aromáticos												Triazol				Sustit	Aldeh
	2-C	3-C	4-C	5-C	6-C	7-C	12-C	13-C	14-C	15-C	16-C	17-C	8-C	9-C	10-C	11-C	18-OMe	1-C
4a	130.4	132.08		115.1		163.2	134.4	129.00		129.2		128.2	62.2	143.7	122.9	54.4	-	190.8
4b	130.7	109.3	126.8	112.7	150.01	153.1	143.3	128.9		129.2		128.2	63.06	143.6	123.2	56.08	54.40	191.02
4c	130.6	131.3		115.1		163.2	132.2	130.4	132.1	127.7	130.5	130.1	62.2	133.7	123.3	51.8	-	190.9
4d	130.6	109.2	123.6	110.8	149.9	153.1	132.2	130.1	130.6	126.9	130.5	127.7	63.01	133.7	112.6	56.1	51.6	191.1

9.2. Síntesis de los compuestos α – aminonitrilos análogos de girgensohnina y nicotina.

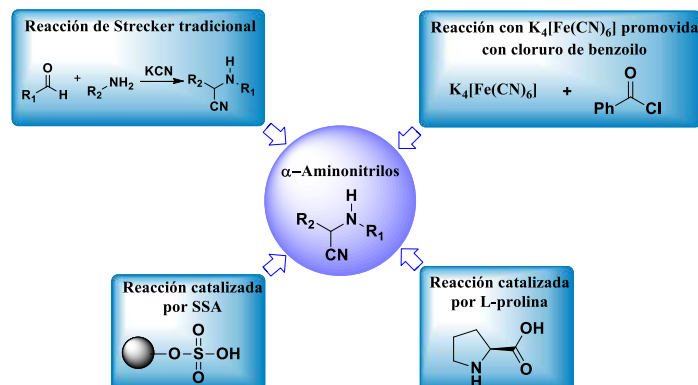
Tomando en cuenta los compuestos cabeza de serie, se propuso dividir los productos finales en tres series diferentes, nombradas como la serie A, B y C. La serie A incluyó los α -aminonitrilos basados en aminas primarias en su fragmento amínico, estas aminas poseen el fragmento piridínico que también posee la nicotina, anabasina y nornicotina (Tabla 11).

Tabla 11. Compuestos cabeza de serie para la síntesis de los α -aminonitrilos.

Alcaloides cabeza de serie		
 <p>Girgensohnina $C_{13}H_{16}N_2O$ P.M: 216,28</p>	 <p>Nicotina $C_{10}H_{14}N_2$ P.M: 162,23</p>	 <p>Anabasina $C_{10}H_{14}N_2$ P.M: 162,23</p>

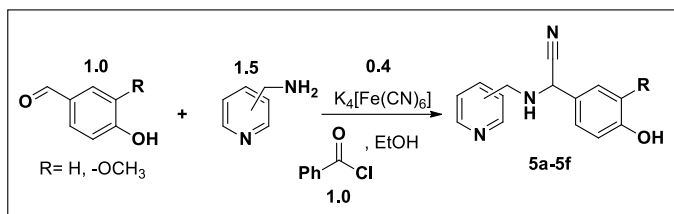
Para determinar el protocolo usado para la síntesis de los productos deseados se realizaron con una molécula de cada serie tres variaciones de la reacción de Strecker: La reacción de Strecker catalizada por ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA), la reacción enantioselectiva catalizada por L – prolina y la reacción de Strecker con ferrocianuro de potasio como fuente de cianuro y el cloruro de benzoilo como promotor de la reacción.

Figura 25. Variaciones de la reacción de Strecker para la obtención de α -aminonitrilos.



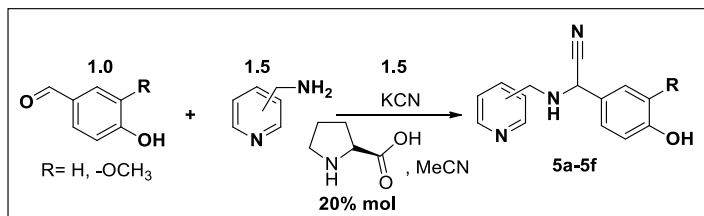
Para el caso de la reacción con ferrocianuro de potasio (Esq. 16), al momento de adicionar el cloruro de benzoilo la reacción cambió su coloración a un color verde oscuro y se mantuvo así hasta el momento de realizar la extracción con éter dietílico, esta extracción se dificultó debido a que la mezcla de reacción tenía una consistencia viscosa; después de realizar la purificación por columna cromatográfica se obtuvo con bajo rendimiento un aceite de color púrpura, que al confirmarse por cromatografía en capa fina no mostró la presencia del producto de reacción. Para esta reacción se evaluaron diferentes tiempos de reacción obteniendo el mismo resultado en todos los ensayos, aunque en uno de los reportes de esta reacción solo se trabajó con cetonas como precursores carbonílicos,⁴¹ Li y colaboradores utilizaron diferentes cetonas y aldehídos como precursores.⁴⁸ A diferencia de los precursores trabajados en las anteriores publicaciones, los de este trabajo poseen el fragmento triazol en el precursor aldehído, lo cual puede causar un impedimento estérico, además del uso del anillo piridínico en el fragmento amínico. Por otro lado, se pueden observar mejores resultados con el uso de catalizadores que activen los precursores en vez de promotores que faciliten la formación de la fuente de cianuro.

Esquema 16. Reacción de Strecker promovida por cloruro de benzoilo.



En la reacción catalizada por L – prolina (Esq. 17), se utilizó como disolvente acetonitrilo; después de iniciar la reacción entre los precursores y confirmar que estaban disueltos en el acetonitrilo, cuando se adicionó la L-prolina se observó la formación de sólidos en el balón, por lo cual se agregó mayor cantidad de disolvente a la reacción con el fin de disolverlos, tal como se reportó en la literatura.⁵³ Se realizaron controles después de 2, 5 y 10 horas de iniciar la reacción sin observarse la presencia del producto de reacción; después de 24 horas se observó en capa fina la presencia de precursor de reacción y una pequeña mancha del producto; después de realizar la purificación por cromatografía en columna se obtuvo en bajo rendimiento un aceite amarillo que mostraba aún la presencia del precursor.

Esquema 17. Reacción de Strecker catalizada por L-Prolina



Para la reacción de Strecker catalizada por SSA en la serie A (Esq. 18), unas horas después de agregar los precursores en una relación 1:1.3 (aldehído: amina), el KCN y el catalizador, se observó la presencia de un sólido diferente al catalizador en la mezcla de reacción, el cual después de 24 horas se filtró con agua destilada con el fin de eliminar el catalizador y el KCN en exceso. El sólido filtrado se lavó varias veces con agua destilada y finalmente con éter de petróleo.

Esquema 18. Reacción de Strecker catalizada por ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA)

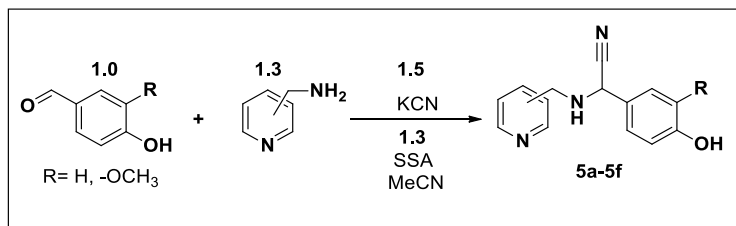


Tabla 12. Compuestos α -aminonitrílicos propuestos para la serie A.

Análogos serie A	Comp.	-NH-	R ₁	R ₂	Comp.	-NH-	R ₁	R ₂
	5a	α	-OH	-H	5d	α	-OH	-OCH ₃
	5b	β	-OH	-H	5e	β	-OH	-OCH ₃
	5c	γ	-OH	-H	5f	γ	-OH	-OCH ₃

Para el compuesto **5b** se observó la presencia del compuesto puro en capa fina, y para el compuesto **5d** se realizó recristalización con mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo. En el caso de los demás compuestos, estos se obtuvieron en bajo rendimiento y la cantidad no fue suficiente para confirmar la estructura por espectroscopía RMN. Los rendimientos y propiedades de los productos obtenidos se registran en la Tabla 13. Ya que de las metodologías evaluadas, aquella que brindó los mayores rendimientos fue la reacción de Strecker catalizada por SSA, este protocolo se utilizó para la obtención de los demás compuestos.

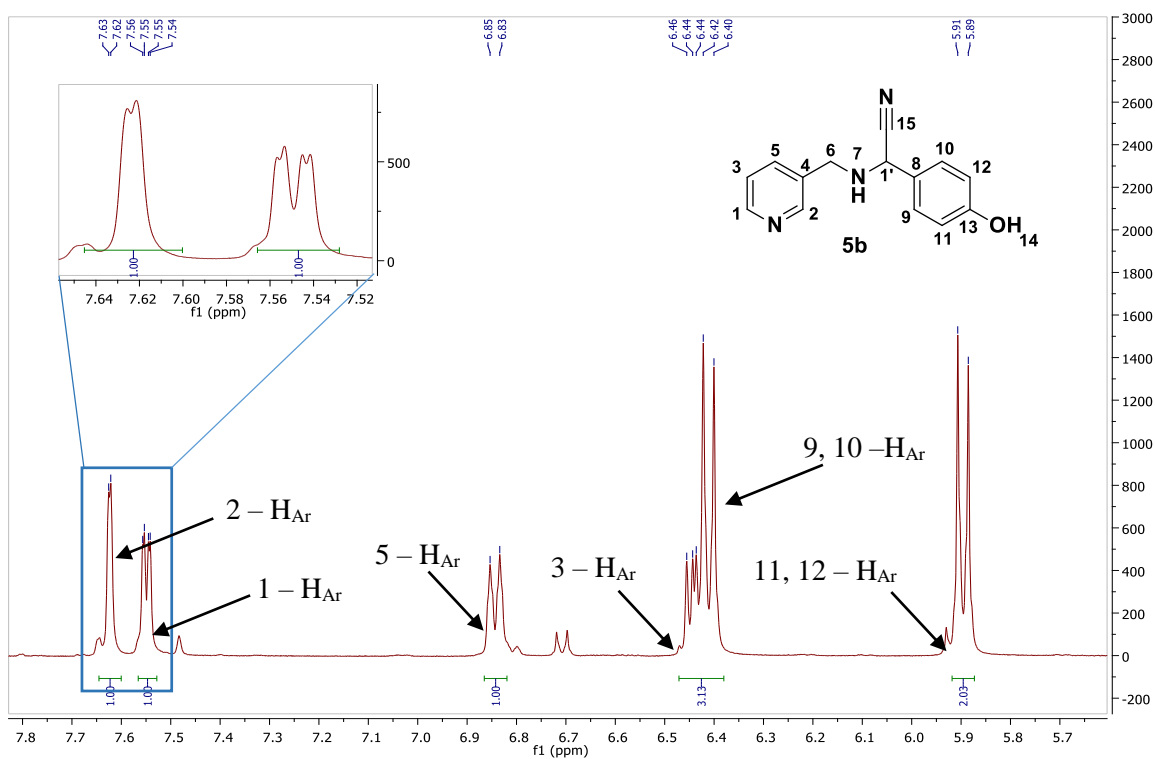
Tabla 13. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie A.

Molécula	Rendimiento	Color	P.F (°C)
5b	40	Beige	94 – 95
5d	62	Naranja	89 - 90

La estructura de los compuestos se determinó por espectroscopía de RMN; para la molécula **5b** se observó en el espectro ¹H-RMN a campos bajos las señales de los

anillos aromáticos. Para el caso del anillo de piridina, se identificaron a 7.62 ppm un doblete correspondiente al protón en el carbono 2 con una constante de acoplamiento de 1.7 Hz correspondiente al acoplamiento *meta*, y a 7.56 ppm un doblete de dobletes que pertenece al protón en el carbono 1 con constantes de acoplamiento de 1.4 Hz del acoplamiento en *meta* y de 4.3 Hz, cercano al acoplamiento en orto; a un corrimiento de 6.84 ppm se identificó un doblete de tripletes del protón en el carbono 5, seguido a esta señal se observó un multiplete a 6.44 ppm correspondiente al protón del carbono 3; para el caso del anillo aromático del fragmento fenólico se observaron dos señales a 6.41 ppm y 5.90 ppm correspondientes a los protones de los carbonos 9, 10 y 11, 12, respectivamente (Fig. 25).

Figura 26. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo **5b**.



A campos altos del espectro, para el caso de la serie A se observó un doblete a 4.00 ppm correspondiente al protón en el carbono alfa al nitrilo ($1'$ -H). Esta multiplicidad es debida al acoplamiento de este protón con el de la amina secundaria (7 -H).

Seguido a esta señal se encontraron dos multipletes a 2.88 ppm y 2.68 ppm correspondientes a los protones metilénicos del carbono 6 y del hidroxilo (14 – OH) respectivamente. Finalmente, a 1.60 ppm se identificó un multiplete correspondiente al protón de la amina secundaria (7 – H) (Fig. 26). La asignación de los carbonos de la estructura se determinó usando el espectro ^{13}C – RMN (Fig. 27).

Figura 27. Región de campos altos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo **5b**.

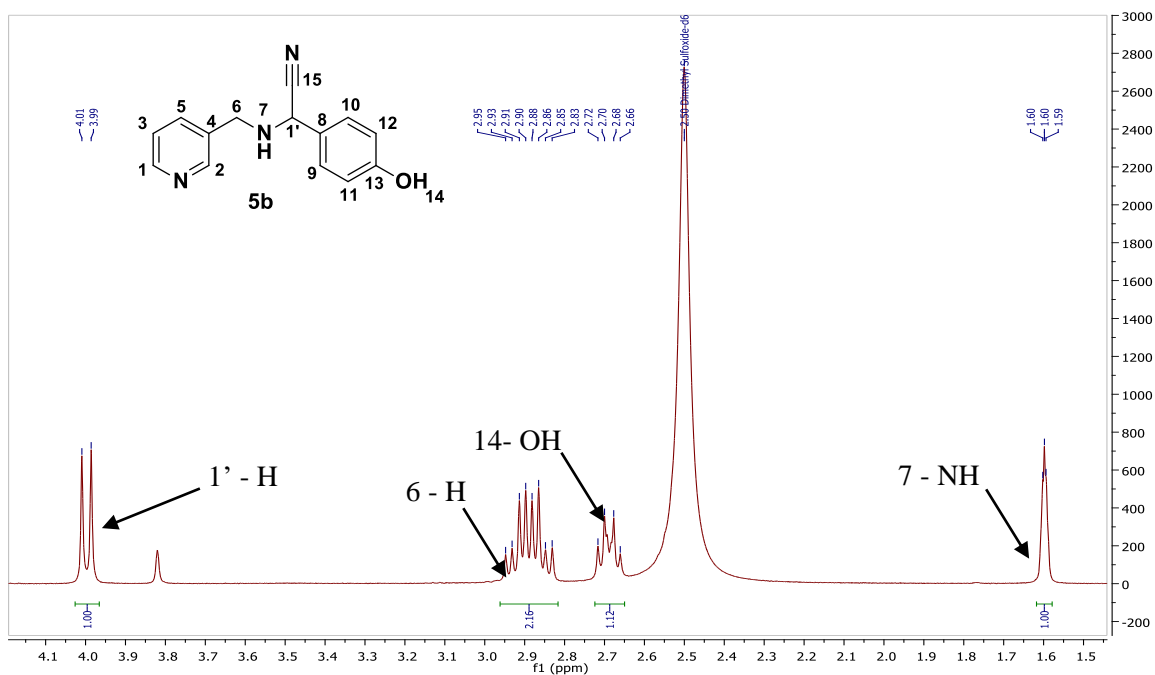


Figura 28. Espectro ^{13}C – RMN con CDCl_3 como disolvente del α -aminonitrilo **5b**.

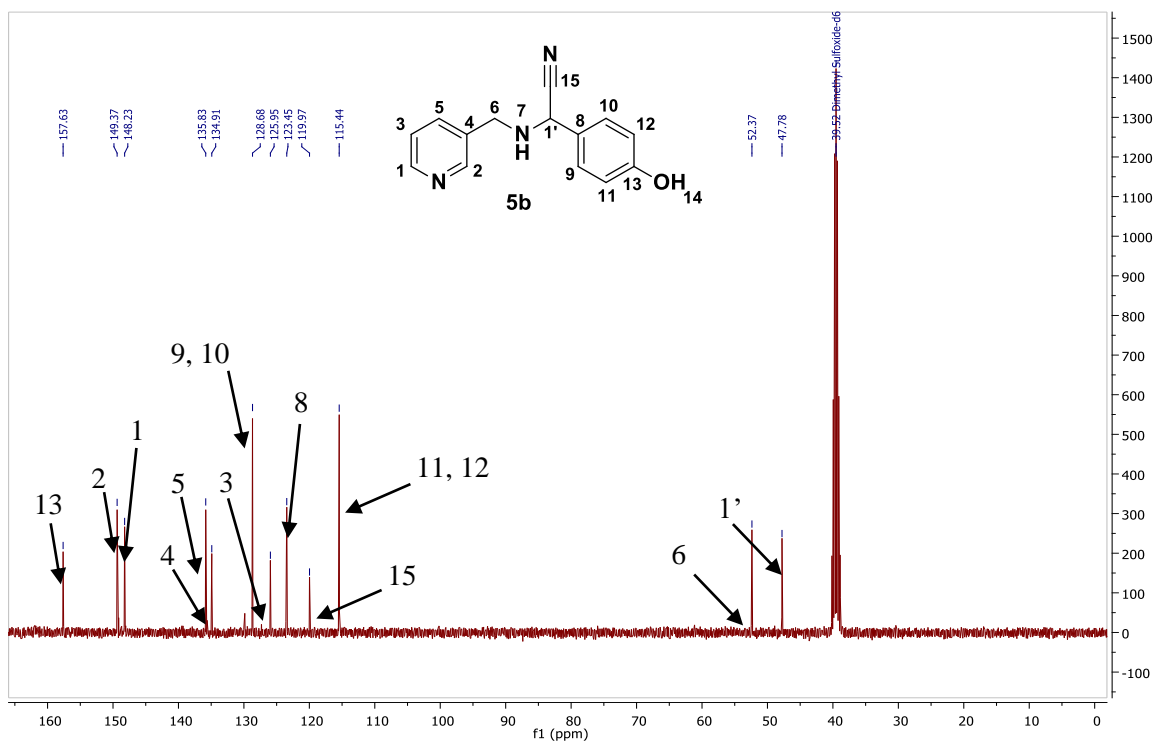


Tabla 14. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ^1H – RMN para los productos sintetizados en la serie A. **5b, 5d.**

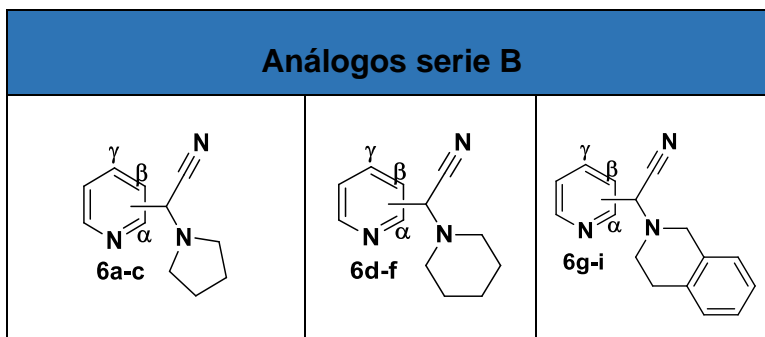
N	Piridínicos					Fenílicos				NH	-CH ₂ -	OH	Sust.	Protón α
	1-H	2-H	3-H	4-H	5-H	9-H	10-H	11-H	12-H	7-H	6-H	14-H	16-OMe	1'-H
5b	7.55 dd J= 3.3, 1.4	7.62 d J= 1.7	6.44 m	-	6.84 dt J= 7.9	6.41 d J= 8.7		5.90 d J= 8.6		1.60 t J= 1.7	2.88 m	2.69 m	-	4.00 d J= 9.3
5d	7.55 dd J= 4.5, 1.5		6.42 d J= 5.8		-	5.98 dd J= 8.2, 1.9	6.14 d J= 1.9	5.86 d J= 8.1	-	1.56 t J= 1.7	2.76 m	2.88 m	2.83 s	3.95 d J= 9.3

Tabla 15. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie A. **5b, 5d.**

N	Piridínicos					Fenílicos						CN	-CH ₂ -	Sust.	Protón α
	1-C	2-C	3-C	4-C	5-C	8-C	9-H	10-H	11-H	12-H	13-C	15-C	6-C	16-OMe	1'-C
5b	148.2	149.3	125.9	134.9	135.8	123.4	128.6		115.4		157.6	119.9	52.3	-	47.78
5d	149.5		123.06		148.6	126.4	120.05	111.4	115.4	147.8	146.9	119.9	52.6	55.7	50.4

En el caso de los productos de la serie B se utilizaron aminas secundarias cíclicas como la pirrolidina, piperidina y tetrahidroisoquinolina y el anillo piridínico de los aldehídos α , β y γ – piridincarbaldéhidó (Tabla 16).

Tabla 16. Compuestos α – aminonitrílicos propuestos para la serie B.



Comp	-CCN	Amina	Comp.	-CCN	Amina	Comp.	-CCN	Amina
6a	α	Pirrolidin	6d	α	Piperidin	6g	α	THIQ
6b	β	Pirrolidin	6e	β	Piperidin	6h	β	THIQ
6c	γ	Pirrolidin	6f	γ	Piperidin	6i	γ	THIQ

Para facilitar la solubilidad de las aminas en la reacción, se adicionaron los precursores en una mezcla 1:1 de acetonitrilo y agua, después de media hora de agitación se adicionó el KCN y el SSA (Esq. 19), manteniendo en agitación constante a temperatura ambiente, después de 24 horas de iniciar la reacción se observó turbidez en la mezcla de reacción, por lo cual se filtró con acetato de etilo para eliminar el exceso de KCN y SSA; posteriormente se realizó extracción líquida con acetato de etilo y se concentró el producto en un rotaevaporador obteniéndose un aceite amarillo. Finalmente el producto se obtuvo por recristalización con mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo a bajas temperaturas para facilitar la precipitación de los cristales; estos se obtuvieron como sólidos de color blanco y su

estructura se confirmó mediante métodos espectroscópicos. Los rendimientos y propiedades de los productos obtenidos están registrados en la Tabla 17.

Esquema 19. Reacción de Strecker para la obtención de los α -aminonitrilos de la serie B.

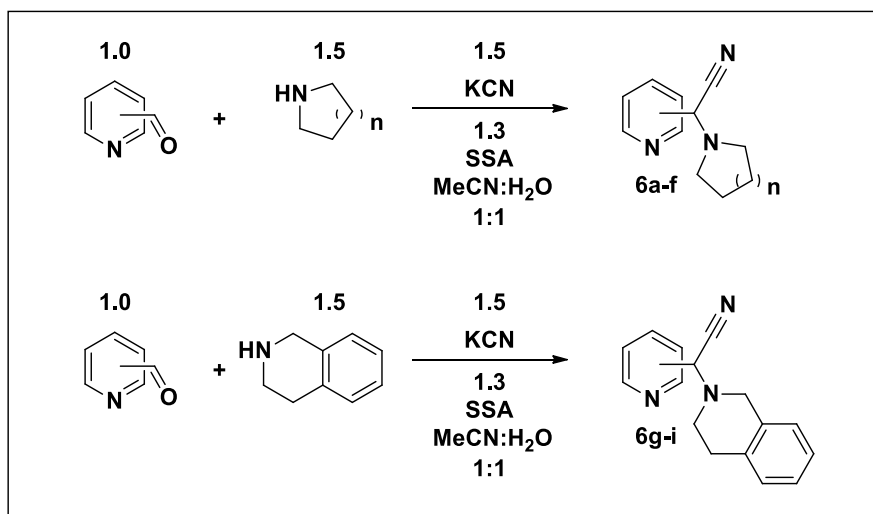


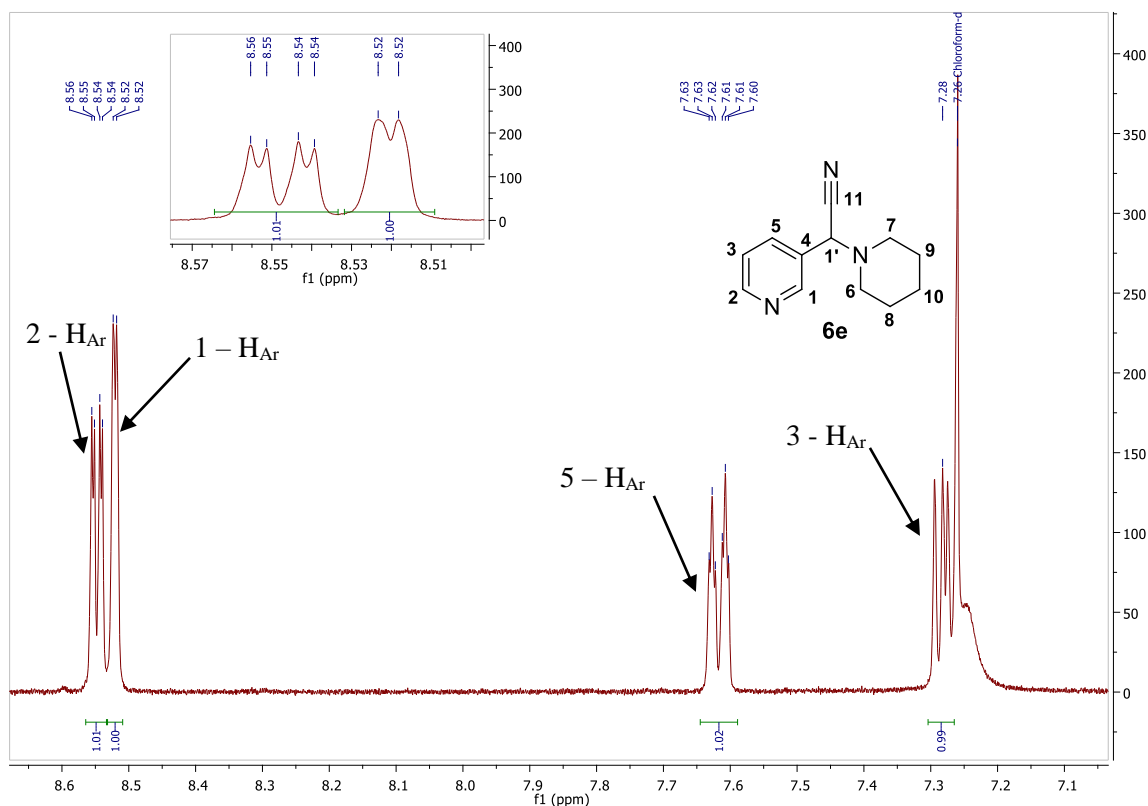
Tabla 17. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie B.

Molécula	Rendimiento (%)	Color	P.F (°C)
6b	50	Blanco	157 – 159
6e	69	Blanco	147 – 149
6f	39	Blanco	155 – 156
6g	27	Naranja	128 – 130
6h	18	Blanco	167 – 169

Para la molécula **6e** se identificaron a campos bajos las señales del anillo aromático de la piridina, registrando el protón del carbono 2 como un doblete de dobletes a 8.55 ppm con una constante de acoplamiento $J = 4.8$ Hz correspondiente al acoplamiento con la posición *meta*. Se observó un doblete del protón en el carbono 1 con una constante de acoplamiento $J = 2.0$ Hz. A 7.62 ppm se observó un doblete de tripletes con una $J = 7.9, 4.2$ Hz (Acoplamiento orto y meta respectivamente),

correspondiente al protón en el carbono 5. Finalmente, a 7.28 ppm se observó un multiplete correspondiente al protón en el carbono 3. (Fig. 28).

Figura 29. Campos bajos del espectro ^1H – RMN con CDCl_3 como disolvente para el α -aminonitrilo **6e**.



Por otro lado, a campos altos se observó el singlete característico del protón en el carbono α al enlace nitrílico (1') a 3.99 ppm; además de esto se identificó un singlete pequeño a 5.96 ppm que puede atribuirse a impurezas del disolvente. Seguido a estos singletes se observaron tres multipletes a 2.38 ppm, 1.58 ppm y 1.40 ppm, los cuales corresponden a los protones del anillo piperidínico (Fig. 29).

Utilizando el experimento bidimensional COSY – RMN se confirmaron los acoplamientos de los protones en la estructura, además de confirmar el singlete que corresponde a la impureza del disolvente (CDCl_3), ya que en el espectro se registró una asignación entre esta señal y la registrada para el disolvente a 7.26 ppm (Fig. 30).

El experimento bidimensional HSQC – RMN (Fig. 31) se utilizó para asignar los protones a cada carbono de la estructura; además de esto, el espectro DEPT – 135 confirmó la presencia de los carbonos metilénicos (CH₂) con intensidad negativa, y los metílicos (CH₃) y metínicos (CH) con intensidad positiva, asignando de esta manera los carbonos de la estructura del compuesto en el espectro ¹³C – RMN (Fig. 32).

Figura 30. Campos altos espectro ¹H – RMN con CDCl₃ como disolvente para el α-aminonitrilo **6e**.

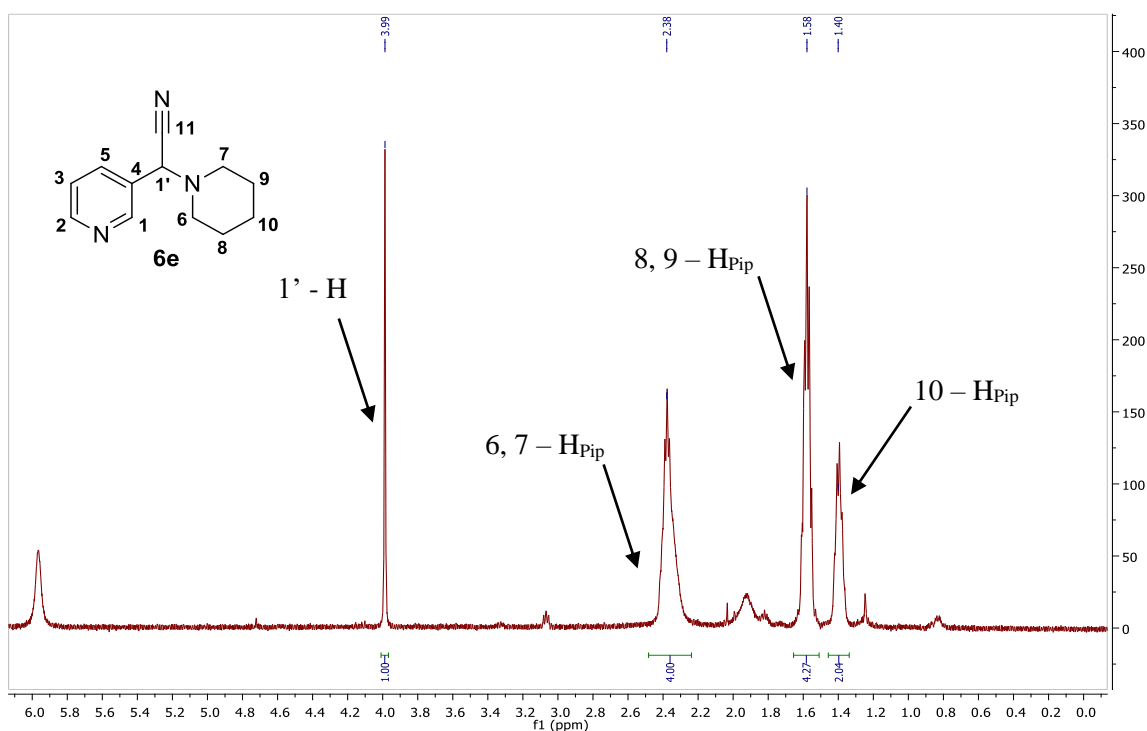


Figura 31. Espectro bidimensional COSY – RMN para el compuesto **6e**.

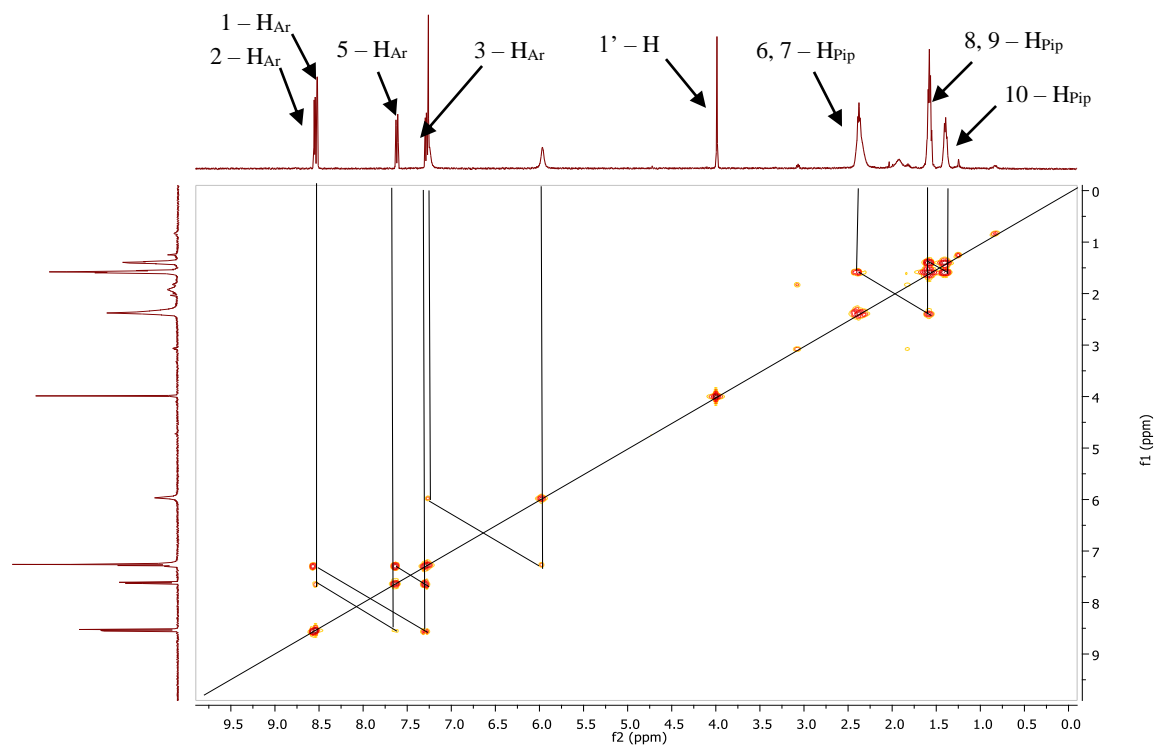


Figura 32. Espectro bidimensional HSQC – RMN para el compuesto **6e**.

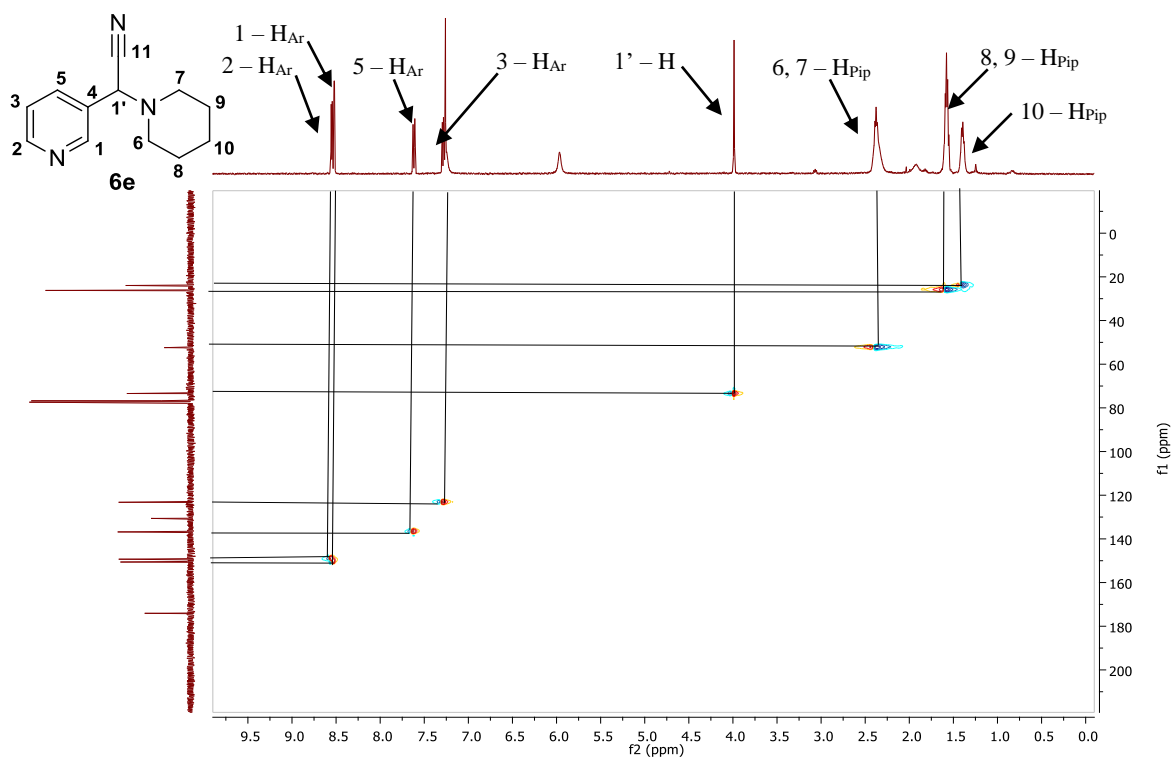


Figura 33. Comparación espectros ^{13}C – RMN y DEPT – 135 para el compuesto **6e**.

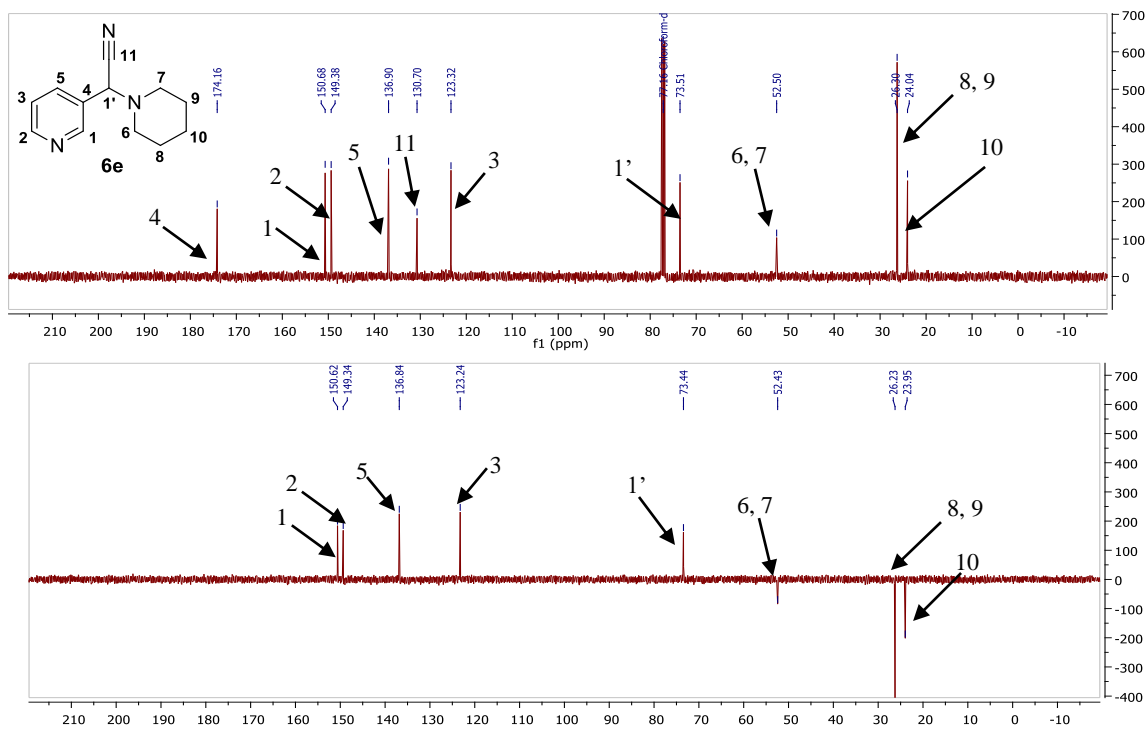


Tabla 18. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ¹H – RMN para los productos sintetizados en la serie B. **6b – 6h.**

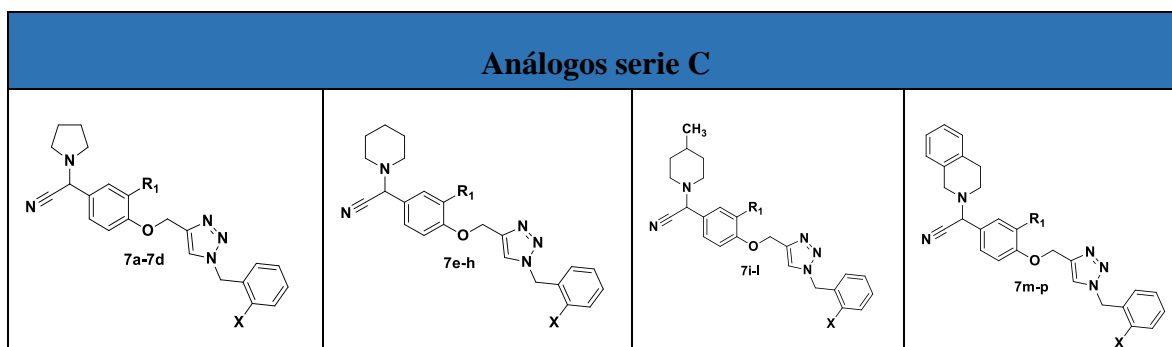
N	Piridínicos					Fenílicos (Tetrahidoroquinolina)				Amínicos							α
	1-H	2-H	3-H	4-H	5-H	7-H	8-H	9-H	10-H	6-H	7-H	8-H	9-H	10-H	11-H	12-H	1'-H
6b	8.68 d J= 2.1	8.51 dt J= 4.8, 1.6	7.24 m	-	7.71 dt J= 7.9, 1.9	-	-	-	-	2.54 m	2.41 m	1.74 m		-	-	-	3.81 s
6e	8.52 d J= 2.0	8.55 dd J= 4.8, 1.6	-	7.28 m	7.62 dt J= 7.9, 4.2	-	-	-	-	2.38 m		1.58 m		1.40 m	-	-	3.99 s
6f	8.65 dd J= 4.5, 1.6		7.49 m		-	-	-	-	-	2.50 t J = 2.5		1.61 m		1.49 m	-	-	4.80 s
6g	8.82 dq J= 4.9, 1.7	-	7.47 qq J= 7.5, 4.9	7.77 dd J= 7.9	7.90 td J= 7.7, 1.8	7.25 m	7.13 m	7.29 m	7.28 m	3.97 q J= 14.8	-	-	-	-	3.07 m	3.14 m	5.33 s
6h	8.66 dd J= 4.9, 1.3	8.85 d J= 2.4	7.37 m	-	7.92 m	-	7.10 m	7.14 m	7.16 m	3.79 q J= 14.8	-	-	-	-	2.85 m	2.95 m	5.09 s

Tabla 19. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie B. **6b - 6h.**

N	Piridínicos					Fenílicos (Tetrahidrisoquinolina)						Amínicos						CN	α	
	1-C	2-C	3-C	4-C	5-C	7-C	8-C	9-C	10-C	13-C	14-C	6-C	7-C	8-C	9-C	10-C	11-C	12-C	CN	1'-C
6b	174.1	149.7	135.8	133.3	149.5	-	-	-	-	-	-	52.6		23.4	-	-	-	123.5	72.7	
6e	150.6	149.3	123.2	174.2	136.8	-	-	-	-	-	-	52.4		26.2	23.9	-	-	130.7	73.4	
6f	150.4		122.5		142.8	-	-	-	-	-	-	51.2		25.8	22.8	-	-	114.5	62.4	
6g	149.8	153.1	123.9	122.5	137.3	126.6	126.5	125.9	128.8	133.2	133.5	52.6	-	-	-	-	29.3	48.0	115.0	64.6
6h	149.3	150.5	123.6	126.5	133.5	126.6	128.8	126.0	129.1	133.2	135.5	52.5	-	-	-	-	29.2	47.6	114.4	60.1

Para la obtención de los productos de la serie C se utilizaron los triazoles **4a** – **4d** previamente preparados como los aldehídos precursores y aminas secundarias cíclicas como pirrolidina, piperidina, 4 – metilpiperidina y tetrahydroisoquinolina (Tabla 20). Los primeros ensayos de reacción se realizaron iniciando con la reacción de Strecker para la formación del α -aminonitrilo para luego propargilar el grupo hidroxilo del fragmento aldehído y finalmente formar el triazol; utilizando este primer protocolo se dificultó la purificación del producto final, lo cual llevó primero a formar el triazol con los precursores **3a** y **3b** para luego obtener el producto final con la reacción de Strecker; esta nueva modificación llevó a obtener mejores resultados y mayor facilidad en la purificación.

Tabla 20. Compuestos α -aminonitrílicos de la serie C.



Comp	R ₁	X	Amina	Comp.	R ₁	X	Amina
7a	H	H	Pirrolidina	7i	H	H	4 – Metil piperidina
7b	H	Cl	Pirrolidina	7j	H	Cl	4 – Metil piperidina
7c	-O-CH ₃	H	Pirrolidina	7k	-O-CH ₃	H	4 – Metil piperidina
7d	-O-CH ₃	Cl	Pirrolidina	7l	-O-CH ₃	Cl	4 – Metil piperidina
7e	H	H	Piperidina	7m	H	H	THIQ
7f	H	Cl	Piperidina	7n	H	Cl	THIQ

7g	-O-CH ₃	H	Piperidina	7o	-O-CH ₃	H	THIQ
7h	-O-CH ₃	Cl	Piperidina	7p	-O-CH ₃	Cl	THIQ

Para llevar a cabo la reacción de Strecker se adicionó el aldehído y la amina precursora en una mezcla 1:1 acetonitrilo: agua para facilitar la solubilidad de las aminas, después de mantener en agitación constante durante 30 minutos, se agregó el KCN y el SSA (Esq. 20), observando después de 24 horas turbidez en la mezcla de reacción y en el caso de algunos productos, un sólido blanco diferente al catalizador en la mezcla; para el caso de algunos compuestos se llevó a cabo la reacción de Strecker sin catalizador SSA, obteniéndose de igual manera el producto con buenos rendimientos (Tabla 21).

Esquema 20. Reacción de Strecker para la obtención de los α -aminonitrilos de la serie C.

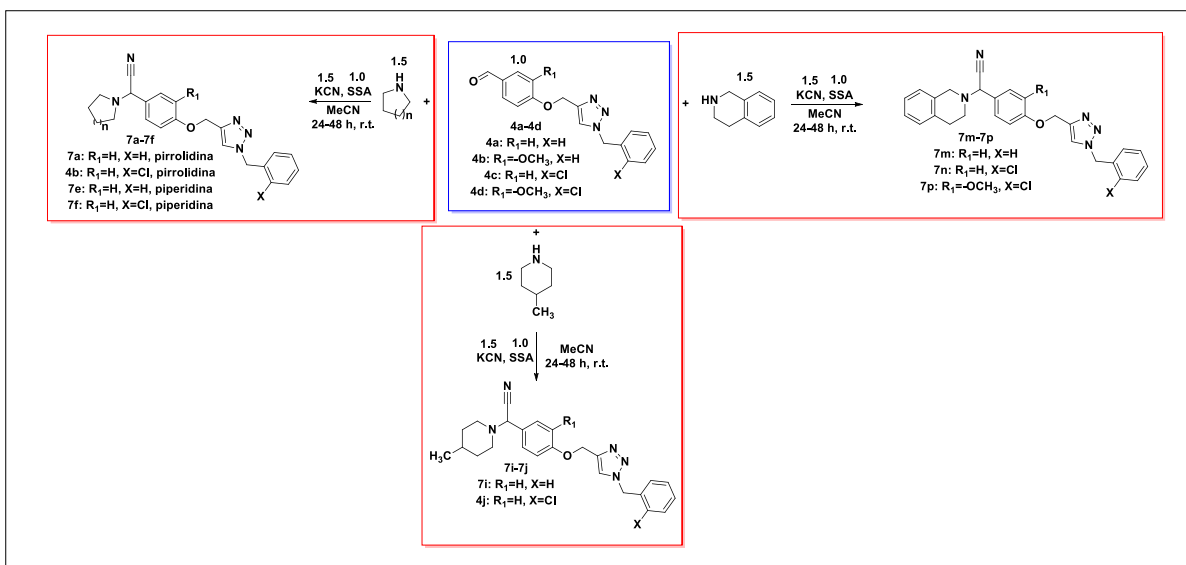


Tabla 21. Rendimientos y propiedades de los productos obtenidos en la serie C.

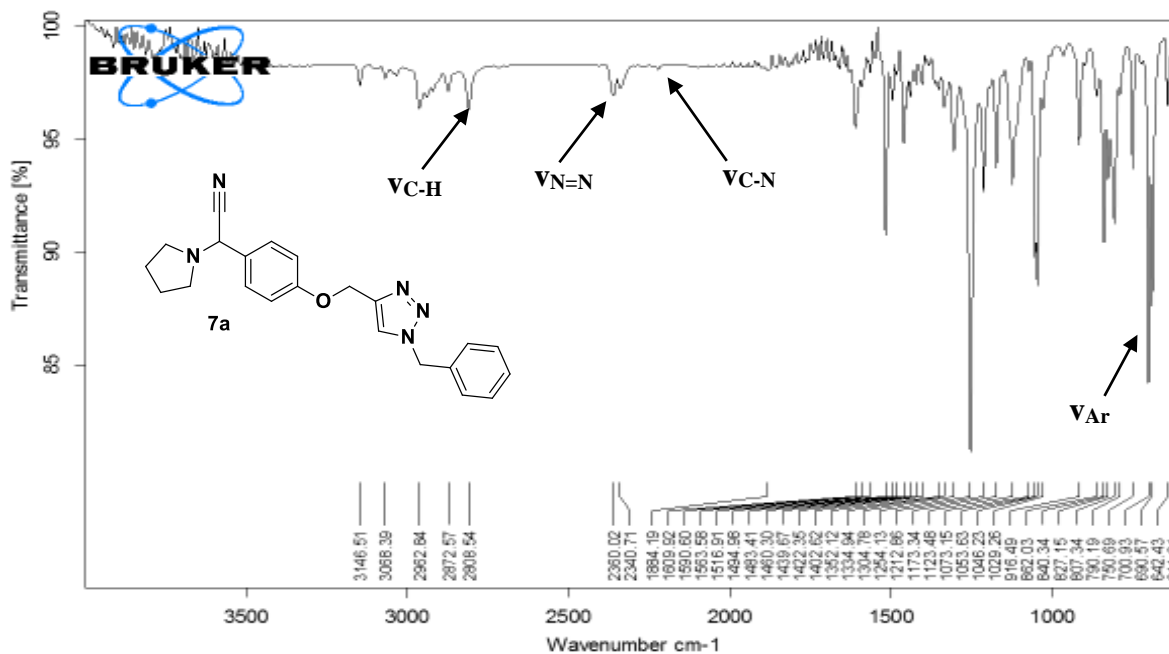
Molécula	Rendimiento (%)	Color	P.F (°C)
7a	90	Blanco	98 – 99
7b	86	Blanco	86 – 87
7e	87	Blanco	135 – 136
7f	85	Blanco	126 – 127
7i	90	Blanco	120 – 121
7j	82	Blanco	136 – 137
7m	51	Blanco	169 – 170
7n	95	Blanco	124 – 125
7p	95	Blanco	155 – 156

Tal como se registra en la Tabla 21, aparte del compuesto **7m** todos los productos de la serie C se obtuvieron con excelentes rendimientos en comparación con las moléculas obtenidas en las otras series, una posible razón es que la conformación que adquiere el aldehído en su fragmento triazol produce una rotación libre, facilitando de esta manera la condensación del aldehído con la amina precursora debido al impedimento estérico producido por el anillo aromático unido al triazol.

Después de terminar la reacción, los productos puros se obtuvieron filtrando el sólido con agua destilada para eliminar el exceso de KCN, y posteriormente con éter de petróleo para secar el producto, en el caso de que aun mostrará la presencia de precursor, el sólido se recrystalizó con mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo a baja temperatura, el catalizador se eliminó filtrando la mezcla de reacción con acetato de etilo.

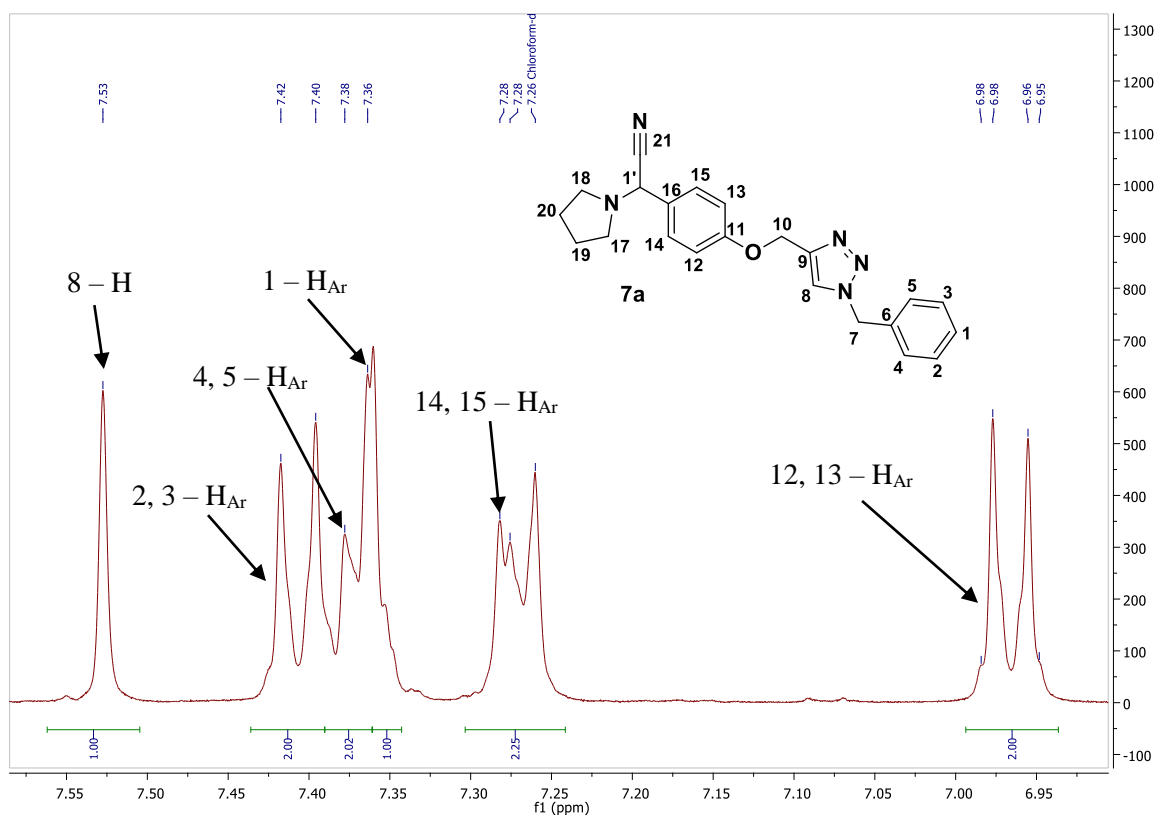
Para todas las moléculas sintetizadas se observó en el espectro infrarrojo una señal cercana a 2221 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace C-N en el enlace nitrílico, y para el caso de la serie C aparece una señal cercana a 2350 cm^{-1} correspondiente a la vibración N=N en el fragmento triazol, tal como se observa para el compuesto **7a** (Fig. 33).

Figura 34. Espectro infrarrojo (IR) para el α -aminonitrilo híbrido **7a** de la serie C.



En el análisis del espectro ^1H – RMN para el compuesto **7a** se identificó a campos bajos la señal del singulete a 7.53 ppm correspondiente al protón del anillo triazólico (8 – H), seguido a un multiplete en donde se encuentran tres señales superpuestas que corresponden al anillo aromático unido al triazol. A de 7.28 ppm se observó un multiplete relacionado con los protones de los carbonos 14 y 15 del anillo aromático; finalmente, a 6.97 ppm se identificó un doblete de tripletes de los protones aromáticos en los carbonos 12 y 13 con constante de acoplamiento $J = 8.7$ Hz correspondiente al acoplamiento en orto con los protones 14 y 15 (Fig. 34).

Figura 35. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido **7a**.



En la región de campos altos del espectro se identificaron tres singletes a 5.53 ppm, 5.18 ppm y 4.96 ppm que corresponden a los protones metilénicos de los carbonos 7 y 10 y al protón del carbono α al enlace nitrílico respectivamente; seguido a estas señales aparecen dos multipletes correspondientes a los protones del anillo de pirrolidina, a 2.62 ppm de los protones en los carbonos 17 y 18, y a 1.81 ppm de los protones en los carbonos 19 y 20 (Fig. 35).

La asignación de estos protones se confirmó con el experimento bidimensional COSY – RMN (Fig. 36), comprobando los acoplamientos entre los diferentes protones de la estructura; además de esto, con ayuda del espectro bidimensional HSQC – RMN (Fig. 37) y el experimento DEPT – 135 (Fig. 38) se asignaron los carbonos a los cuales pertenece cada protón del compuesto **7a** en el espectro ^{13}C – RMN (Fig. 38).

Figura 36. Región de campos bajos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido **7a**.

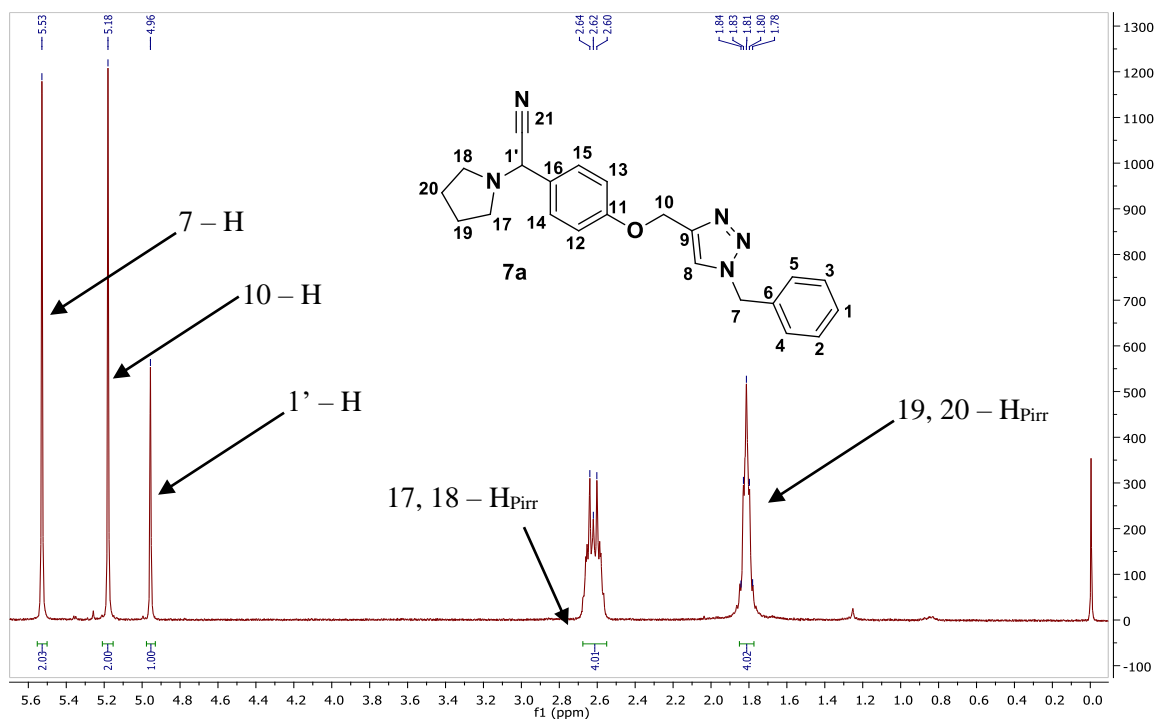


Figura 37. Espectro bidimensional COSY – RMN para el α -aminonitrilo híbrido **7a**.

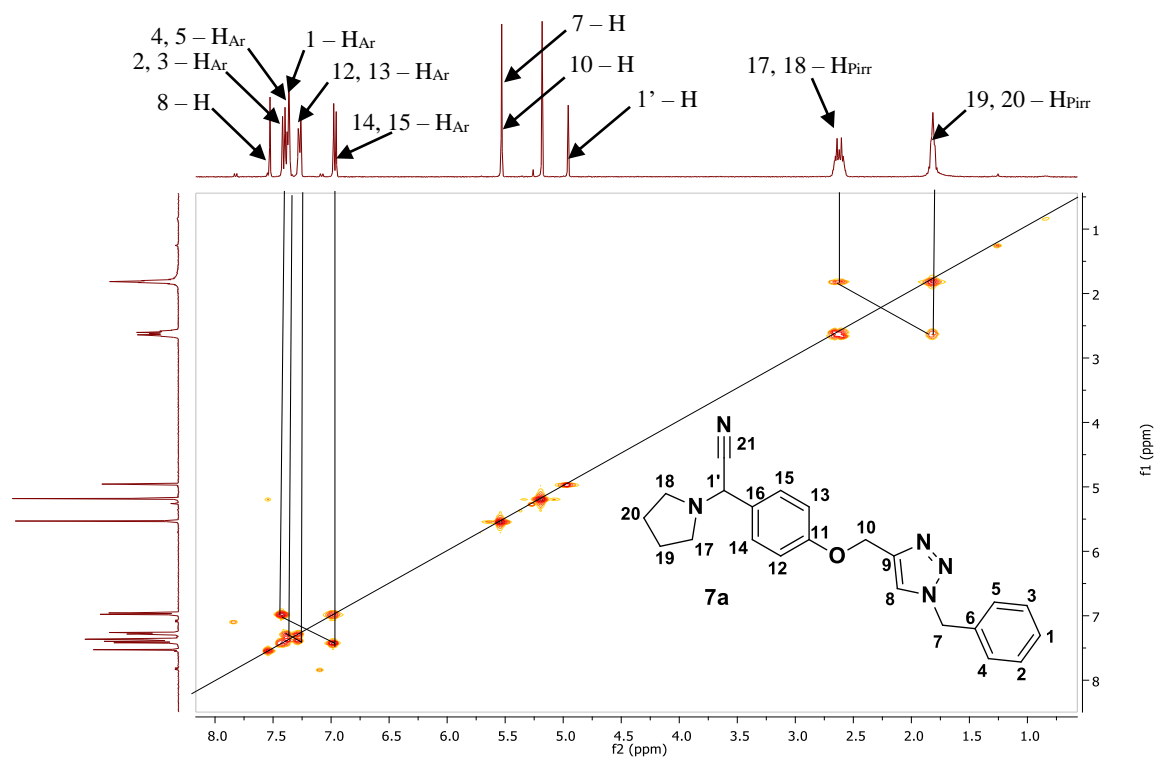


Figura 38. Espectro bidimensional HSQC – RMN para el α -aminonitrilo híbrido **7a**.

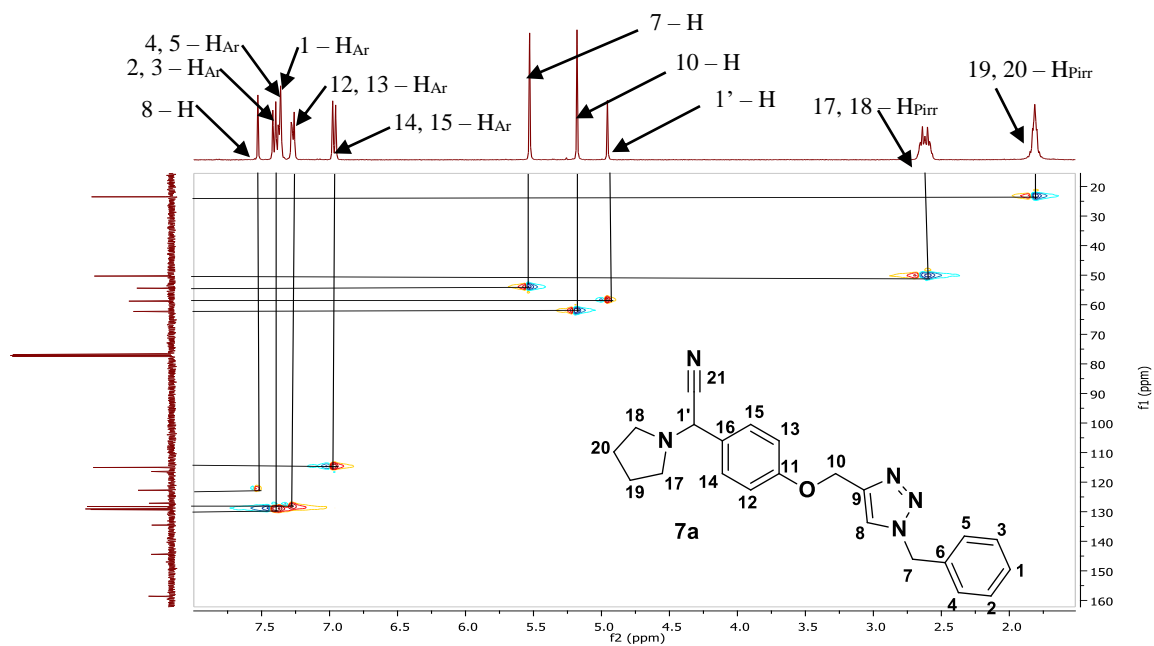
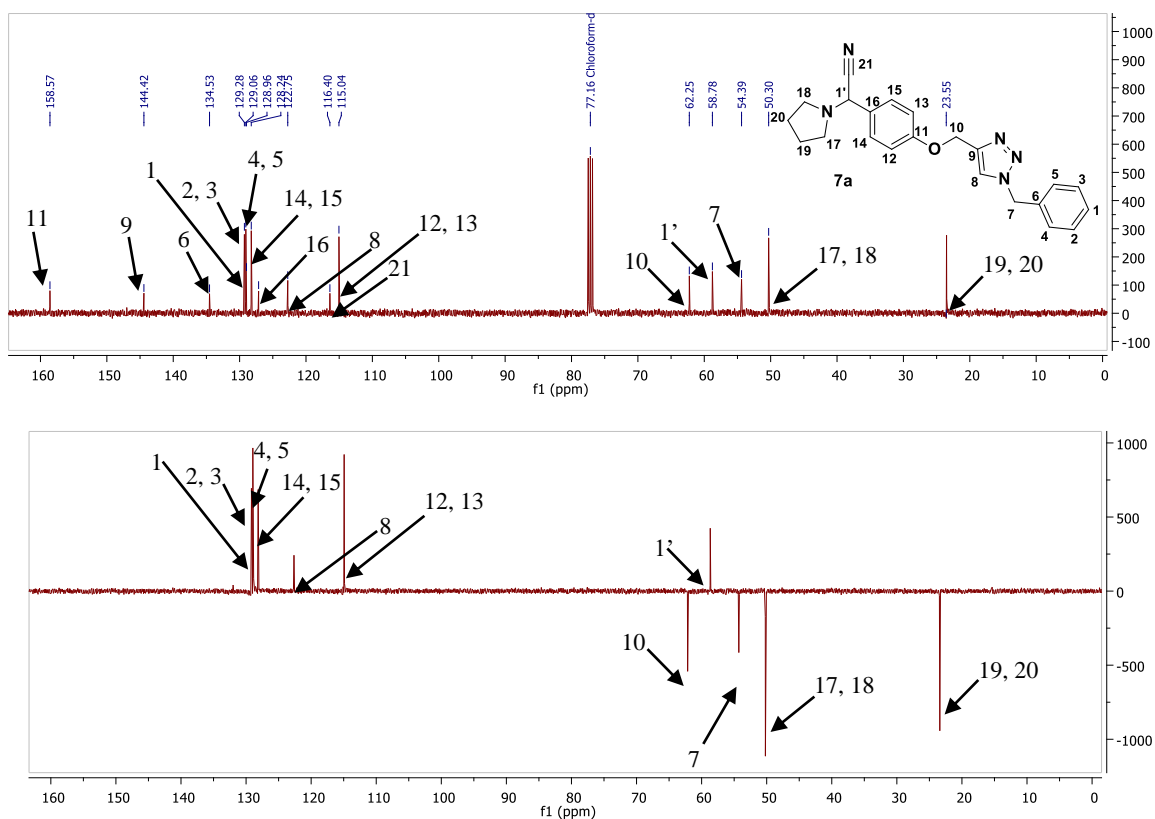


Figura 39. Comparación espectros ^{13}C – RMN y DEPT–135 para el α -aminonitrilo híbrido **7a**.



Para el caso de los α -aminonitrilos **7i** y **7j** con fragmento 4-metilpiperidina en el fragmento amínico, en la región de campos altos del espectro ^1H – RMN se observó la separación de las señales de los protones axiales y ecuatoriales del fragmento amínico de la estructura, tal como se observa en la Figura 39; estas interacciones axiales y ecuatoriales se confirmaron por sus constantes de acoplamiento ($J_{\text{Geminal}} \sim 11.4$ Hz, $J_{\text{ec-ax}} \sim 3.4$ Hz, $J_{\text{ec-ec}} \sim 2.0$ Hz). De esta manera se confirmó el cambio del ambiente químico al agregar un grupo metil al anillo heterocíclico.

Figura 40. Región de campos altos del espectro ^1H – RMN para el α -aminonitrilo híbrido **7i**.

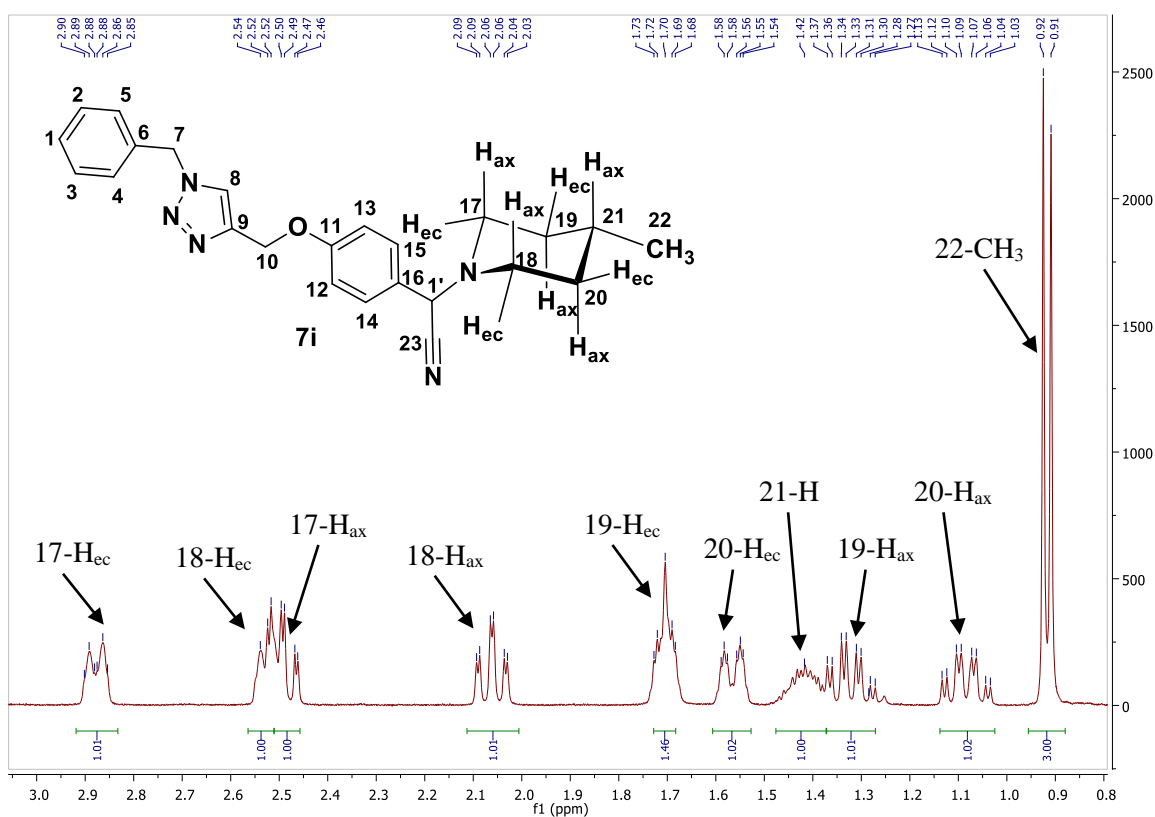


Tabla 22. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ¹H – RMN para los productos sintetizados en la serie C. **7a – 7p.**

N	Aromáticos									Triazol			Sustituyentes		α
	1-H	2-H	3-H	4-H	5-H	12-H	13-H	14-H	15-H	7-H	8-H	10-H	OCH ₃	CH ₃	1'-H
7a	7.36 m	7.42 m		7.38 m		6.97 dt J= 8.7, 2.9		7.28 d J= 2.5		5.53 s	7.53 s	5.18 s	-	-	4.96 s
7b	7.20 dd J= 7.5, 1.8	7.43 m	7.26 td J= 7.6, 1.4	-	7.31 td J= 7.6, 1.9	6.97 dt J= 8.7, 4.7		7.40 m		5.66 s	7.64 s	5.19 s	-	-	4.96
7e	7.36 m	7.42 m		7.38 m		6.97 dt J= 8.7, 2.9		7.28 d J= 2.5		5.53 s	7.53 s	5.18 s	-	-	4.74 s
7f	7.20 dd J= 7.5, 1.9	7.43 m	7.26 td J= 6.2, 1.4	-	7.32 td J= 7.5, 1.7	6.98 dt J= 8.7, 5.0, 2.9		7.41 m		5.67 s	7.64 s	5.19 s	-	-	4.74 s
7i	7.35 m	7.37 m		7.28 m		6.97 dt J= 8.8, 4.9, 3.0		7.42 m		5.53 s	7.53 s	5.18 s	-	0.92 d J= 6.4	4.76 s
7j	7.21 dd J= 7.6, 1.8	7.41 m	7.27 td J= 6.0, 1.5	-	7.32 td J= 7.6, 1.9	6.97 dt J= 8.8, 4.7, 3.0		7.44 m		5.67 s	7.65 s	5.19 s	-	0.91 d J=6.4	4.77 s
N	Aromáticos									Triazol			Sustituyentes		α
	1-H	2-H	3-H	4-H	5-H	12-H	13-H	14-H	15-H	7-H	8-H	10-H	OCH ₃	CH ₃	1'-H
7m	7.37 m	7.38 m		7.28 m		7.00 dt J= 8.8, 3.0		7.50 dt J= 8.6, 2.8		5.54 s	7.54 s	5.20 s	-	-	4.99 s
7n	6.97 d J= 1.9	7.15 m	7.13 m	-	7.27 td J= 6.0, 1.6	7.01 dt J= 8.8., 4.9, 2.9		7.50 d J= 8.5		5.68 s	7.66 s	5.21 s	-	-	5.00 s
7p	7.13 m	7.16 m	7.14 m		7.28 m		7.00 m	7.08 m	7.05 m	5.66 s	7.68 s	5.29 s	3.84 s		4.99 s

Tabla 23. Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidades y constantes de acoplamiento (J, Hz) de los protones en los espectros ¹H – RMN para los productos sintetizados en la serie C. **7a – 7p** (continuación).

N	Aromáticos (Tetrahydroisoquinolina)				Aminas								
	22-H	23-H	24-H	25-H	17-H _{ax}	17-H _{ec}	18-H _{ax}	18-H _{ec}	19-H _{ax}	19-H _{ec}	20-H _{ax}	20-H _{ec}	21-H
7a	-	-	-	-	2.62 m				1.81 m				-
7b	-	-	-	-	2.62 m				1.81 m				-
7e	-	-	-	-	2.47 m				1.58 m				1.47 m
7f	-	-	-	-	2.48 m				1.58 m				1.46 m
7i	-	-	-	-	2.48 dd J= 11.1, 2.5	2.87 m	2.06 td J= 11.4, 2.6	2.53 m	1.32 qd J= 8.4, 7.6, 4.0	1.71 m	1.08 qd J= 8.6, 7.9, 4.1	1.57 dt J= 13.0, 7.6, 2.5	1.42 m
7j	-	-	-	-	2.48 dd J= 11.1, 2.6	2.88 m	2.05 td J= 11.5, 2.6	2.52 m	1.32 qd J= 8.5, 7.7, 3.9	1.70 dt J= 12.4, 7.1, 2.7	1.08 qd J= 8.9, 7.7, 4.1	1.56 dt J= 13.0, 7.4, 2.7	1.41 m
N	Aromáticos (Tetrahydroisoquinolina)				Aminas								
	22-H	23-H	24-H	25-H	17-H _{ax}	17-H _{ec}	18-H _{ax}	18-H _{ec}	19-H _{ax}	19-H _{ec}	20-H _{ax}	20-H _{ec}	21-H
7m	7.11 m	6.97 d J= 1.9	7.15 m	7.13 m	2.82 m		3.74 t J= 15.9		2.88 m		-	-	-
7n	7.44 dd J= 7.8, 1.3	7.22 dd J= 7.5, 1.6	7.32 td J= 7.7, 1.9	7.10 m	2.81 m		3.74 q J= 14.7, 2.3		2.94 m		-	-	-
7p	7.43 dd= 7.8, 1.2	7.19 dd J= 7.6, 1.7	7.31 td J= 7.6, 1.9	7.10 m	2.80 m		3.77 m		2.93 m		-	-	-

Tabla 24. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie C. **7a – 7p.**

N	Aromáticos										Triazol					Sustituyentes		
	1-C	2-C	3-C	4-C	5-C	6-C	11-C	12-C	13-C	14-C	15-C	16-C	7-C	8-C	9-C	10-C	OCH ₃	CH ₃
7a	128.9	129.2		129.06		134.5	158.5	115.04		128.2		127.3	54.3	122.7	144.4	62.2	-	-
7b	130.5	130.07	129.06	132.3	127.7	133.6	158.5	115.05		130.4		127.1	51.6	123.1	144.2	58.7	-	-
7e	128.9	129.2		129.27		134.5	158.5	114.9		128.2		126.3	54.3	122.7	144.4	62.2	-	-
7f	130.5	130.09	127.7	132.3	129.2	133.6	158.5	114.9		130.4		126.3	50.9	123.1	144.3	62.2	-	-
7i	126.3	129.2		129.2		134.5	158.5	114.9		128.9		128.2	53.3	122.7	144.4	62.1	-	21.8
7j	130.5	129.2	127.7	132.3	130.4	133.6	158.5	114.9		130.08		126.3	51.6	123.1	144.3	62.1	-	21.8
7m	126.7	126.5		125.7		134.5	158.8	115.2		128.2		125.9	54.3	122.7	144.3	62.2	-	-
7n	126.7	126.5	125.7	132.3	127.7	133.8	158.7	115.1		129.3		125.9	51.6	123.1	144.2	62.2	-	-
7p	126.7	126.5	126.51	132.3	127.7	133.8	148.1	149.9	113.9	111.02	120.3	125.9	51.6	123.4	144.3	63.2	56.1	-

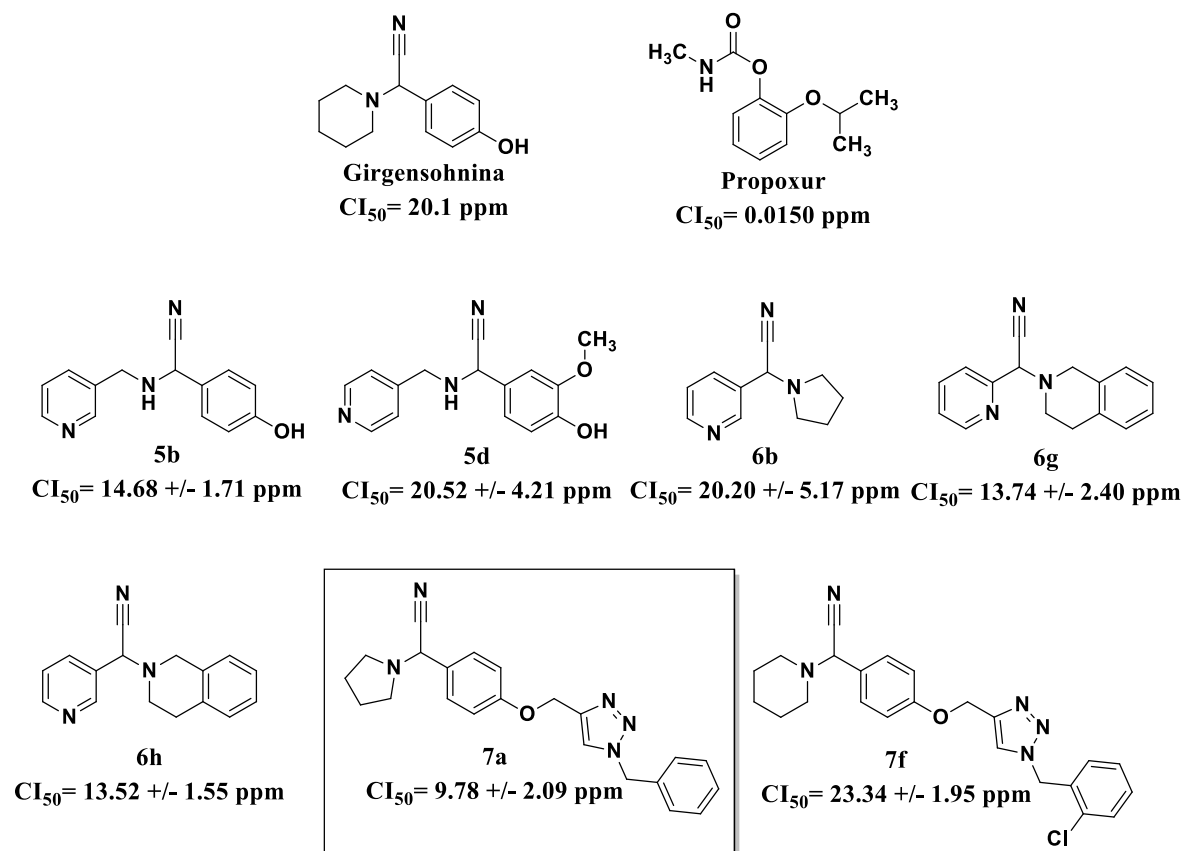
Tabla 25. Desplazamientos químicos (ppm) de los carbonos en los espectros ^{13}C – RMN para los productos sintetizados en la serie C. **7a – 7p** (continuación).

N	Aromáticos (Tetrahidroisoquinolina)						Aminas					α	CN
	20-C	21-C	22-C	23-C	24-C	25-C	17-C	18-C	19-C	20-C	21-C	1'-C	
7a	-	-	-	-	-	-	50.3		23.5		-	58.7	116.4
7b	-	-	-	-	-	-	50.2		23.5		-	62.2	116.3
7e	-	-	-	-	-	-	50.9		25.8		24.07	62.5	115.9
7f	-	-	-	-	-	-	51.6		25.9		24.08	62.5	115.9
7i	-	-	-	-	-	-	54.4	47.3	34.4	33.9	30.5	62.2	115.8
7j	-	-	-	-	-	-	53.3	47.2	34.4	33.8	30.5	62.17	115.9
7m	133.7	133.8	128.9	129.3	129.2	128.8	47.5	52.3	29.3	-	-	61.6	115.6
7n	133.6	133.7	130.09	130.5	130.4	128.8	47.5	52.3	29.3	-	-	61.6	115.6
7p	133.6	133.7	130.07	130.5	130.4	128.8	47.3	52.6	29.4	-	-	61.9	115.5

9.3. Ensayos de actividad biológica

9.3.1. Ensayo de inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) comercial (Extraída de *Electrophorus electricus*). La evaluación de cada molécula se realizó por triplicado y los valores de CI_{50} encontrados se compararon con el reportado previamente para la girgensohnina (20.1 mg/L),¹² de esta manera se eligieron aquellos compuestos más activos (Fig. 40).

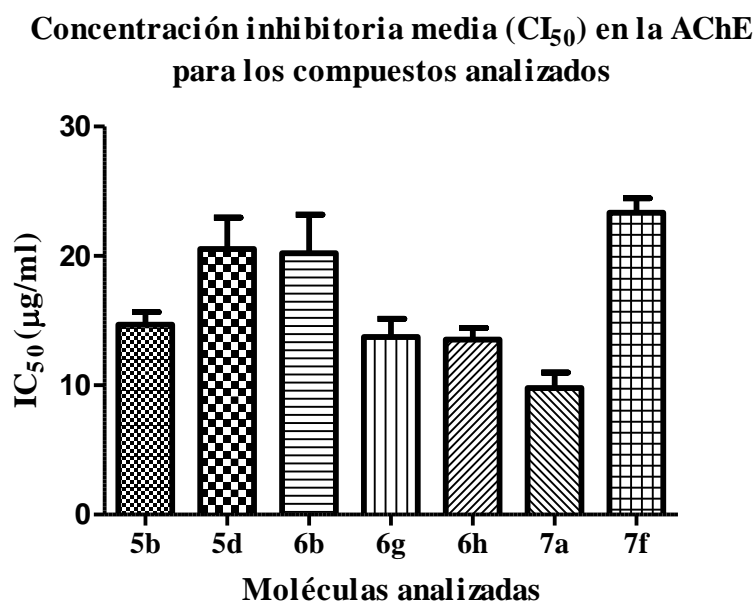
Figura 41. Valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los productos más activos en el ensayo de inhibición de la AChE comercial.



Aunque todas las moléculas reportaron un grado de inhibición de la AChE, al comparar con el control de la reacción se puede observar que aquellos compuestos con el fragmento tetrahydroisoquinolinico tuvieron mayor actividad de inhibición

sobre la AChE a diferencia de los anillos de piridina y piperidina, tal como se observa para las moléculas **6g** y **6h** (Fig. 36). Sin embargo, al cambiar el fragmento amínico por un anillo de pirrolidina y al adicionar el fragmento triazol a la estructura se reportó el menor valor de concentración inhibitoria media, revelando a la molécula **7a** como el mejor inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Fig. 36).

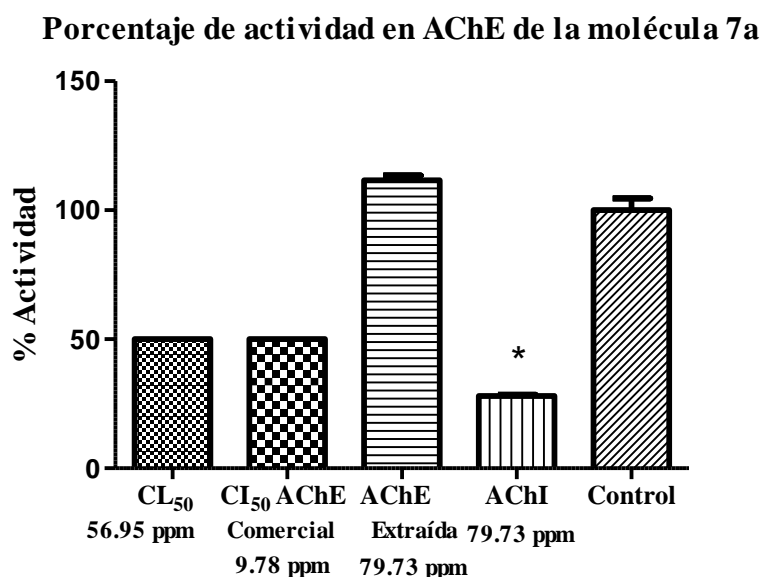
Figura 42. Gráfico de comparación de las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) en acetilcolinesterasa comercial para los compuestos analizados.



En el caso de la acetilcolinesterasa extraída de larvas, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas al ser comparadas con el control ($p > 0.05$ en el test de Tukey) dando como resultado valores de actividad entre el 97% y 117% para las tres concentraciones evaluadas en el ensayo, por lo cual se observa que no hay inhibición en la AChE extraída de larvas, incluso para el valor de $CL_{70} = 79.73$ ppm (Fig.37). Se observó el efecto del Propoxur como inhibidor de la enzima al comparar las placas AChE y AChI. Debido a que la molécula **7a** inhibió la actividad de la enzima AChE comercial, los resultados de este ensayo indicarían que la molécula evaluada o bien no interacciona con la AChE de larvas de *Aedes aegypti* o debido a la naturaleza del homogenizado, el cual para esta determinación no es

centrifugado, es posible que la molécula interactúe con otras enzimas o proteínas más abundantes en el homogenizado. Se ha reportado la presencia de enzimas esterasas, oxidasas de función mixta, glutatión S transferasas,^{21,82} las cuales pueden interactuar con las moléculas debido a su estructura de alcaloides análogos de compuestos naturales. Considerando que análisis computacionales en los cuales se comparan las estructuras de la AChE de diferentes especies han mostrado una alta homología entre sus cadenas, de más del 85% de la proteína, y un porcentaje aún mayor en el sitio activo, se considera como más probable la opción que involucra la interacción de la molécula con otras enzimas y proteínas más abundantes en el homogenizado de larvas.

Figura 43. Gráfico de porcentaje de actividad en acetilcolinesterasa extraída de larvas tratadas con la molécula **7a**, comparando con el valor de CL₅₀ en larvas y el valor de CI₅₀ en AChE comercial.



(*) $p < 0.05$, diferencias significativas

21. MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R. & VALLE, D. The classification of esterasas: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012, **107**, p. 437–449.

82. FAUCON, F. *et al.* Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res.* 2015, **25**, p. 1347–1359.

9.3.2. Ensayo *in vivo* de actividad larvicida en *Aedes aegypti*. Para las concentraciones de 50 ppm, 70 ppm y 120 ppm, los valores del porcentaje de mortalidad a las 24 horas y 48 horas se registraron en la Tabla 26; para cada valor de porcentaje de actividad se calculó el valor de desviación.

Tabla 26. Porcentajes de mortalidad en el ensayo larvicida para los compuestos sintetizados.

Moléc.	24 horas			48 horas			Blanco (DMSO)
	50 ppm	70 ppm	120 ppm	50 ppm	70 ppm	120 ppm	
Serie A							
5b	0	5 ± 0.57	2.5 ± 0.50	2.5 ± 0.50	15 ± 1.0	32.5 ± 2.21	0
5d	0	2.5 ± 0.50	22.5 ± 0.50	0	10 ± 0.81	35 ± 1.7	0
Serie B							
6b	0	0	50 ± 1.15	5 ± 0.57	7.5 ± 1.50	55 ± 1.29	0
6e	2.5 ± 0.50	0	12.5 ± 0.50	2.5 ± 0.50	0	17.5 ± 0.50	0
6f	0	2.5 ± 0.50	22.5 ± 0.50	0	10 ± 0.81	35 ± 1.73	0
6g	0	0	20 ± 1.63	2.5 ± 1.89	45 ± 1.41	100 ± 1.50	0
6h	0	25 ± 1.0	100	2.5 ± 0.50	45 ± 0.57	100	0
Serie C							
7a	52.5 ± 1.71	90 ± 1.41	100	65 ± 1.91	100	100	0
7b	20 ± 1.15	25 ± 0.95	65 ± 1.50	25 ± 0.50	50 ± 1.0	75 ± 1.25	0
7e	0	2.5 ± 0.50	55 ± 1.73	5 ± 0.57	7.5 ± 0.95	55 ± 1.73	0
7f	0	5 ± 0.50	0	0	5 ± 0.50	5 ± 0.50	0
7i	0	0	0	0	0	0	0
7j	0	0	0	0	0	0	0
7m	0	5 ± 0.50	5 ± 0.50	0	5 ± 0.50	5 ± 0.50	0
7n	0	0	0	0	0	0	0
7p	0	0	50 ± 1.15	5 ± 0.57	7.5 ± 1.5	55 ± 1.29	0

Entre las moléculas evaluadas, sobresalen los compuestos **7a** y **7b** que pertenecen a la serie de α -aminonitrilos con fragmento 1,2,3-triazol (Serie C), mostrando una similitud en la actividad al comparar con el valor obtenido en el ensayo de inhibición de la AChE comercial para la molécula **7a**. Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo de larvas, se observa que posiblemente la actividad insecticida de la molécula sea debida al anillo de pirrolidina en la estructura, ya que no se observó la misma tendencia para los demás triazoles.

Con los compuestos **7a** y **7b** se realizó el ensayo de dosis múltiples utilizando ocho concentraciones diferentes entre 25 ppm y 128 ppm; la evaluación de la mortalidad se registró a las 24 y 48 horas y estos datos se utilizaron para calcular el valor de la concentración letal media (CL₅₀) con el análisis estadístico de Probit.⁷⁶ Después de 24 horas, se observaron cambios morfológicos de las larvas, como engrosamiento, reducción del tamaño, deformidades y oscurecimiento de la cabeza; los valores de concentración letal están registrados en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados del análisis de Probit para las moléculas **7a** y **7b**.

Comp.	LC ₅₀ (ppm) (Límites de confianza)		LC ₉₈ (ppm) (Límites de confianza)		X ²	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
7a	56.95 (53.95–60.06)	53.22 (50.22–56.21)	110.32 (98.79–128.71)	106.06 (94.66–124.55)	4.42	4.09
7b	67.53 (64.20–70.83)	56.65 (52.86–60.02)	157.67 (140.03–185.08)	144.82 (127.46–173.28)	4.71	8.49

A partir de estos resultados, teniendo en cuenta que los compuestos con valores de CL₅₀ menores a 100 ppm son considerados activos sobre las larvas de *Aedes aegypti*, se observó que bajo condiciones de laboratorio, las larvas son susceptibles a las moléculas **7a** y **7b** sobresaliendo como posibles compuestos insecticidas sobre el mosquito. Para la molécula más activa (**7a**) se realizaron los siguientes ensayos biológicos para elucidar el mecanismo de acción en el organismo de las larvas.

9.3.3. Inhibición de enzimas mitocondriales en larvas de *Aedes aegypti*

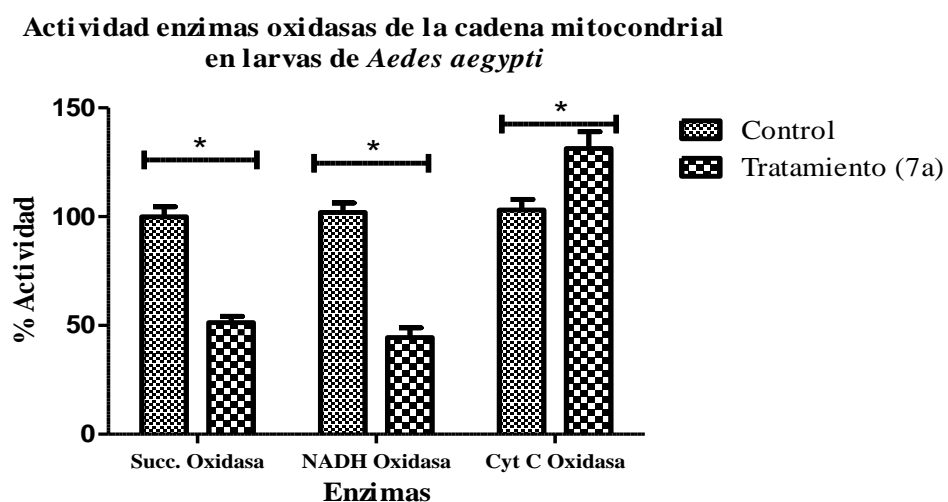
Para los ensayos de inhibición de las enzimas mitocondriales se utilizó la concentración letal media de la molécula más activa en el ensayo de actividad larvicida (**7a**, LC₅₀ = 56.95 ppm). Después del aislamiento y la fragmentación de las mitocondrias se cuantificó la cantidad de proteína e inicialmente se realizó el ensayo de inhibición por método polarográfico de las enzimas succinato oxidasa y NADH oxidasa; los resultados de este ensayo revelaron una inhibición de estas enzimas al tratar con la molécula, comparadas con el control (Fig. 43), además de esto, el

análisis estadístico de Tukey mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento para estas dos enzimas ($p < 0.05$).

Seguido a estos ensayos se realizó la evaluación de la inhibición en las enzimas succinato deshidrogenasa y NADH deshidrogenasa, las cuales no reportaron una inhibición al comparar con el control y no mostraron diferencias significativas al realizar el análisis estadístico, al igual que al realizar el ensayo de succinato citocromo C deshidrogenasa; sin embargo, al realizar la evaluación de la inhibición de NADH citocromo C deshidrogenasa se reportó una inhibición considerable y el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el tratamiento y el control ($p < 0.05$) (Fig. 44).

Finalmente se realizaron los ensayos de inhibición de citocromo C oxidasa, en donde se observó una activación de la enzima al ser tratada con la molécula y se encontraron diferencias significativas con el control en el análisis de Tukey ($p < 0.05$) (Fig. 43); y para el ensayo con ATPasa, que se reportó como la concentración de fosfato hidrolizado y no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 7a ($p > 0.05$ en análisis de Tukey) (Fig. 45).

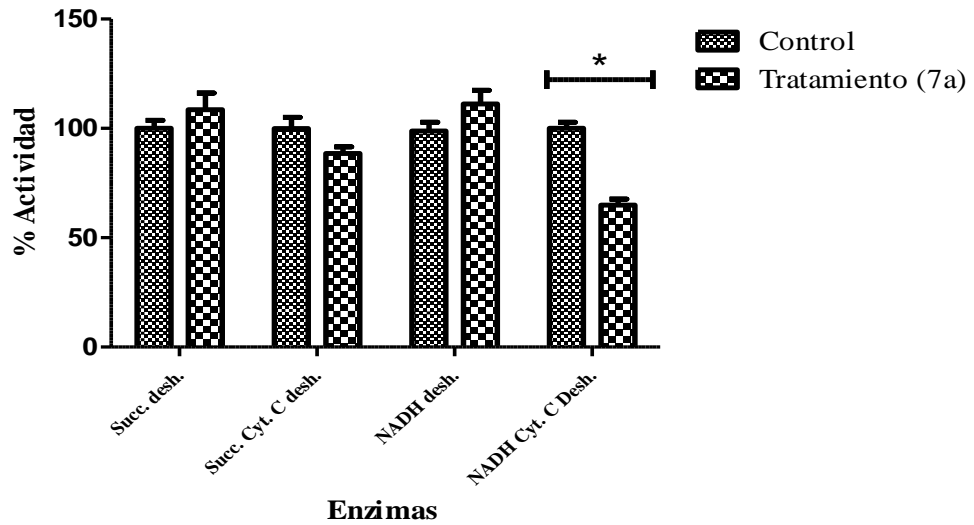
Figura 44. Resultados del ensayo de inhibición de las oxidasas en larvas de *Aedes aegypti*.



(*) $P < 0.05$, diferencias significativas

Figura 45. Resultados del ensayo de inhibición de las deshidrogenasas en larvas de *Aedes aegypti*.

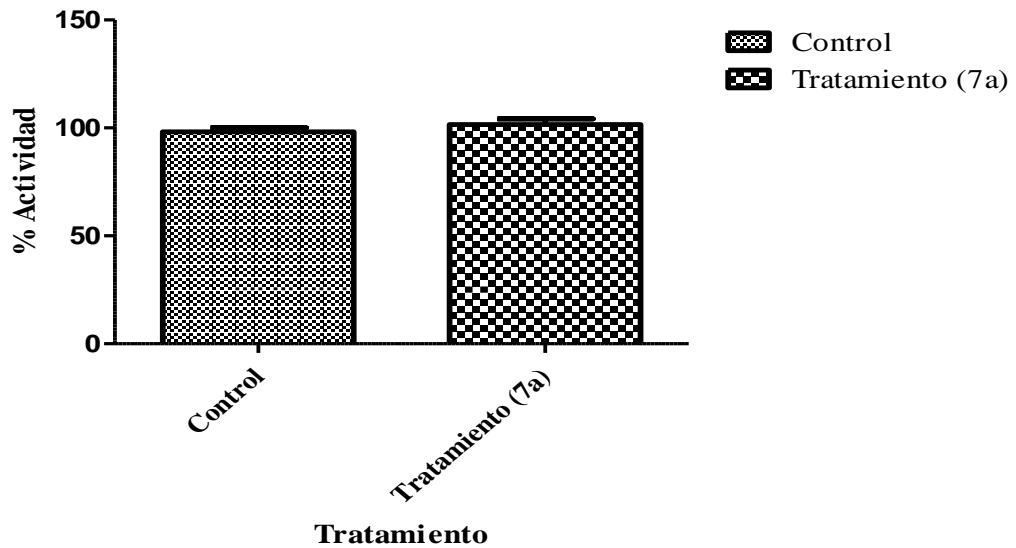
Actividad enzimas deshidrogenasas de la cadena mitocondrial en larvas de *Aedes aegypti*



(*) $P < 0.05$, diferencias significativas

Figura 46. Resultados del ensayo de inhibición de la enzima ATPasa en larvas de *Aedes aegypti*.

Actividad enzima ATPasa de la cadena mitocondrial en larvas de *Aedes aegypti*



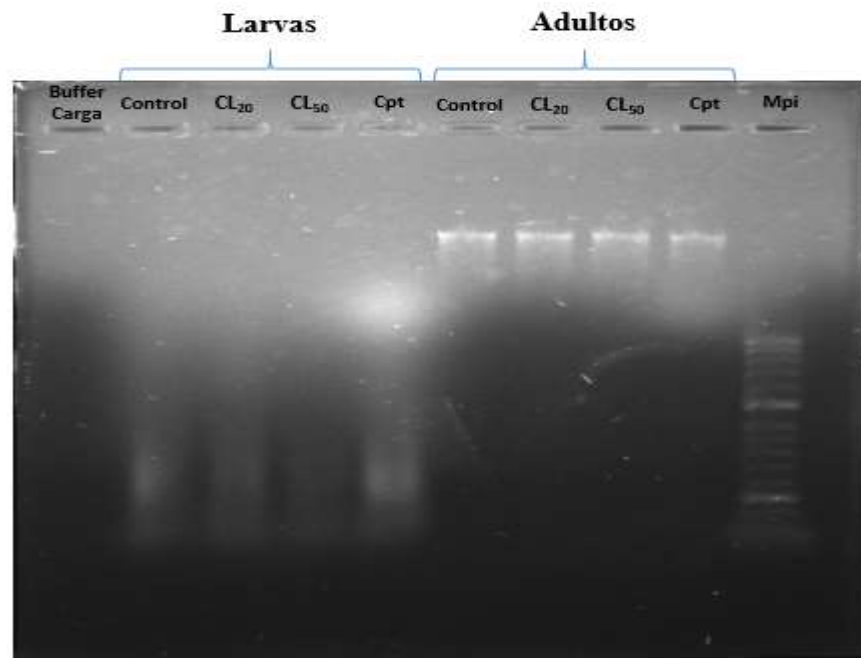
Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de ATPasa, se descarta una inhibición de esta enzima, además de esto, en el de citocromo C oxidasa, se pudo observar una activación en el complejo IV de la cadena mitocondrial. Debido a que uno de los inhibidores del complejo IV es el cianuro, se confirma que no hay liberación de este fragmento en la molécula al observar la activación de esta enzima.

Los resultados de la enzima succinato oxidasa sugieren una inhibición en el recorrido del complejo I al complejo III de la cadena mitocondrial, y para la enzima NADH oxidasa una inhibición en el recorrido del complejo II al complejo III; para confirmar si la inhibición se presenta en el complejo I o II se realizaron los ensayos de NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa respectivamente. Al no observarse inhibición en ninguna de estas dos enzimas, se descarta la inhibición de estos complejos. Sin embargo, la inhibición observada en la enzima NADH citocromo C deshidrogenasa confirma el efecto de la molécula en el complejo III de la cadena mitocondrial; además, la inhibición de las enzimas NADH oxidasa (Transporte de electrones del complejo I al III) y succinato oxidasa (transporte de electrones del complejo II al III), puede ser señal de que se produzca estrés oxidativo en la mitocondria debido a la formación del radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) en el paso de electrones del complejo I a QH_2 .

9.3.4. Ensayo de daño en el ADN por fragmentación o degradación. Para el ensayo de fragmentación de ADN se utilizaron larvas y adultos de *Aedes aegypti* vivos; el tratamiento en el ensayo se realizó con las concentraciones CL_{20} y CL_{50} de la molécula más activa en el ensayo *in vivo* de actividad larvicida (**7a**). Además de un tratamiento con camptotecina 4 μM , fármaco utilizado en los tratamientos de quimioterapia e inhibidor de la enzima topoisomerasa I, y un control con larvas y adultos sin adicionar la molécula. Los individuos se transfirieron por aparte a tubos van-Potter para proceder a la homogenización y el aislamiento del ADN; finalmente se llevó a electroforesis en gel de agarosa para observar la fragmentación o degradación del ADN.

La comparación del ADN de larvas y adultos en el gel de agarosa reveló una degradación del ADN extraído de larvas de *Aedes egypti* aún en el control de larvas sin tratamiento (Fig. 46), lo cual no es información suficiente para concluir que la molécula está causando tal degradación. Por otro lado, en adultos no se observó efecto de degradación o fragmentación en el ADN extraído, deduciendo que el α -aminonitrilo **7a** no está teniendo un efecto en el ADN de adultos; además de esto, teniendo en cuenta que se utilizó el mismo protocolo para larvas y adultos, es posible que exista un factor externo relacionado con el mantenimiento de los individuos bajo condiciones de cría no relacionado con el efecto potencial de la molécula en el ADN. Por tanto esta prueba no permite inferir acerca del efecto que produce la molécula en los ácidos nucleicos de larvas de *Aedes egypti*.

Figura 47. Revelación del gel de agarosa en electroforesis de ADN extraído de larvas y adultos de *Aedes aegypti*



*cpt= tratamiento con camptotecina, *Mpi= Marcador de peso molecular.

10. CONCLUSIONES.

Teniendo en cuenta los objetivos logrados en el presente trabajo de maestría, se puede concluir que:

Escogiendo como mejor protocolo la reacción de Strecker catalizada por ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA) se obtuvo una nueva serie de 16 α – aminonitrilos análogos de la nicotina y girsensohnina usando en la reacción parámetros de la química verde; entre estos 16 compuestos se obtuvieron nueve (9) α – aminonitrilos híbridos con fragmento 1,2,3–triazol en su estructura, lo cual incluye una reacción de cicloadición 1,3–dipolar catalizada por cobre para la obtención de los precursores.

Los rendimientos de los precursores fueron altos, confirmando de esta manera las características de las reacciones “Click Chemistry”, además, los productos finales se obtuvieron con rendimientos aceptables para las series A y B, resaltando para la serie C rendimientos altos para la mayoría de las moléculas, debido posiblemente a la conformación que adquiere el triazol precursor al momento de la condensación con la amina. La pureza de los productos se confirmó con las técnicas de caracterización de IR y RMN.

En el estudio de la actividad biológica se reportó para todos los productos finales una inhibición de la acetilcolinesterasa comercial, sobresaliendo el compuesto 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**7a**) como el mejor inhibidor de esta enzima con un valor de $CI_{50} = 9.78 \pm 2.09$ ppm.

El ensayo *in vivo* de actividad larvicida mostró que bajo condiciones de laboratorio, las larvas de mosquito *Aedes aegypti* son susceptibles a algunos compuestos obtenidos, sobresaliendo los α –aminonitrilos 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**7a**) y 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**7b**), como los que reportan

mayor mortalidad a las 24 horas con valores de concentración letal de 56.95 ppm y 67.53 ppm respectivamente, mostrando para la molécula **7a** una similitud entre la actividad en larvas de *Aedes aegypti* y la inhibición con la enzima acetilcolinesterasa comercial.

El estudio del mecanismo de acción de la molécula más activa (**7a**) no mostró inhibición de la enzima AChE extraída de larvas de *Aedes aegypti*, ya que no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento con la molécula; esto puede deberse a que la molécula interactúa con alguna de las enzimas presentes en el homogenizado, ya que en este no se encuentra solo la acetilcolinesterasa. Para el ensayo de inhibición de las enzimas mitocondriales se concluye que la inhibición del complejo III de la cadena mitocondrial debido a la inhibición de la enzima NADH citocromo C deshidrogenasa, al ser tratada con el compuesto, además de un posible estrés oxidativo en la mitocondria debido a la inhibición de las enzimas NADH oxidasa y succinato oxidasa.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE-OBANDO, O. A., *et al.* Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera : Culicidae) from Colombia. *Zoologia*. 2015, **32**, p. 14–22.

ALI, M. Silica sulfuric acid / NaNO₂ as a novel heterogeneous system for production of thionitrites and disulfides under mild conditions. *Tetrahedron*. 2001, **57**, p. 9509–9511.

ANISZEWSKI, T. *Alkaloids - Secrets of Life*. Amsterdam. Elsevier 2007.

ASHFORD, J. . & SOWDEN, R. R. Multi-Variate Probit Analysis. *Biometrics*. 1970, **26**, p. 535–546.

BAHRAMI, K., MEHDI, M. & ROOSTAEI, M. Sodium azide as a catalyst for the hydration of nitriles to primary amides in water. *J. Chem. Res*. 2015, **39**, p. 267–269.

BENELLI, G. & MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitol. Res*. 2016, **115**, p. 1747–1754.

BERGÉ, J.; FEYEREISEN, R. & AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1998, **353**, p. 1701–1706.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013, **496**, p. 504–507.

BOREN, B. C. *et al.* Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, **130**, p. 8923–8930.

BORRERO LANDAZABAL, M. A., *et al.* Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol*. 2017, p. 1-7.

BRAGA, I. A. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. e Serviços Saúde*. 2007, **16**, p. 279–293.

CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016, **387**, p. 1531–1539.

CAREY, F. A. & SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and mechanism*. Virginia, Springer, 5th ed. 2007.

CAREY, F. A. & SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reaction and Synthesis*. Virginia, Springer, 5th ed. 2007.

CARREÑO OTERO, A. L., *et al.*. Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girsengosohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 2018, **204**, p. 14–25.

CARREÑO, A. L., *et al.* Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsengosohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **78**, p. 392–400.

CASTRO, Raúl. *Costos del dengue en Colombia (2010-2012), Impacto en salud pública*. 2014, Bogota D.C., Universidad de los Andes, p. 1–45.

COREY, E. J. & GROGAN, M. J. Enantioselective synthesis of alpha-amino nitriles from N-benzhydryl imines and HCN with a chiral bicyclic guanidine as catalyst. *Org. Lett.* 1999, **1**, p. 157–160.

CUDWORTH, D. P. *et al.* Structure-activity relationship development of dihaloaryl triazole compounds as insecticides and acaricides. 1. Phenyl thiophen-2-yl triazoles. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, p. 7517–7526.

DE NICOLA, L., *et al.* A simple analytical method for dhurrin content evaluation in cyanogenic plants for their utilization in fodder and biofumigation. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 8065–8069.

DEBATIN, K.-M., PONCET, D. & KROEMER, G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002, **21**, p. 8786–8803.

DEKAMIN, *et. al.* Facile and One-Pot Synthesis of α -Aminonitriles by Strecker Reaction Catalyzed by [BMIM][PINO] as a New Ionic Liquid. *Int. Elec. Conf. Synt. Org. Chem.* 2011, p. 2–7.

DIAS, C. N. & MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitol. Res.* 2013, **113**, p. 565–592.

ELLMAN, G., *et. al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**, p. 88–95.

FAUCON, F. *et al.* Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res.* 2015, **25**, p. 1347–1359.

GUZMAN, M. G. & HARRIS, E. Dengue. *Lancet.* 2015, **385**, p. 453–465.

HAIPOUR, A. R. & DEHBANE, I. M. An efficient one-pot synthesis of α -amino nitriles using ecofriendly Lewis-acidic ionic liquid choline chloride. 2ZnCl_2 . *Iran. J. Catal.* 2012, **2**, p. 147–151.

HEMINGWAY, J. & RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 2000, **45**, p. 371–391.

HEMINGWAY, J. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.* World Health Organization, 2005.

HEMINGWAY, J., *et. al.* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2004, **34**, p. 653–65.

HU, X., MA, Y. & LI, Z. Eco-friendly synthesis of α -aminonitriles from ketones in PEG-400 medium using potassium Hexacyanoferrate (II) as cyanide source. *J.*

Organomet. Chem. 2012, **705**, p. 70–74.

HUISGEN, R. & WEBERNDÖRFER, V. 1,3-Dipolare Additionen der Thioketocarbene. *Tetrahedron Lett.* 1960, **12**, p. 5–8.

HULL, J. W., *et al.* Development of Manufacturing Processes for a New Family of 2,6-Dihaloaryl 1,2,4-Triazole Insecticides Abstract: *Org. Proc. Res. Dev.* 2009, **13**, 1125–1129.

Instituto Nacional de Salud (INS). Boletín epidemiológico semana 34-2017. Colombia, 2017, p. 14-24.

Instituto Nacional de Salud INS. Boletín epidemiológico semana 43 de 2017. Colombia. 2017, p. 14-27.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med. Mal. Infect.* 2014, **44**, p. 302–307.

IRFAN, M. *et al.* Synthesis, QSAR and anticandidal evaluation of 1,2,3-triazoles derived from naturally bioactive scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, **93**, p. 246–254.

KATHIRAVAN, M. K. *et al.* A Rapid and Facile Synthesis of α -Amino Nitrile Employing Ionic Liquid. *Chem. J.* 2012, **2**, p. 199–205.

KHUTORNENKO, A. A., *et al.* The role of dihydroorotate dehydrogenase in apoptosis induction in response to inhibition of the mitochondrial respiratory Chain complex III. *Acta Naturae* 2014, **6**, p. 69–75.

KOBAYASHI, S. & Ishitani, H. Catalytic enantioselective addition to imines. *Chem. Rev.* 1999, **99**, p. 1069–94.

LAGUNA, F., RODRÍGUEZ-TUDELA, J. & MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis.* 1997, **24**, p. 124–130.

LEE, K.-S., AN, H.-S. & HWANG, C.-Y. An Efficient Synthesis of Nitriles from Aldoximes Using Diethyl Phosphorocyanidate under Mild Conditions. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012, **33**, p. 3173–3174.

LI, J. J. *Name Reactions, a Collection of Detailed Reaction Mechanisms*. Germany, Springer. 2006, p. 579-581.

LI, Z., *et al.* One-pot three-component synthesis of α -aminonitriles using potassium hexacyanoferrate(II) as an eco-friendly cyanide source. *Tetrahedron Lett.* 2010, **51**, p. 3922–3926.

LIU, X. C. *et al.* Bioactivities of a new pyrrolidine alkaloid from the root barks of *Orixa japonica*. *Molecules*. 2016, **21**, p. 1–8.

LUMJUAN, N. *et al.* The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007, **37**, p. 1026–1035.

MANRIQUE-SAIDE, P. *et al.* Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, **21**, p. 308–311.

MARTÍNEZ, R., RAMÓN, D. J. & YUS, M. Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Lett.* 2005, **46**, p. 8471–8474.

MASON, T. L., POYTON, R. & WHARTON, D. C. Cytochrome C Oxidase from Bakers' Yeast. *J. Biol. Chem.* 1973, **248**, p. 1346–1354.

MELDAL, M. & TORNOE, C. W. Cu-catalyzed azide - Alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* 2008, **108**, p. 2952–3015.

MOHAMMAD, D., *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017, **16**, p. 1009–1019.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R. & VALLE, D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012, **107**, p. 437–449.

NAKAMURA, S., *et al.* A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et₂AICN. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2004, **15**, p. 1513–1516.

NASREEN, A. I-Proline catalyzed one pot synthesis of α -aminonitriles. *Tetrahedron Lett.* 2013, **54**, p. 3797–3800.

NILSSON, M. I. *et al.* Redox state and mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of LGMD2A patients. *PLoS One* 2014, **9**, p. 1-11.

PULLMAN, M. E., *et al.* Partial Resolution Oxidative of the Enzymes Phosphorylation Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1960, **235**, p. 3322–3329.

RANU, B., SUVENDU, S. D. & ALAKANANDA, H. Indium Trichloride Catalyzed One-Step Synthesis of α -Aminonitriles by a Three-Component Condensation of Carbonil Compounds, Amines and Potassium Cyanide.pdf. *Tetrahedron.* 2002, **58**, p. 2529–2532.

RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S. & KELLER, P. A. Chikungunya Virus : Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 2014, **57**, p. 1147–1166.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 2010, **29**, p. 913–920.

RUSSELL, R. J. *et al.* Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2004, **79**, p. 84–93.

RYAN, M. F. & BYRNE, O. Plant - insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 1988, **14**, p. 1965–1975.

SAIDI, M. R. & AZIZI, N. A Novel and Efficient Method for the Synthesis of α - Aminonitriles by the Reaction of Aminals with Trimethylsilyl Cyanide Catalyzed by Iodine. *J. Iran. Chem. Soc.* 2004, **1**, p. 136–140.

SAITOH, F., NOMA, M. & KAWASHIMA, N. The alkaloid contents of sixty Nicotiana species. *Phytochemistry*. 1985, **24**, p. 477–480.

SEIFERLE, E. J. & FREAR, D. E. H. Insecticides derived from plants. *Ind. Eng Chem.* 1948, **40**, p. 683–691.

SHAABANI, A. & MALEKI, A. Cellulose sulfuric acid as a bio-supported and recyclable solid acid catalyst for the one-pot three-component synthesis of α -amino nitriles. *Appl. Catal. A Gen.* 2007, **331**, p. 149–151.

SHARIFI, M., *et. al.* Characterization of acetylcholinesterase from elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* and QSAR of temephos derivatives against its activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2017, **136**, p. 12–22.

SHRAGG, T. A. & ALBERTSON, T. E. Cyanide Poisoning After Bitter Almond Ingestion. *West. J. Med.* 1982, **136**, 65–69.

SINGER, T. . Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* 1974, **22**, 123–175.

SOMLO, M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1965, **97**, p. 183–201.

STELLWAGEN, N. C. DNA Gel Electrophoresis. *Nuc. Ac. Electroph.* 1998, p. 1–53.

STEVENS, A. J., *et. al.* The Medicinal Chemistry of Dengue Fever. *J. Med. Chem.* 2009, **52**, p. 7911–7926.

STRECKER, A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper; *Eur. J. Org. Chem.* 1850, **75**, p. 27–45.

TAKAMURA, M., *et al.* A catalytic asymmetric strecker-type reaction promoted by Lewis acid-Lewis base bifunctional catalyst. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2000, **48**, p. 1586–1592.

TAPIA-CONYER, R. Dengue: an escalating public health problem in Latin America. *Paediatr. Int. Child Health*. 2012, **32 Suppl 1**, p. 14–17.

TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: The determinants of life or death. *Acc. Chem. Res.* 2009, **42**, 260–269.

TOMIZAWA, M., LEE, D. L. & CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, p. 6016–6024.

VAAMONDE GARCÍA, C. *et al.* Oligomycin, an inhibitor of complex V of mitochondrial respiratory chain, induces an inflammatory response in rat knee joint. *Osteoarthr. Cartil.* 2013, **21**, p. S70.

VACHAL, P. & JACOBSEN, E. N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**, p. 10012–10014.

VARGAS, L. Y. & KOUZNETSOV, V. V. First Girgensohnine Analogs Prepared Through InCl_3 -catalyzed Strecker Reaction and their Bioprospection. *Curr. Org. Synth.* 2013, **10**, p. 969–973.

VASQUES DA SILVA, R. *et al.* Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2002, **59**, p. 521–527.

WANG, J., LIU, X. & FENG, X. Asymmetric Strecker Reactions. *Chem. Rev.* 2011, **111**, p. 6947–6983.

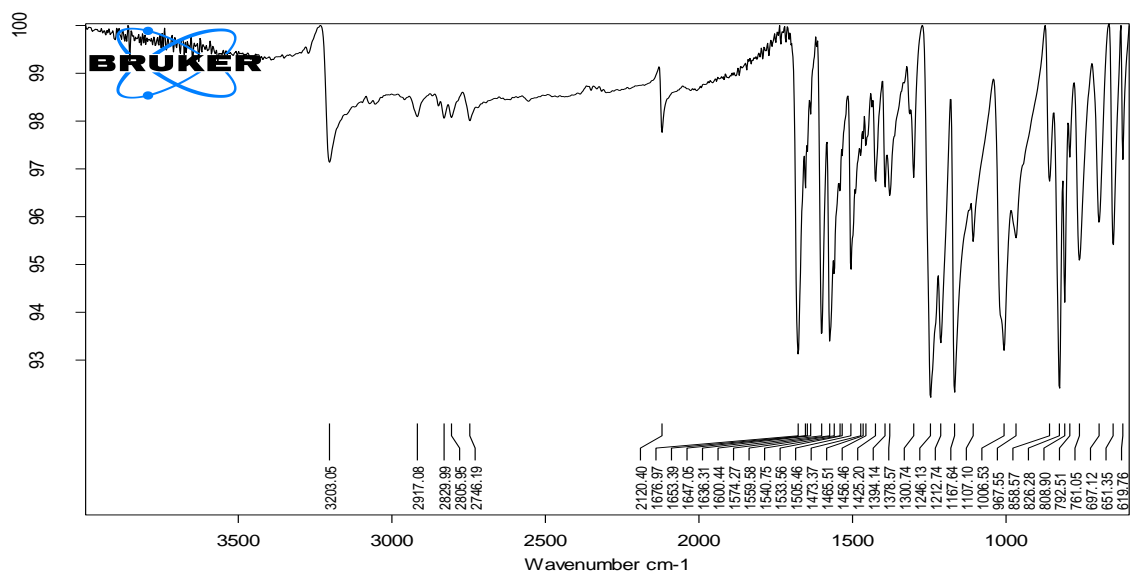
XU, M. *et al.* Insecticidal quinoline and isoquinoline isoxazolines. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2014, **24**, p. 4026–4030.

ANEXOS – ANEXO I

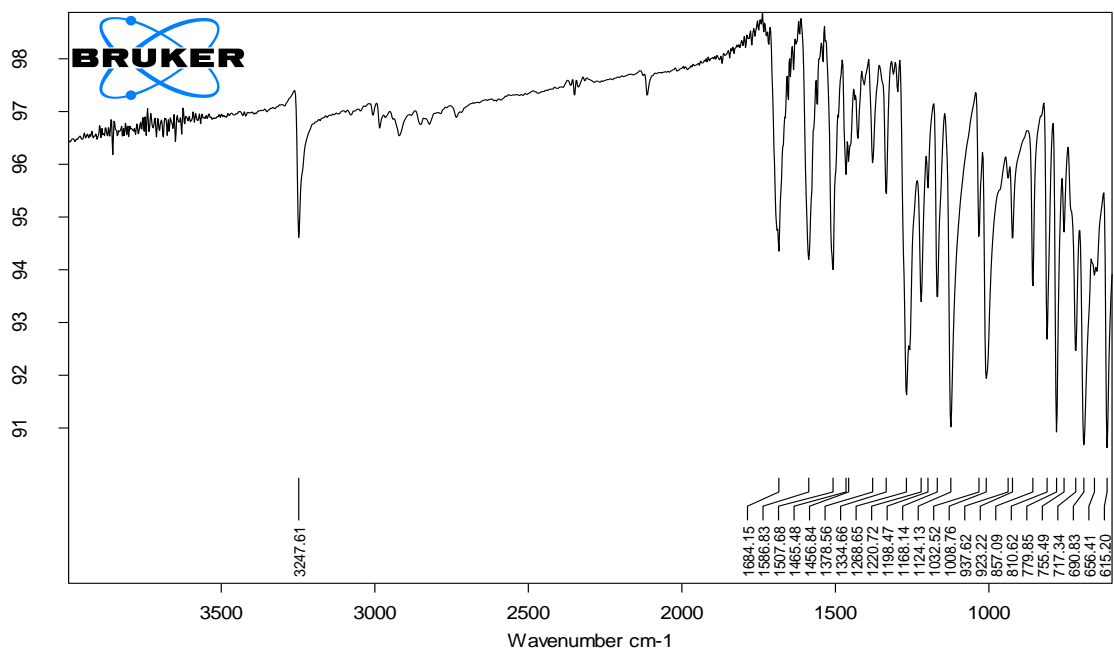
Espectros IR de los compuestos sintetizados

- Precursores:

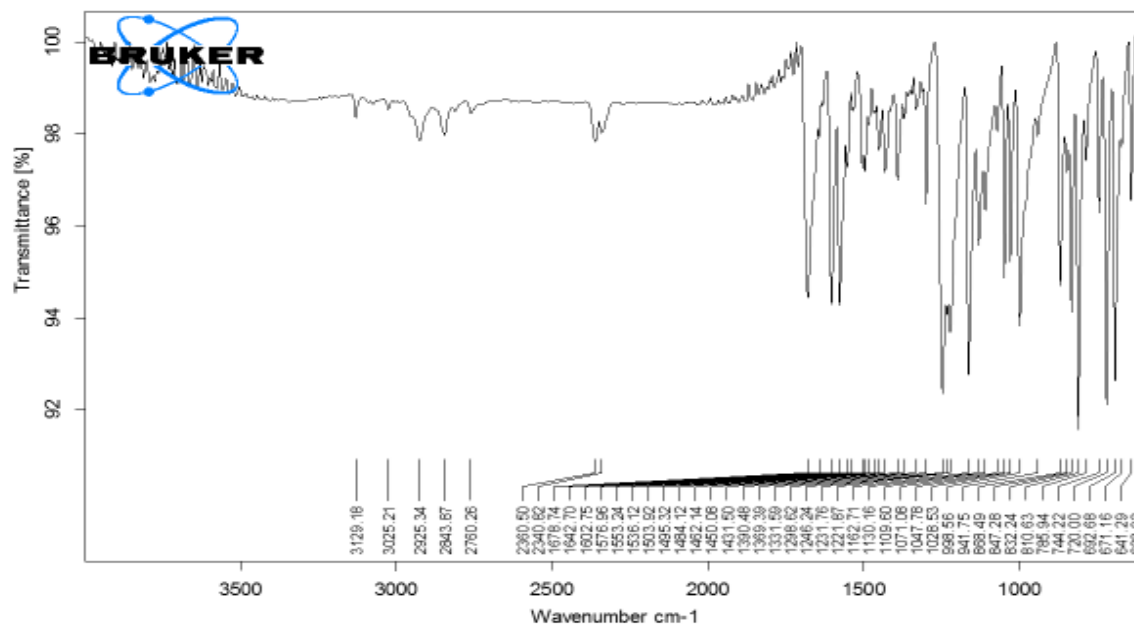
Anexo 1. 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a).



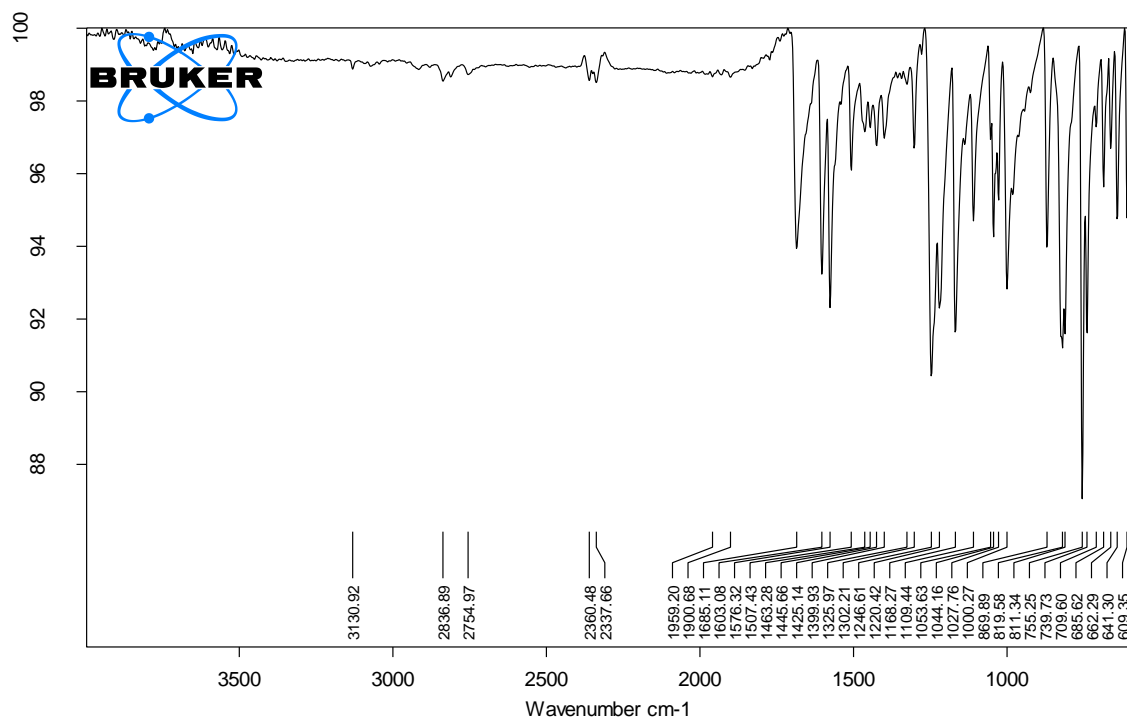
Anexo 2. 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).



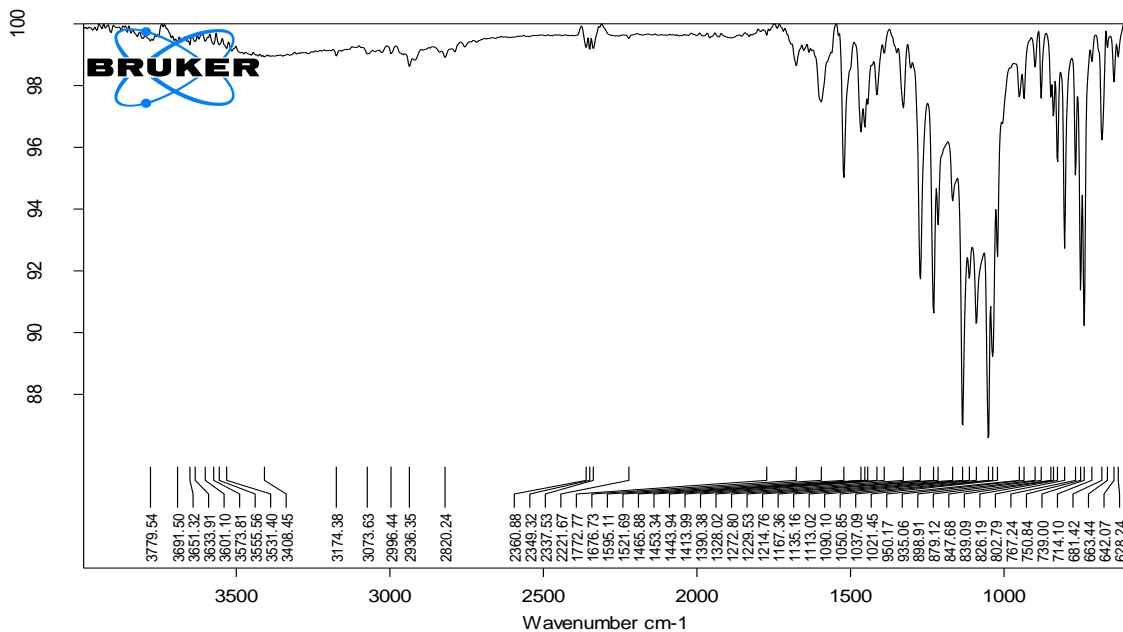
Anexo 3. 4-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (4a).



Anexo 4. 4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (4c).

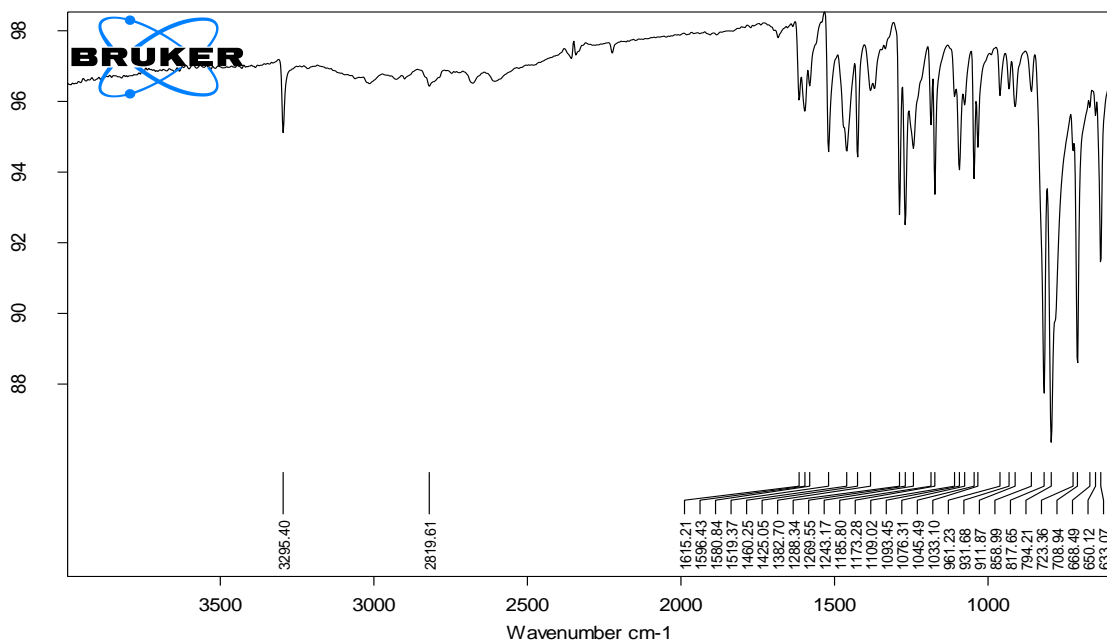


Anexo 5. 4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (4d).

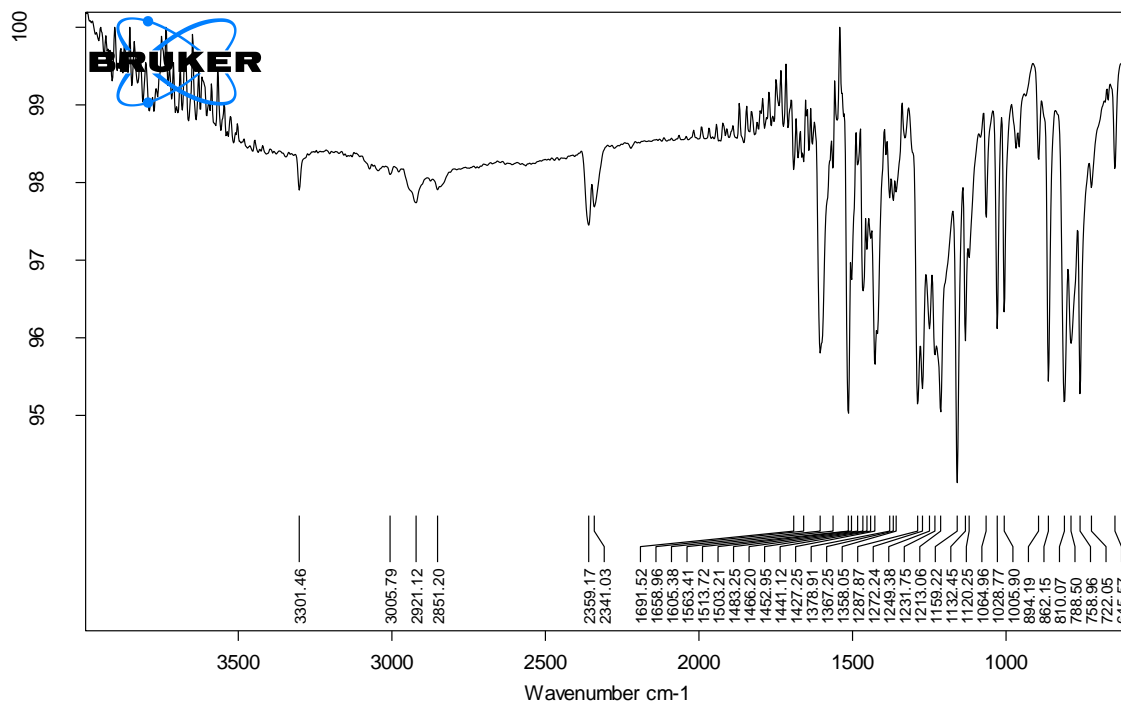


- **Productos finales serie A:**

Anexo 6. 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (5b).

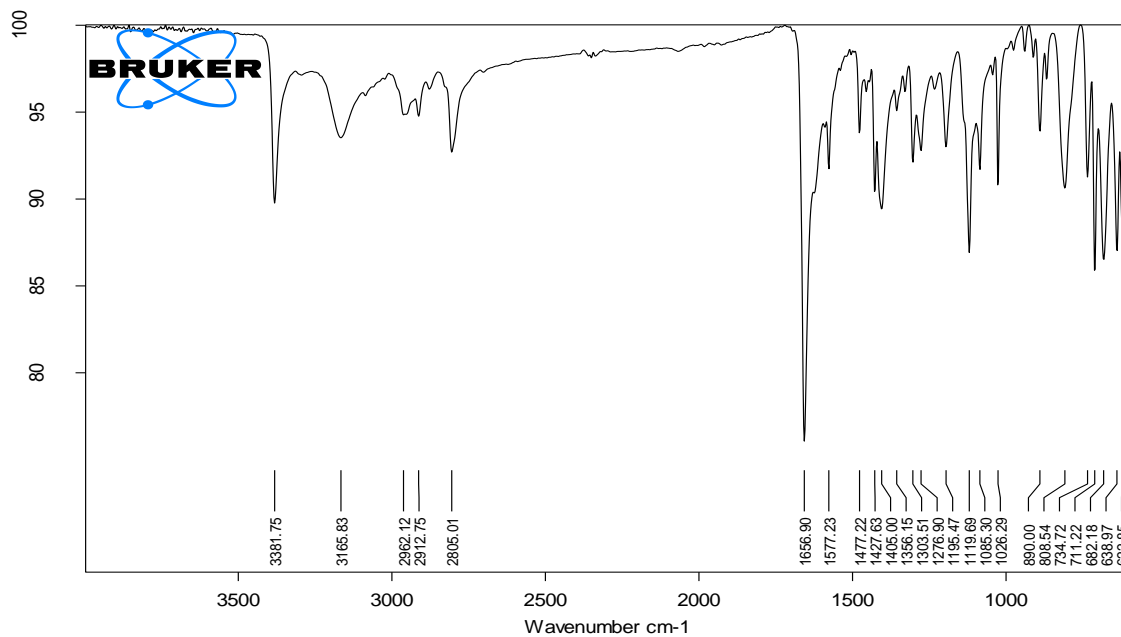


Anexo 7. 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (5d).

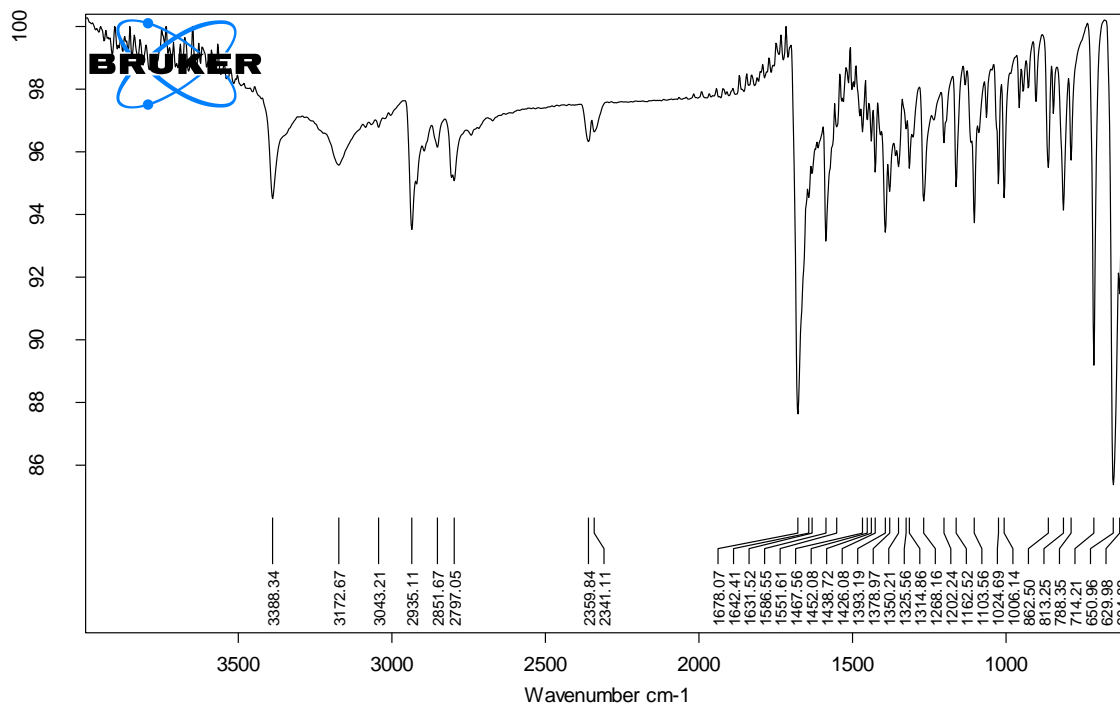


- Productos finales serie B:

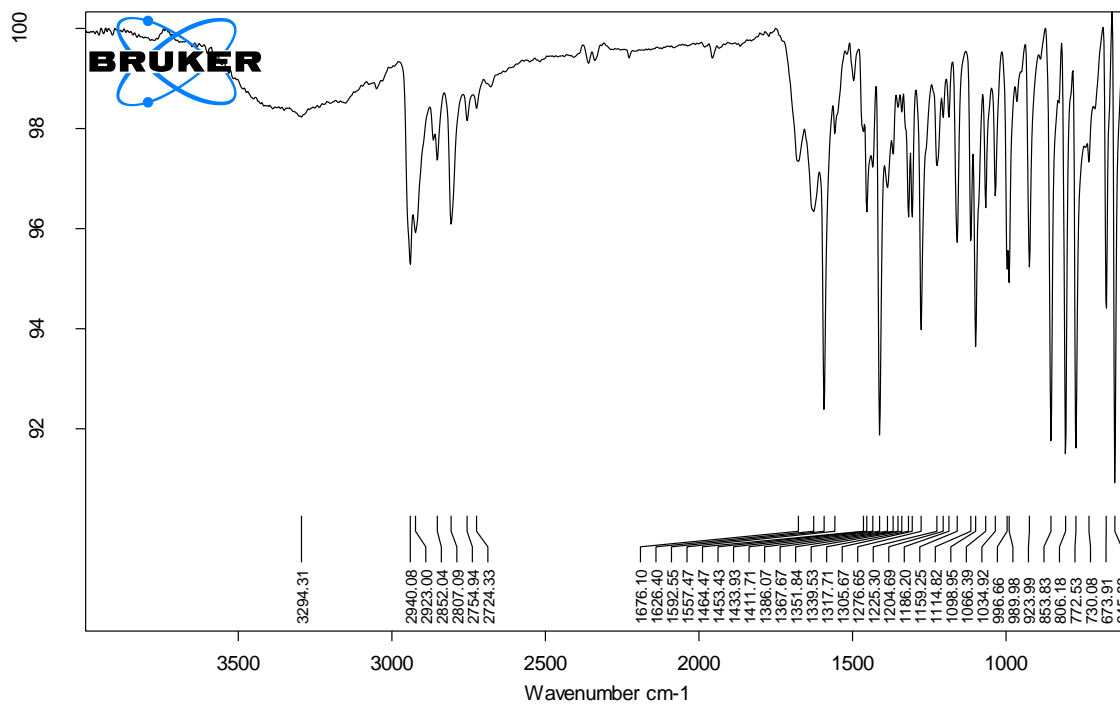
Anexo 8. 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (6b).



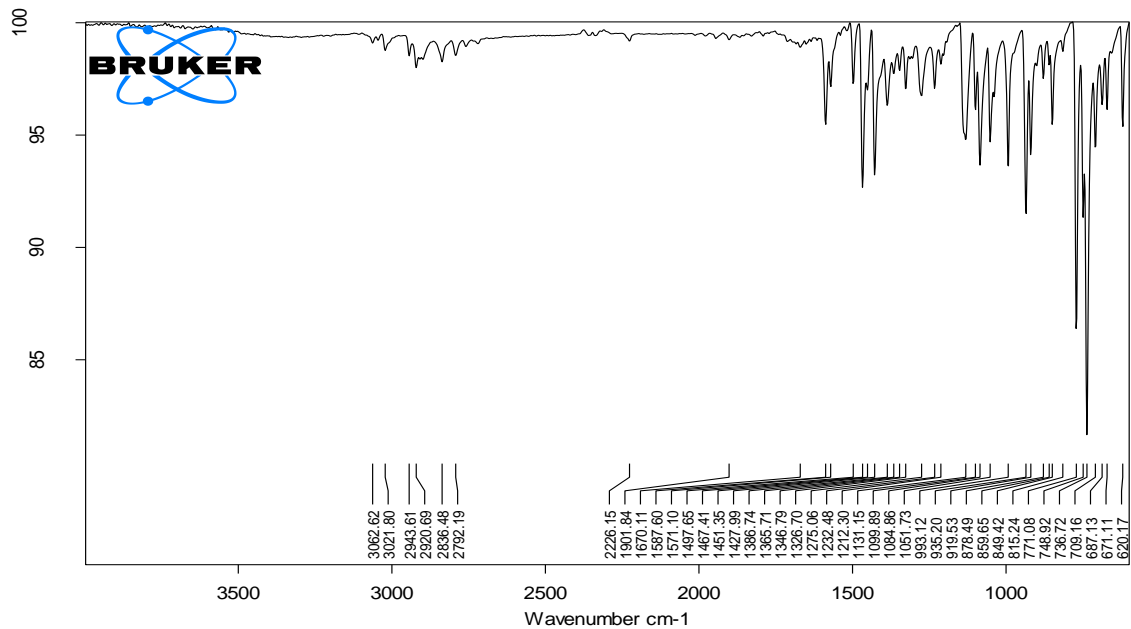
Anexo 9. 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (6e).



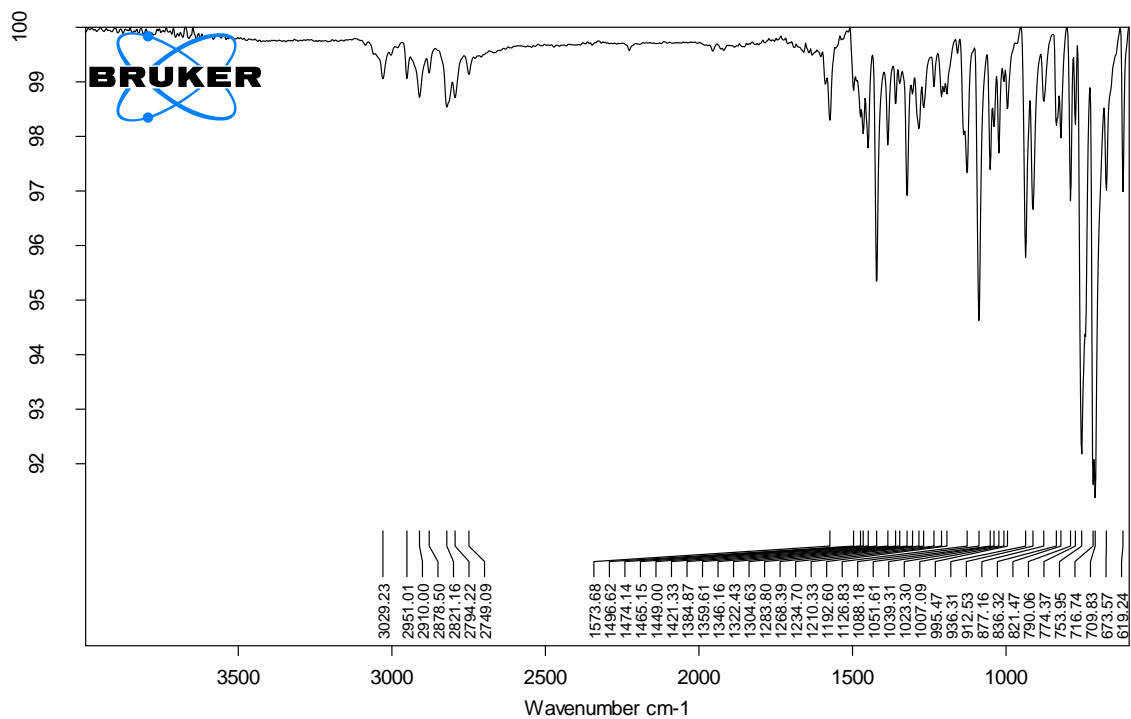
Anexo 10. 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetonitrilo (6f)



Anexo 11. 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetonitrilo (**6g**).

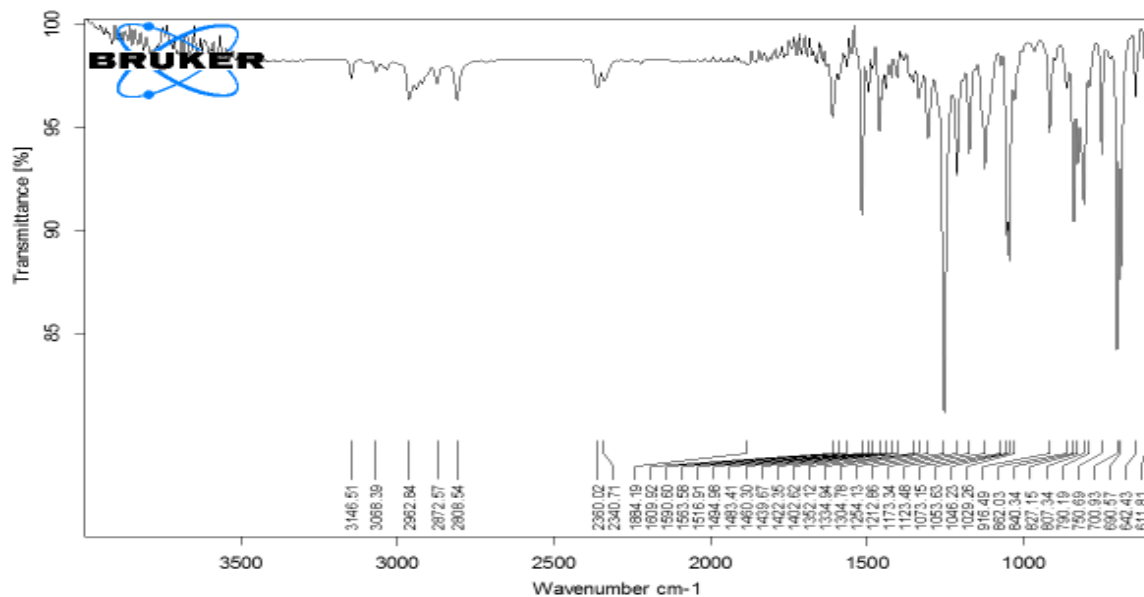


Anexo 12. 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6h**).

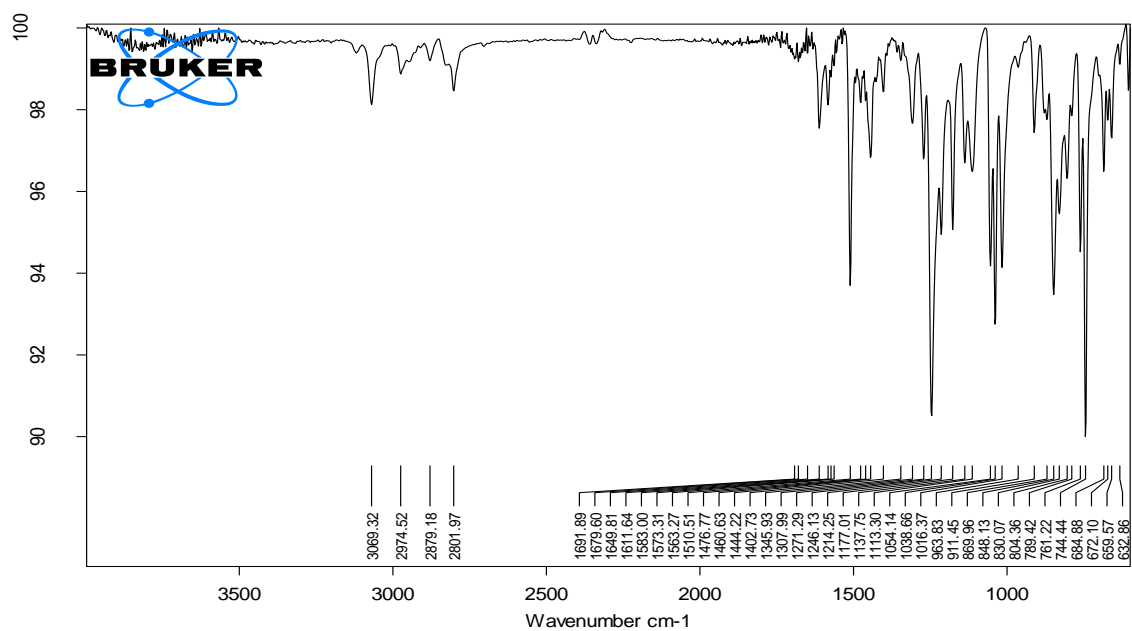


- **Productos finales serie C:**

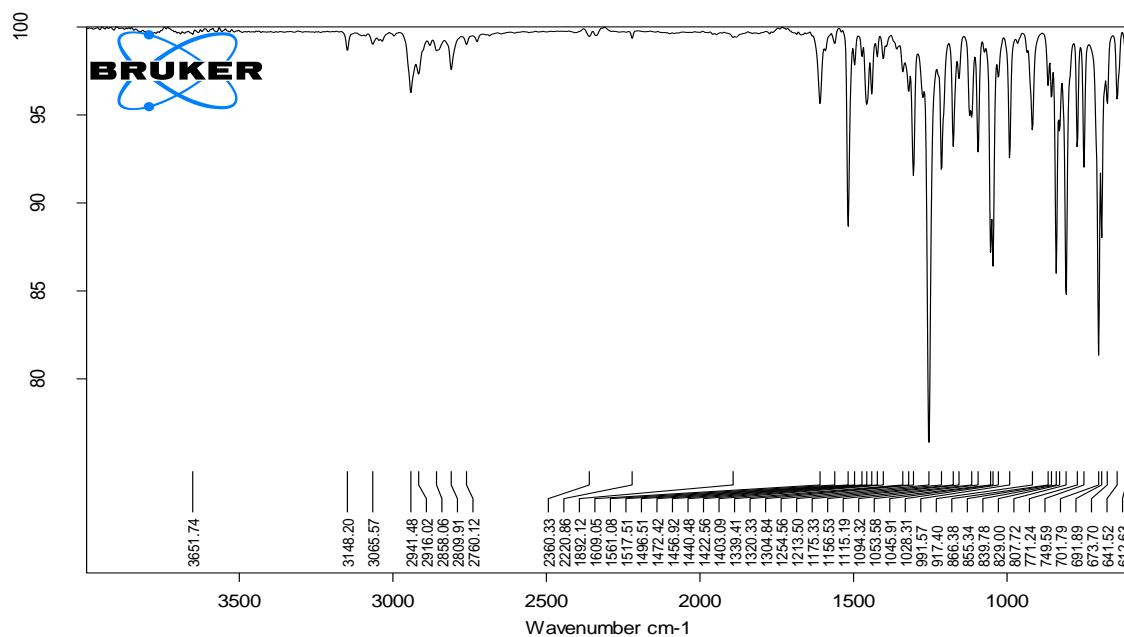
Anexo 13. 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**7a**).



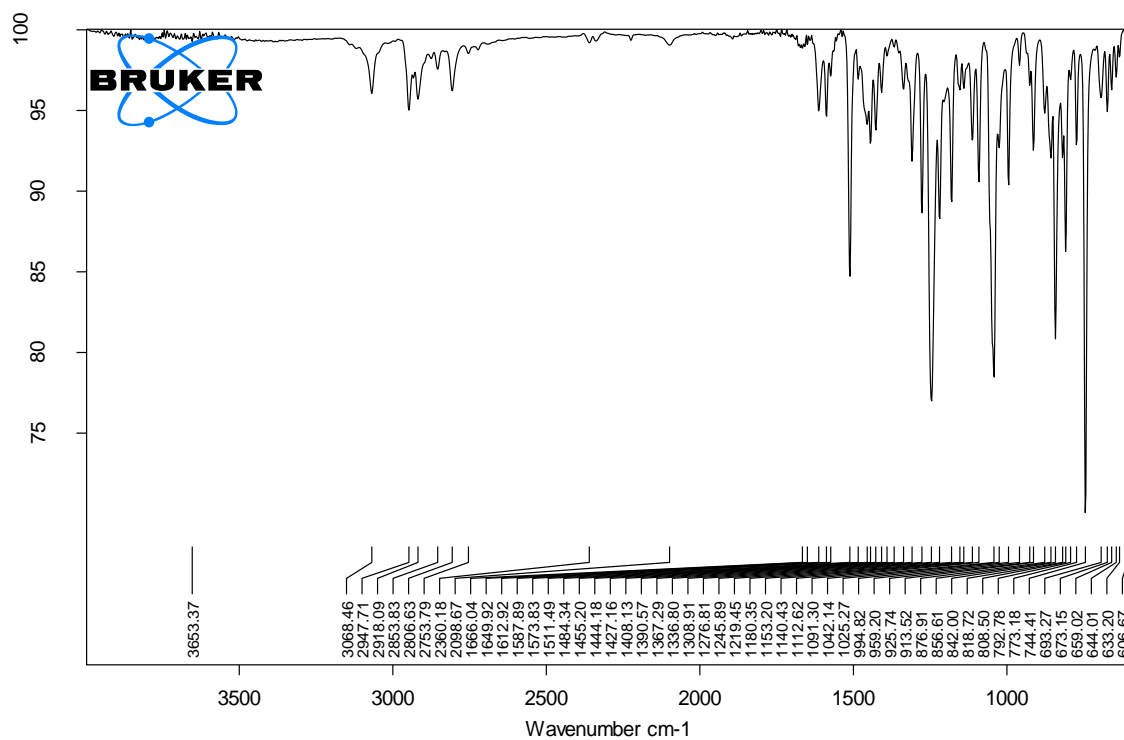
Anexo 14. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**7b**).



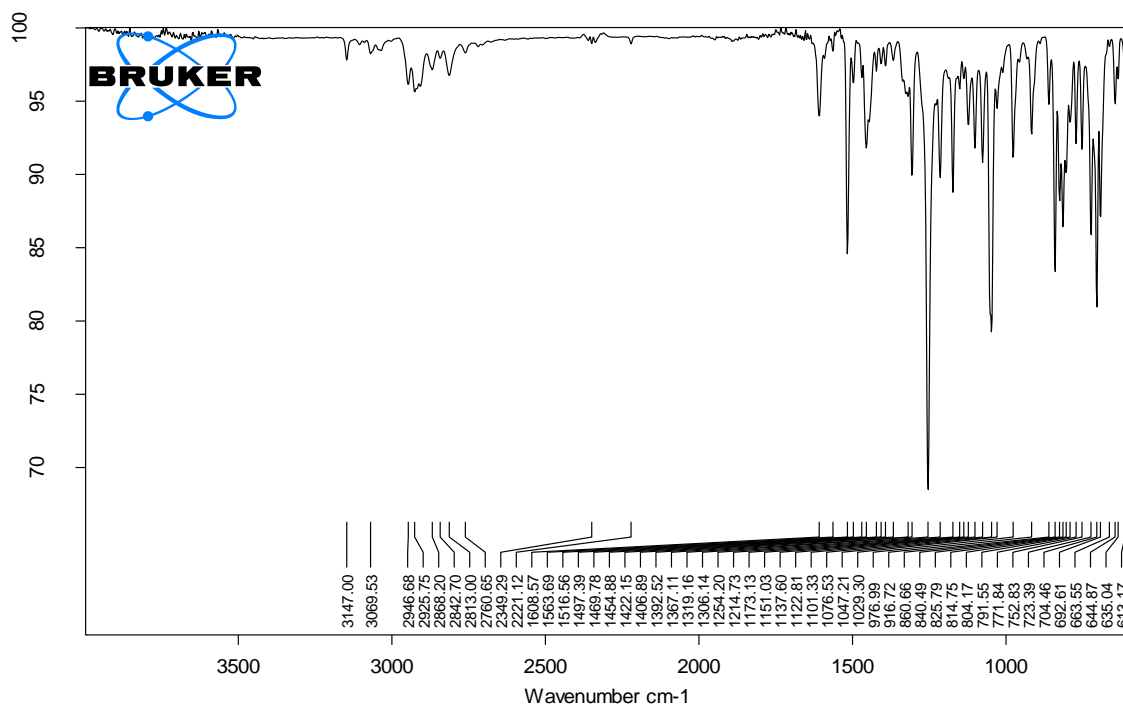
Anexo 15. 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**7e**)



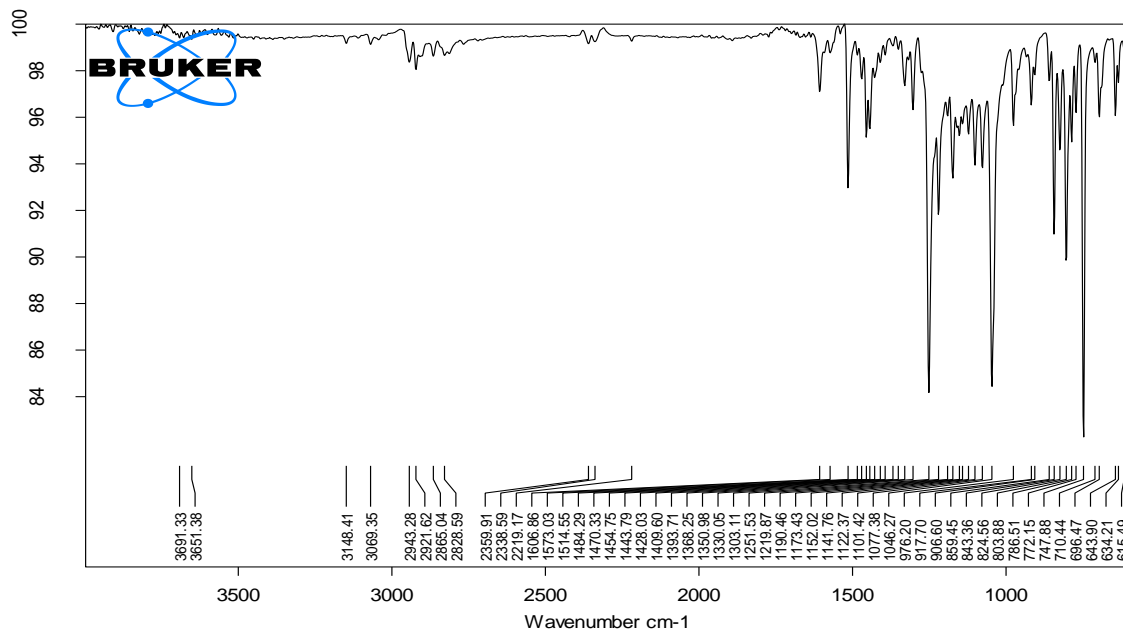
Anexo 16. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**7f**)



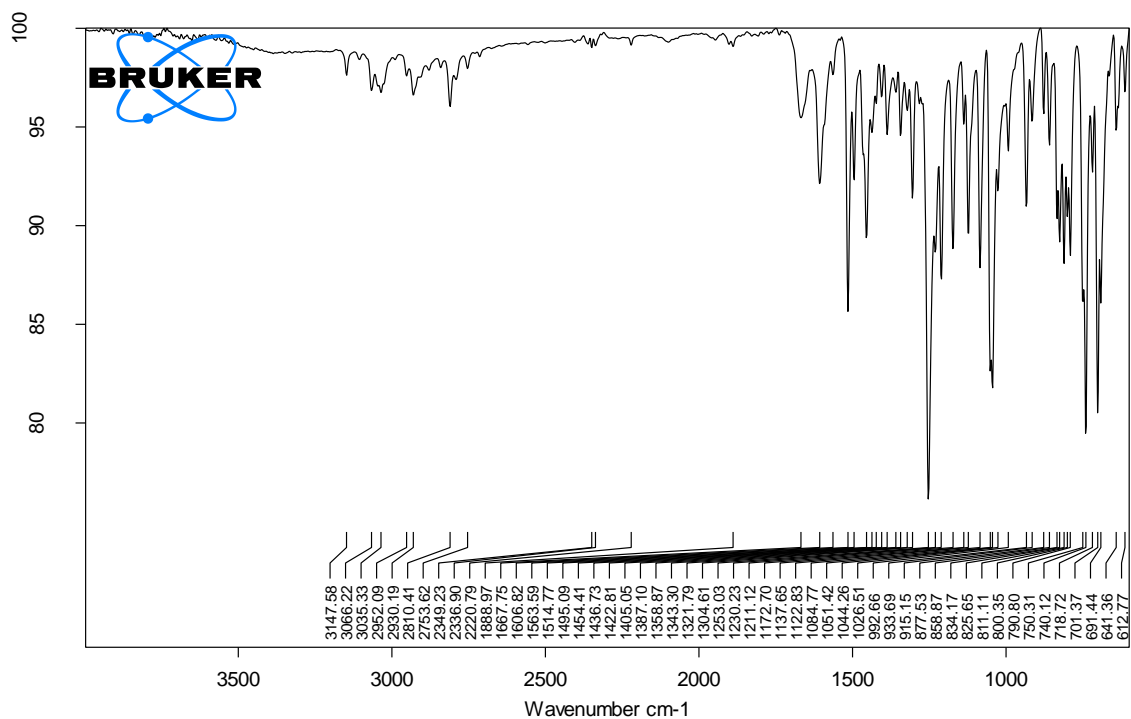
Anexo 17. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7i**).



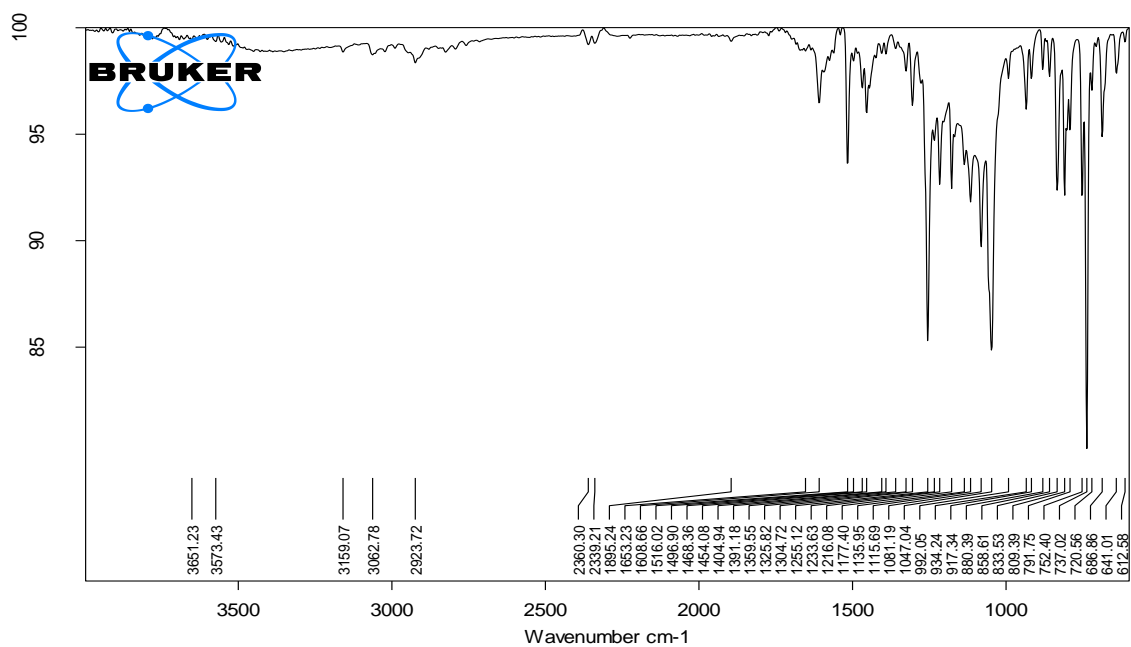
Anexo 18. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



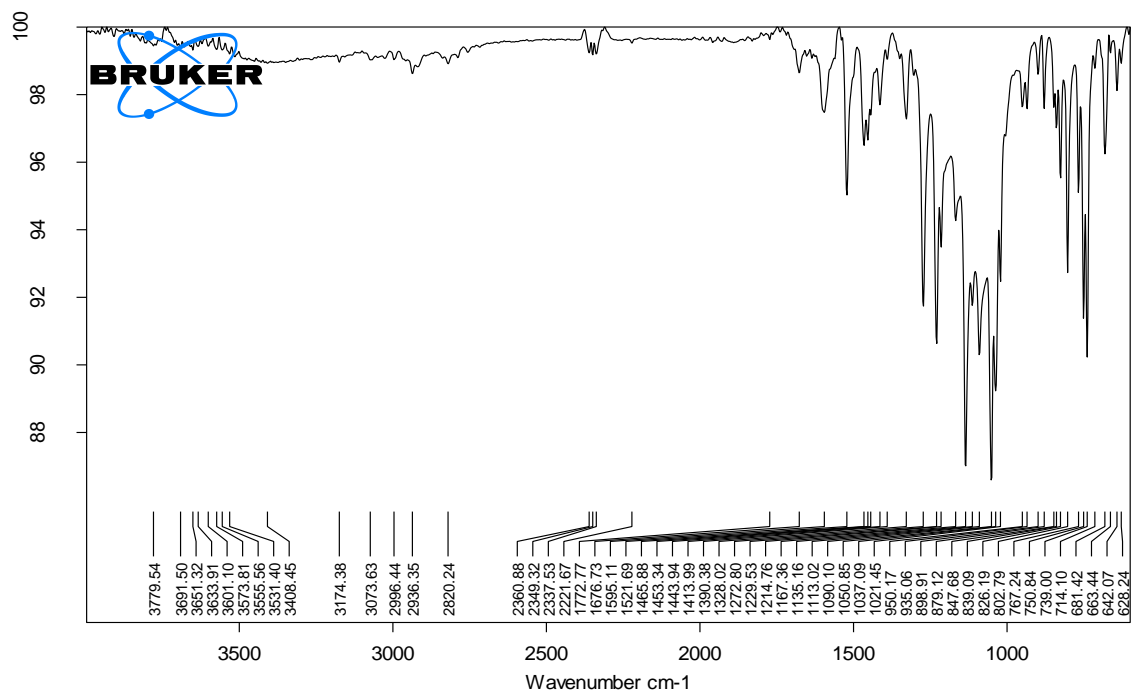
Anexo 19. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H-il)acetonitrilo (7m).



Anexo 20. 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H-il)acetonitrilo (7m).



Anexo 21. 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)acetonitrilo (**7p**).

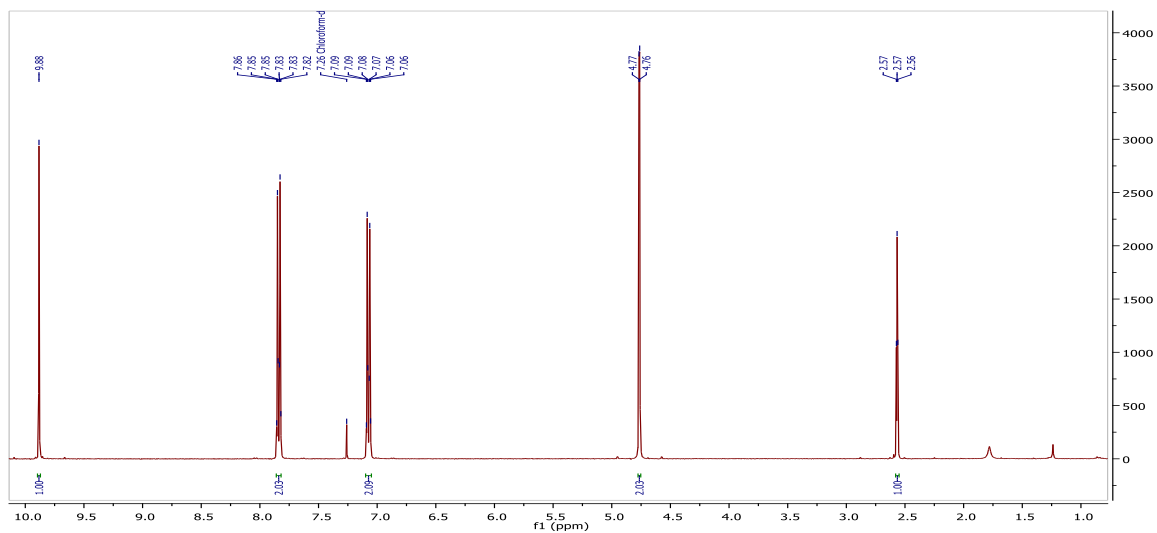


ANEXO II

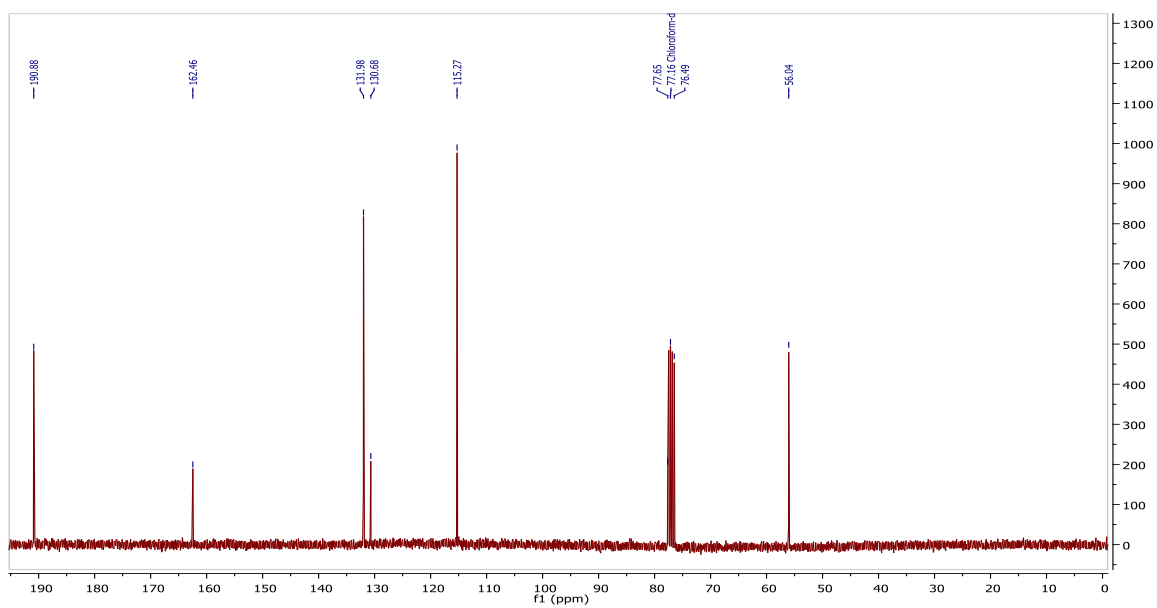
Espectros RMN de los compuestos sintetizados

- Precursores:

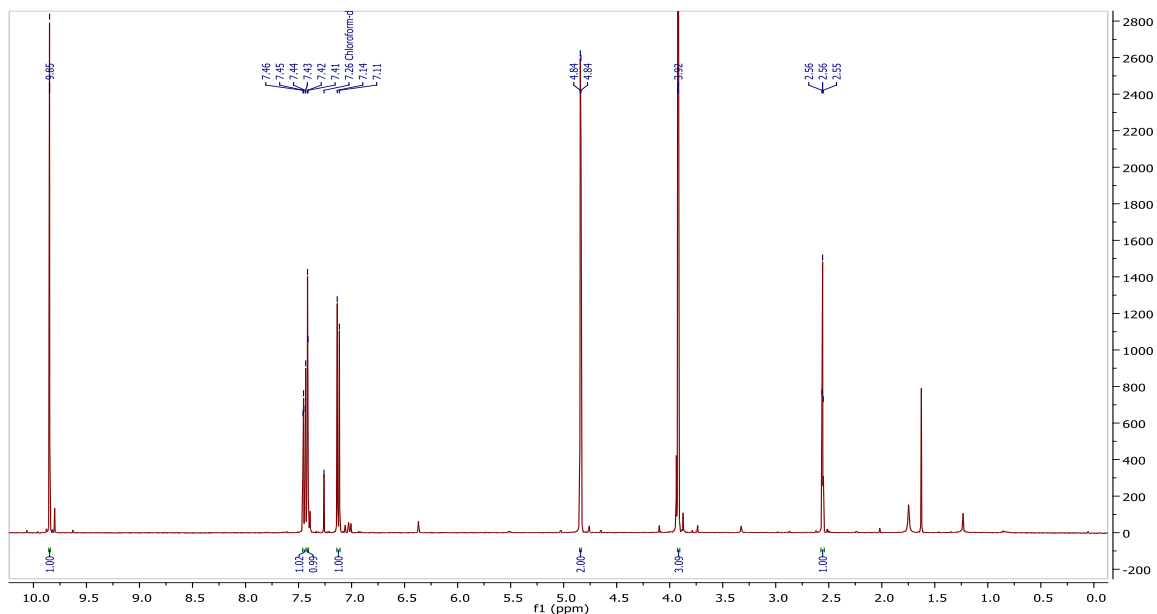
Anexo 1. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a).



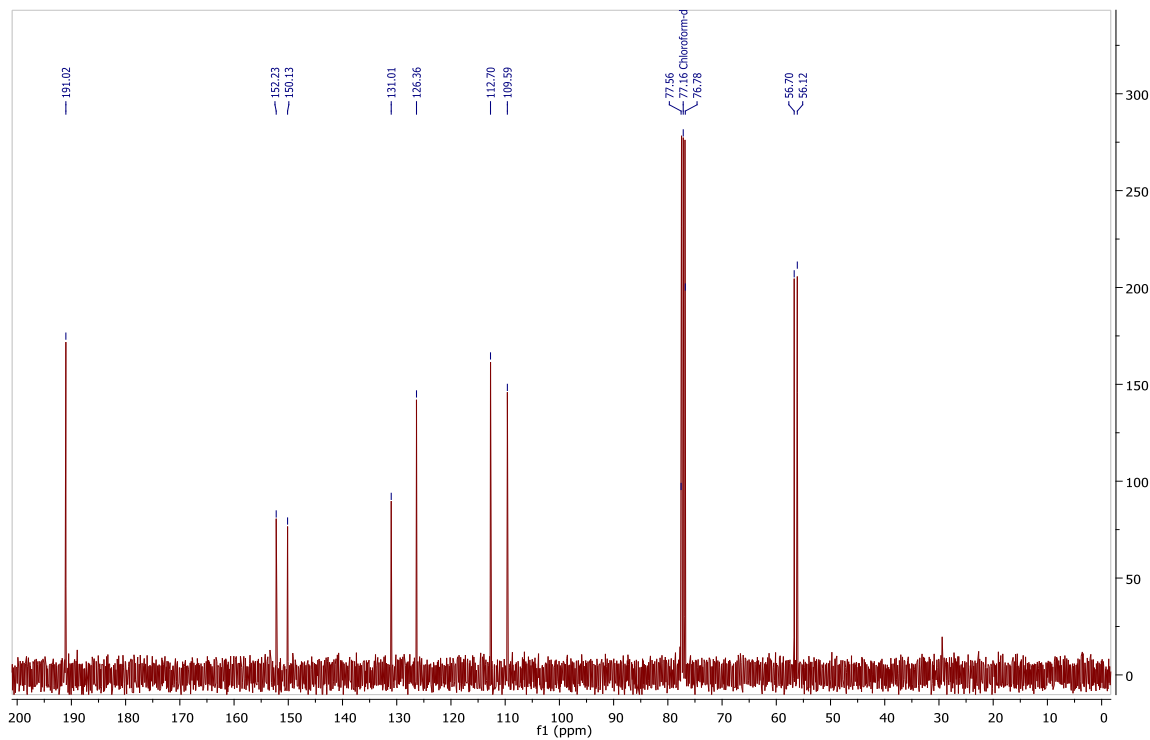
Anexo 2. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3a).



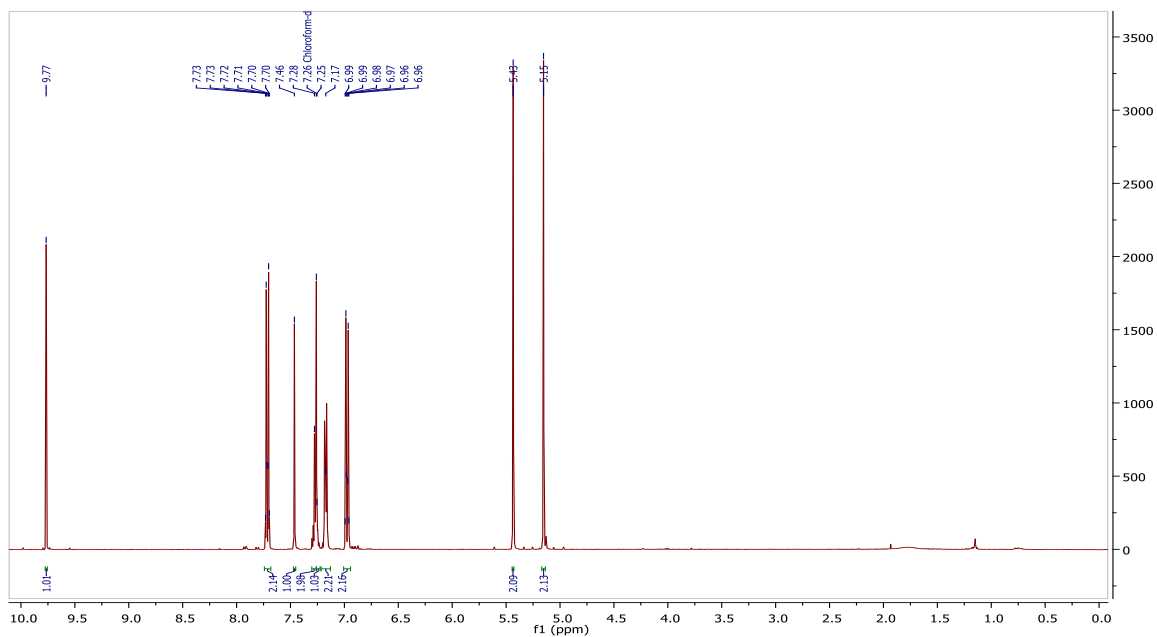
Anexo 3. Espectro 1H – RMN del compuesto 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).



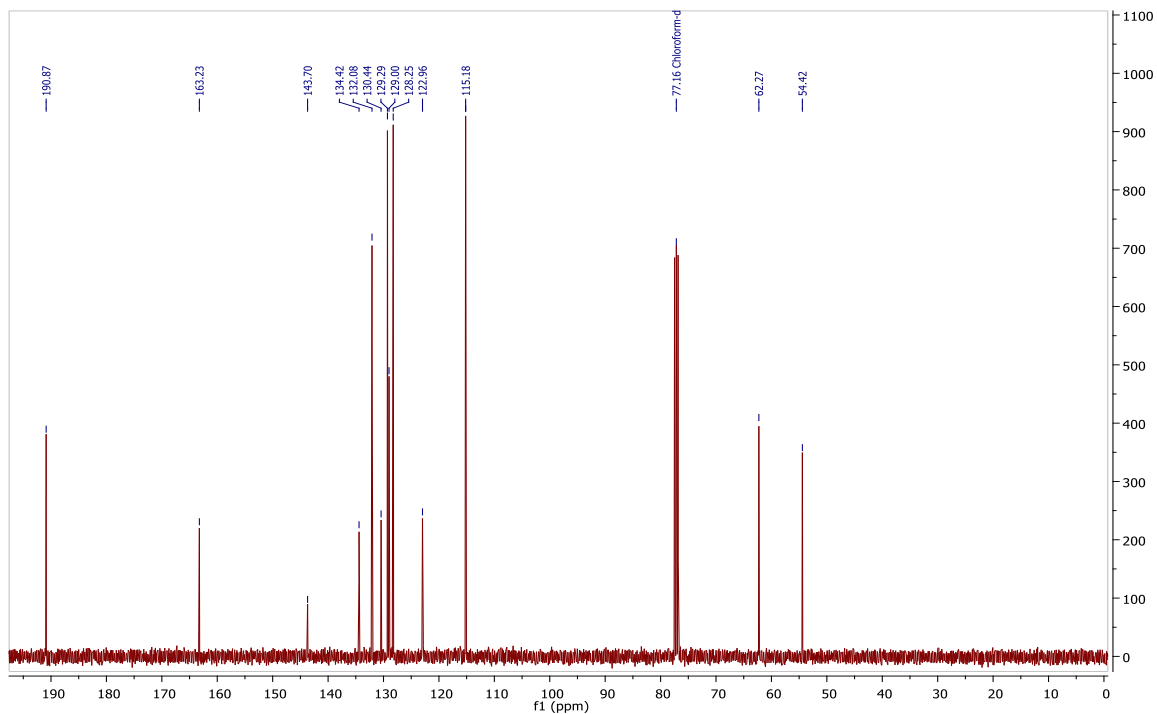
Anexo 4. Espectro 13C – RMN del compuesto 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi) benzaldehído. (3b).



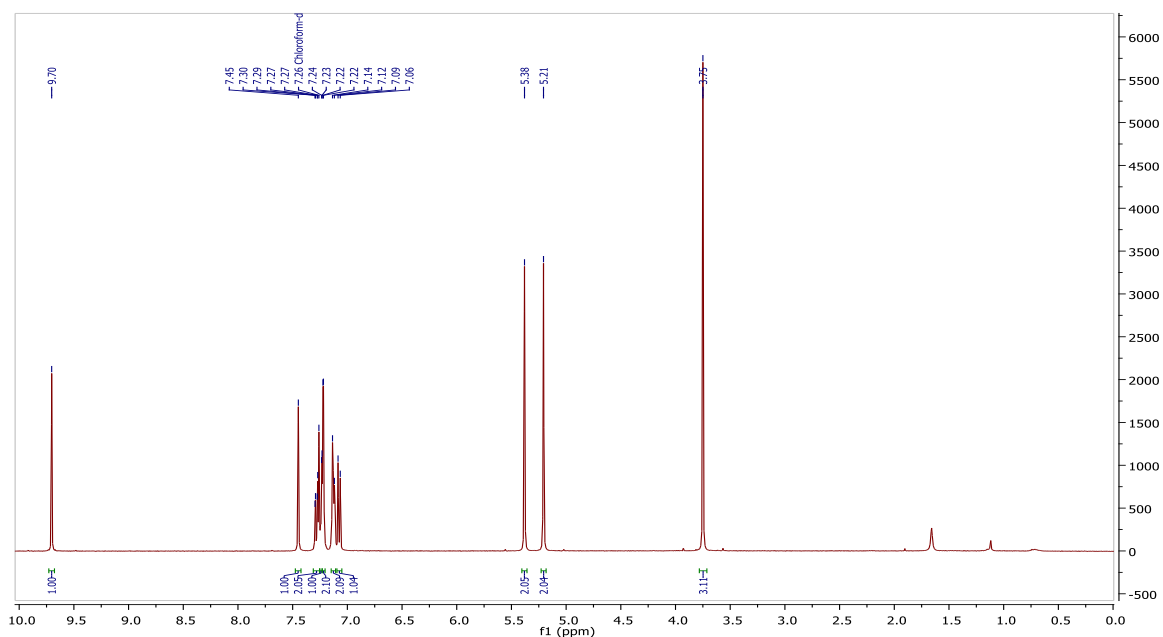
Anexo 5. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (**4a**).



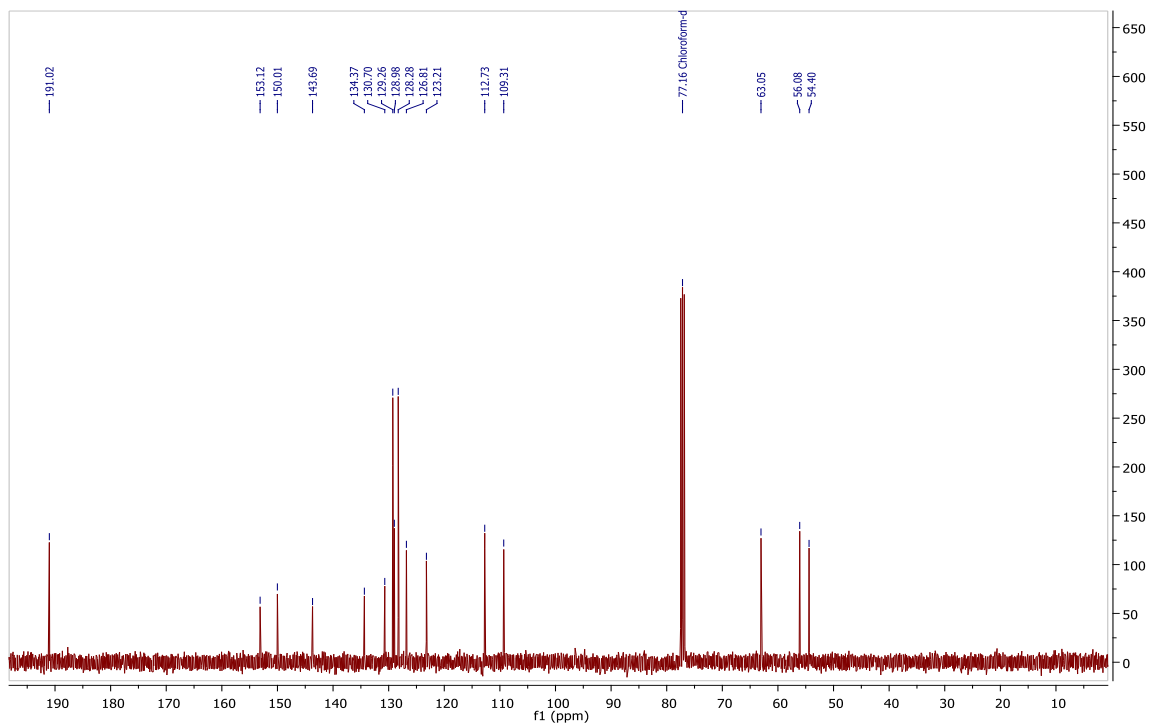
Anexo 6. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi) benzaldehído (**4a**).



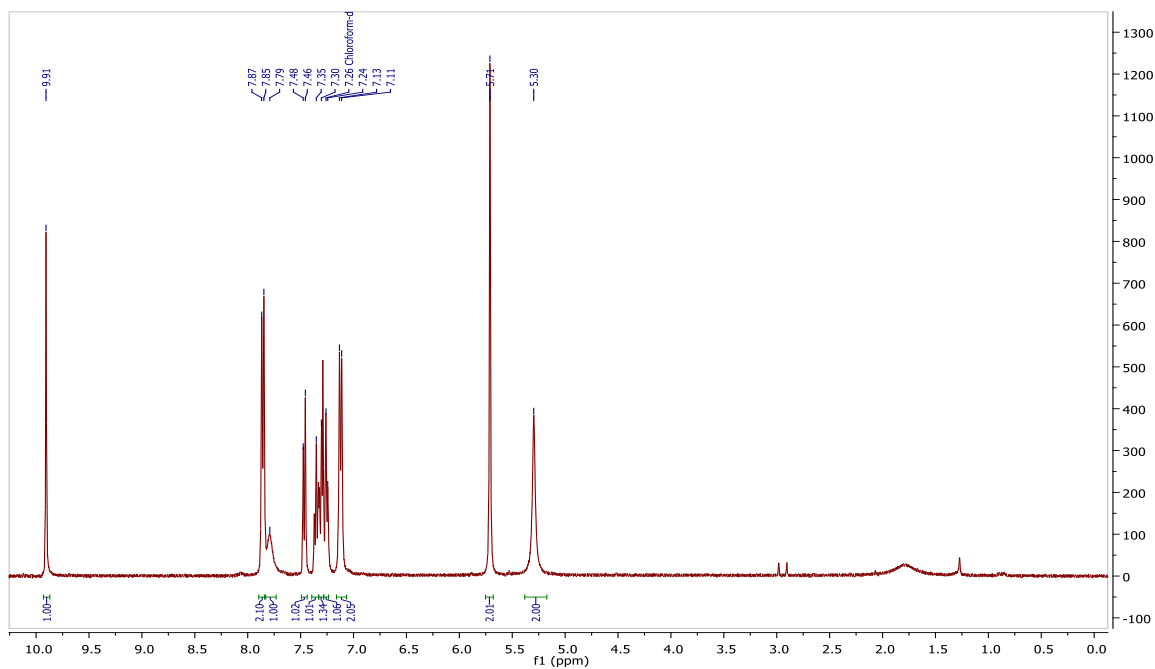
Anexo 7. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (**4b**).



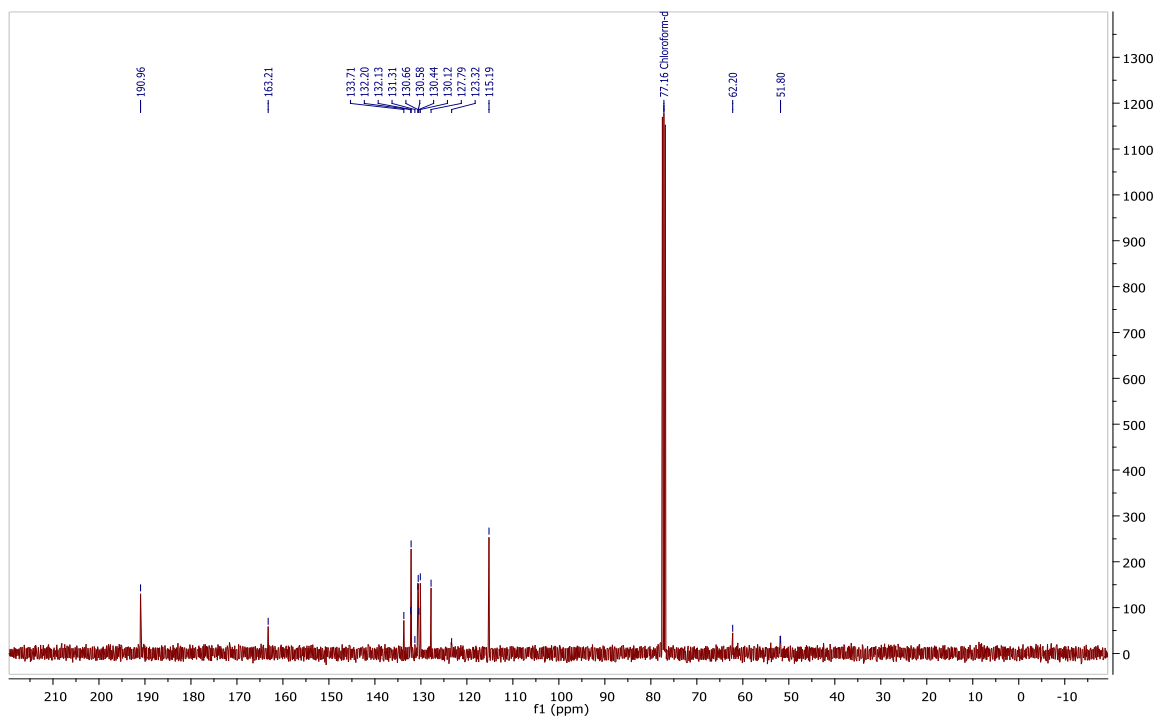
Anexo 8. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (**4b**).



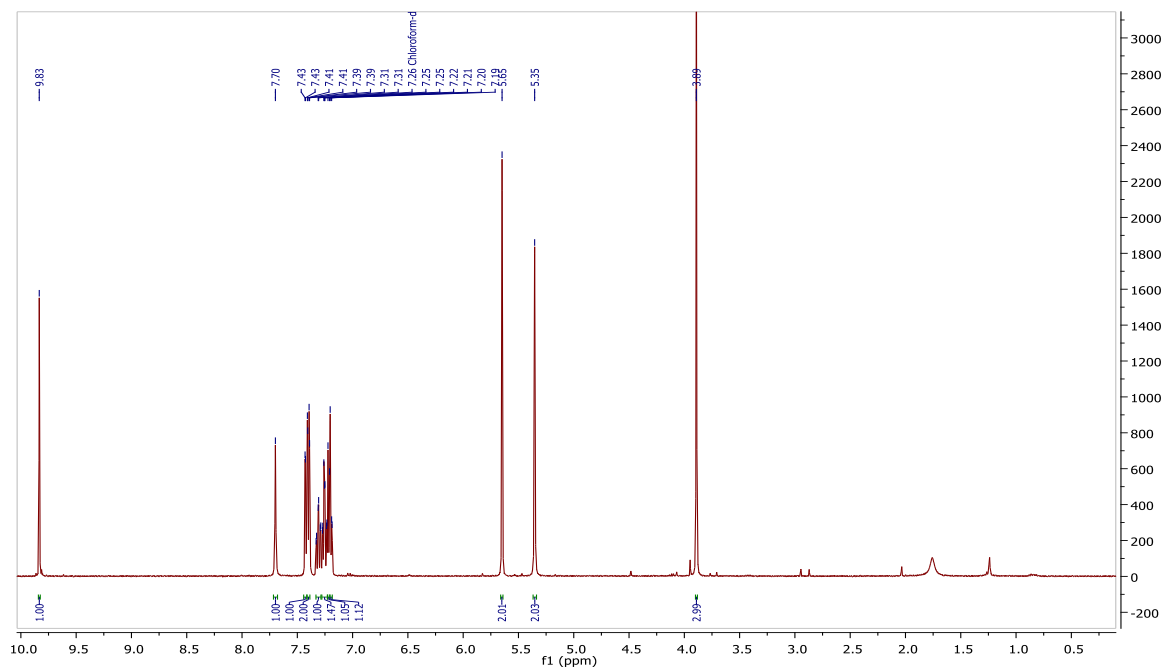
Anexo 9. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (**4c**).



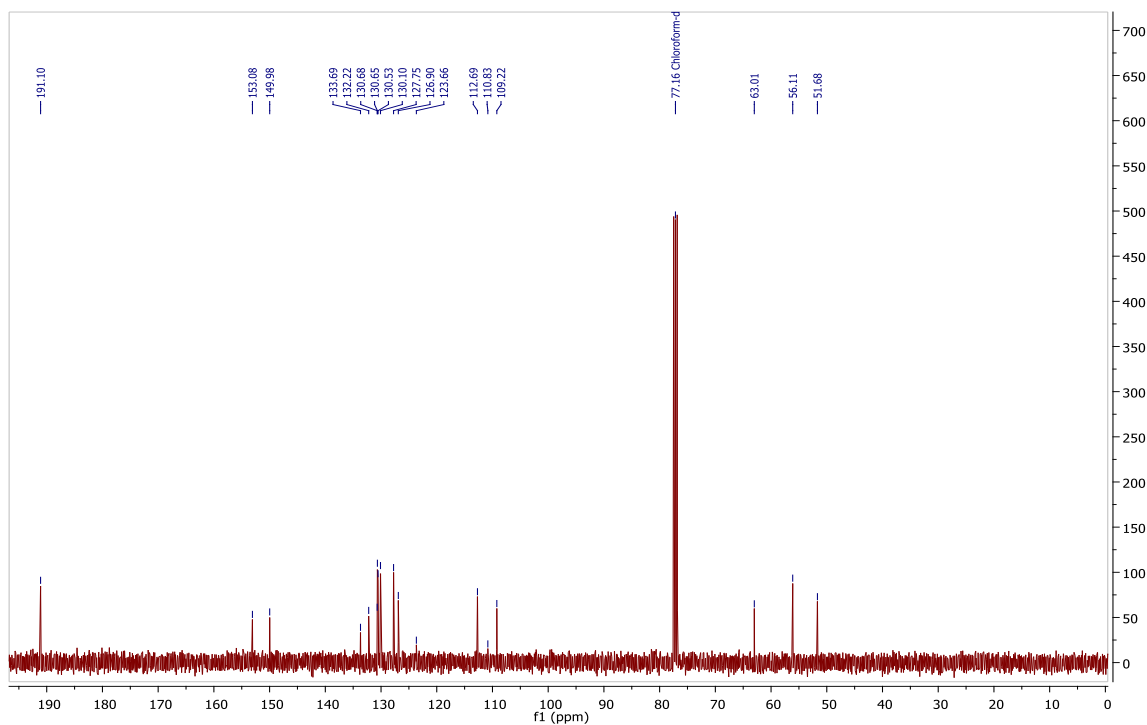
Anexo 10. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldehído (**4c**).



Anexo 11. Espectro ^1H – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (**4d**).

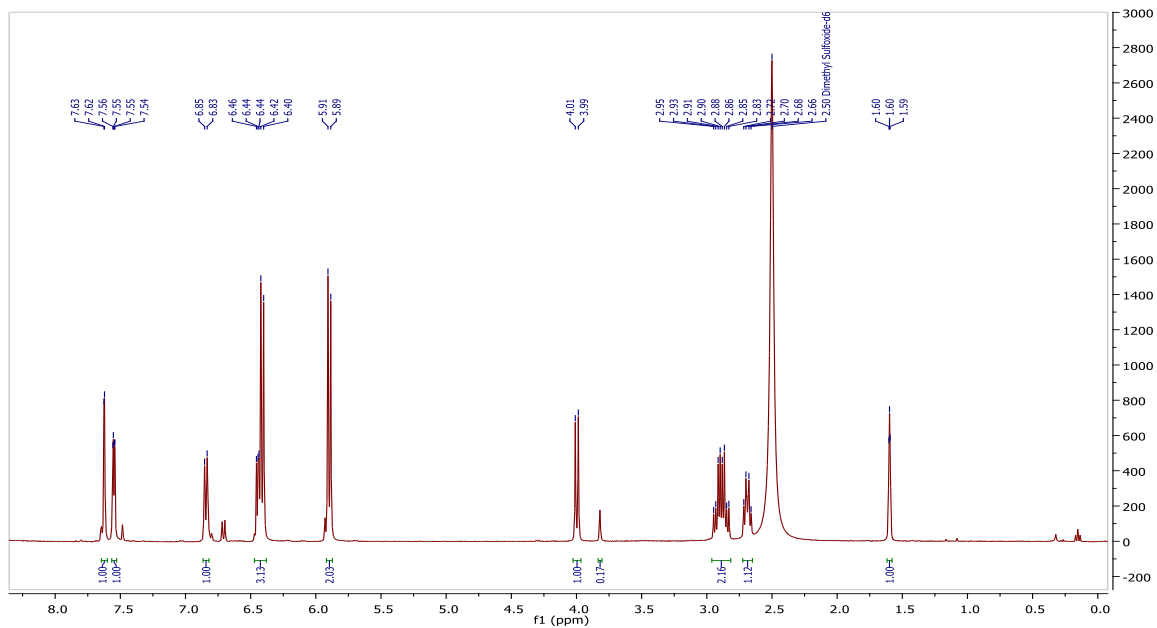


Anexo 12. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldehído (**4d**).

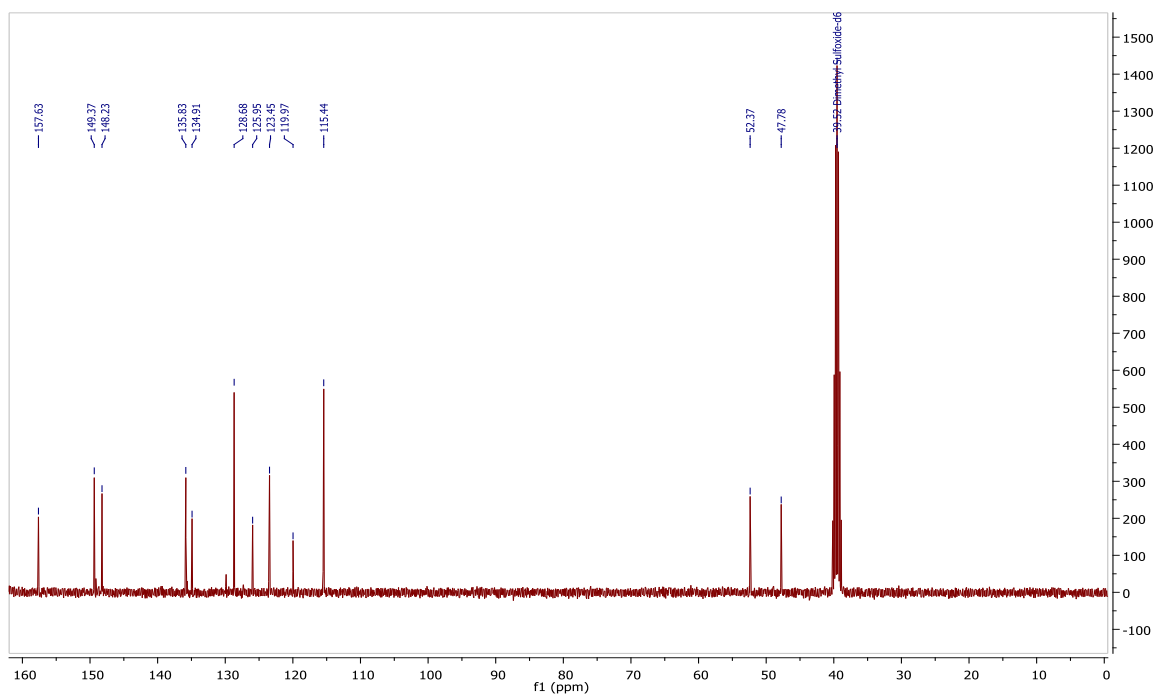


- **Productos finales serie A:**

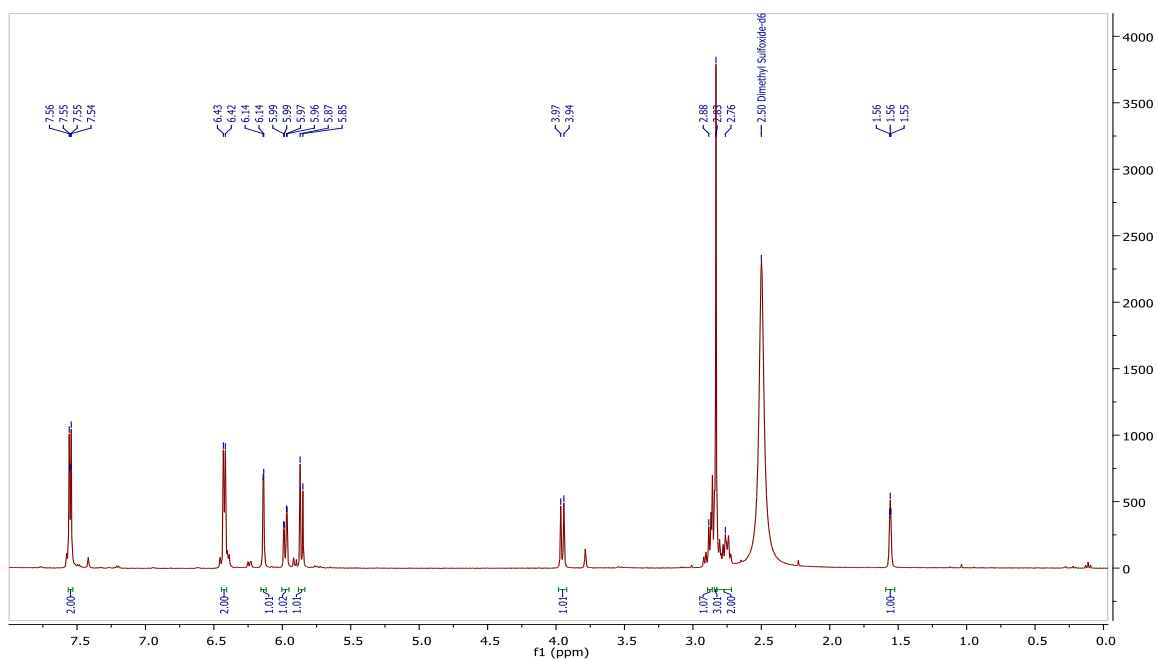
Anexo 13. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (**5b**).



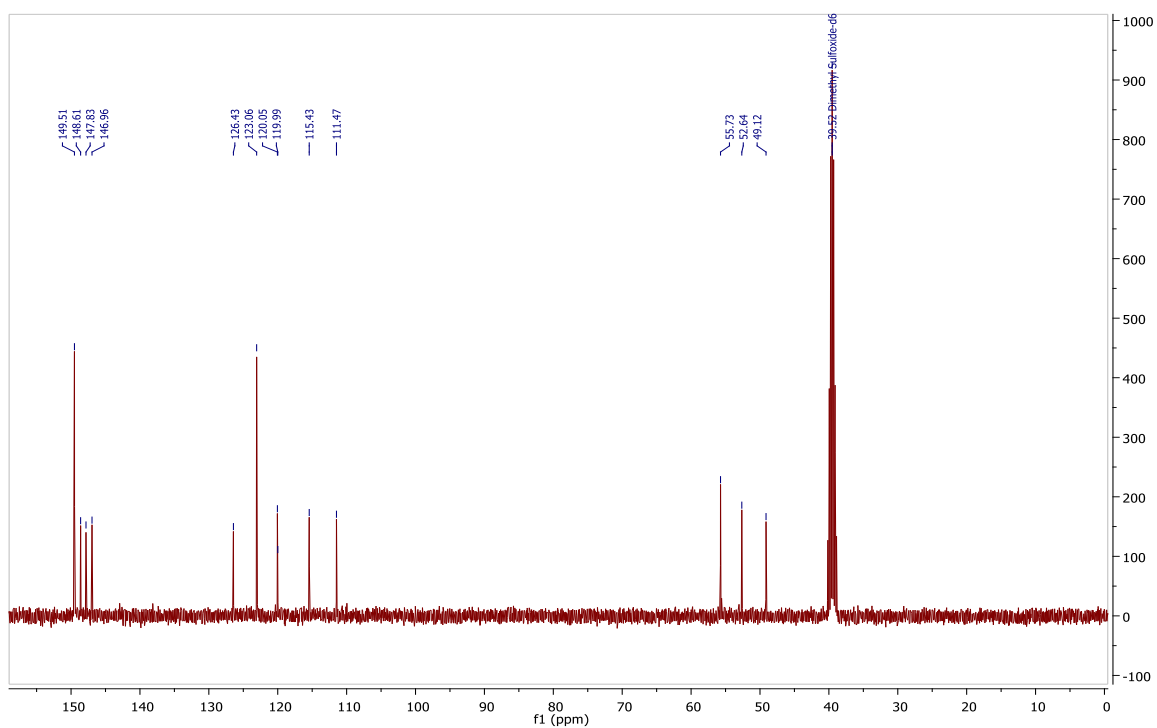
Anexo 14. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(4-hidroxifenil)-2-((piridin-3-ilmetil)amino)acetonitrilo (**5b**).



Anexo 15. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (**5d**).

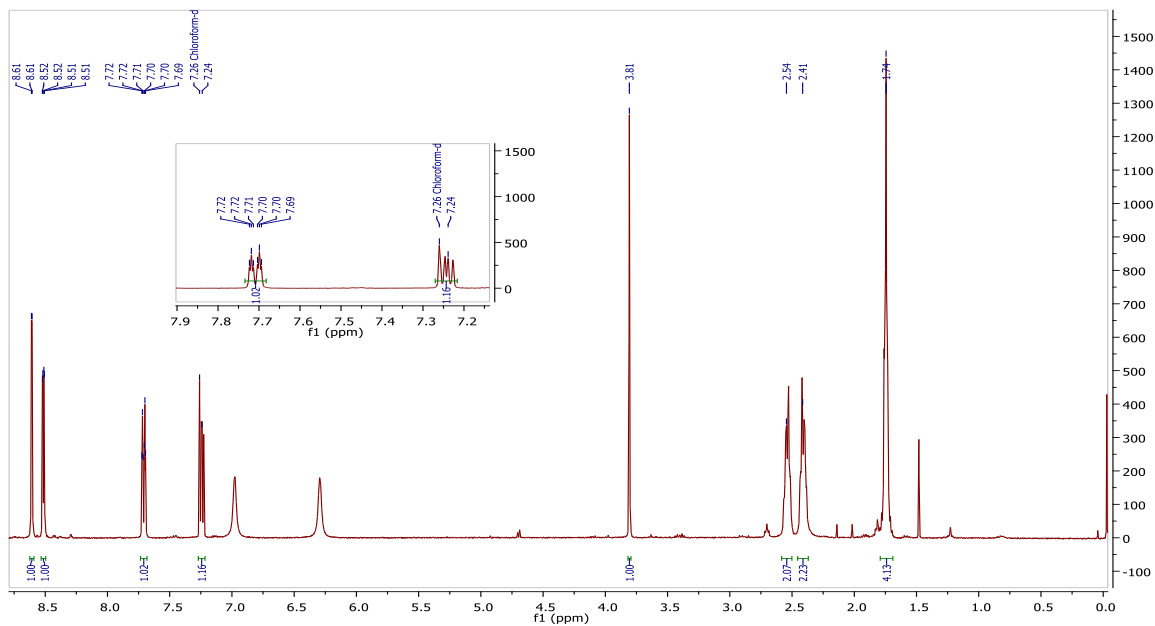


Anexo 16. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-((piridin-4-ilmetil)amino)acetonitrilo (**5d**).

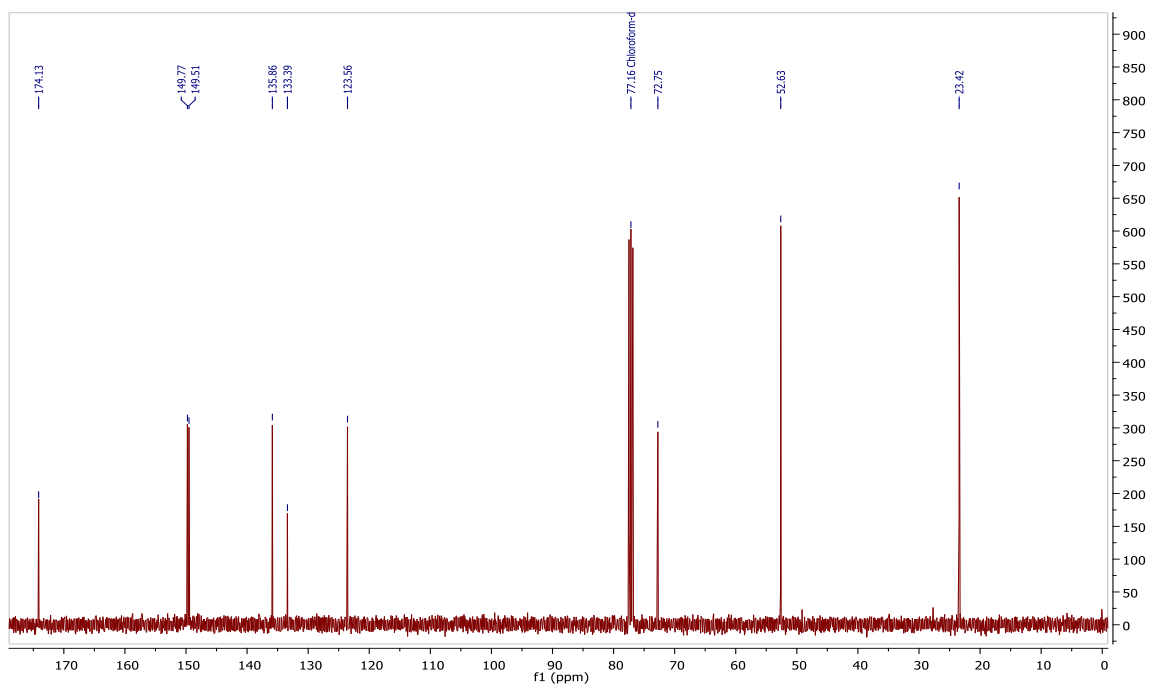


- **Productos finales serie B:**

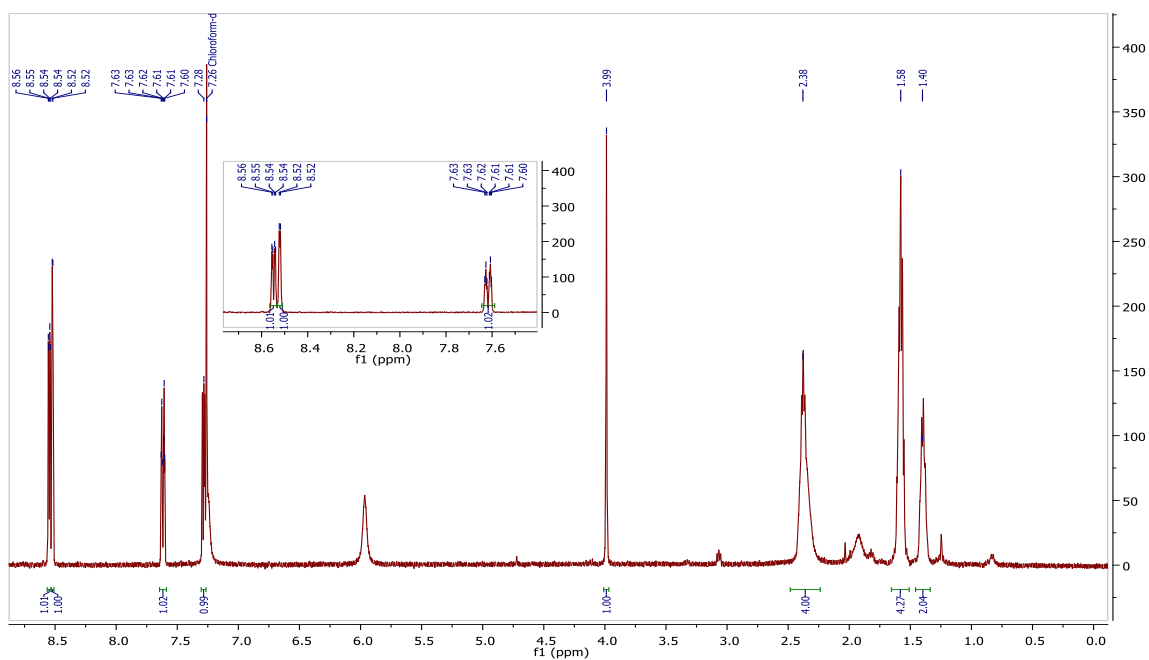
Anexo 17. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**6b**).



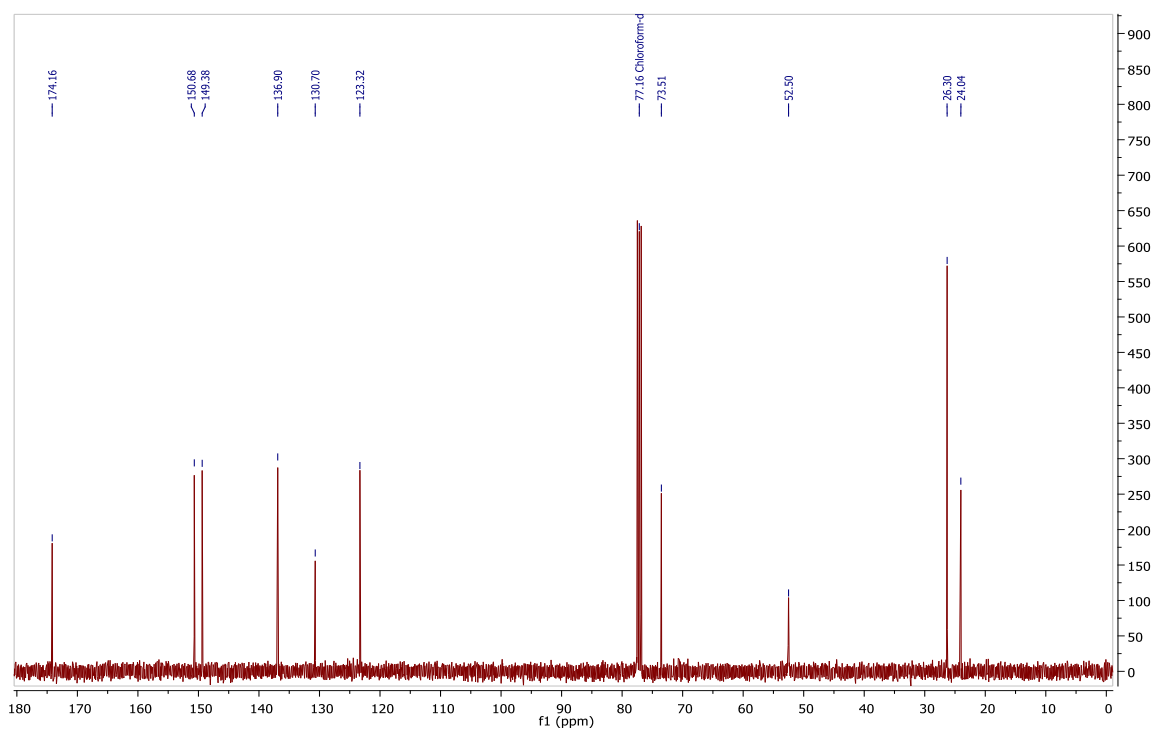
Anexo 18. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(piridin-3-il)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**6b**).



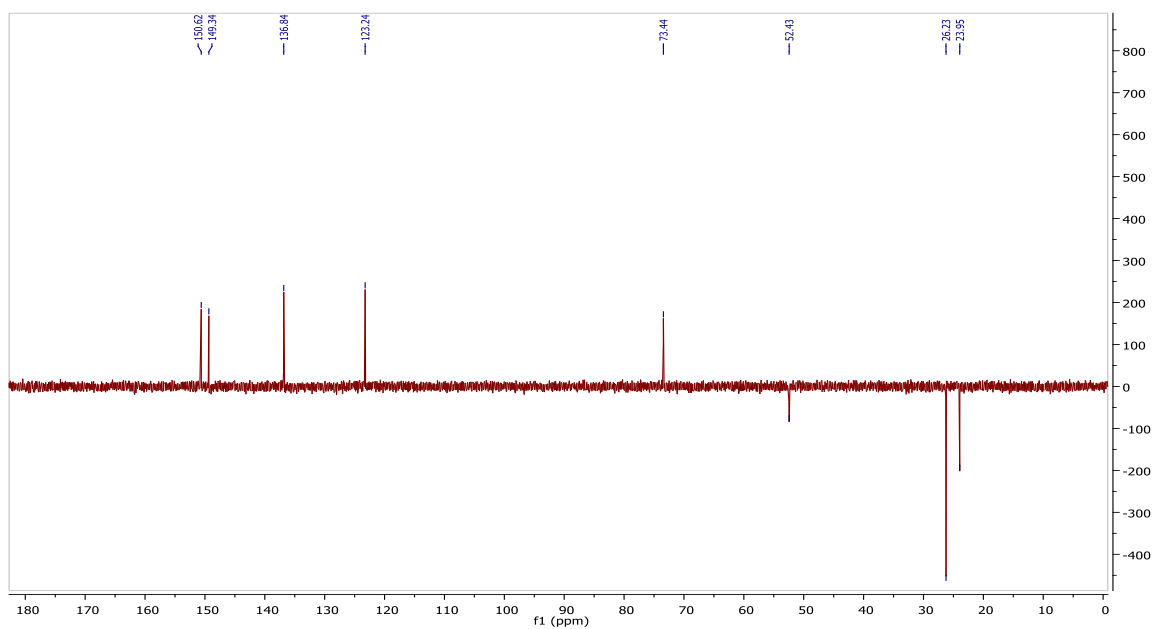
Anexo 19. Espectro ^1H – RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6e**).



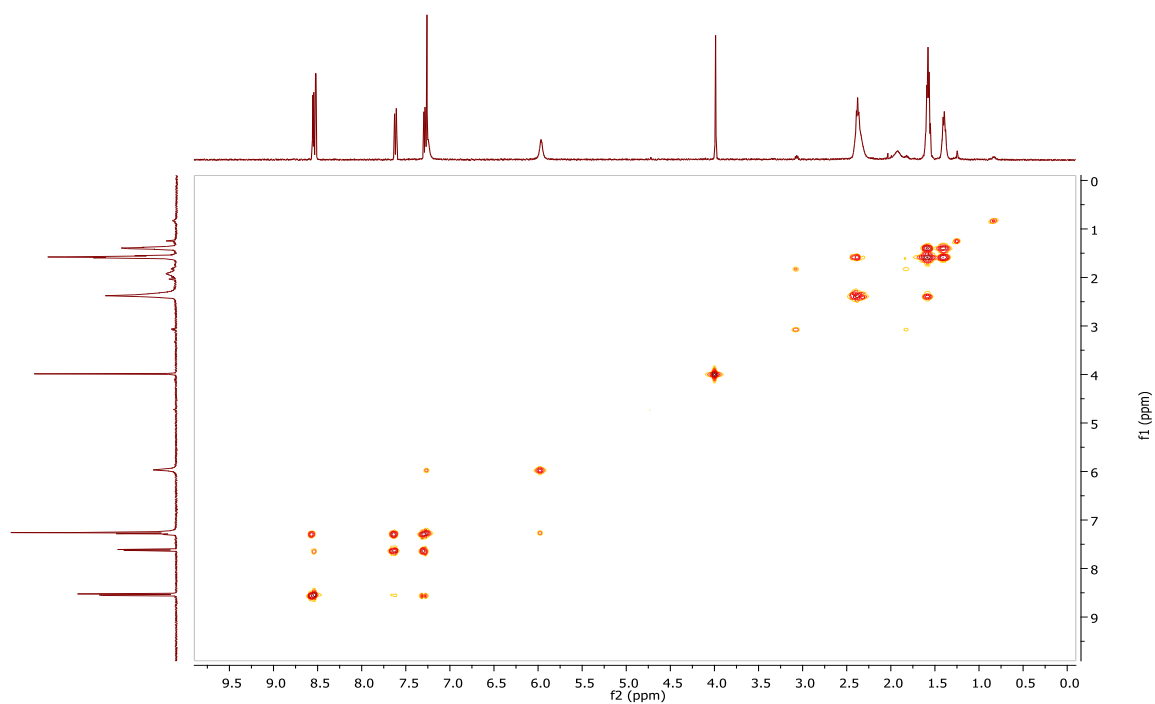
Anexo 20. Espectro ^{13}C – RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6e**).



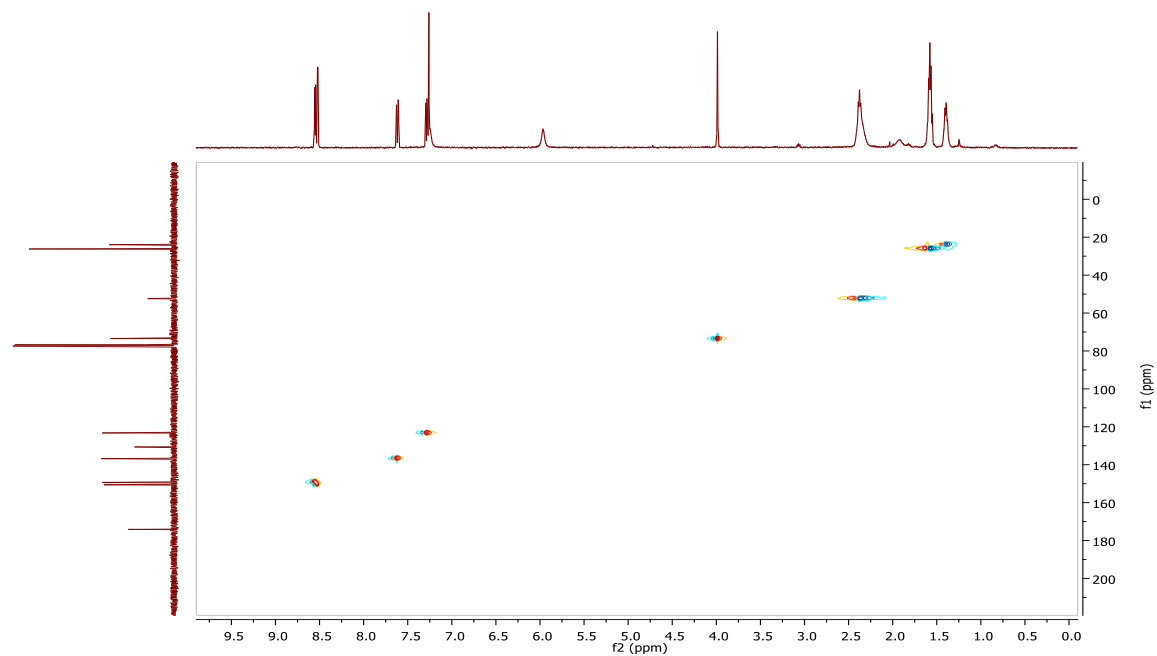
Anexo 21. Espectro DEPT – 135 RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6e**).



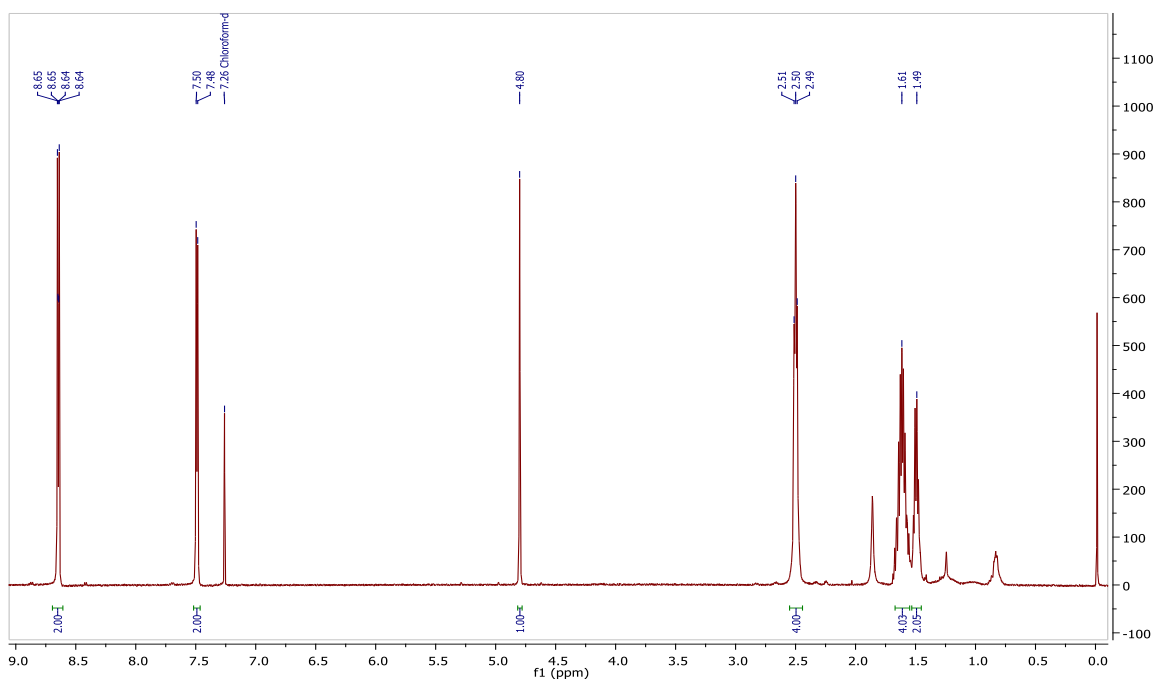
Anexo 22. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6e**).



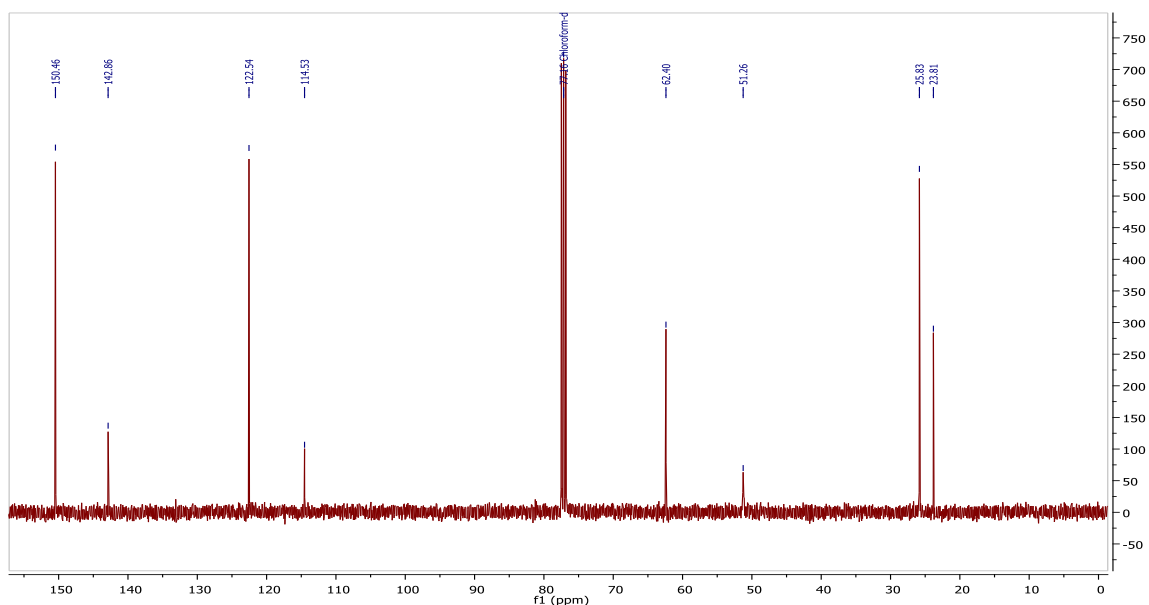
Anexo 23. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6e**).



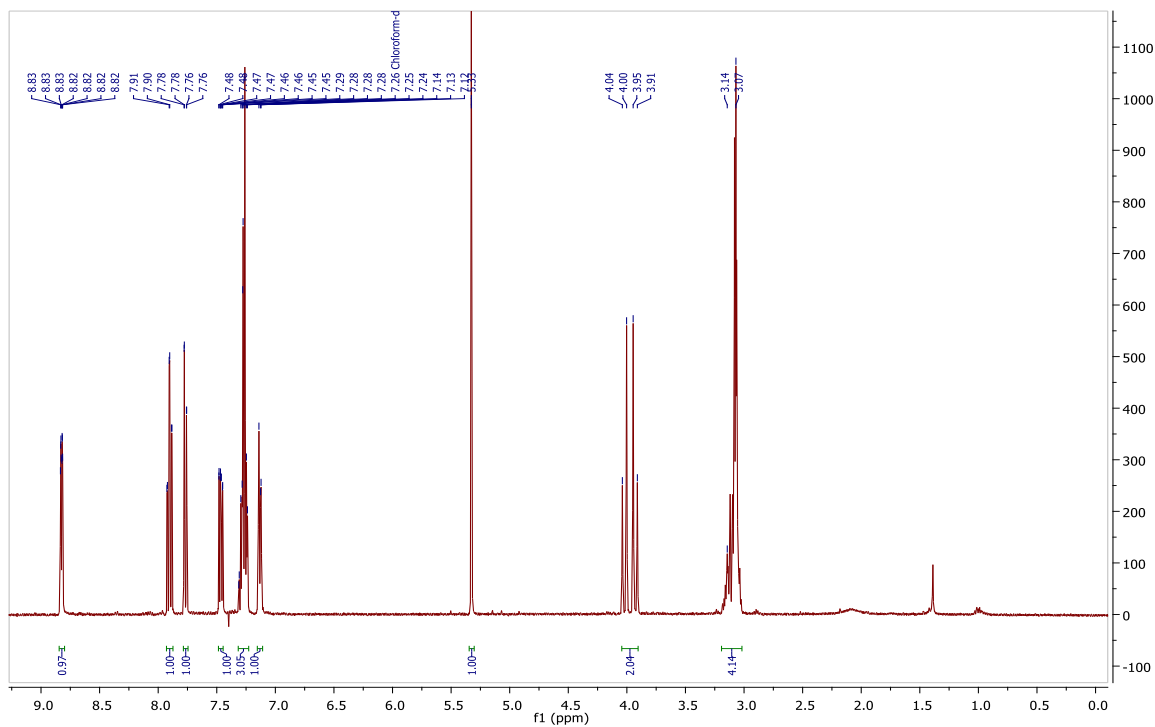
Anexo 24. Espectro 1H-RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetonitrilo (**6f**).



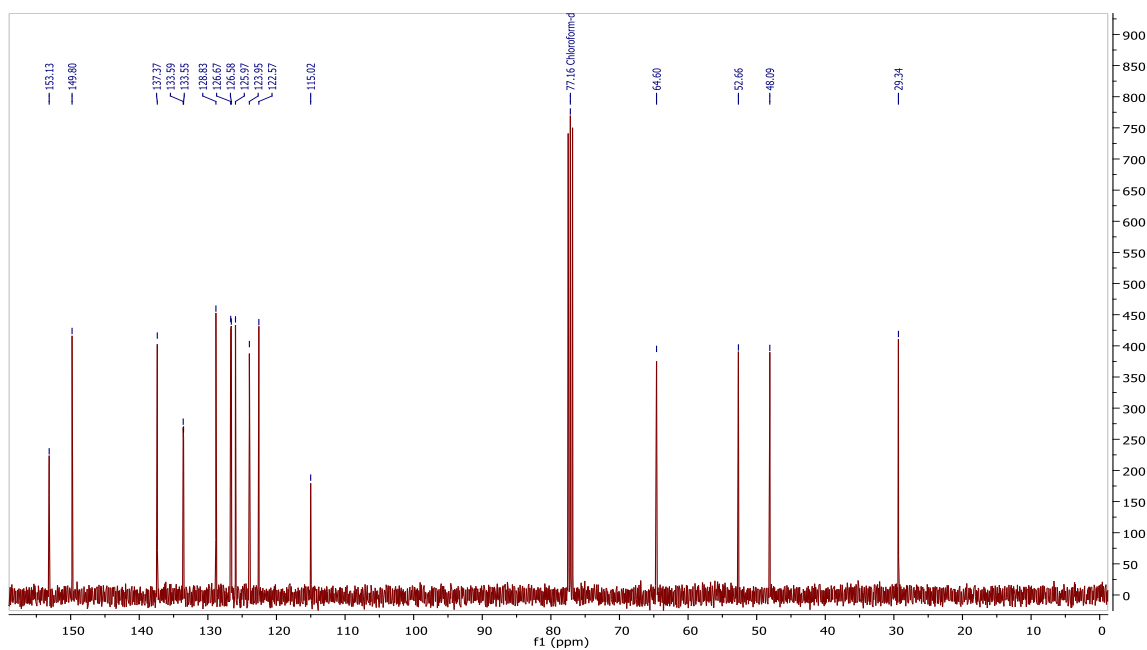
Anexo 25. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(piperidin-1-il)-2-(piridin-4-il)acetonitrilo (**6f**).



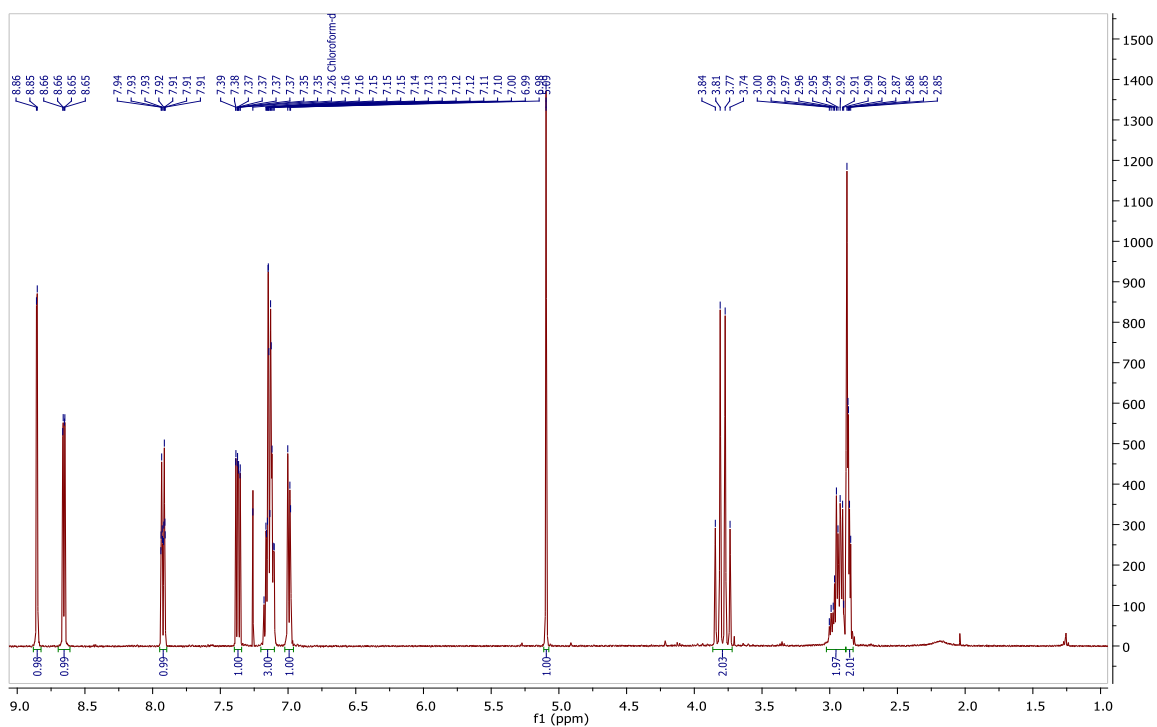
Anexo 26. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetonitrilo (**6g**).



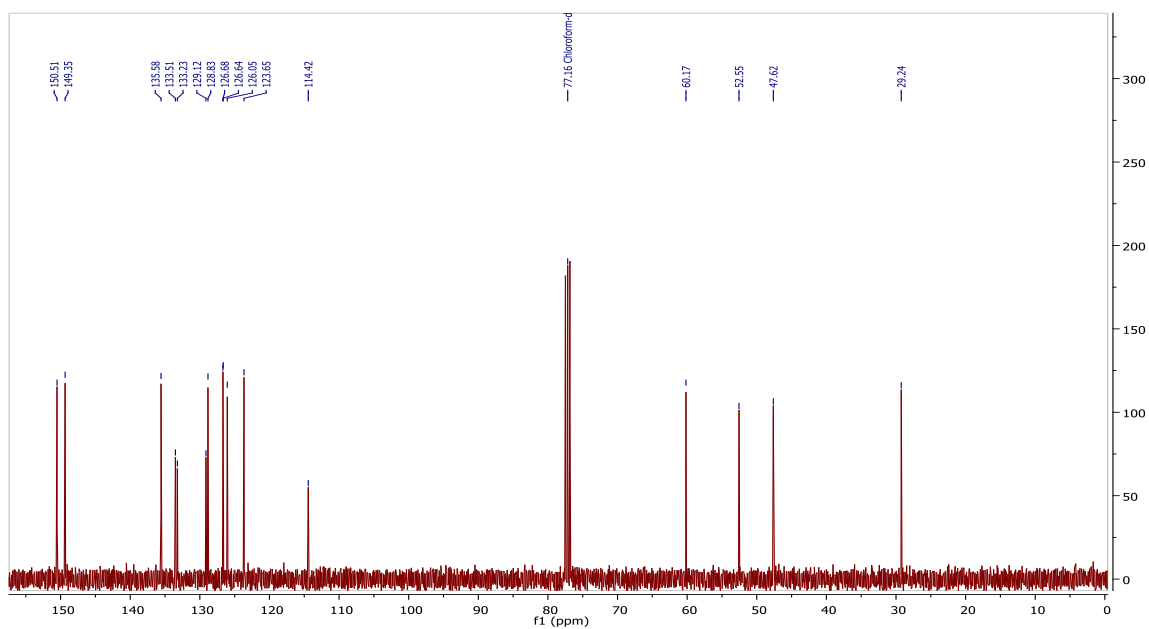
Anexo 27. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-2-il)acetonitrilo (**6g**).



Anexo 28. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6h**).

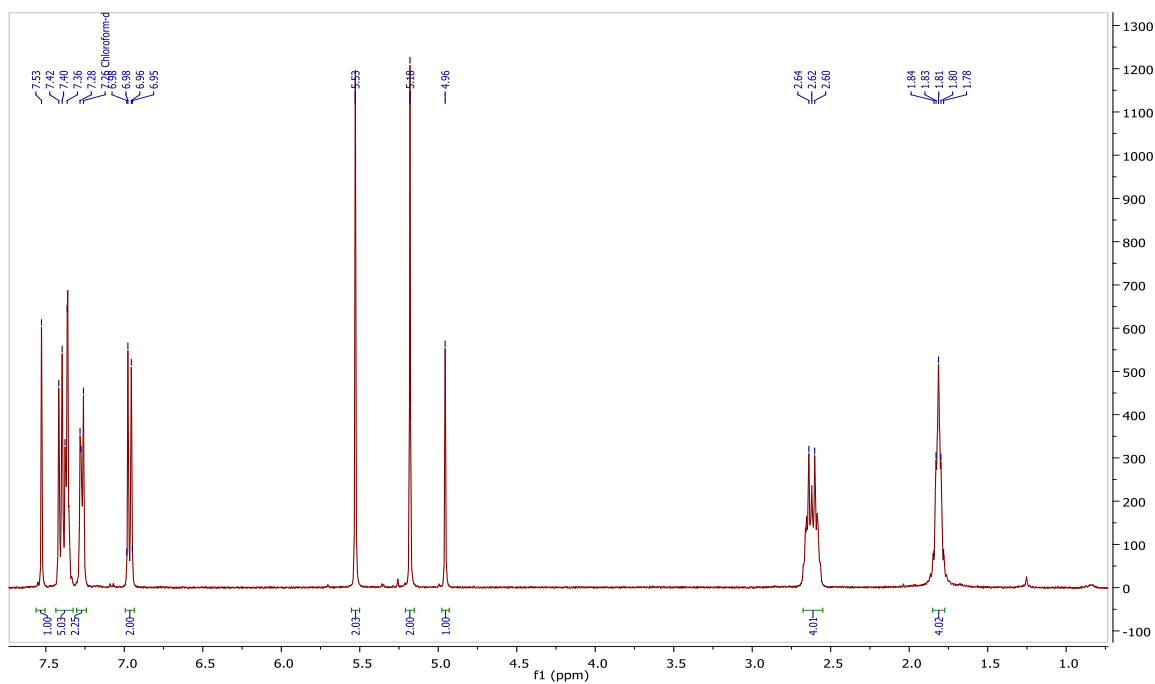


Anexo 29. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)-2-(piridin-3-il)acetonitrilo (**6h**).

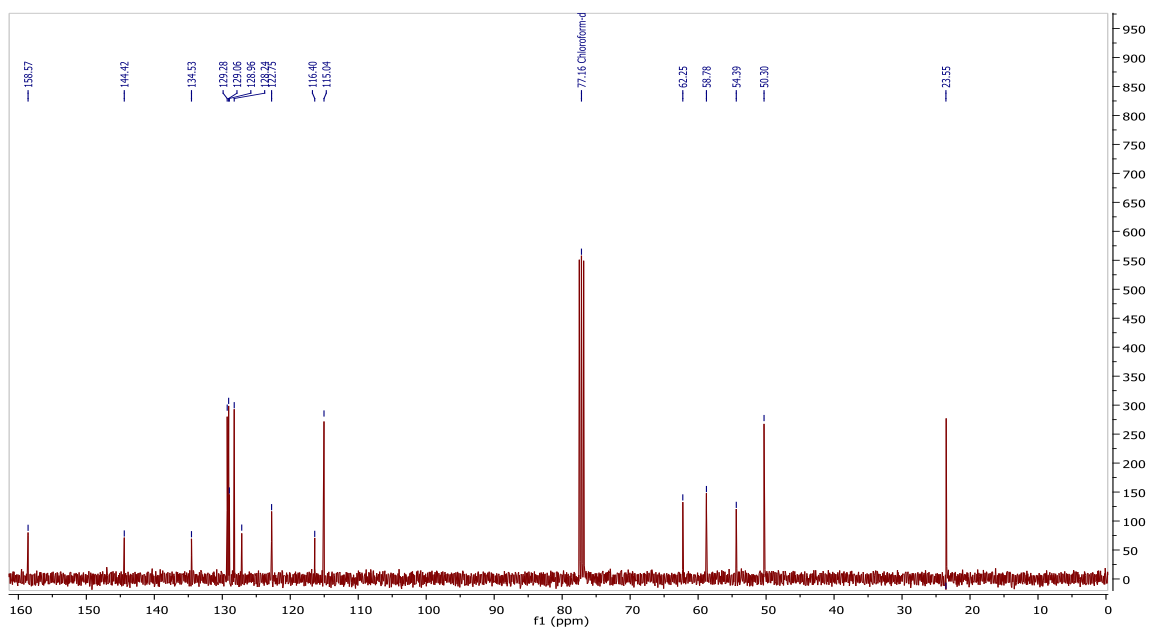


- **Productos finales serie C:**

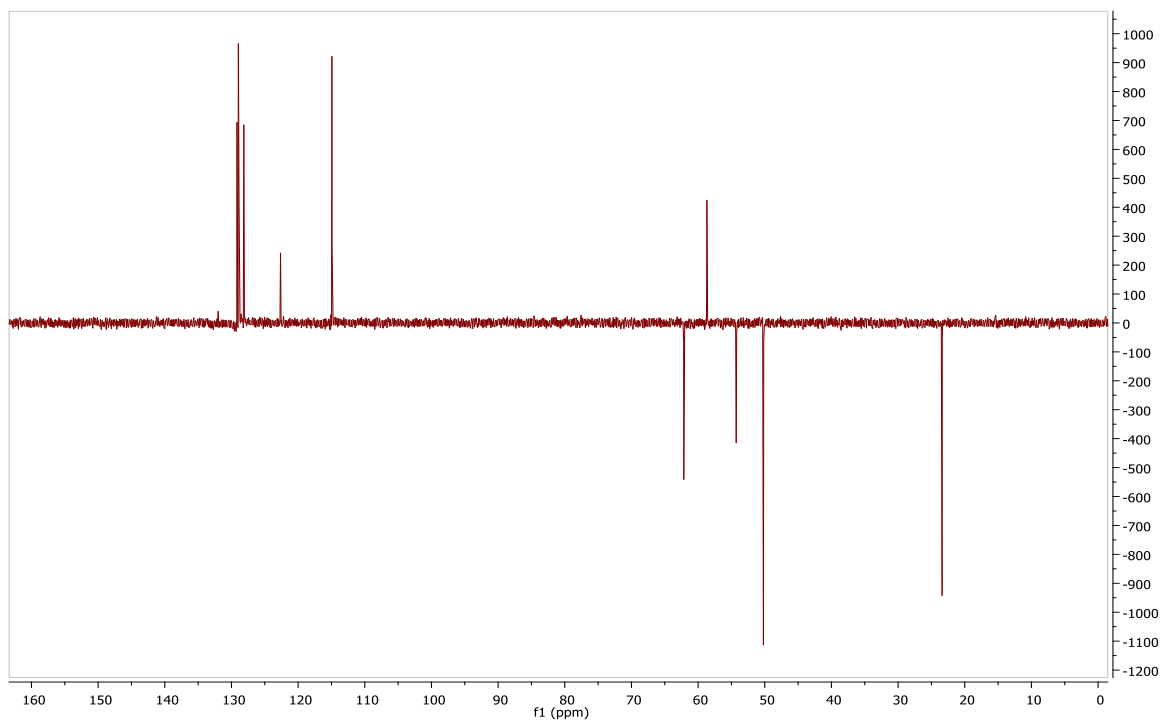
Anexo 30. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7a**).



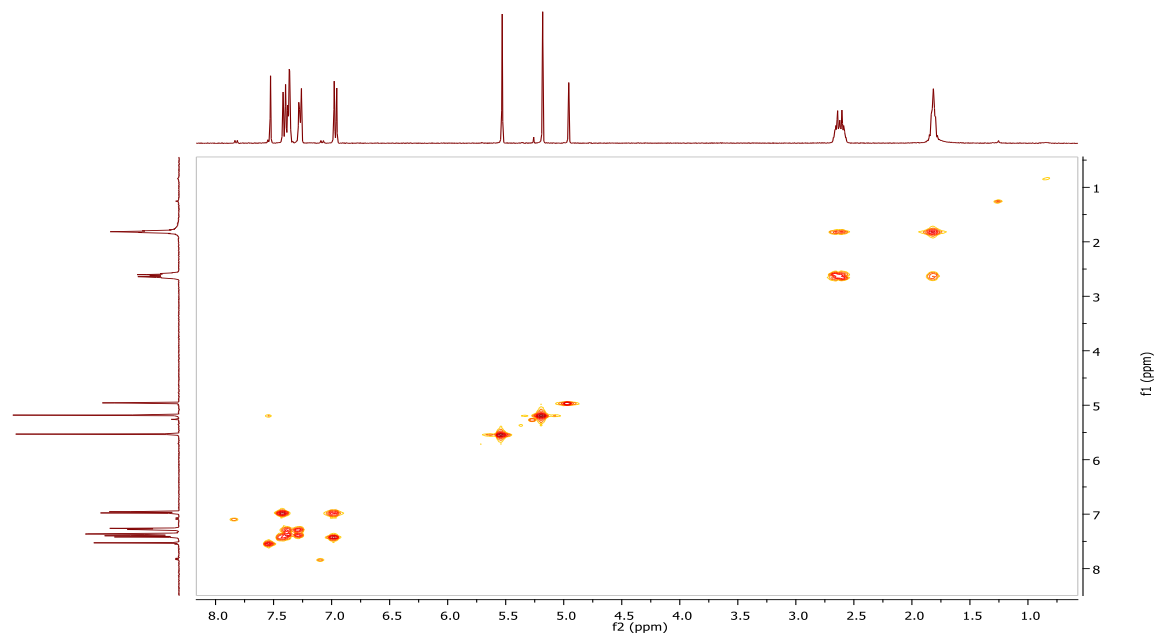
Anexo 31. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7a**).



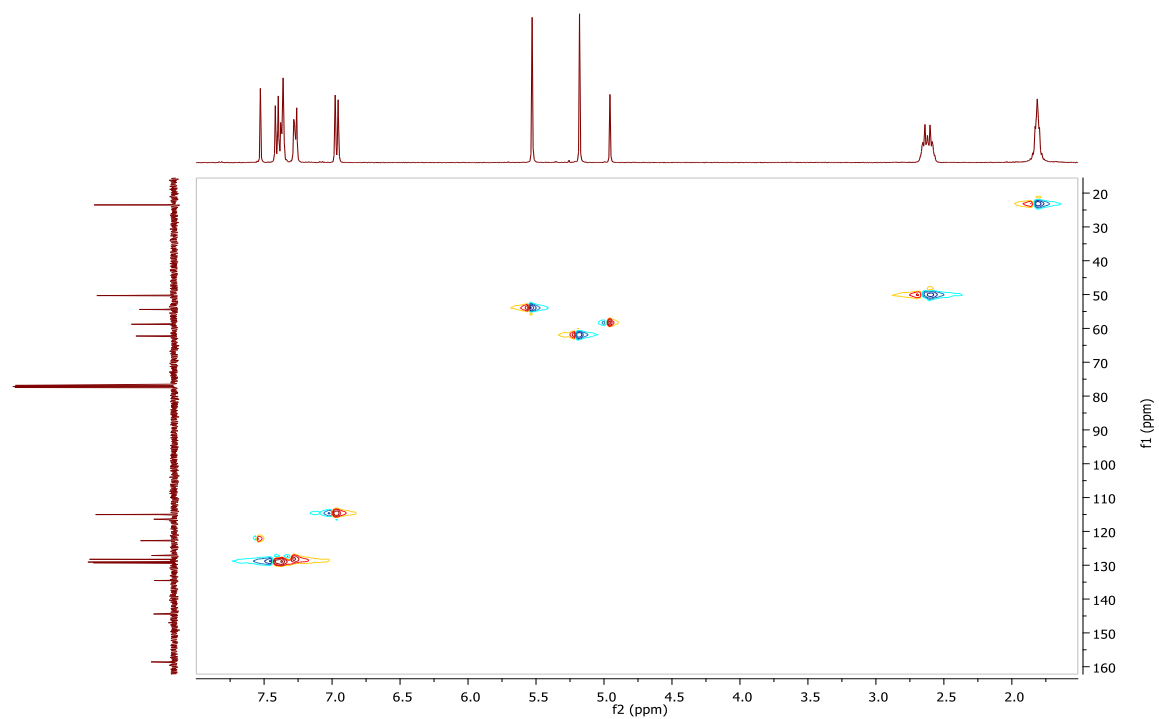
Anexo 32. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7a**).



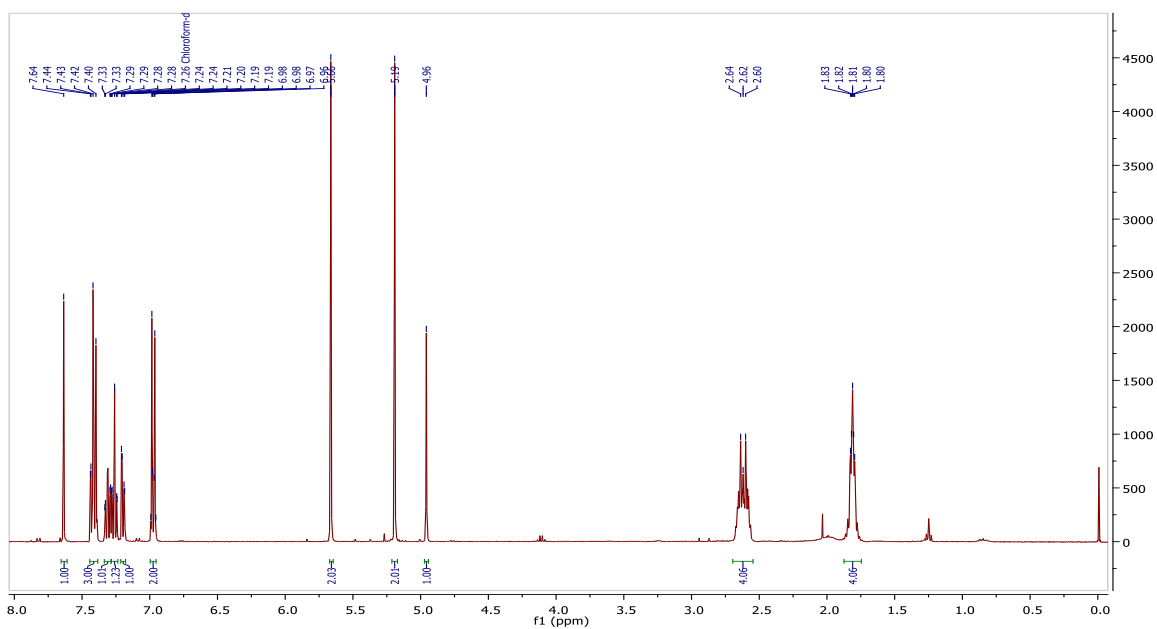
Anexo 33. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7a**).



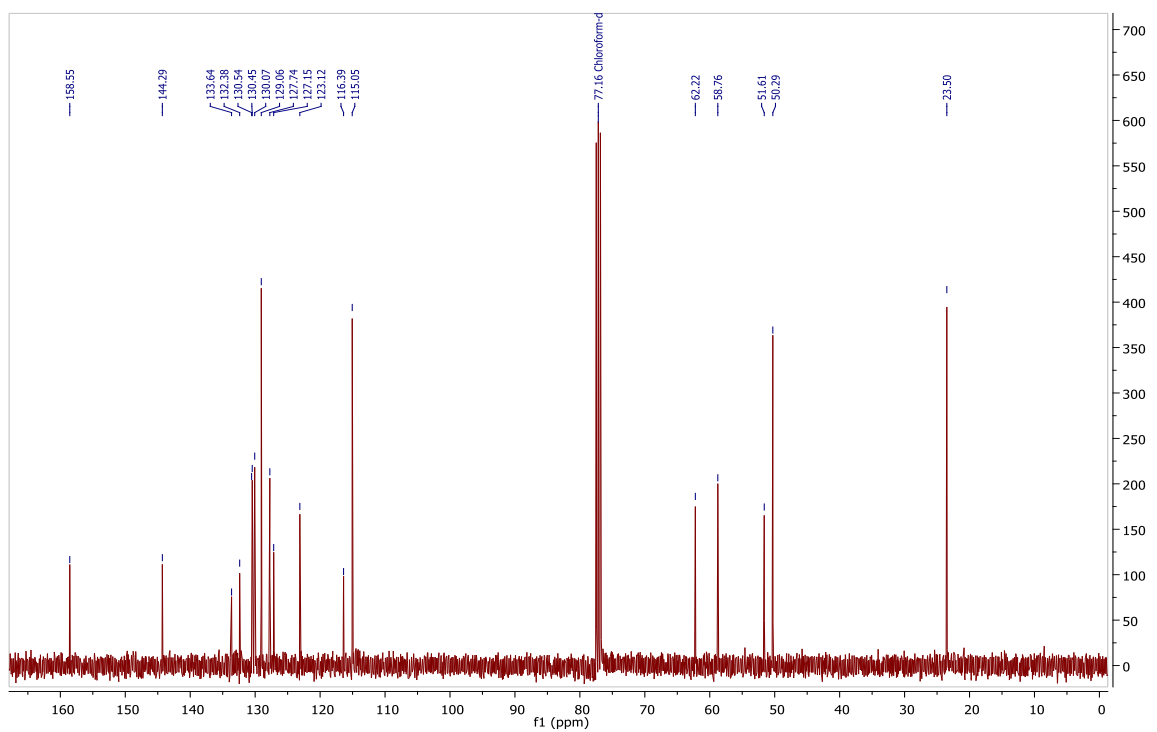
Anexo 34. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7a**).



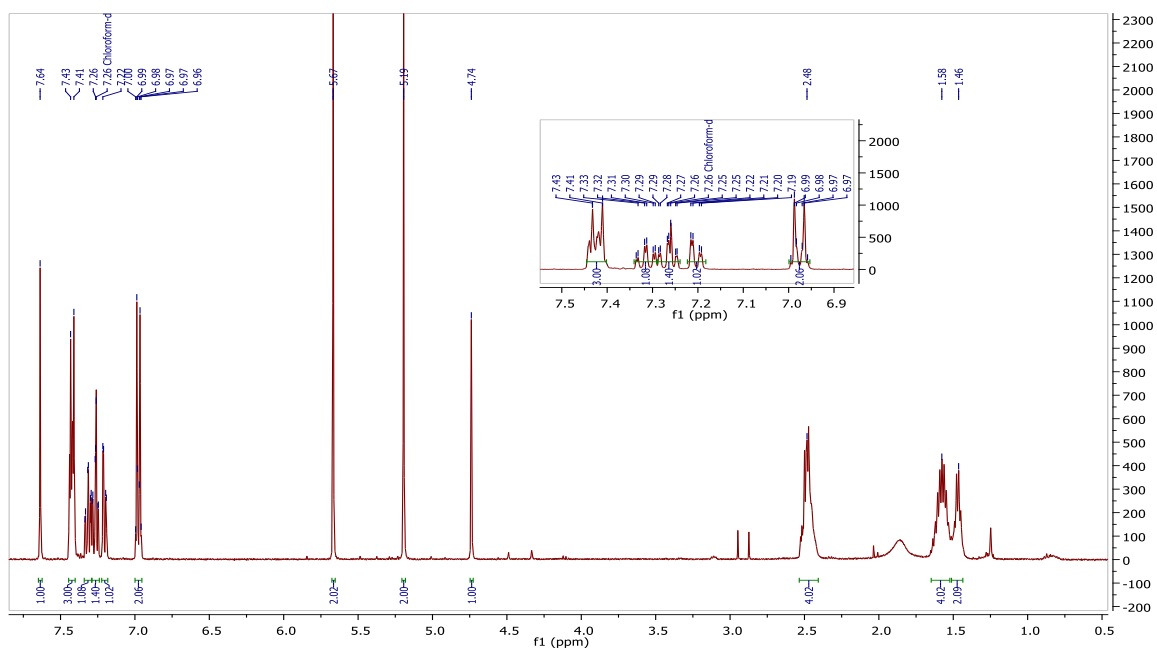
Anexo 35. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7b**).



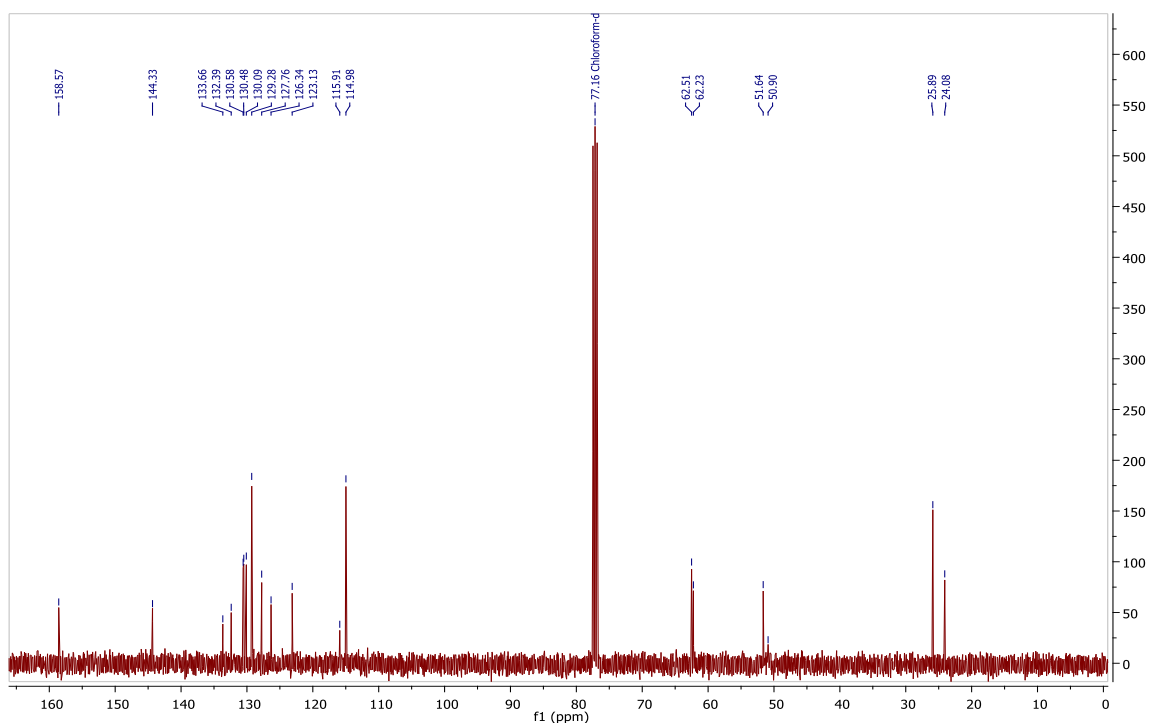
Anexo 36. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (**7b**).



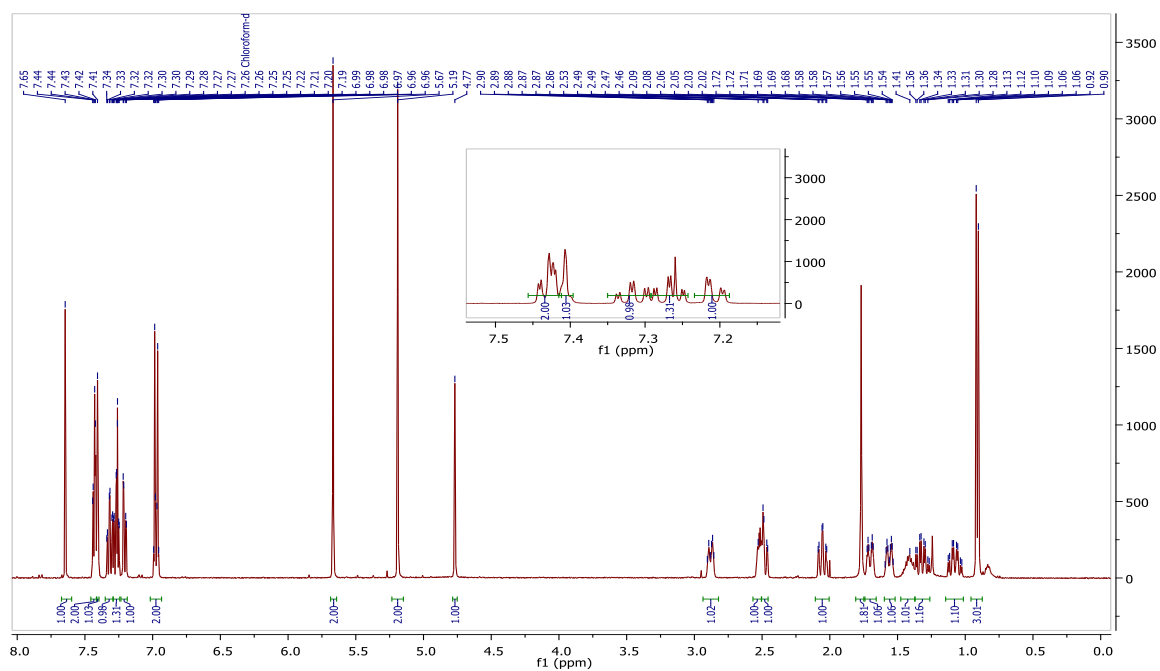
Anexo 39. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (**7f**).



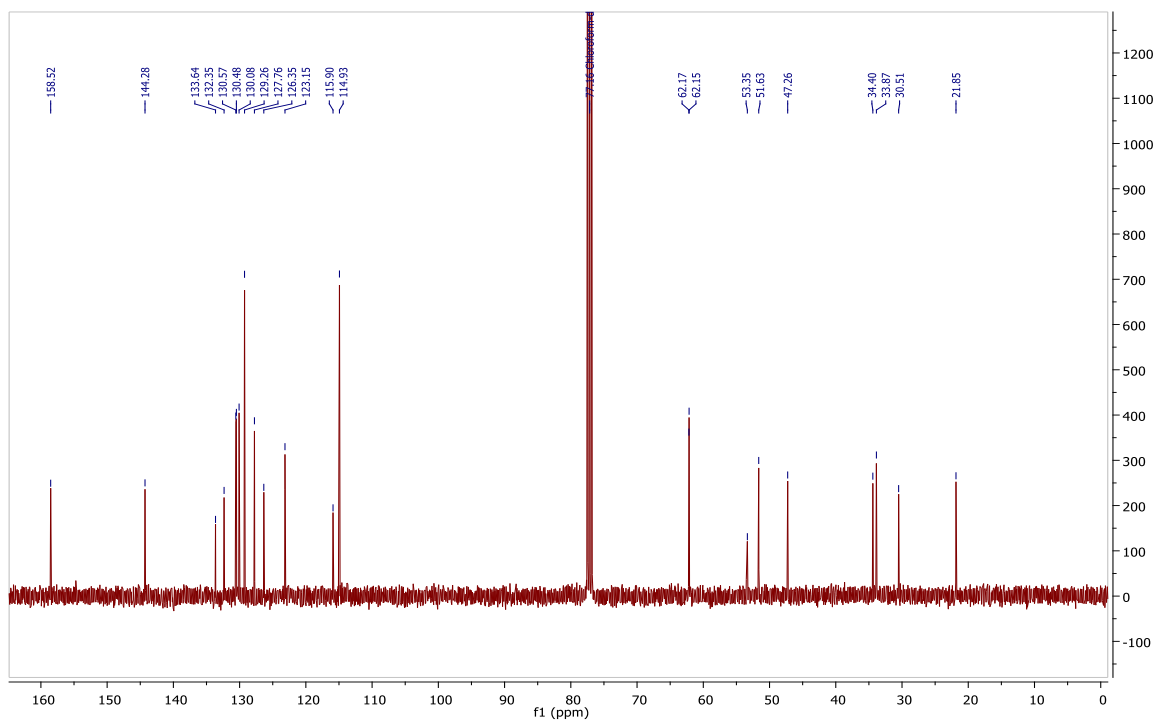
Anexo 40. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (**7f**).



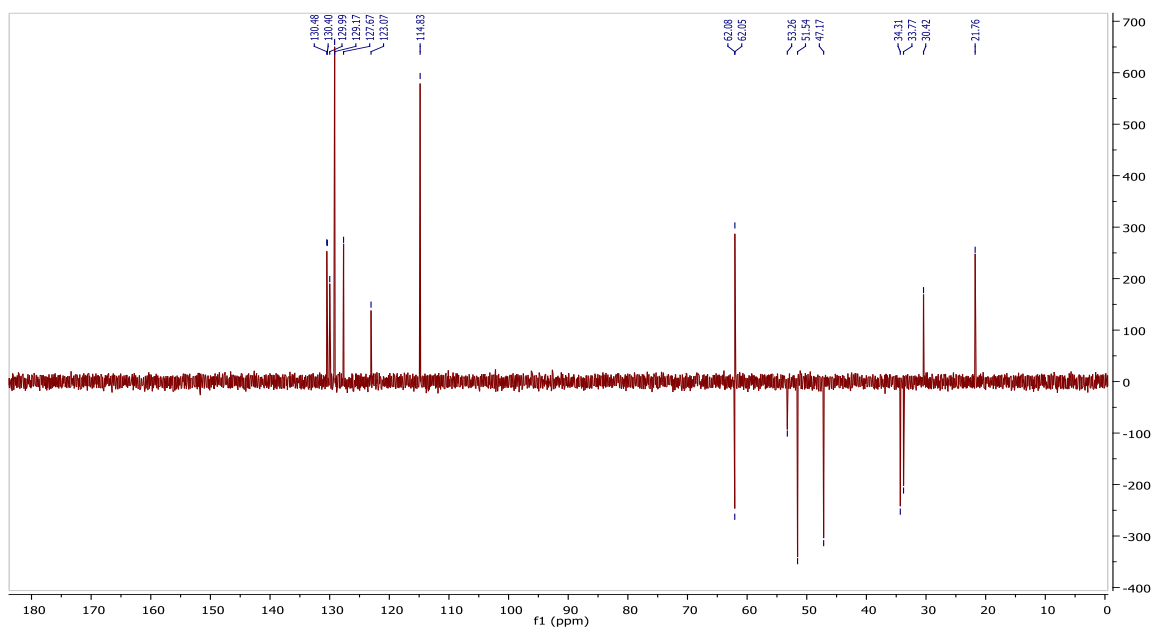
Anexo 43. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



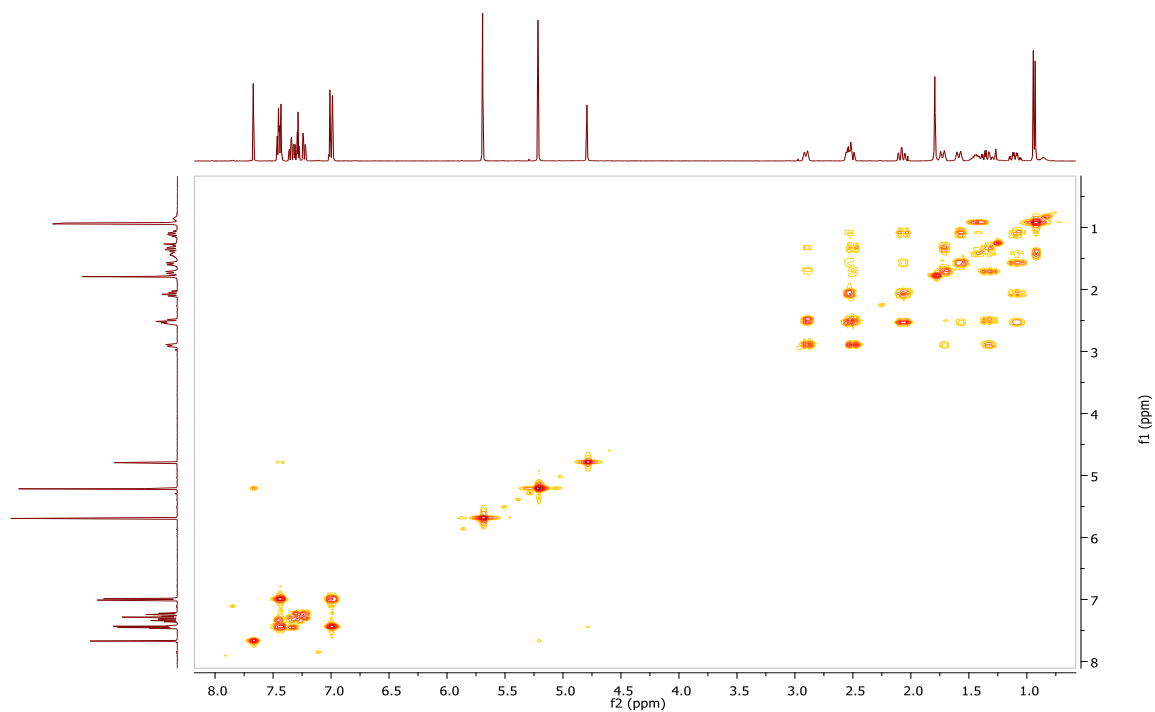
Anexo 44. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



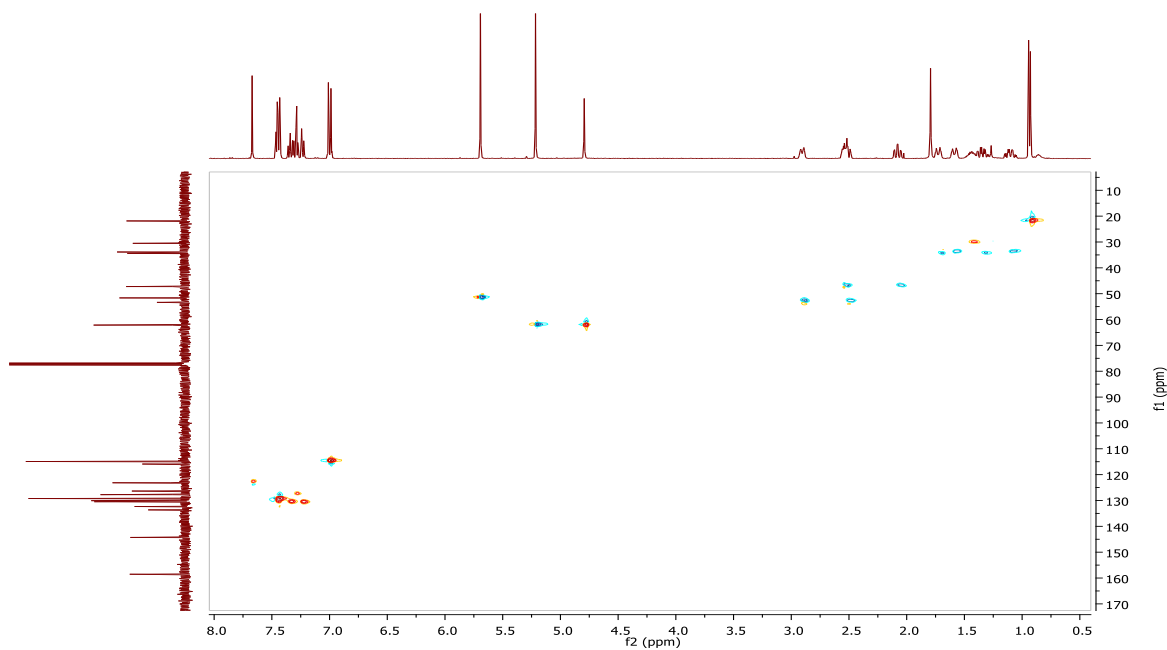
Anexo 45. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



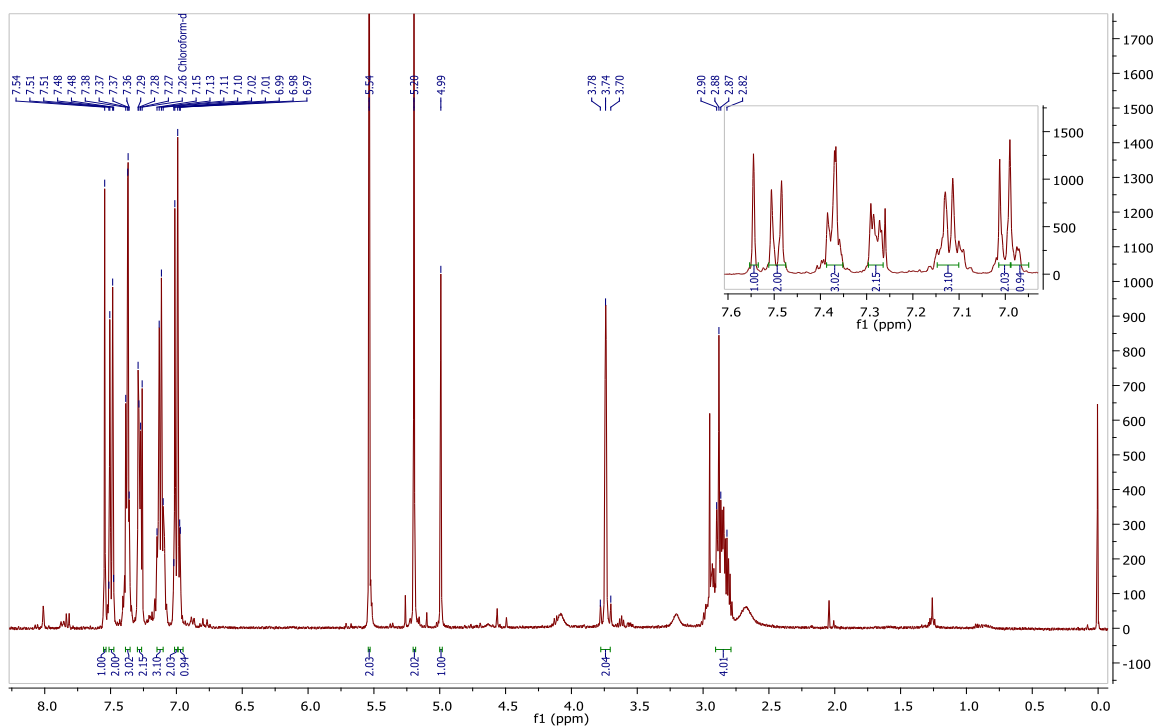
Anexo 46. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



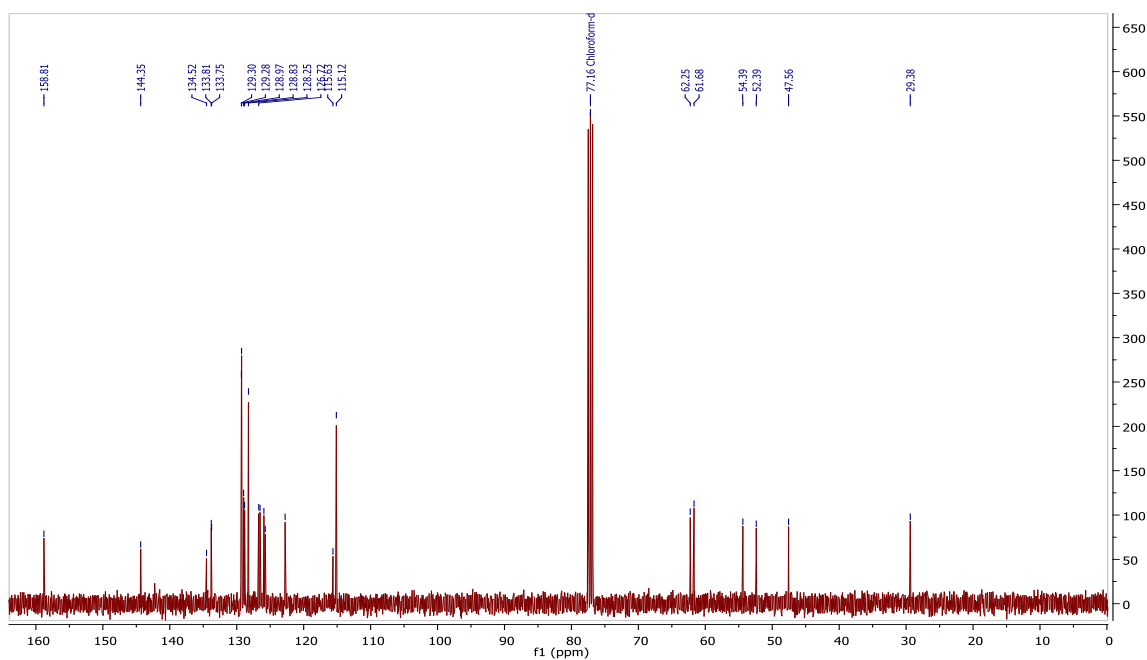
Anexo 47. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**7j**).



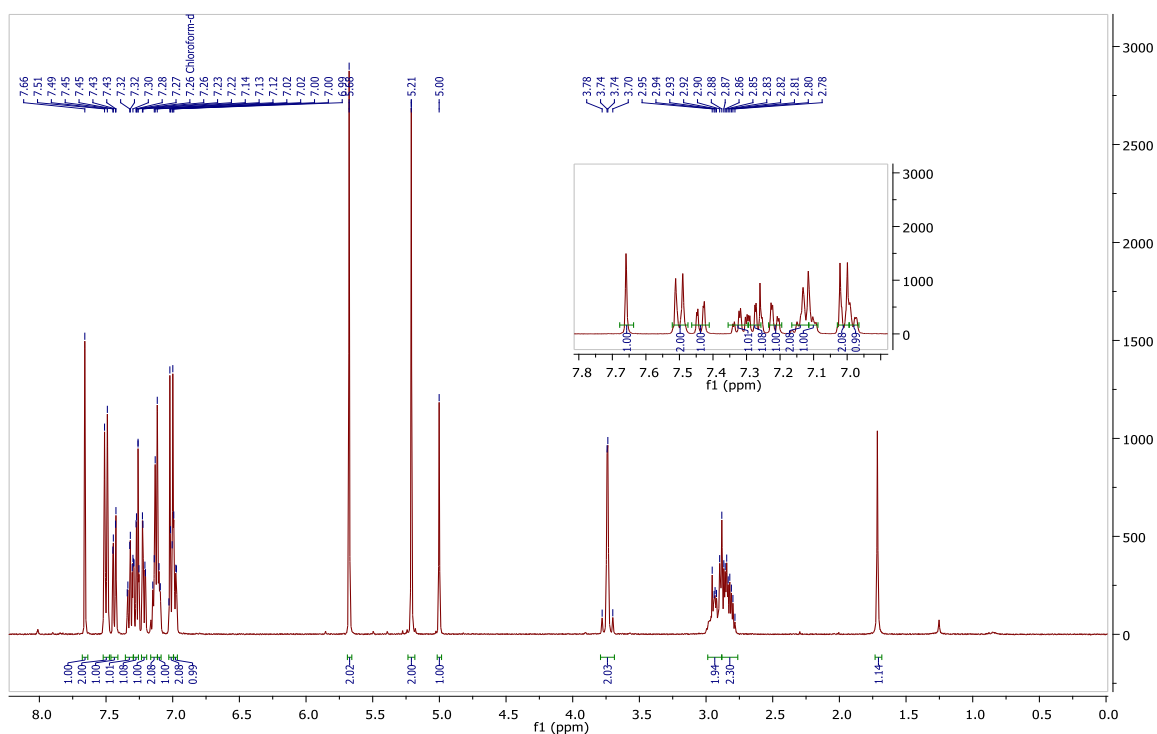
Anexo 48. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (**7m**).



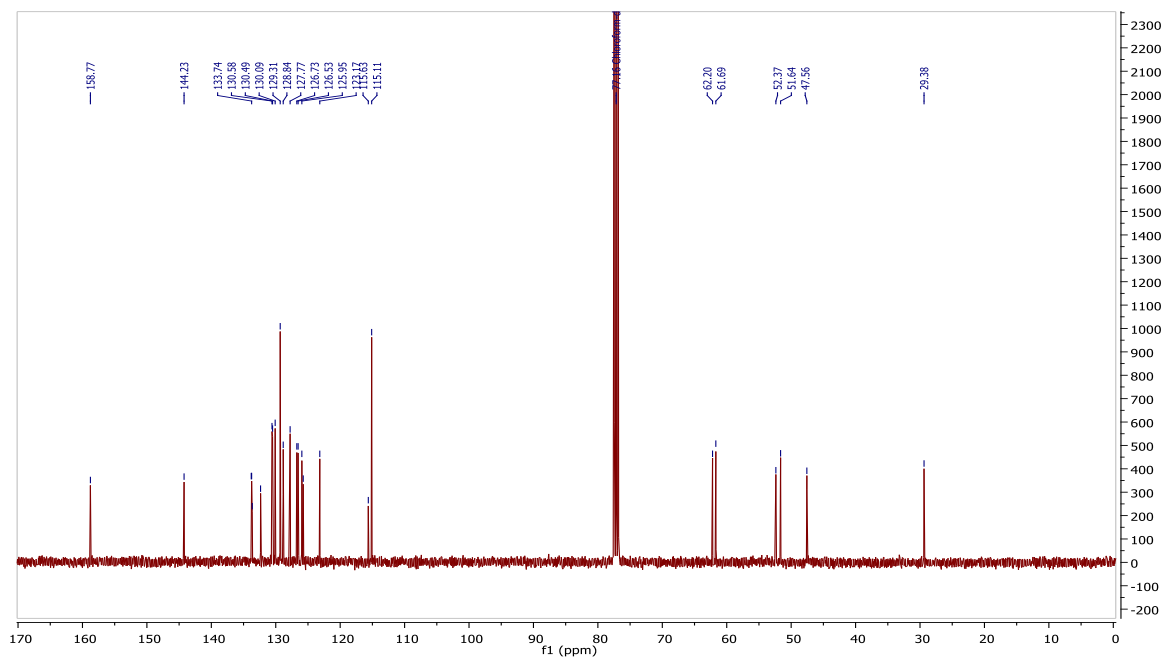
Anexo 49. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)acetonitrilo (**7m**).



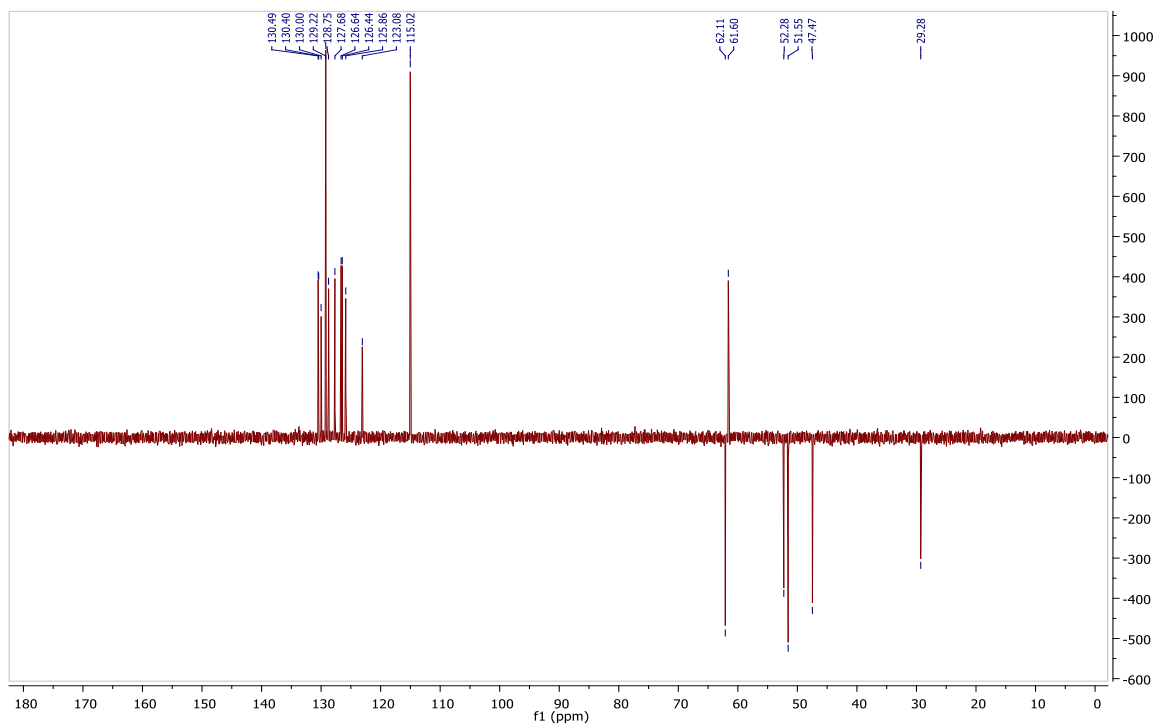
Anexo 50. Espectro ^1H -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il) acetonitrilo (**7n**).



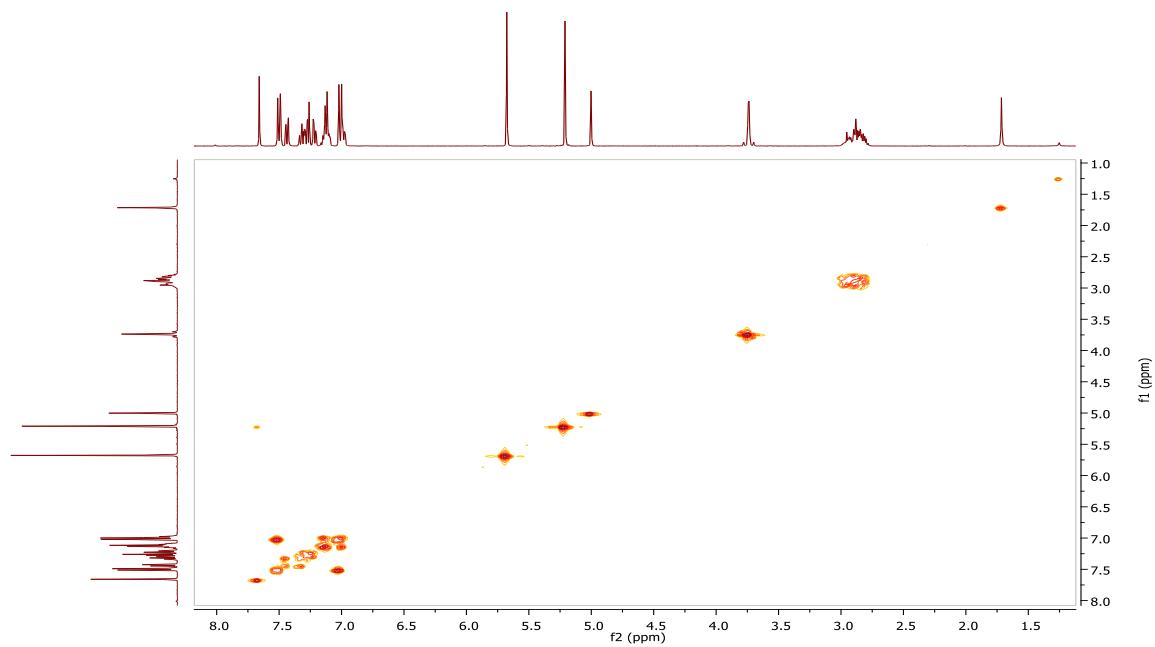
Anexo 51. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il) acetonitrilo (**7n**).



Anexo 52. Espectro DEPT-135 RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il) acetonitrilo (**7n**).



Anexo 53. Espectro COSY-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il) acetonitrilo (**7n**).



Anexo 54. Espectro HSQC-RMN del compuesto 2-(4-((1-(2-clorobencil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il) acetonitrilo (**7n**).

