

DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS α -AMINONITRILOS VÍA REACCIÓN DE STRECKER: BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS CON ACCIÓN INSECTICIDA Y SU EFECTO SOBRE EL MOSQUITO *Aedes aegypti*, VECTOR PRINCIPAL DE LA ENFERMEDAD DEL DENGUE.

ANDRÉS GILBERTO RUEDA JAIMES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2015**

DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS α -AMINONITRILOS VÍA REACCIÓN DE STRECKER: BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS CON ACCIÓN INSECTICIDA Y SU EFECTO SOBRE EL MOSQUITO *Aedes aegypti*, VECTOR PRINCIPAL DE LA ENFERMEDAD DEL DENGUE.

ANDRÉS GILBERTO RUEDA JAIMES

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director:

VLADIMIR V. KOUZNETSOV

PhD, DSc. Química

Codirectora:

AURORA LISETTE CARREÑO OTERO

MSc. Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
2015**

A Dios, mi patrocinador principal, que me guía y me dio la sabiduría para llegar hasta este momento. “Aunque tu principio sea pequeño, tu postrer estado será muy grande”.

A los amores de mi vida, mi madre Cristina, mi abuela Amelia y mi padre Gilberto, los amo, siempre estaré agradecido por todo lo que me han enseñado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer un reconocimiento a aquellas personas que estuvieron acompañándome en el camino de este trabajo y contribuyeron en gran manera:

Primeramente a mi familia, a mis padres Cristina y Gilberto, que han estado siempre motivándome y llevándome a alcanzar lo mejor, a mi abuela Amelia que ha sido una segunda madre para mí, apoyándome en todas las decisiones importantes en mi vida, a mis tíos Henry, Patricia y a mi abuelo Vicente, por el apoyo moral y económico durante la universidad, siempre estaré agradecido por esa gran contribución que hicieron en mí.

A mi director de proyecto, Vladimir V. Kouznetzov, Químico Ph.D, D.Sc, por colocar su confianza en mi trabajo, por el apoyo, paciencia y comprensión en el desarrollo del proyecto de grado, gracias por haber tenido la oportunidad de trabajar en un laboratorio de calidad científica y humana como lo es el LQOBio, donde aprendí acerca de la humildad y la disciplina en el trabajo.

A mi codirectora Aurora L. Carreño, Química MSc, por haber creído en mí, y desde el principio llevarme a anhelar siempre lo mejor en mi proyecto, por haberme enseñado que con paciencia y dedicación todo se puede lograr, fuiste además de codirectora, amiga y otra madre para mí.

En el paso por mi carrera de pregrado aprendí que hay personas que en poco tiempo marcan la vida dejando una huella muy importante, y quiero agradecer a todos ellos, mis amigos, a Andrea, gracias porque en estos 5 años de amistad estoy seguro que serán muchos más, gracias por su apoyo, sus consejos, su confianza en mí, no alcanzan las palabras para demostrar mi agradecimiento,

gracias a Johny, Monica y Natalia, por brindarme una amistad sincera y por apoyarme siempre; gracias a Giselle, Lina y Luz, porque en poco tiempo lograron ocupar un lugar especial en mi corazón, gracias por confiar en mí, y por todo el apoyo que me dieron, gracias por ser como son.

Al profesor Julio Roberto Pinzón, por su paciencia y su orientación en la evaluación del proyecto de grado. Al profesor Jonny Duque, siempre estaré agradecido por su orientación no solo académica, también por motivarme a buscar siempre lo mejor, por enseñarme a hacer las cosas de la mejor manera y por enseñarme el maravilloso mundo de los insectos. A la profesora Stelia Carolina Méndez por su orientación en los ensayos de actividad biológica, gracias por su paciencia. Al profesor Arnold Romero por tratarme como un pupilo directo, por sus palabras y su motivación en mi trabajo.

A los integrantes del laboratorio de química orgánica y biomolecular LQOBio por estar cada día instruyéndome y colaborándome en el trabajo, Fausto, Camilo, Cala, Mauricio, Karime, Catalina, Carlos Puerto, William. Al centro de investigaciones en enfermedades tropicales CINTROP y sus integrantes Ruth, Sharon, Juliana, Gustavo, Nicolás, Natalia, Adriana, por enseñarme acerca de un área que no conocía como la biología, aprendí mucho de todos ustedes.

A todas las personas que estuvieron conmigo en la carrera, que tienen la misma pasión en la química, por ser ese apoyo incondicional, siempre viviré agradecido con Dios por haber puesto personas tan especiales en mi vida, que Dios les recompense todo lo que hicieron.

Contenido

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1. ESTADO DEL ARTE | 23 |
| 1.1. CIANOGENÉISIS: | 23 |
| 1.2. SISTEMA COLINÉRGICO; INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA | 25 |
| 1.3. REACCIÓN DE STRECKER | 28 |
| 1.3.1. Fuentes de cianuro. | 29 |
| 1.3.2. Catalizadores | 31 |
| 1.3.3. Disolventes | 34 |
| 1.4. DISEÑO RACIONAL DE SISTEMAS CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 35 |
| 1.4.1. Principio de hibridación molecular | 35 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 38 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 39 |
| 4. HIPÓTESIS | 40 |
| 5. OBJETIVOS | 41 |
| 6. DISEÑO RACIONAL DE LOS NUEVOS COMPUESTOS A-AMINONITRÍLICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 42 |
| 6.1. PRINCIPIO DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR | 42 |
| 6.2. CRIBADO VIRTUAL | 44 |
| 7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CRIBADO VIRTUAL | 46 |
| 8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 48 |
| 8.1. CONSIDERACIONES GENERALES | 48 |
| 8.2. PREPARACIÓN DEL CATALIZADOR DE ÁCIDO SULFÚRICO SOPORTADO EN GEL DE SÍLICE. | 48 |
| 8.3. OBTENCIÓN DE LOS A-AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LA GIRGENSOHNINA. | 49 |
| 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES. | 59 |
| 9.1. SÍNTESIS DE LOS NUEVOS A-AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LA GIRGENSOHNINA. | 59 |
| 10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 74 |
| 10.1. ENSAYO DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ENZIMA ACHE COMERCIAL (EXTRAÍDA DE LA ANGUILA ELÉCTRICA <i>Electrophorus electricus</i>) | 74 |
| 10.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS ANÁLOGOS SINTETIZADOS | 77 |

| | |
|---|----|
| 10.2.1.Mantenimiento de una colonia de <i>Aedes aegypti</i> | 77 |
| 10.2.2.Ensayo de actividad larvicida en <i>Aedes aegypti</i> | 78 |
| 10.3.ENSAYO DE ACTIVIDAD INSECTICIDA DE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i> | 80 |
| 11.CONCLUSIONES:..... | 82 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:..... | 84 |
| BIBLIOGRAFÍA | 89 |
| ANEXOS | 94 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Fuentes de cianuro usadas en la reacción de Strecker..... | 30 |
| Tabla 2. Catalizadores reportados en la reacción de Strecker..... | 32 |
| Tabla 3. Valores obtenidos del programa Molinspiration® | 46 |
| Tabla 4. Valores de toxicidad obtenidos en Osiris® property explorer..... | 47 |
| Tabla 5. Valores para la obtención de la afinidad de fármaco de Osiris® property explorer. | 47 |
| Tabla 6. Análogos α -aminonitrílicos obtenidos. | 51 |
| Tabla 7. Propiedades, rendimientos y señal IR del enlace nitrílico de los análogos sintetizados..... | 60 |
| Tabla 8. Iones característicos de los análogos sintetizados..... | 62 |
| Tabla 9. Señales en el espectro ^1H de las moléculas 1a-1c | 70 |
| Tabla 10. Señales en el espectro ^1H -RMN de las moléculas 2a-4b | 71 |
| Tabla 11. Señales en el espectro ^{13}C -RMN de las moléculas sintetizadas. | 73 |
| Tabla 12. Valores de IC_{50} para las moléculas evaluadas y el propoxur..... | 76 |
| Tabla 13. Resultados ensayo larvicida para las dosis exploratorias. | 79 |
| Tabla 14. Resultados análisis de Probit para los análogos 1a y 2a | 80 |
| Tabla 15. Resultados del ensayo de actividad adulticida en <i>Aedes aegypti</i> | 80 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Casos de dengue reportados en las últimas dos décadas en Colombia | 19 |
| Figura 2. Girgensohnina y su fuente natural, la planta <i>Girgensohnia oppositiflora</i> | 21 |
| Figura 3. Cianoglucósidos presentes en diferentes alimentos..... | 25 |
| Figura 4. Componentes importantes del sistema colinérgico..... | 26 |
| Figura 5. Organofosforados y carbamatos usados como insecticidas. Los fragmentos característicos se representan en rojo. | 28 |
| Figura 6. Activación de la imina con la guanidina bicíclica y HCN. | 33 |
| Figura 7. Incremento de la electrofilicidad del carbono carbonílico..... | 33 |
| Figura 8. Comparación de la reacción de Strecker con diferentes disolventes y MeCN. .. | 35 |
| Figura 9. Inhibidores de la acetilcolinesterasa reportados en estudios anteriores para el tratamiento del Alzheimer y como insecticidas..... | 36 |
| Figura 10. Parámetros de Lipinski para que un fármaco tenga buenas propiedades ADME. | 37 |
| Figura 11. Hipótesis del trabajo realizado en la tesis de grado..... | 40 |
| Figura 12. Moléculas con actividad biológica reportadas en la literatura. | 42 |
| Figura 13. Alcaloides con actividad biológica reportados en literatura para la síntesis de los α -aminonitrilos..... | 43 |
| Figura 14. Obtención de los parámetros de Lipinski con el programa molinspiration..... | 44 |
| Figura 15. Obtención de los riesgos de toxicidad con el programa Osiris property explorer. | 45 |
| Figura 16. Moléculas analizadas por cribado virtual. | 46 |
| Figura 17. Montaje experimental para la preparación del catalizador SSA. | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Análogos α -aminonitrílicos sintetizados..... | 52 |
| Figura 19. Espectro IR del análogo 2a | 60 |
| Figura 20. Espectro de masas del compuesto 1a | 61 |
| Figura 21. Señales pertenecientes a los protones aromáticos en el espectro ^1H -RMN de 2a | 63 |
| Figura 22. Señales del protón del carbono quiral y el grupo metoxilo en el espectro ^1H -RMN de 2a | 64 |
| Figura 23. Señales de los protones del fragmento de piperidina en el espectro ^1H -RMN de 2a | 64 |
| Figura 24. Región de los protones aromáticos en el espectro bidimensional COSY para 2a | 65 |
| Figura 25. Región de los protones de la piperidina en el espectro bidimensional COSY para 2a | 65 |
| Figura 26. Región aromática en el espectro bidimensional HSQC para 2a | 66 |
| Figura 27. Región de la piperidina en el espectro bidimensional HSQC para 2a | 67 |
| Figura 28. Comparación del espectro ^{13}C -RMN con DEPT-135 RMN para la molécula 2a | 68 |
| Figura 29. Región de la piperidina en el espectro ^1H -RMN de la molécula 2b | 69 |
| Figura 30. Región de la piperidina en el espectro COSY de la molécula 4b | 69 |
| Figura 31. Esquema de la distribución de las concentraciones en la microplaca..... | 75 |
| Figura 32. Porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa para las moléculas evaluadas. | 76 |
| Figura 33. Preparación de las réplicas para el ensayo in vivo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Dosis exploratorias)..... | 78 |

Índice de esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Mecanismo de cianogénesis de la amigdalina..... | 23 |
| Esquema 2. Reacción de degradación de la acetilcolina..... | 26 |
| Esquema 3. Mecanismo de liberación de colina y restitución de la enzima..... | 27 |
| Esquema 4. Carbarilación de la enzima a través de la interacción de serina con el carbamato Propoxur. | 27 |
| Esquema 5. Reacción de Strecker para formación de α -aminonitrilos seguido de hidrólisis para la formación de α -aminoácidos. | 28 |
| Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Strecker para la síntesis de la girgensohnina. | 29 |
| Esquema 7. Mecanismos de reacción del TMSCN con la imina intermedia. | 31 |
| Esquema 8. Mecanismo de reacción de Strecker con catalizador ácido soportado en gel de sílice. | 34 |
| Esquema 9. Síntesis del catalizador SSA | 48 |
| Esquema 10. Reacción de Strecker, obtención de α -aminonitrilos..... | 50 |
| Esquema 11. Posible ruta de fragmentación del producto 1a | 61 |
| Esquema 12. Formación del anión del ácido tionitrobenzoico (amarillo) en el método de inhibición de inhibición de la AChE reportado por Ellman. | 74 |

Índice de anexos

Anexos I

| | |
|---|----|
| Anexo A 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1a | 94 |
| Anexo B 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIRROLIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1b | 94 |
| Anexo C 2-(4-METOXIFENIL)-2- MORFOLINOACETONITRILO. 1c | 95 |
| Anexo D 2-(4-METOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2a | 95 |
| Anexo E 2-(4-METOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2b | 96 |
| Anexo F 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3a | 96 |
| Anexo G 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3b ... | 97 |
| Anexo H 2-(BENZO [D] [1,3] DIOXOL-5-IL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 4a | 97 |
| Anexo I 2-(BENZO [D] [1,3] DIOXOL-5-IL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 4b | 98 |

Anexos II

| | |
|--|-----|
| Anexo A 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1a | 98 |
| Anexo B 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIRROLIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1b | 99 |
| Anexo C 2-(4-METOXIFENIL)-2- MORFOLINOACETONITRILO. 1c | 99 |
| Anexo D 2-(4-METOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2a | 99 |
| Anexo E 2-(4-METOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2b | 100 |
| Anexo F 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3a .. | 100 |
| Anexo G 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3b . | 101 |
| Anexo H 2-(BENZO [D] [1,3]DIOXOL-5-IL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 4a | 101 |

| | |
|--|-----|
| Anexo I 2-(BENZO [D] [1,3]DIOXOL-5-IL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILLO. | |
| 4b | 102 |
| Anexos III | |
| Anexo A Región aromática espectro ¹ H-RMN para 1a | 102 |
| Anexo B Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 1a | 103 |
| Anexo C Espectro ¹³ C-RMN para 1a | 103 |
| Anexo D Espectro DEPT-135 para 1a | 104 |
| Anexo E Región aromática espectro ¹ H-RMN para 1b | 104 |
| Anexo F Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 1b | 105 |
| Anexo G Espectro ¹³ C-RMN para 1b | 105 |
| Anexo H Región aromática espectro ¹ H-RMN para 1c | 106 |
| Anexo I Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 1c | 106 |
| Anexo J Espectro ¹³ C-RMN para 1c | 107 |
| Anexo K Espectro DEPT-135 para 1c | 107 |
| Anexo L Región aromática espectro ¹ H-RMN para 2a | 108 |
| Anexo M Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 2a | 108 |
| Anexo N Espectro ¹³ C-RMN para 2a | 109 |
| Anexo O Espectro DEPT-135 para 2a | 109 |
| Anexo P Región aromática espectro ¹ H-RMN para 2b | 110 |
| Anexo Q Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 2b | 110 |
| Anexo R Espectro ¹³ C-RMN para 2b | 111 |
| Anexo S Región aromática espectro ¹ H-RMN para 3a | 111 |
| Anexo T Región heterocíclica espectro ¹ H-RMN para 3a | 112 |
| Anexo U Espectro ¹³ C-RMN para 3a | 112 |

| | |
|--|-----|
| Anexo V Región aromática espectro ^1H -RMN para 3b | 113 |
| Anexo W Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para 3b | 113 |
| Anexo X Espectro ^{13}C -RMN para 3b | 114 |
| Anexo Y Región aromática espectro ^1H -RMN para 4a | 114 |
| Anexo Z Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para 4a | 115 |
| Anexo A1 Espectro ^{13}C -RMN para 4a | 115 |
| Anexo A2 Región aromática espectro ^1H -RMN para 4b | 116 |
| Anexo A3 Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para 4b | 116 |
| Anexo A4 Espectro ^{13}C -RMN para 4b | 117 |
| Anexo A5 Espectro DEPT-135 para 4b | 117 |

RESUMEN

TÍTULO: Diseño y síntesis de nuevos α -aminonitrilos vía reacción de Strecker: Búsqueda de moléculas con acción insecticida y su efecto sobre el mosquito *Aedes aegypti*, vector principal de la enfermedad del dengue.*

Autor: Andrés Gilberto Rueda Jaimes**

Palabras clave: Larvas, adultos, *Aedes aegypti*, girsensohnina, α -aminonitrilos, insecticidas.

El dengue se ha clasificado como una enfermedad endémica en Colombia, presentando una tendencia creciente desde el año 2011 en las zonas Andina y Caribe. Entre los controles que se han realizado de esta enfermedad está la concientización social (eliminación de criaderos de mosquitos) y el control químico con insecticidas para la eliminación de larvas y adultos a través de diferentes mecanismos de acción. Entre los insecticidas más empleados están aquellos que inhiben las enzimas del insecto. La generación y producción de insecticidas centrada en aumentar su efectividad, disminuyendo su toxicidad sobre el ser humano y además, que no tengan efectos adversos sobre el ambiente, es uno de los intereses en la síntesis química.

El alcaloide natural girsensohnina proviene del arbusto *Girsensohnia oppositiflora*, del cual se extrae con un rendimiento no superior al 0.05%. En estudios anteriores el LQOBio sintetizó este alcaloide y una quimioteca de análogos empleando una modificación de la reacción de Strecker multicomponente. Tanto el alcaloide como sus análogos mostraron inhibir la acetilcolinesterasa bovina, bajo condiciones de laboratorio.

Buscando la obtención de nuevos sistemas α -aminonitrílicos inhibidores de la AChE, una nueva serie de análogos de la girsensohnina fueron sintetizados mediante la reacción de Strecker en condiciones suaves de reacción utilizando aminas cíclicas y aldehídos aromáticos. Se evaluó la acción de las moléculas sintetizadas sobre larvas de *Aedes aegypti* revelando una actividad larvicida por debajo de los 150ppm, los compuestos 2-(4-metoxifenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (**1a**) y 2-(4-metoxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo (**2a**) mostraron una actividad larvicida por debajo de los 100ppm, siendo posibles candidatos para el desarrollo de insecticidas potentes sobre mosquitos del género *Aedes aegypti*.

*Trabajo de grado para optar al título de Químico

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Vladimir V. Kouznetzov, PhD, DSc.
Codirectora: Aurora L. Carreño MSc. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular LQOBio.
Universidad Industrial de Santander.

ABSTRACT

TITLE: Design and synthesis of new α -amino nitriles via Strecker reaction. Search of molecules with insecticide action and its effect on the mosquito *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue disease.

Author: Andrés Gilberto Rueda Jaimes*

Key words: Larvae, adults, *Aedes aegypti*, girsensohnine, α -aminonitriles, insecticides.

Dengue disease is classified as endemic in Colombia and since 2011 has had an increasing trend in the Andean and Caribbean zones, controls that have been made for the control of this disease includes social awareness (elimination of mosquito breeding sites) and chemical control with insecticides for the elimination of larvae and adults through different action mechanisms. Among the most used insecticides are those that inhibit the insect enzymes. The generation and production of insecticides focused in increasing its effectivity, decreasing its toxicity in humans and not having effects in the environment is one of the interests in chemical synthesis.

The natural alkaloid girsensohnine comes from the bush *Girsensohnia oppositiflora*, extracting this alkaloid from the plant has a yield less than 0.05%. In previous studies on the LQOBio the girsensohnine alkaloid, and a series of analogues were synthesized, with a modification of multicomponent Strecker reaction. This alkaloid and its analogues reported inhibiting activity of bovine acetylcholinesterase (AChE).

Looking for the production of new α -aminonitriles inhibitors of AChE, a new series of girsensohnine analogs were synthesized by Strecker reaction in mild reaction conditions using cyclic amines and aromatic aldehydes. The action of this molecules was evaluated on larvae of *Aedes aegypti* with the synthesized molecules, revealing a larvicidal activity below 150ppm, compounds **2** (4-methoxyphenyl) -2 (piperidin-1-yl) acetonitrile (**1a**) and **2** (4-methoxyphenyl) -2 (4-methylpiperidin-1-yl) acetonitrile (**2a**) exhibited larvicidal activity below 100ppm; these are possible candidates for the development of potent insecticides in *Aedes aegypti*.

*Undergraduate project to obtain the title of chemist

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Vladimir V. Kouznetzov, PhD, DSc.

Codirectora: Aurora L. Carreño MSc. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular LQOBio.

Universidad Industrial de Santander.

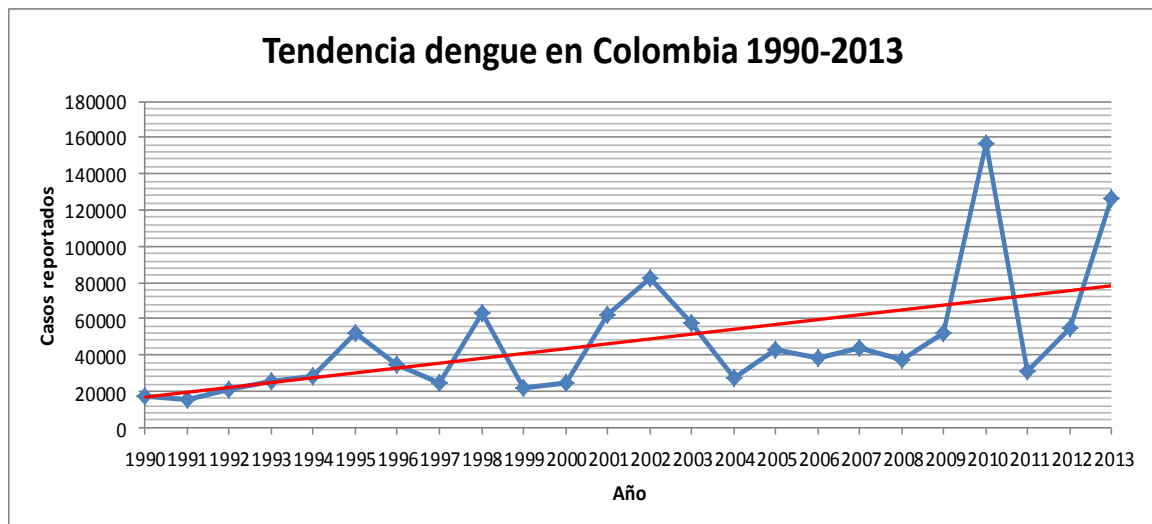
INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial que afecta al hombre en términos de morbilidad y mortalidad, convirtiéndole en un problema de salud pública.^[1]

El dengue se clasifica como una enfermedad endémica en Colombia. En las últimas dos décadas, se ha evidenciado una tendencia creciente en los casos de dengue, reportándose en el 2010 aproximadamente 160000, y desde el 2011 los índices de esta enfermedad han ido en aumento (Fig. 1).^[2]

Figura 1. Casos de dengue reportados en las últimas dos décadas en Colombia

Fuente: Sivigila. Instituto Nacional de Salud. Colombia



A la semana quinta del 2014, el Instituto Nacional de Salud reportó 8444 casos de dengue en todo el país. El departamento de Santander con 1170 casos de dengue y 16 casos de dengue grave ocupó el primer lugar en la lista. Para la semana 16 del mismo año el Instituto Nacional de Salud reportó 32963 casos de dengue y 673 casos de dengue grave, aumentando en 24519 casos en tan solo 3 meses; además se notificaron 81 muertes probables por dengue, 8 de ellas reportadas en Santander.

Campañas para la prevención de la enfermedad del dengue, adoptadas por entidades de salud, se enfocan en estrategias para la reducción o eliminación de su vector, el mosquito *Aedes aegypti*. Ante la poca efectividad brindada por las campañas de concientización ciudadana, que buscan por ejemplo eliminar los criaderos, los esfuerzos se dirigen a la generación o estudio de nuevos sistemas con acción insecticida que inhiban diferentes enzimas y canales iónicos del insecto (enzima acetilcolinesterasa, α y β esterasas, citocromo C, glutatión-S-transferasa, canales de sodio, calcio y potasio).^[3]

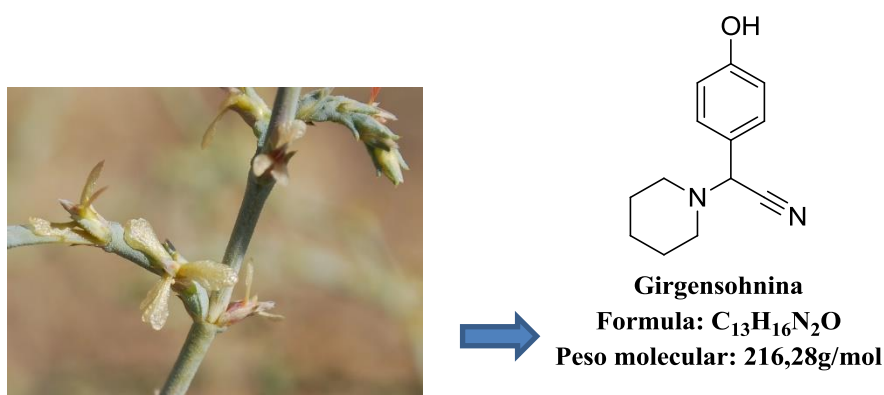
Entre los insecticidas convencionales utilizados para el control de insectos se encuentran los compuestos organofosforados (Coumafós, Malatión, Monocrofós) y los carbamatos (Propoxur, Aldicarb, Carbaril). Sin embargo, debido a su uso continuo, y a errores en la dosificación y concentraciones empleadas, el mosquito ha desarrollado mutaciones en receptores y enzimas detoxificantes desarrollando resistencia, lo que en muchos casos ha resultado en una disminución de su efectividad y un aumento en la concentración a emplear, afectando otros insectos y en algunos casos a los seres humanos.^[3, 4]

La toxicidad que representan para seres humanos, animales y para el medio ambiente, respalda la búsqueda de nuevos compuestos con acción insecticida, que presenten poca o nula toxicidad en el ser humano y además que sean amigables con nuestro entorno.^[5]

Se ha encontrado que las plantas, como mecanismo de defensa contra los insectos y animales pequeños, sintetizan compuestos moderadamente tóxicos, denominados metabolitos secundarios. Estos compuestos tienen diferentes blancos de ataque en los receptores del insecto, es por esto que estos metabolitos secundarios (flavonoides, alcaloides, terpenoides, glucósidos cianogénicos) son de gran interés en la química medicinal, industria agroquímica y en la producción de insecticidas.

En estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio), se reportaron los resultados de los estudios *in vitro* de inhibición del alcaloide natural girgensohnina sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) bovina. La girgensohnina es un alcaloide presente en la planta *Girgensohnia oppositiflora*, de la familia *Chenopodiaceae*. Esta planta, presente al sur de Rusia e Irán, brinda el alcaloide cianogénico con un rendimiento no superior al 0.05% (Figura 2).

Figura 2. Girgensohnina y su fuente natural, la planta *Girgensohnia oppositiflora*.



Debido entre otros factores a la poca cantidad de este alcaloide presente de forma natural, en el año 2008 el LQOBio realizó su síntesis, obteniéndole con un rendimiento del 76%, utilizando la piperidina y p-hidroxibenzaldehido como precursores, NaCN como fuente de cianuro y como catalizador el ácido de Lewis $InCl_3$.^[6] Estudios posteriores llevaron al diseño y síntesis de una nueva serie de 20 análogos, con los cuales se buscó potenciar su acción inhibitoria sobre la AChE, mejorando en algunos casos los valores de IC_{50} con respecto al alcaloide natural. La evaluación de la acción insecticida *in vivo* de estos análogos sobre el *Aedes aegypti*, mostró valores de CL_{50} inferiores a los 100ppm.^[7]

De esta manera, el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) en su interés por desarrollar nuevas moléculas que inhiban a la AChE del mosquito

Aedes aegypti, ha propuesto la síntesis de nuevos análogos de la girsensohnina, buscando potenciar su actividad insecticida sobre el vector principal del dengue.

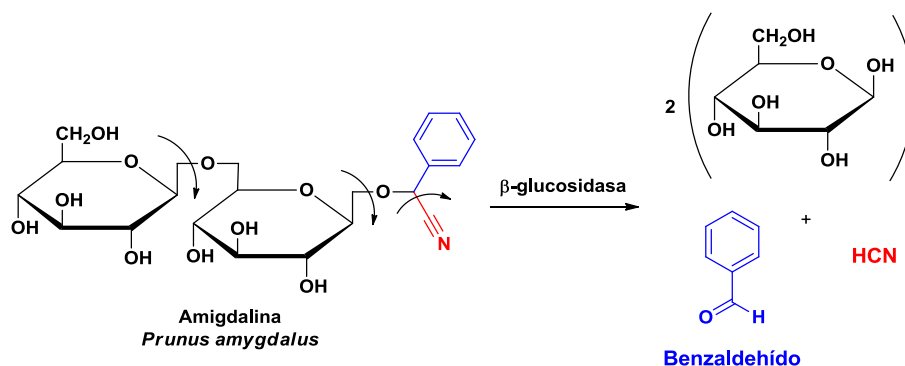
Esta investigación sobre la síntesis de nuevos α -aminonitrilos y la búsqueda de moléculas de acción insecticida con efecto sobre el mosquito *Aedes aegypti*, vector principal de la enfermedad del dengue ha sido realizada gracias al soporte económico de Colciencias.

1. ESTADO DEL ARTE:

1.1. CIANOGENÉISIS:

La búsqueda de los principios activos responsables de la protección y defensa de las plantas ha llevado a encontrar numerosas sustancias, entre las cuales se tienen metabolitos secundarios de gran diversidad fisiológica y química [8] Los compuestos cianogénicos son metabolitos secundarios presentes en diferentes partes de algunas plantas, como las semillas, con principios activos y actividades biológicas marcadas acompañadas numerosas veces de toxicidad, lo que les permite cumplir funciones de defensa.[9] Cuando las plantas son atacadas por insectos o mamíferos pequeños, la enzima β -glucosidasa hidroliza estos compuestos cianogénicos liberando ácido cianhídrico tóxico (Esquema 1).

Esquema 1. Mecanismo de cianogénesis de la amigdalina

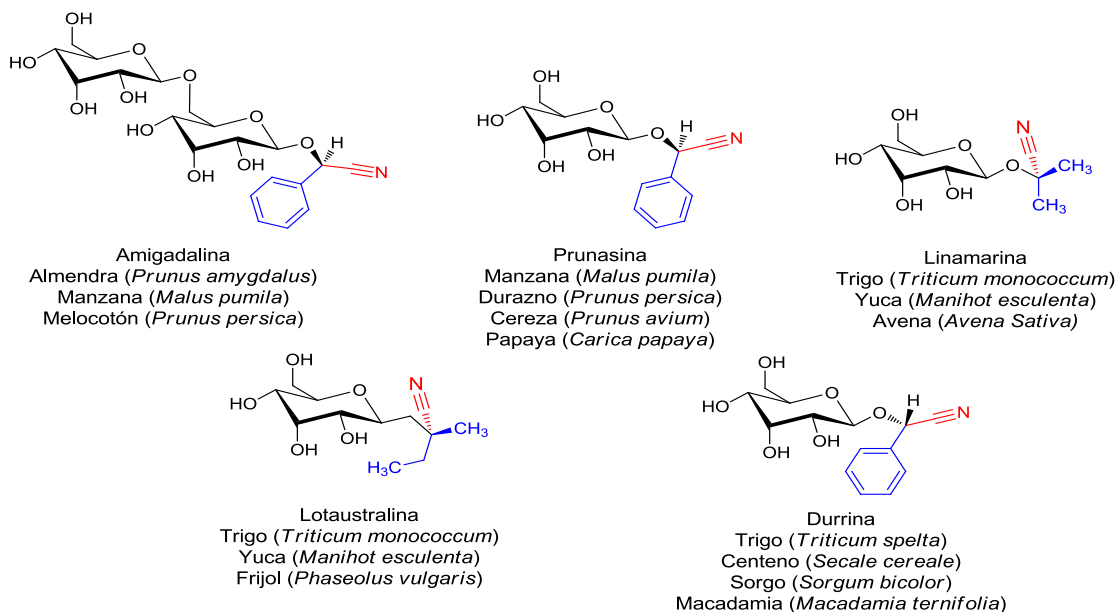


Este proceso de degradación es llamado cianogénesis,^[10] y tal como se muestra en el esquema 1 con la degradación de la amigdalina, presente en las almendras amargas, se produce un fragmento glucosídico, el cual es usado como fuente de energía; benzaldehído, el cual le confiere el sabor amargo a las semillas de almendra, y debido a la ruptura del enlace nitrílico en la amigdalina, se produce el ácido cianhídrico.

Tanto la amigdalina como otros compuestos cianogénicos que poseen un glucósido en su estructura son llamados cianoglucósidos ^[11] y están presentes en diferentes partes de frutas y plantas comestibles, algunos ejemplos se muestran en la figura 3.

Aunque la presencia de estos cianoglucósidos en estos alimentos puede llevar a pensar equivocadamente que estos alimentos son nocivos debido a la liberación de HCN en la cianogénesis, se debe tener en cuenta diferentes factores. Estudios a través de espectrometría de masas de triple cuadrupolo con ionización electro-spray acoplado a cromatografía líquida de ultra-alta presión (UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS) ^[12] muestra que en la almendra dulce la amigdalina se encuentra en una concentración media de 63.13 +/- 57.54 mg/kg, en la almendra semiamarga de 992.24 +/- 513.04 mg/kg, y en la almendra amarga de 40060.34 +/- 7855.26 mg/kg. En un estudio realizado por Shragg ^[13], se determinó una concentración de 469 mg de cianuro por 100 g de almendras amargas, (4690 mg/kg), estimándose una dosis letal de 0.5 mg de cianuro por kg de peso en el ser humano. Estos valores confirman que para que estas almendras tengan un efecto nocivo en el ser humano, se tendría que consumir gran cantidad de estas. Además, en el tratamiento de las almendras amargas, estas se maceran para que de esta manera al haber un daño mecánico se produzca la liberación de HCN gaseoso. Otros factores a tomar en cuenta son la baja concentración de estos cianoglucósidos en los alimentos y que en algunos casos, se encuentran en partes no comestibles del fruto, por ejemplo la raíz o las semillas, y no en la pulpa.

Figura 3. Cianoglucósidos presentes en diferentes alimentos.

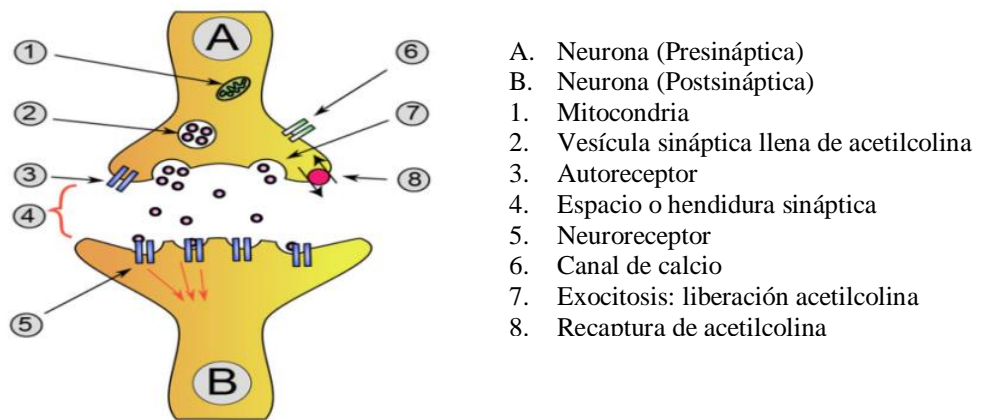


1.2. SISTEMA COLINÉRGICO; INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA

Como mecanismo de defensa, las plantas sintetizan compuestos moderadamente tóxicos contra los insectos, teniendo diferentes blancos de ataque como los canales iónicos (calcio, potasio, sodio), enzimas como la α y β esterasa, el citocromo C y las carboxilesterasas. Entre las carboxilesterasas se cuenta a la enzima acetilcolinesterasa, la cual hace parte del sistema colinérgico y es la enzima de estudio en este trabajo de investigación.

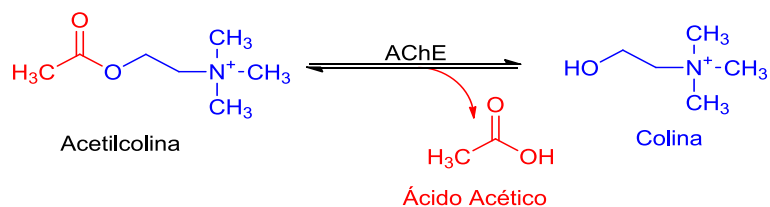
El sistema colinérgico (Figura 4) es el encargado de transmitir impulsos nerviosos a través de las neuronas para producir el movimiento de los músculos y el funcionamiento de diferentes órganos en los insectos. Cuando el neurotransmisor acetilcolina llega a los receptores en la membrana postsináptica, la conformación de los canales de calcio cambia, permitiendo el paso de estos iones al interior de la neurona postsináptica causando una despolarización que es la responsable del impulso nervioso.

Figura 4.Componentes importantes del sistema colinérgico.



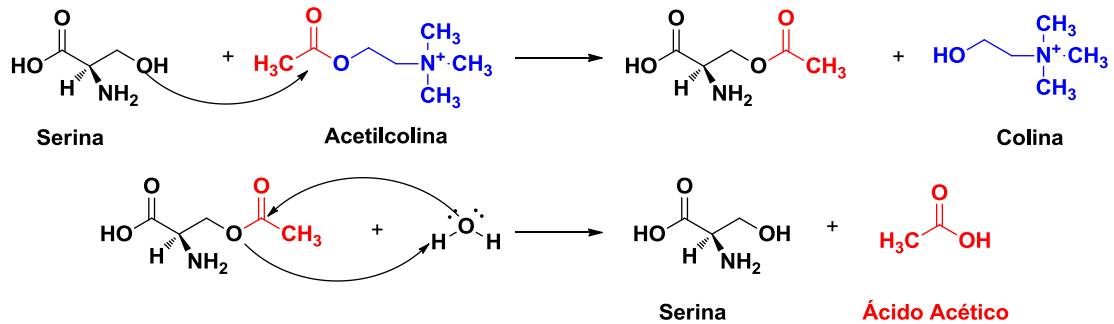
Para regular la cantidad de acetilcolina liberada, en la hendidura sináptica se encuentra la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que degrada la acetilcolina produciendo colina y ácido acético (Esquema 2). Mediante el mecanismo de endocitosis, la colina es reabsorbida por la neurona presináptica y con el acetato proveniente de la coenzima A, se sintetiza la acetilcolina para continuar con la sinapsis colinérgica.

Esquema 2.Reacción de degradación de la acetilcolina.



La triada catalítica responsable de la degradación de acetilcolina está conformada por los aminoácidos serina 203, histidina 440 y glutamina 327, y el mecanismo de degradación inicia cuando el oxígeno de la Ser203 se enlaza al carbono electrofílico de la acetilcolina.^[3] (Esquema 3).

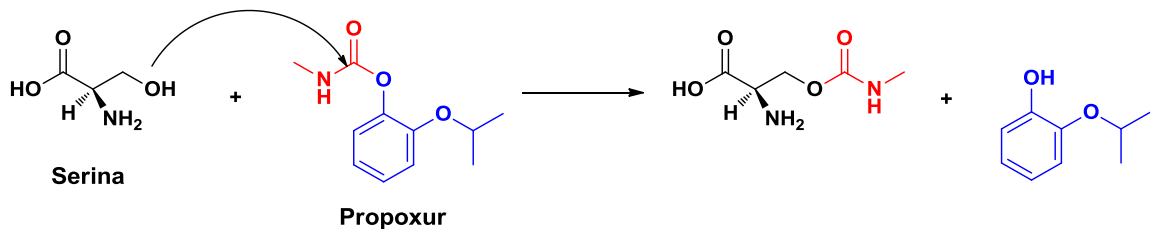
Esquema 3. Mecanismo de liberación de colina y restitución de la enzima.



Para la restitución de la enzima, el agua presente en el medio se enlaza al carbono electrofílico del fragmento tomado por la serina para liberar ácido acético y recuperar su estructura.

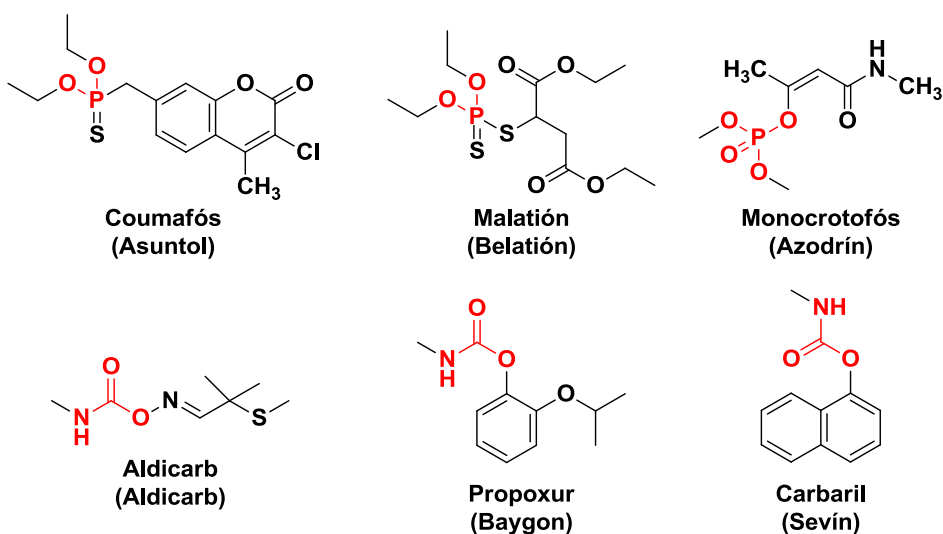
Al utilizar insecticidas como carbamatos u organofosforados, (Figura 5) estos interactúan con la AChE debido a la presencia de una especie electrofílica, la cual se enlaza al oxígeno de la serina mediante fosforilación o carbarilación (esquema 4), causando una disminución en la regulación de la acetilcolina, acumulándose en los receptores nicotínicos y causando la parálisis y posterior muerte del insecto.^[4]

Esquema 4. Carbarilación de la enzima a través de la interacción de serina con el carbamato Propoxur.



Debido al uso prolongado e inadecuado de estos insecticidas, la AChE de varios insectos ha sufrido mutaciones, confiriéndole resistencia frente a compuestos carbamatos y/o organofosforados. Se ha propuesto que la mutación de la AChE es de tipo conformacional, de manera que limita la entrada del insecticida a la triada catalítica de la enzima.^[3]

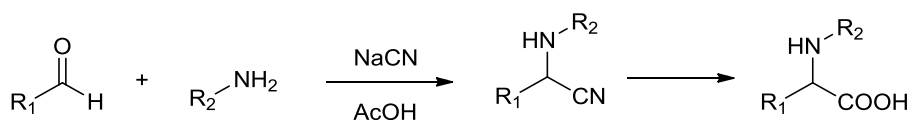
Figura 5. Organofosforados y carbamatos usados como insecticidas. Los fragmentos característicos se representan en rojo.



1.3. REACCIÓN DE STRECKER

Esta reacción, desarrollada por Adolph Strecker en 1850, consiste en una condensación de tres componentes: un aldehído, una amina y una fuente de cianuro para la formación de α -aminonitrilos. Una de las mayores aplicaciones de estos compuestos es que al ser hidrolizados conducen a la formación de α -aminoácidos, amidas, tetrazoles, entre otros (Esquema 5). Debido a la variedad de productos que pueden ser sintetizados a partir de los α -aminonitrilos, investigaciones recientes se han centrado en el desarrollo de una reacción asimétrica.

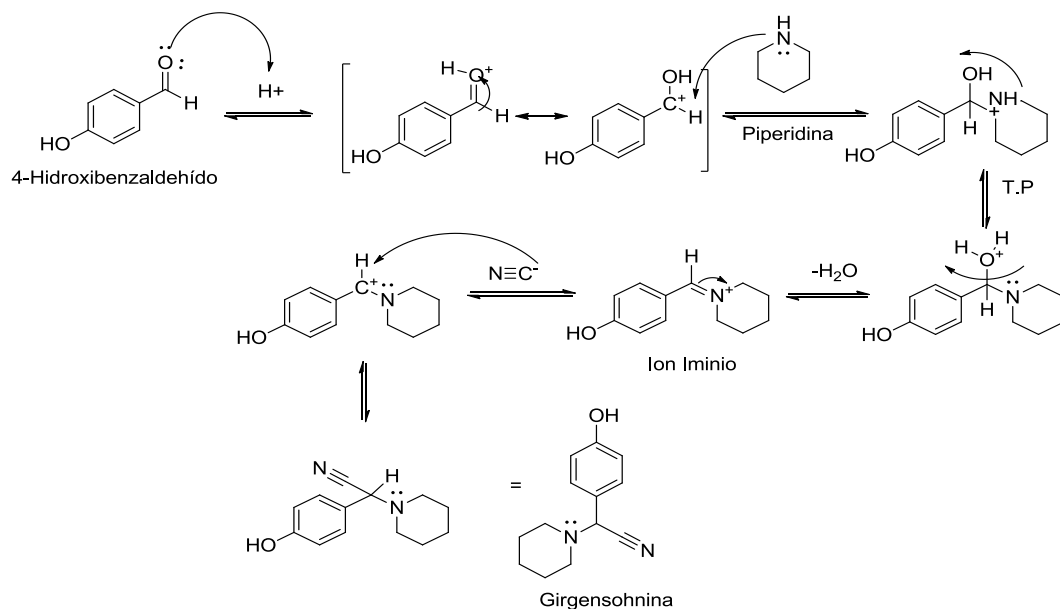
Esquema 5. Reacción de Strecker para formación de α -aminonitrilos seguido de hidrólisis para la formación de α -aminoácidos.



El mecanismo de esta reacción es una sustitución nucleofílica,^[14] la cual implica dos adiciones en secuencia, generando primeramente el ion iminio producto de la adición del sistema amínico al compuesto carbonílico, para luego dar lugar a la

adición nucleofílica del ion cianuro para así formar *in situ* el α -aminonitrilo esperado (Esquema 6).

Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Strecker para la síntesis de la girgensohnina.



Modificaciones realizadas a la metodología clásica de Strecker como las variaciones en la fuente de cianuro, condiciones de reacción, compuestos carbonílicos y aminas utilizadas, la convirtieron en una ruta atractiva a nivel de síntesis orgánica al brindar productos de gran importancia tanto a escala de laboratorio como a escala industrial

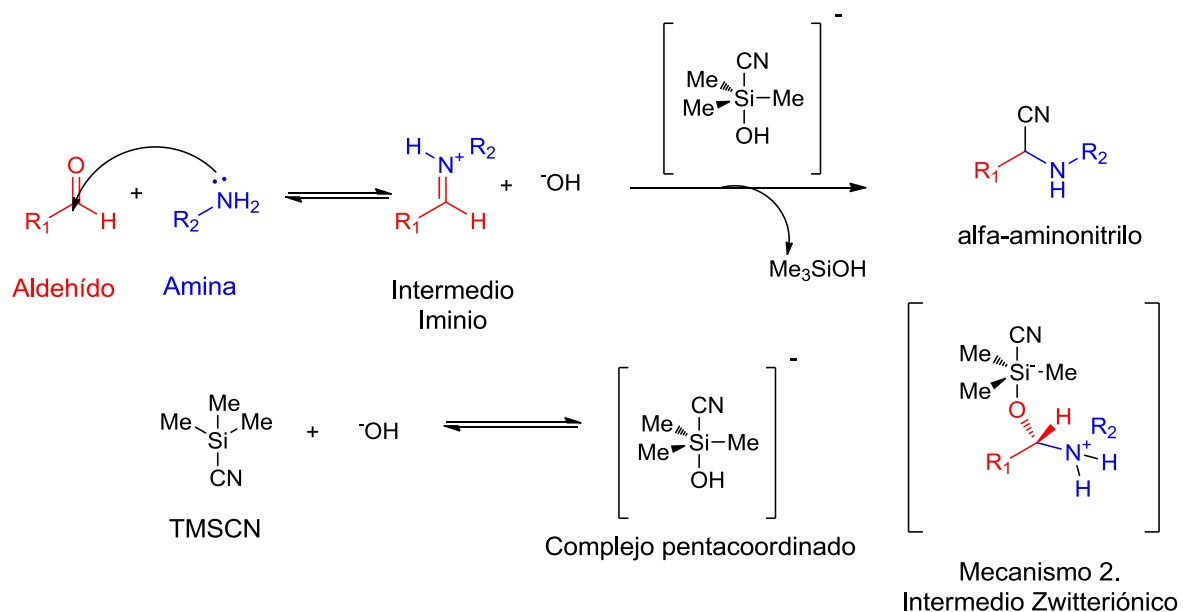
1.3.1. Fuentes de cianuro: Desde el desarrollo de la reacción de Strecker se han utilizado el HCN y cianuros de metales alcalinos (NaCN, KCN), requiriéndose cuidados en su manejo debido a la alta toxicidad de estas especies. Por esto se han empleado fuentes de cianuro que aumenten el rendimiento de la reacción y reduzcan el tiempo de reacción y el riesgo que estas suponen. (Tabla 1).

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

| Fuente de cianuro | Rendimiento | Referencia |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|
| DEPC ((EtO) ₂ P(O)CN) | 67-86% | [15] |
| HCN | 90-97% | [16] |
| Bu ₃ SnCN | 70-97% | [16] |
| Et ₂ AlCN | 30-99% | [17] |
| TMSCN (Me ₃ SiCN) | 75->99% | [18] |

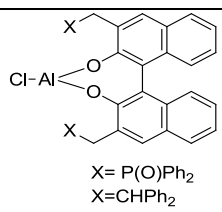
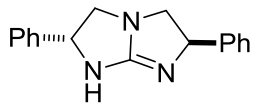
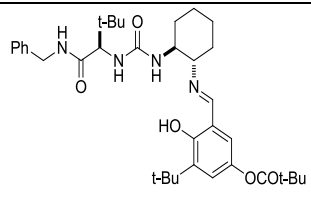
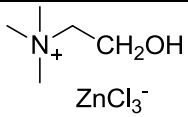
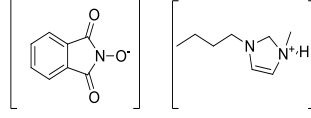
Entre estas fuentes, la más utilizada es el cianuro de trimetilsililo (TMSCN), para el cual se han propuesto dos rutas para la formación de aminonitrilos,^[16] la primera lleva a la formación de un complejo pentacoordinado con el hidróxido liberado, el cual es atraído por el silicio oxofílico, reaccionando con la imina intermedia; y la segunda mediante la formación de un intermedio switteriónico entre el TMSCN y la imina, debido a la alta electrofilicidad del TMSCN, seguida por una transferencia intramolecular de hidrógeno y -CN (Esquema 7). Aunque los reportes de rendimientos de la reacción Strecker al utilizar este catalizador son, en la mayoría de las ocasiones, superiores al 80%, cabe resaltar que el cianuro de trimetilsilil tiene entrada restringida a nuestro país y la mayoría de países de latinoamérica.

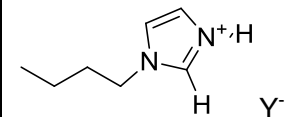
Esquema 7. Mecanismos de reacción del TMSCN con la imina intermedia.



1.3.2. Catalizadores: El objetivo al emplear catalizadores es el de aumentar la velocidad de la reacción, y en muchos casos aumentar el rendimiento. Con el objetivo de aumentar el rendimiento de reacción y el exceso enantiomérico, se han utilizado catalizadores quirales y líquidos iónicos (tabla 2).

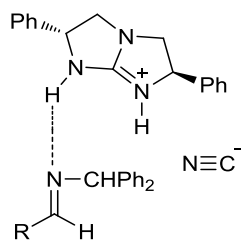
Tabla 2. Catalizadores reportados en la reacción de Strecker.

| Ent | Estructura | Nombre | Rendimiento | Tiempo de reacción | Ref. |
|-----|--|---|---|--------------------|------|
| 1 |  <p>X = P(O)Ph₂ X = CHPh₂</p> | Catalizador Bifuncional acido de Lewis/Base de Lewis | 67-99% Mejores rendimientos con PhOH | 13-192 horas | [19] |
| 2 |  | Guanidina (2R,6R)-2,6-difenil-2,3,5,6-tetrahidro-1H-imidazo[1,2-a]imidazol Biciclica Quiral (en presencia de HCN) | 88-99% | 8-72 horas | [20] |
| 3 | I ₂ | Yodo (Yoduro de trimetilsilil in situ) | 96-99% | | [21] |
| 4 | CoCl ₂ | Cloruro de Cobalto (II) (en acetonitrilo y KCN) | 74-91% | 10-14 horas | [22] |
| 5 |  | Catalizador libre de metales | 80-99.3% (exceso enantiomérico) | | [23] |
| 6 | Ti(O i-Pr) ₄ | Complejo de Titanio (IV) con chinchonina | 61-99% | | [24] |
| 7 | La(OPh) ₃ | Complejo lantano(III) con catalizador BINSÁ | 28-99% | 20-96 horas | [24] |
| 8 | InCl ₃ | Tricloruro de Indio | 47-93% | 4-14 horas | [25] |
| 9 |  | Complejo cloruro de colina y ZnCl ₂ | 70-99% | 0.5-180 minutos | [26] |
| 10 |  | Complejo [Ftalimida-N-Oxilo][BMIM] | 85-98% | 1-24 minutos | [27] |

| | | | | | |
|----|---|--|--------|------------|------|
| 11 |  | Complejos [Hbim ⁺][ClO ₄] [Hbim ⁺][Cl] [Hbim ⁺][Br ⁻] | 85-96% | 25-400 min | [28] |
|----|---|--|--------|------------|------|

En el estudio del mecanismo del catalizador 2, ^[20] se propone la formación de un complejo protonado que activa la imina a través de un enlace de hidrógeno (Figura 4).

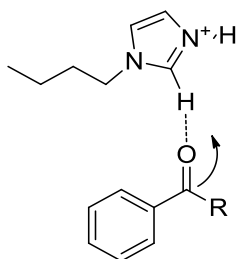
Figura 6. Activación de la imina con la guanidina bicíclica y HCN.



Para el catalizador 5, ^[23] mediante estudio de isótopos se encontró que los hidrógenos más ácidos son los que se encuentran en las ureas y son esenciales para la actividad catalítica.

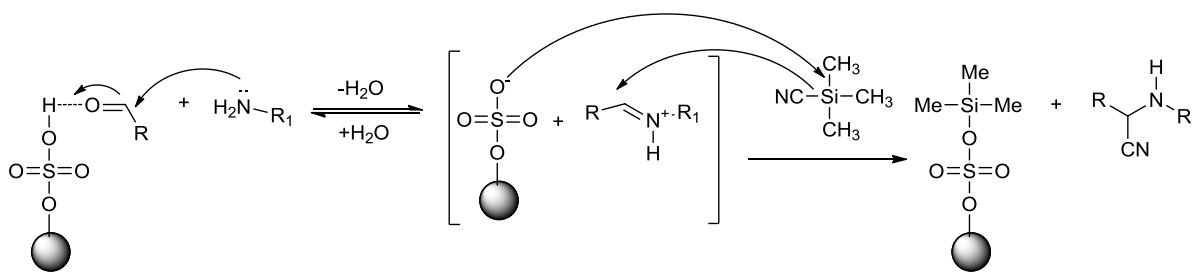
Entre las ventajas del uso de líquidos iónicos está su reutilización, además se evitan las condiciones fuertemente ácidas y el tedioso tratamiento acuoso que lleva a la formación de desechos tóxicos. La activación con líquidos iónicos, a diferencia de los otros catalizadores, como se muestra en la figura 5 es a través del oxígeno del enlace carbonílico en el aldehído, aumentando la electrofilicidad del carbono de este enlace. (Figura 5)

Figura 7. Incremento de la electrofilicidad del carbono carbonílico.



Entre los catalizadores recuperables, se encuentran los catalizadores ácidos soportados en celulosa y gel de sílice (Esquema 8).^[29-31]

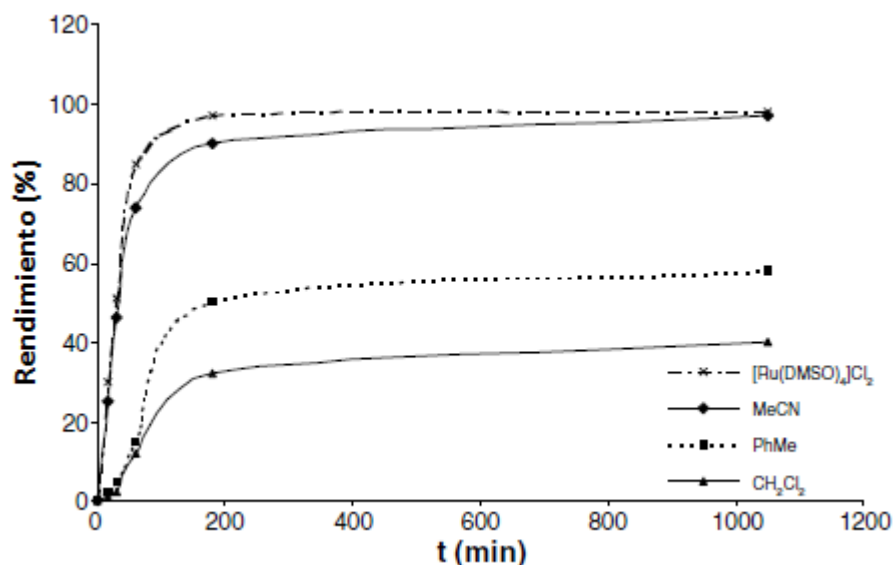
Esquema 8. Mecanismo de reacción de Strecker con catalizador ácido soportado en gel de sílice.



Los reportes de esta reacción muestran altos rendimientos (85-97%) a temperatura ambiente y cortos tiempos de reacción, además, al finalizar la reacción, el catalizador se puede separar del producto mediante filtración con el disolvente utilizado para luego recuperarse lavando y posteriormente secando a 60°C.^[32]

1.3.3. Disolventes: Para que la amina no reaccione con el disolvente, se seleccionan disolventes apróticos (no debe ceder protones). El más utilizado es el acetonitrilo (MeCN).^[33] Con el objetivo de eliminar el uso de catalizadores, Martínez et. al. realizaron un estudio de la reacción de Strecker con TMSCN y diferentes disolventes,^[33] y se encontró que al llevar a cabo la reacción con acetonitrilo y TMSCN se obtienen buenos resultados sin el uso de ácidos de Lewis. En este estudio se comparó esta reacción con diferentes disolventes, y se obtuvieron los resultados de la figura 6.

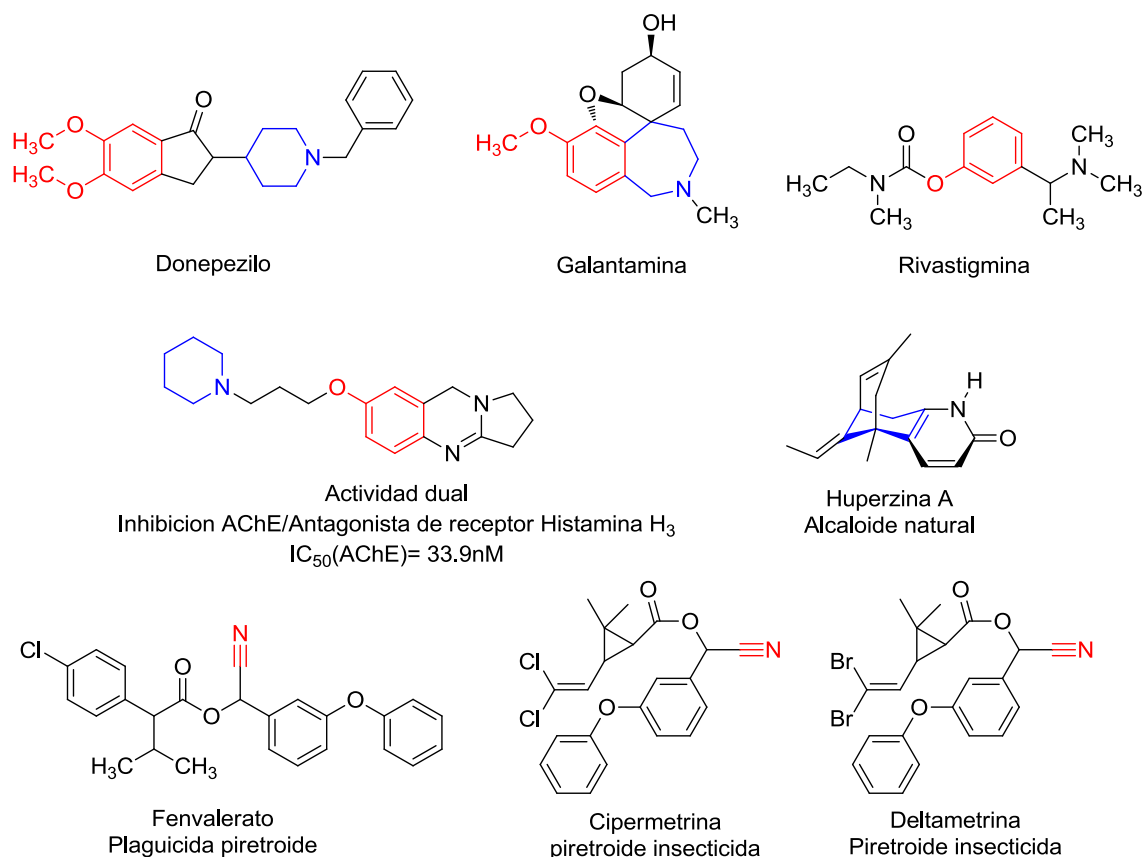
Figura 8. Comparación de la reacción de Strecker con diferentes disolventes y MeCN.



1.4. DISEÑO RACIONAL DE SISTEMAS CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

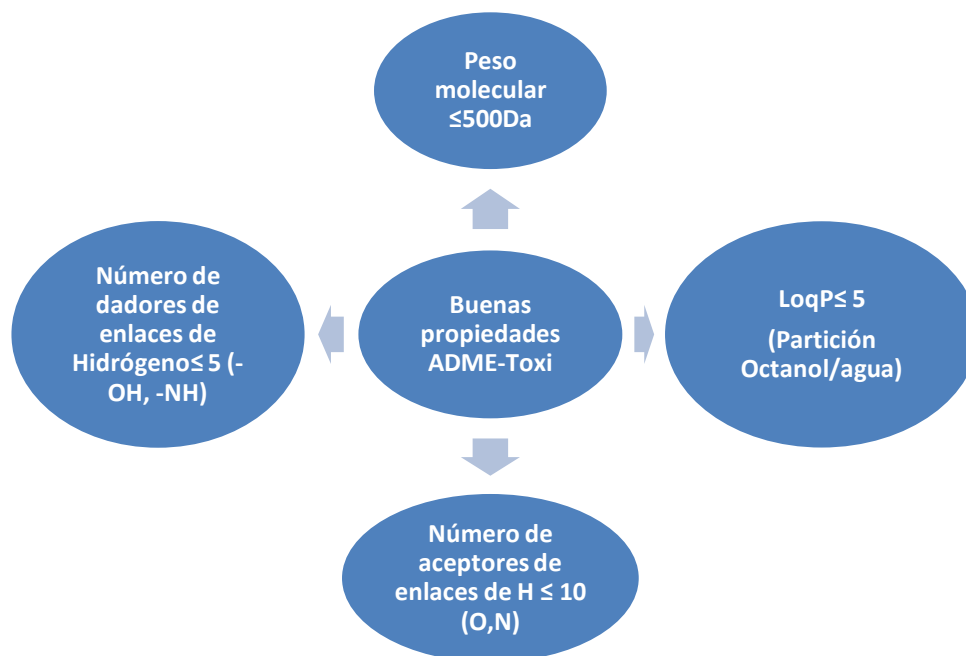
1.4.1. Principio de hibridación molecular: Los inhibidores de la AChE han mostrado utilidad práctica tanto en la medicina (contra la enfermedad de Alzheimer) como en la agricultura (insecticidas). En la búsqueda de potentes inhibidores de la AChE se han reportado varias moléculas (Figura 9) con grupos en común que han mostrado efecto inhibitorio sobre la enzima, [34-36] estos grupos comunes llamados farmacóforos, ayudan a la síntesis de análogos que aumenten la inhibición en la AChE. El proceso racional para sintetizar este tipo de compuestos con grupos farmacóforos es llamado hibridación molecular.

Figura 9. Inhibidores de la AChE reportados en para el tratamiento del Alzheimer y como insecticidas.



Lipinski y colaboradores contribuyeron a esta tarea examinando una biblioteca de moléculas probadas clínicamente, analizando las propiedades distinguibles en común. Este análisis le llevo a formular la regla de los cinco de Lipinski,^[37, 38] que consiste en una comparación teórica entre los fragmentos de fármacos ya conocidos y los de la molécula a evaluar, las similitudes entre ellos y su estructura sugieren si una molécula tiene o no afinidad con respecto a la permeabilidad, medida por la lipofilidad mediante el índice de partición octanol/agua, y la solubilidad del fármaco en el organismo, analizando las propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción, además de propiedades de toxicidad aceptables para el organismo (ADME-Tox) (Figura 10).

Figura 10. Parámetros de Lipinski para que un fármaco tenga buenas propiedades ADME.



Otros estudios realizados han mostrado nuevos parámetros comunes entre fármacos, como el número de enlaces rotables (NER), el cual mide la flexibilidad de la molécula según el número de enlaces sencillos acíclicos y el área superficial polar de la molécula (PSA), el cual es la sumatoria de las superficies de átomos polares como oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Estos estudios mostraron que las moléculas con $NER \leq 10$ y $PSA \leq 5$, teóricamente, tendrían permeabilidad aceptable a través del intestino delgado. Lipinski encontró que al combinar al menos dos de los parámetros, se obtenía un rango deseable inferior al 10%, lo que significa que si dos de los parámetros están por fuera del rango, es posible que los parámetros ADME-Tox sean pobres, ya que no cumplirían los parámetros de solubilidad y permeabilidad propios de la mayoría de los fármacos.^[38]

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por el mosquito *A. aegypti* en Colombia como lo son el dengue y actualmente el chikungunya han ido creciendo en las últimas dos décadas en gran manera. Un problema en el control químico de este insecto es la resistencia que ha adquirido a compuestos organofosforados y carbamatos que son los que más se utilizan como insecticidas.

El uso de metabolitos extraídos de plantas ha sido de gran interés para la química medicinal y como repelentes e insecticidas en la agricultura. Los inconvenientes encontrados al tratar de obtener los alcaloides a partir de las plantas, como sus bajo rendimientos, requerimientos de grandes cantidades de materia prima, problemas en la purificación, etc., continúan desafiando a la química orgánica sintética llevando a la modificación y desarrollo de nuevas metodologías. La generación de estos alcaloides con un mayor rendimiento es uno de los objetivos, además potenciando su actividad biológica, apoyados en los principios de hibridación molecular, para la síntesis de análogos de estos compuestos.

En estudios anteriores en el LQOBio, los análogos del alcaloide girgensohnina, obtenido de la planta *Girgensohnia oppositiflora* han mostrado actividad insecticida contra larvas del mosquito *A. aegypti*, y en la investigación del mecanismo de acción de estos compuestos se ha encontrado actividad de inhibición del alcaloide girgensohnina y sus análogos sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) bovina.

Es necesario entonces sintetizar nuevos sistemas aminonitrílicos que brinden mayor actividad inhibitoria de la AChE del mosquito *A. aegypti*. Para tal fin, este trabajo de investigación busca sintetizar nuevos análogos de la molécula girgensohnina, y confirmar su actividad en el mosquito mediante pruebas biológicas *in vitro* de inhibición de la enzima AChE e *in vivo* en larvas y adultos del insecto.

3. JUSTIFICACIÓN:

Debido a que:

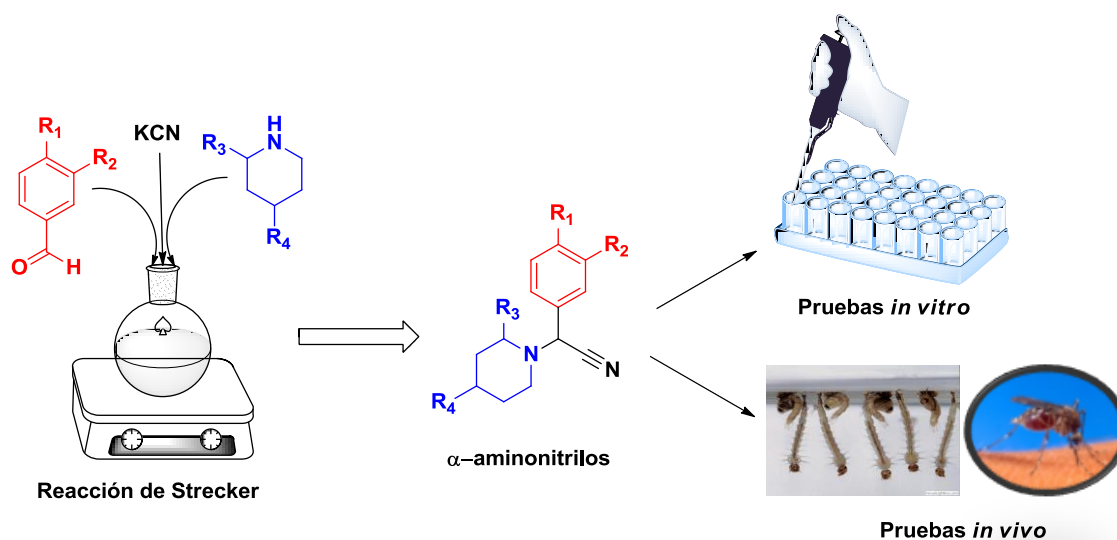
- El comportamiento del dengue en Colombia muestra una tendencia creciente sostenida en las últimas dos décadas.
- Los vectores de esta enfermedad han mostrado resistencia a compuestos organofosforados y carbamatos, además que este tipo de insecticidas no son amigables con el ambiente y son tóxicos para el ser humano y otros mamíferos.
- Los reportes de actividad biológica de la girsensohnina y sus análogos con pruebas *in vitro* sobre la AChE bovina e *in vivo* sobre las larvas del *A. aegypti* que se han realizado en el LQOBio.

Se hace necesario el diseño, síntesis y obtención de nuevas moléculas buscando potenciar su actividad inhibitoria contra la AChE, y que además no sean tóxicas para los seres humanos.

4. HIPÓTESIS

Es posible utilizar una reacción one-pot como la reacción de Strecker, para preparar una nueva serie de α -aminonitrilos, bajo condiciones suaves (temperatura ambiente y presión atmosférica) con parámetros sintéticos propios de la química verde, obteniendo moléculas con promisoría inhibición de la AChE como posibles insecticidas sobre el mosquito *A. aegypti*. (Figura 11).

Figura 11. Hipótesis del trabajo realizado en la tesis de grado.



5. OBJETIVOS

Establecida la anterior hipótesis y teniendo en cuenta la información recopilada y presentada, se proponen los siguientes objetivos para su desarrollo:

OBJETIVO GENERAL

Diseñar y sintetizar una nueva serie de moléculas α -aminonitrilicas con posible acción inhibitoria de la enzima AChE en *A. aegypti*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el catalizador de ácido sulfúrico soportado en gel de sílice (SSA) mediante la reacción del ácido clorosulfónico con gel de sílice.
- Sintetizar una nueva serie de nueve análogos del alcaloide girsensohnina mediante la reacción de Strecker empleando como fuente de cianuro el cianuro de potasio (KCN) y un catalizador que sea recuperable (SSA).
- Caracterizar los compuestos a través de técnicas instrumentales (IR, MS, RMN de ^1H y ^{13}C) y determinar sus propiedades fisicoquímicas.
- Realizar bioensayos de inhibición *in vitro* de la AChE y ensayos de acción insecticida *in vivo* en las larvas y adultos del mosquito *Aedes aegypti*.

6. DISEÑO RACIONAL DE LOS NUEVOS COMPUESTOS α -AMINONITRÍLICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

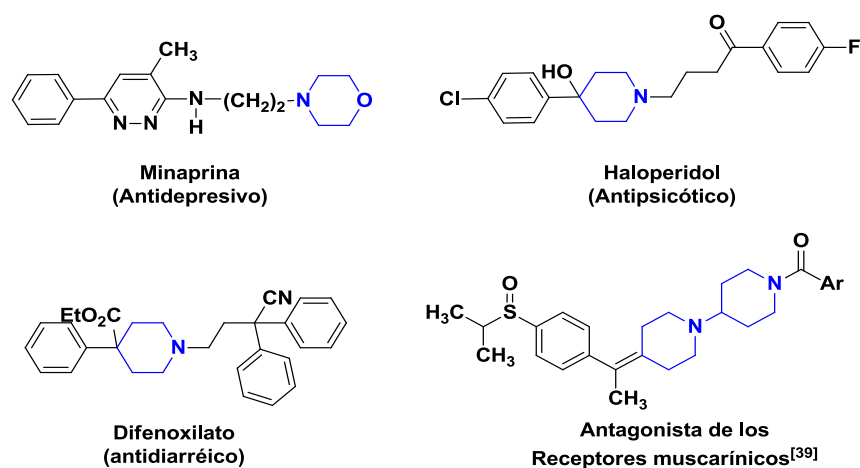
Como se explicó anteriormente en el estado del arte, el método de hibridación molecular se centra en los fragmentos en común de moléculas que expresen actividad biológica. Este trabajo se enfocó en el alcaloide natural de girsensohnina como compuesto cabeza de serie, ya que en los estudios anteriores esta molécula expresó actividad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa (AChE).

6.1. PRINCIPIO DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

Para seleccionar los sistemas amínicos y aldehídos para la síntesis de los α -aminonitrilos, se tuvo en cuenta los reportados con actividad biológica en literatura científica.

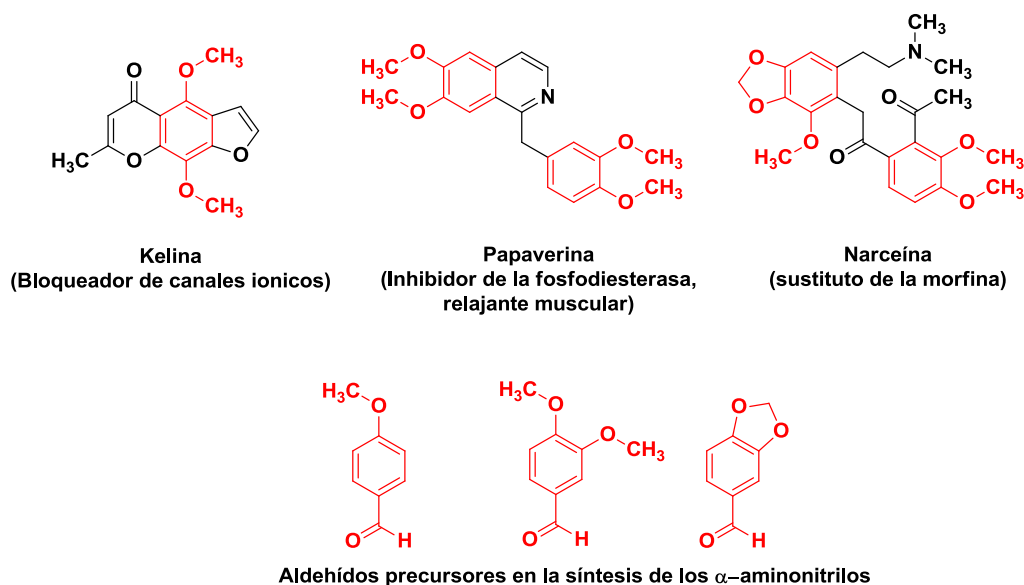
Se ha reportado en varios artículos la presencia de fragmentos de piperidina y morfolina en los agentes antidepresivos, antipsicóticos, antidiarreicos, antibióticos e inhibidores de la AChE para el tratamiento del Alzheimer y como insecticidas en los receptores muscarínicos, tal como se muestra en la figura 7 del estado del arte y en la figura 12.

Figura 12. Moléculas con actividad biológica reportadas en la literatura.



Para la elección de los precursores aldehídos en los compuestos sintetizados se tuvo en cuenta aquellos fragmentos de los alcaloides y que presentan actividad biológica, estos se han utilizado como relajantes musculares, bloqueadores de canales iónicos y como anestésicos, algunos de estos se muestran en la figura 13.

Figura 13.Alcaloides con actividad biológica reportados en literatura para la síntesis de los α -aminonitrilos.



En la naturaleza los cianoglucósidos han sido moléculas con gran interés biológico, y más aquellos que tienen el enlace nitrílico (-CN) en la posición alfa al enlace glucosídico, debido a la liberación de HCN por la acción de enzimas glucosidasas en la cianogénesis; como ejemplos se encuentran los descritos en el estado del arte (figura 3). Este enlace nitrílico también se encuentra en diferentes fármacos como el letrozol y anastrozol, utilizados para la prevención del cáncer, e insecticidas como el fenvalerato, cipermetrina y deltametrina (Figura 7), además de la girsensohnina, compuesto cabeza de serie de este trabajo.

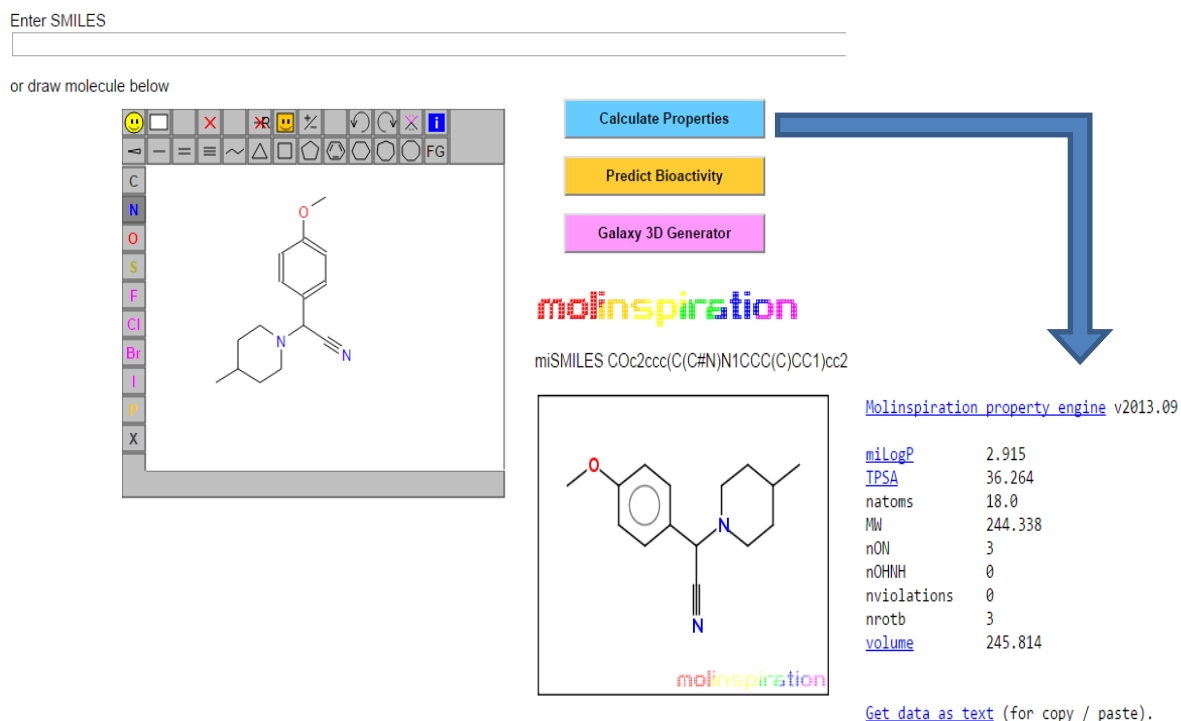
Teniendo en cuenta estas moléculas reportadas, se escogieron nueve (9) compuestos α -aminonitrílicos para adicionar a la quimioteca de los compuestos sintetizados en el laboratorio anteriormente.

6.2. CRIBADO VIRTUAL

Posteriormente a la aplicación de la hibridación molecular para determinar los sistemas α -aminonitrílicos a sintetizar, estos fueron sometidos a un cribado virtual para el cálculo de los parámetros de Lipinski y para determinar su biodisponibilidad teórica, se calcularon las propiedades ADMETox (Figura 14). Estos cálculos se realizaron *in silico* utilizando software encontrados en la web.

Para la obtención de los parámetros de Lipinski (peso molecular, LogP, NAEH, NDEH), además de la PSA y el NER, se utilizó el software Molinspiration^[40], desarrollado por Novartis y utilizado industrialmente y reportado en artículos científicos para la obtención de propiedades moleculares.

Figura 14. Obtención de los parámetros de Lipinski con el programa Molinspiration^[40].



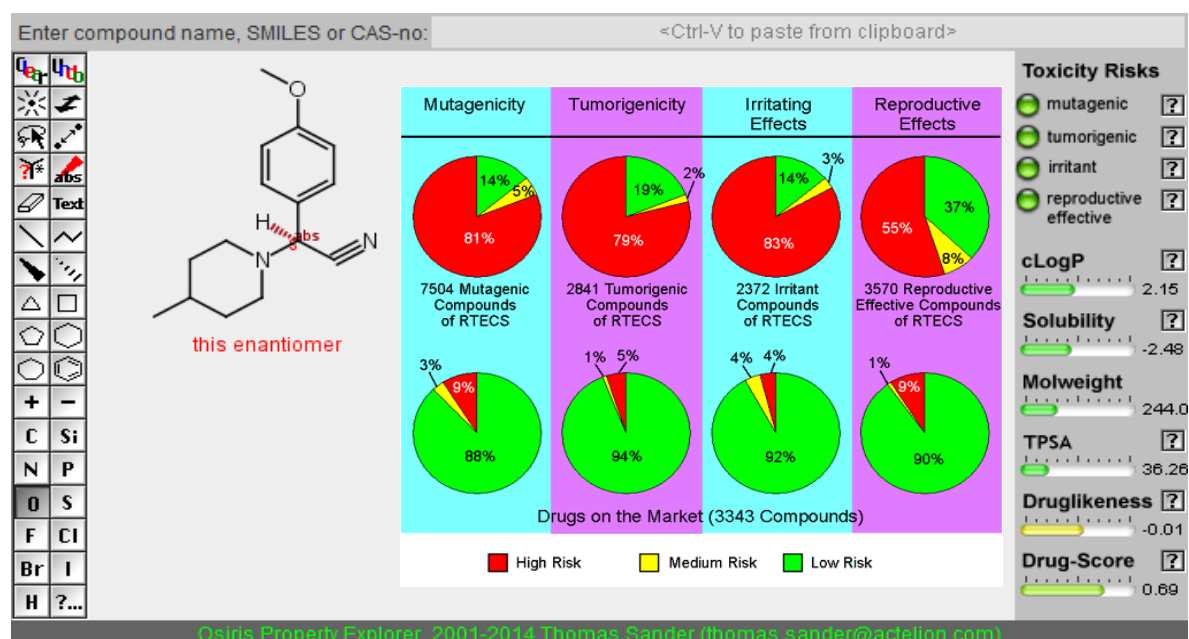
The screenshot displays the Molinspiration web interface. At the top, there is a text input field labeled "Enter SMILES" and a button "or draw molecule below". Below the input field is a drawing toolbar with various icons for building a molecule. The main drawing area shows a chemical structure of a molecule: a piperidine ring with a methyl group, connected to a carbon atom that is also bonded to a nitrile group and a 4-methoxyphenyl ring. To the right of the drawing area are three buttons: "Calculate Properties" (blue), "Predict Bioactivity" (yellow), and "Galaxy 3D Generator" (pink). Below these buttons is the Molinspiration logo and the miSMILES string: COc2ccc(C(C#N)N1CCC(C)CC1)cc2. A large blue arrow points from the "Calculate Properties" button to the results section. The results section shows the Molinspiration property engine v2013.09 output:

| | |
|-----------------------------|---------|
| miLogP | 2.915 |
| TPSA | 36.264 |
| natoms | 18.0 |
| MW | 244.338 |
| nON | 3 |
| nOHNH | 0 |
| nviolations | 0 |
| nrotb | 3 |
| volume | 245.814 |

At the bottom of the results section, there is a link: [Get data as text](#) (for copy / paste).

Para la obtención de los valores de solubilidad y el riesgo para el ser humano, se utilizó el programa Osiris Property Explorer ^[41], desarrollado por Actelion, el cual utiliza una base de datos de diferentes moléculas y predice los fragmentos de aquellas que tienen riesgos biológicos, además de calcular los parámetros de Lipinski y la solubilidad del compuesto, dando un valor de afinidad para ser fármaco (druglikeness y drug-score) este valor es calculado por el software tomando las contribuciones de las propiedades individuales (cLogP, P.M, TPSA, solubilidad y riesgos de toxicidad). Para la clasificación de riesgo, el programa utiliza un código de colores, siendo rojo para riesgo alto, naranja para riesgo medio y verde para riesgo bajo (Figura 15).

Figura 15. Obtención de los riesgos de toxicidad con el programa *Osiris property explorer*.



7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CRIBADO VIRTUAL

Con la información obtenida del programa Molinspiration se construyó la tabla 3 con los parámetros de Lipinski para las moléculas evaluadas registradas en la figura 16.

Figura 16. Moléculas analizadas por cribado virtual.

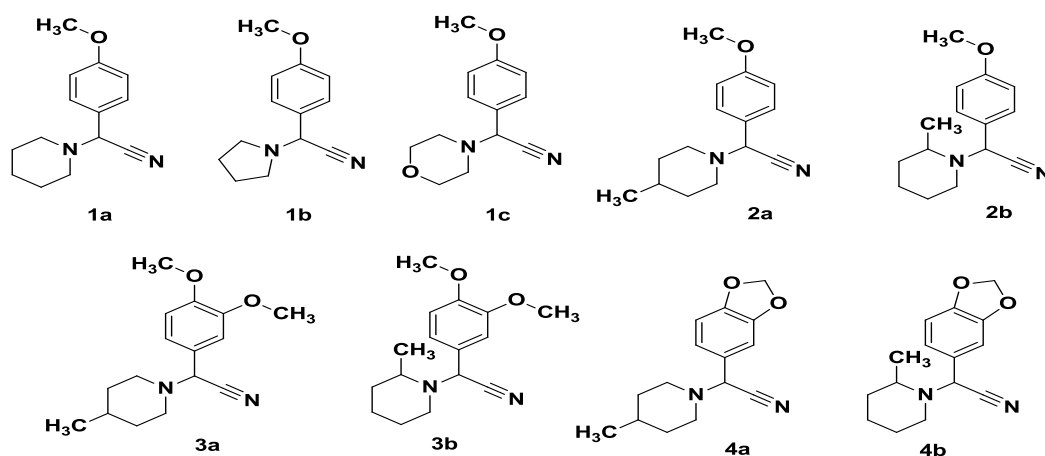


Tabla 3. Valores obtenidos del programa Molinspiration[®].

| Molécula | P.M (g/mol) | LogP | NDEH | NAEH | NER | TPSA Å ² |
|-----------|----------------|-------|------|------|-----|------------------------|
| 1a | 230.31 | 2.674 | 0 | 3 | 3 | 36.264 |
| 1b | 216.28 | 2.169 | 0 | 3 | 3 | 36.264 |
| 1c | 232.28 | 1.612 | 0 | 4 | 3 | 45.498 |
| 2a | 244.33 | 2.915 | 0 | 3 | 3 | 36.264 |
| 2b | 244.33 | 3.004 | 0 | 3 | 3 | 36.264 |
| 3a | 274.364 | 2.505 | 0 | 4 | 4 | 45.498 |
| 3b | 274.364 | 2.594 | 0 | 4 | 4 | 45.498 |
| 4a | 258.321 | 2.749 | 0 | 4 | 2 | 45.498 |
| 4b | 258.321 | 2.838 | 0 | 4 | 2 | 45.498 |

Se puede observar que todas las moléculas sintetizadas cumplen con los parámetros de Lipinski; los pesos moleculares varían entre 216.28-274.364 (≤ 500), el LogP está entre 1.612-3.004 (≤ 5), no hubo dadores de enlaces de hidrogeno (0) (≤ 5), el NAEH está entre 3-4 (≤ 5), esto significa que si estas

moléculas tienen actividad biológica, es probable que tengan efectividad por vía oral, lo que se confirma con los otros parámetros de biodisponibilidad obtenidos; NER entre 2-4 (≤ 10) y el TPSA entre 36.264-45.498 Å² (≤ 140 Å²), indicando según datos teóricos que tendría facilidad de transporte por absorción intestinal.

Con ayuda del programa Osiris Property Explorer se logró encontrar que las moléculas sintetizadas tienen generalmente valores bajos de toxicidad debido a que entre las moléculas registradas en el software no hay fragmentos similares a los de análogos sintetizados que tengan riesgos de toxicidad (Tabla 4); además se observa que con las contribuciones individuales de los valores obtenidos, da como resultado un valor aceptable de puntaje de fármaco (drug-score) (Tabla 5).

Tabla 4. Valores de toxicidad obtenidos en Osiris[®] property explorer.

| Molécula | Mutagénico | Tumorigénico | Irritante | Efectos Reproductivos |
|----------|------------|--------------|-----------|-----------------------|
| 1a | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 1b | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 1c | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 2a | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 2b | Bajo | Bajo | Medio | Bajo |
| 3a | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 3b | Bajo | Bajo | Medio | Bajo |
| 4a | Bajo | Bajo | Bajo | Bajo |
| 4b | Bajo | Bajo | Medio | Bajo |

Tabla 5. Valores para la obtención de la afinidad de fármaco de Osiris[®] property explorer.

| Molécula | cLogP | Solubilidad | P.M. | TPSA | Drug-likeness | Drug-score |
|----------|-------|-------------|-------|-------|---------------|------------|
| 1a | 1.88 | -2.32 | 230.0 | 36.26 | -3.03 | 0.49 |
| 1b | 1.54 | -2.05 | 216.0 | 36.26 | -0.53 | 0.65 |
| 1c | 0.71 | -1.43 | 232.0 | 45.49 | -2.23 | 0.53 |
| 2a | 2.15 | -2.48 | 244.0 | 36.26 | -0.01 | 0.69 |
| 2b | 2.2 | -2.7 | 244.0 | 36.26 | -2.55 | 0.39 |
| 3a | 2.08 | -2.5 | 274.0 | 45.49 | 1.55 | 0.83 |
| 3b | 2.13 | -2.72 | 274.0 | 45.49 | -1.02 | 0.45 |
| 4a | 2.33 | -3.18 | 258.0 | 45.49 | -0.27 | 0.63 |
| 4b | 2.38 | -3.39 | 258.0 | 45.49 | -2.83 | 0.36 |

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

8.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Para la obtención de los productos, se utilizaron precursores (aldehídos y aminas) de las marcas Merck[®], Sigma Aldrich[®] y J.T. Baker[®]. Los disolventes utilizados en el medio de reacción y en las purificaciones fueron destilados y secados previamente a su uso.

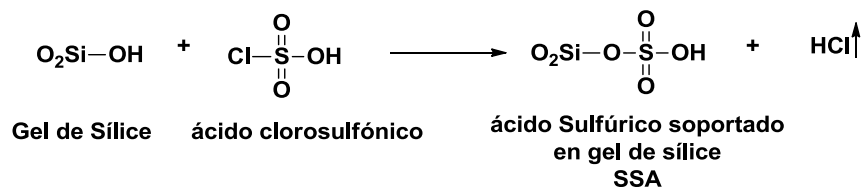
Para controlar el transcurso de la reacción, confirmar la pureza del producto y observar los componentes en las mezclas de reacción se utilizó la cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography TLC) en cromatofolios de Silufol UV254, para observar este control se empleó luz ultravioleta de 254nm o se utilizó para su revelado vapor de yodo.

La purificación de los productos se realizó por separación cromatográfica en columna de óxido de aluminio neutro como soporte sólido (Al₂O₃ 90 activo neutro, 70-230 mesh Merck[®]) y mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo en diferentes relaciones dependiendo del resultado observado en las placas cromatográficas.

8.2. PREPARACIÓN DEL CATALIZADOR DE ÁCIDO SULFÚRICO SOPORTADO EN GEL DE SÍLICE.

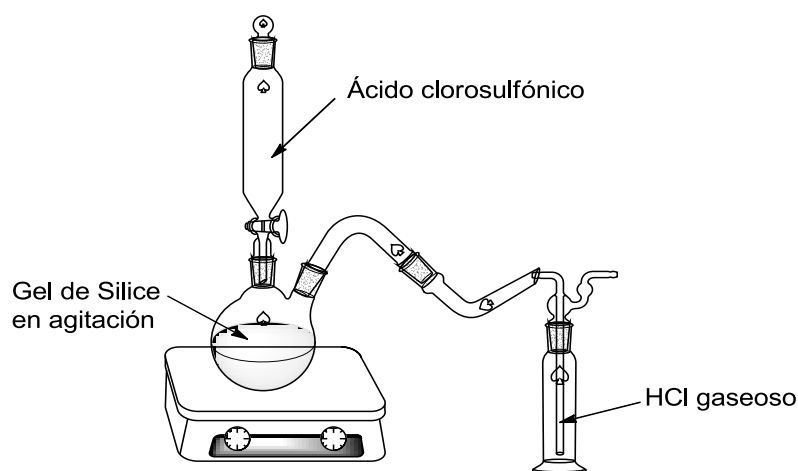
Para la preparación del catalizador de ácido sulfúrico soportado en gel de sílice se sigue el siguiente esquema de reacción ^[42].

Esquema 9. Síntesis del catalizador SSA



Se adiciona a un balón de dos bocas el gel de sílice y se realiza el montaje de la figura 17, se adiciona al gel de sílice gota a gota, y a través de un embudo de adición el ácido clorosulfónico a temperatura ambiente hasta que no se observe el desprendimiento de HCl en la trampa de gases; se continua la agitación en el balón durante 30 minutos, obteniéndose de esta manera el catalizador como un sólido de color blanco el cual se almacena a temperatura ambiente. La cantidad de H^+ se determina mediante la liberación de iones H_3O^+ , la cual se titula con una solución estándar de NaOH.

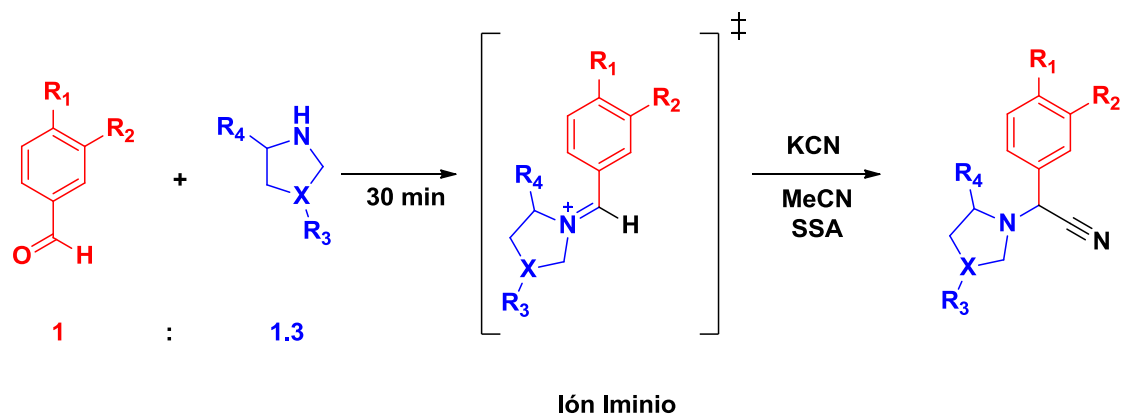
Figura 17.Montaje experimental para la preparación del catalizador SSA.



8.3. OBTENCIÓN DE LOS A-AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LA GIRGENSOHNINA.

En un balón de fondo redondo de 50mL provisto de un agitador magnético se adicionan los precursores con una relación molar 1: 1.3 (aldehído: amina) manteniendo agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente (Esquema 10).

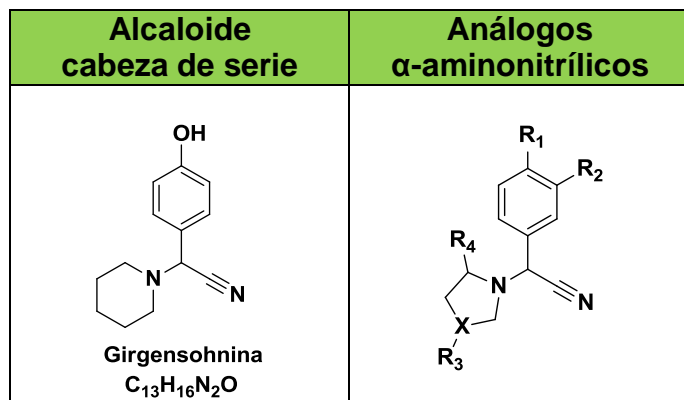
Esquema 10. Reacción de Strecker, obtención de α -aminonitrilos.



Posteriormente se agregó al balón 10mL de MeCN, KCN en relación 1: 1.5 (amina: KCN) y 0.800g de catalizador SSA. Después de 18-22 horas de reacción se extrae el producto de reacción retirando el catalizador y KCN presente en la mezcla mediante filtración; a continuación se lava el producto varias veces con acetato de etilo utilizando un embudo de extracción y se concentra eliminando el disolvente en un rotaevaporador.

El producto concentrado se purifica en una columna de óxido de aluminio con mezcla de diferentes relaciones de éter de petróleo/acetato de etilo para de esta manera obtener el producto sin impurezas. La presencia del producto puro se confirma mediante cromatografía en capa fina comparando el aldehído precursor con el producto obtenido (Tabla 6).

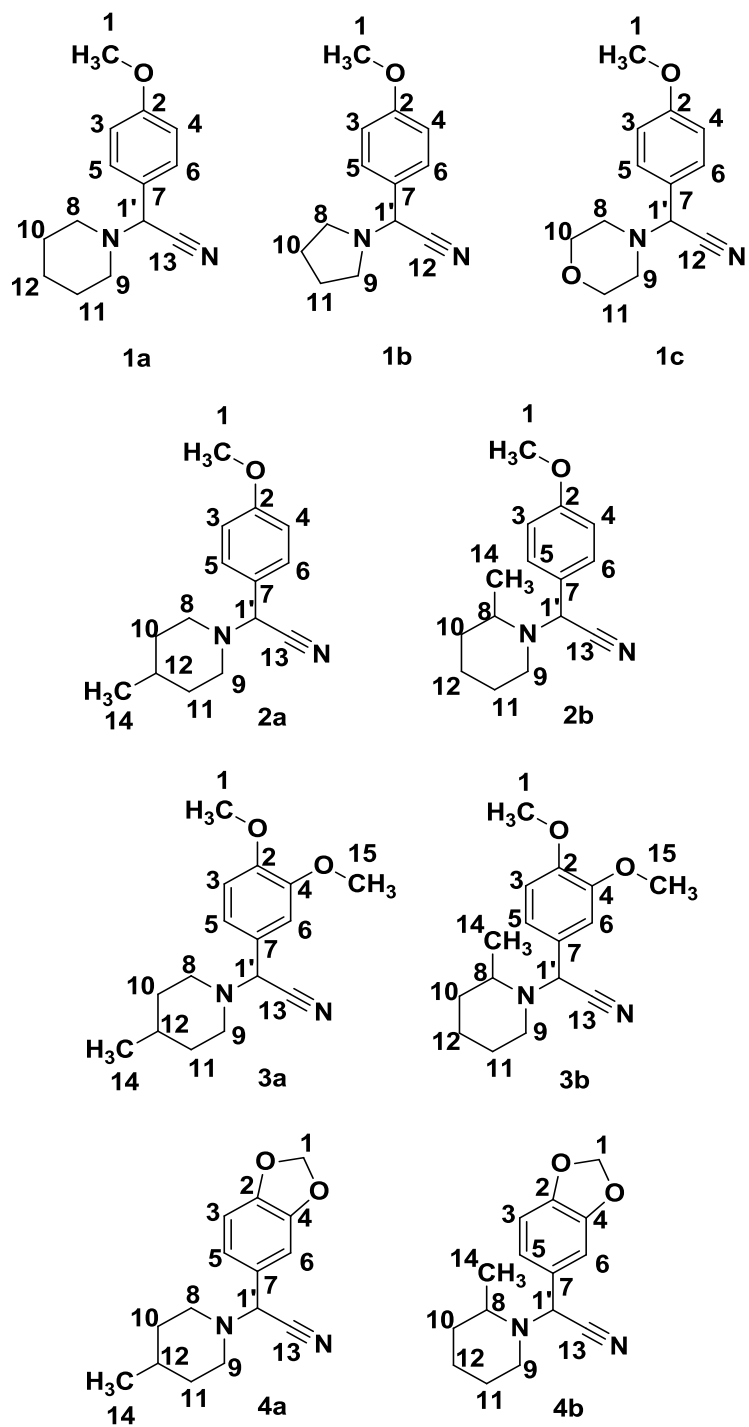
Tabla 6. Análogos α -aminonitrílicos obtenidos.



| Molécula | X | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|-----------|---------------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1a | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₃ | -H | -H | -H |
| 1b | CH ₂ | -OCH ₃ | -H | -H | -H |
| 1c | CH ₂ O | -OCH ₃ | -H | -H | -H |
| 2a | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₃ | -H | -CH ₃ | -H |
| 2b | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₃ | -H | -H | -CH ₃ |
| 3a | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₃ | -OCH ₃ | -CH ₃ | -H |
| 3b | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₃ | -OCH ₃ | -H | -CH ₃ |
| 4a | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₂ O- | | -CH ₃ | -H |
| 4b | CH ₂ CH ₂ | -OCH ₂ O- | | -H | -CH ₃ |

Se obtuvieron 9 análogos α -aminonitrílicos y sus resultados se muestran a continuación:

Figura 18. Análogos α -aminonitrílicos sintetizados.



2-(4-metoxifenil)-2-(piperidin-1-il) acetonitrilo (1a). A partir de 3.32g (24.4mmol) de p-anisaldehído, 2.081g (24.4mmol) de piperidina, 2.12g del catalizador SSA ($\text{SiO}_2\text{-O-SO}_3\text{H}$) y 2.3g (35mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 47.05%; $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ (230.31 g/mol); P.f.: 78-79°C. IR (KBr): 2222cm^{-1} ($\nu\text{-C}\equiv\text{N}$), 1250cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-CH}_3}$), 818cm^{-1} ; 849cm^{-1} (ν_{Ar}). CG-EM (70eV): $t_{\text{R}}=2.0\text{min}$. $m/z=$ (231.3, M^+ , 2.79), 483.1 (67.85), 253.2 (3.79), 204.4 (100). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.43 (2H, dd, $^3\text{J}=8.30\text{Hz}$, $^4\text{J}=2.9\text{Hz}$, 5,6- H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, $^3\text{J}=8.8\text{Hz}$, $^4\text{J}=3\text{Hz}$, 3,4- H_{Ar}), 4.76 (1H, s, 1'-H), 3.81 (3H, s, 1-O- CH_3), 2.51 (4H, ddd, $\text{J}=10.7\text{Hz}$, $\text{J}=6.9\text{Hz}$, $\text{J}=3.9\text{Hz}$, 8,9- H_{Pip}), 1.59 (4H, pd, $\text{J}=13\text{Hz}$, $\text{J}=6.8\text{Hz}$, 10,11- H_{Pip}), 1.47 (2H, dd, $\text{J}=5.0$, $\text{J}=5.5$, 12- H_{Pip}). $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz), δ (ppm): 159.87 (2- C_{Ar}), 114.01 (3, 4- C_{Ar}), 125.59 (7- C_{Ar}), 115.98 (13-CN), 129.19 (5, 6- C_{Ar}), 62.62 (1'-C), 55.31 (1-O- CH_3), 51.03 (8, 9- C_{Pip}), 25.86 (10, 11- C_{Pip}), 24.07 (12- C_{Pip}).

2-(4-metoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il) acetonitrilo (1b). A partir de 1.07g (7.86mmol) de p-anisaldehído, 0.55g (7.86mmol) de pirrolidina, 0.87g del catalizador SSA ($\text{SiO}_2\text{-O-SO}_3\text{H}$) y 0.76g (11.7mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un aceite amarillo con un rendimiento de 54.44%; $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (216.28 g/mol); IR (KBr): 2221.63cm^{-1} ($\nu\text{-C}\equiv\text{N}$), 1249.67cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-CH}_3}$), 833.11cm^{-1} (ν_{Ar}). CG-EM (70eV): $t_{\text{R}}=0.3\text{min}$. $m/z=$ (217.4, M^+H , 17.54), 455.1 (72.93), 239.2 (6.61), 190.5 (100). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.43 (2H, dd, $^3\text{J}=8.40\text{Hz}$, $^4\text{J}=3.0\text{Hz}$, 5,6- H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, $^3\text{J}=8.8\text{Hz}$, $^4\text{J}=3.0\text{Hz}$, 3,4- H_{Ar}), 4.97 (1H, s, 1'-H), 3.81 (3H, s, 1-O- CH_3), 2.63 (4H, m, 8,9- H_{Pip}), 1.82 (4H, m, 10,11- H_{Pip}). $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz), δ (ppm): 159.95 (2- C_{Ar}), 114.16 (3, 4- C_{Ar}), 126.51 (7- C_{Ar}), 116.47 (12-CN), 129.00 (5, 6- C_{Ar}), 58.80 (1'-C), 55.44 (1-O- CH_3), 50.29 (8, 9- C_{Pip}), 23.51 (10, 11- C_{Pip}).

2-(4-metoxifenil)-2- morfolinoacetonitrilo (1c). A partir de 0.99g (24.4mmol) de p-anisaldehído, 2.081g (24.4mmol) de piperidina, 2.12g del catalizador SSA ($\text{SiO}_2\text{-O-SO}_3\text{H}$) y 2.3g (35mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 43.77%; $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ (232.28 g/mol); P.f.: 79-80°C. IR (KBr): 2222cm^{-1} ($\nu\text{-C}\equiv\text{N}$), 1250cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-CH}_3}$), 818cm^{-1} ; 864cm^{-1} (ν_{Ar}), 1188cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-C}}$). CG-EM (70eV): $t_{\text{R}}=2.0\text{min}$. $m/z=$ (255.1, M^++Na , 41.58), 487.0 (44.98), 206.3 (100). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.42 (2H, dd, $^3\text{J}=8.60\text{Hz}$, $^4\text{J}=3.0\text{Hz}$, 5,6- H_{Ar}), 6.91 (2H, dd, $^3\text{J}=8.8\text{Hz}$, $^4\text{J}=3\text{Hz}$, 3,4- H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1'-H), 3.81 (3H, s, 1-O- CH_3), 2.55 (4H, m, 8,9- H_{Pip}), 3.70 (4H, m, 10,11- H_{Pip}). $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz), δ (ppm): 160.38 (2- C_{Ar}), 114.45 (3, 4- C_{Ar}), 124.72 (7- C_{Ar}), 115.89 (13-CN), 129.64 (5, 6- C_{Ar}), 62.14 (1'-C), 55.71 (1-O- CH_3), 50.29 (8, 9- C_{Pip}), 25.86 (10, 11- C_{Pip}).

2-(4-metoxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (2a). A partir de 1.106g (8.12mmol) de p-anisaldehído, 1.0475g (10.5mmol) de 4-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA ($\text{SiO}_2\text{-O-SO}_3\text{H}$) y 1.02g (15.75mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 74.70%; $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ (244.33 g/mol); P.f.: 95-96°C. IR (KBr): 2221.63cm^{-1} ($\nu\text{-C}\equiv\text{N}$), 1265.1cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O-CH}_3}$), 833.1cm^{-1} (ν_{Ar}), 1604.51cm^{-1} ; 1511.95cm^{-1} ; 1450.23cm^{-1} (δ_{Ar}), 2931.32cm^{-1} ; 2885.04cm^{-1} (ν_{CH_3}). CG-EM (70eV): $t_{\text{R}}=0.5\text{min}$. $m/z=$ (267.1, M^++Na , 2.71), 511.1 (13.46), 218.3 (100). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz) δ (ppm): 7.43 (2H, dd, $^3\text{J}=8.40\text{Hz}$, $^4\text{J}=3.2\text{Hz}$, 5,6- H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, $^3\text{J}=8.8\text{Hz}$, $^4\text{J}=3\text{Hz}$, 3,4- H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1'-H), 3.81 (3H, s, 1-O- CH_3), 2.89 (1H, dt, $\text{J}=4.5\text{Hz}$, $\text{J}=2\text{Hz}$, 9- $\text{H}_{\text{ec,Pip}}$), 2.56 (1H, m, 8- $\text{H}_{\text{ec,Pip}}$), 2.49 (1H, td, $\text{J}=2,7\text{-J}=8,4$, 9- $\text{H}_{\text{ax,Pip}}$), 2.06 (1H, td, $\text{J}=2,7\text{-J}=8,9$, 8- $\text{H}_{\text{ax,Pip}}$), 1.70 (1H, qd, $\text{J}=2,7\text{-J}=6,9$, 11- $\text{H}_{\text{ec,Pip}}$), 1.57 (1H, qd, $\text{J}=3,0\text{-J}=7,3$, 10- $\text{H}_{\text{ec,Pip}}$), 1.42 (1H, m, 12-H), 1.34 (1H, qd, $\text{J}=7,6\text{-J}=4,0\text{-J}=8,4$, 11- $\text{H}_{\text{ax,Pip}}$), 1.09 (1H, qd, $\text{J}=3,9\text{-J}=7,7\text{-J}=8,9$, 10- $\text{H}_{\text{ax,Pip}}$), 0.92 (3H, d, $^3\text{J}=6.4\text{Hz}$, 14- CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz), δ (ppm): 159.88 (2- C_{Ar}), 132.11 (6- C_{Ar}), 129.18 (5- C_{Ar}), 125.67 (7- C_{Ar}), 115.95 (13-CN), 114.40 (4- C_{Ar}), 114.03 (3- C_{Ar}), 62.15 (1'-C), 55.42 (1-O- CH_3),

53.33 (9-C_{Pip}), 47.33 (8-C_{Pip}), 34.38 (11-C_{Pip}), 33.78 (10-C_{Pip}), 30.52 (12-C_{Pip}), 21.79 (14-CH₃).

2-(4-metoxifenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (2b). A partir de 1.099g (8.07mmol) de p-anisaldehído, 1.05g (10.5mmol) de 4-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA (SiO₂-O-SO₃H) y 1.02g (15.75mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 9.41%; C₁₅H₂₀N₂O (244.33 g/mol); P.f.: 57-58°C. IR(KBr): 2221.63cm⁻¹(ν—C≡N), 1249.67cm⁻¹ (ν_{C-O-CH₃}), 817.68cm⁻¹(ν_{Ar}), 1604.51cm⁻¹; 1511.95cm⁻¹; 1450.23cm⁻¹(δ_{Ar}), 2931.32cm⁻¹(ν_{CH₃}).CG-EM (70eV): t_R=0.1min. m/z= (511.1, 2M⁺+Na, 44.87), 218.3 (92.29). ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz) δ(ppm): 7.43 (2H, dd, ³J=8.50Hz, ⁴J=3.2Hz, 5,6-H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, ³J=8.8Hz, ⁴J=3Hz, J=2.1Hz 3,4-H_{Ar}), 5.23 (1H, s, 1'-H), 3.81 (3H, s, 1-O-CH₃), 2.52 (1H, m, 8-H_{Pip}), 2.50 (1H, m, 9-H_{ax,Pip}), 2.08 (1H, td, J=2,5-J=8.8, 9-H_{ec,Pip}), 1.71 (1H, m, 10-H_{ec,Pip}), 1.69 (1H, m, 11-H_{ec,Pip}), 1.54 (1H, m, 12-H_{ax,Pip}), 1.38 (1H, m, 11-H_{ax,Pip}), 1.35 (1H, m, 10-H_{ax,Pip}), 1.33 (1H, m, 12-H_{ec,Pip}), 1.22 (3-H, d, J= 6.1Hz, 14-CH₃). ¹³C-RMN (100MHz), δ(ppm): 159.79 (2-C_{Ar}), 129.13 (5,6-C_{Ar}), 126.31 (7-C_{Ar}), 115.62 (13-CN), 114.09 (3,4-C_{Ar}), 56.76 (1'-C), 55.63 (8-H_{Pip}), 55.45 (1-O-CH₃), 47.60 (9-C_{Pip}), 35.31 (11-C_{Pip}), 25.95 (12-C_{Pip}), 24.66 (10-C_{Pip}), 20.59 (14-CH₃).

2-(3,4-dimetoxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (3a). A partir de 1.340g (8.07mmol) de 3,4-dimetoxibenzaldehído, 1.047g (10.5mmol) de 4-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA (SiO₂-O-SO₃H) y 0.683g (10.5mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 41.9%; C₁₆H₂₂N₂O₂ (274.33 g/mol); P.f.: 87-88°C. IR (KBr): 2206.21cm⁻¹ (ν—C≡N), 1265.1cm⁻¹ (ν_{C-O-CH₃}), 833.1cm⁻¹(ν_{Ar}), 1619.94cm⁻¹; 1465.66cm⁻¹(δ_{Ar}), 2931.32cm⁻¹; 2885.04cm⁻¹(ν_{CH₃}). CG-EM (70eV): t_R=2.0min. m/z= (275.2, M⁺+H, 3.26), 571.1 (100), 248.3 (73.24). ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz)

δ (ppm): 7.08 (1H, ddd, $J=0.8$ - $J=1.3$ - $J=5.3$, 5- H_{Ar}), 7.00 (1H, d, $^4J=2.1$ Hz, 6- H_{Ar}), 6.84 (1H, d, $^3J=8.3$ Hz, 3- H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1'-H), 3.89 (3H, s, 1-O- CH_3), 3.88 (3H, s, 15-O- CH_3), 2.88 (1H, dt, $J=4.6$ Hz- $J=6.8$ Hz, 9- $H_{ec,Pip}$), 2.56 (1H, m, 8- $H_{ec,Pip}$), 2.50 (1H, td, $J=2.7$ Hz- $J=8.7$ Hz, 9- $H_{ax,Pip}$), 2.05 (1H, td, $J=2.6$ Hz- $J=8.8$ Hz, 8- $H_{ax,Pip}$), 1.70 (1H, dt, $J=2.7$ Hz- $J=7.0$ Hz, 11- $H_{ec,Pip}$), 1.57 (1H, dt, $J=2.7$ Hz- $J=7.7$ Hz, 10- $H_{ec,Pip}$), 1.42 (1H, m, 12-H), 1.33 (1H, qd, $J=3.9$ Hz- $J=7.7$ Hz- $J=8.3$ Hz, 11- $H_{ax,Pip}$), 1.09 (1H, qd, $J=4.0$ Hz- $J=7.7$ Hz- $J=8.9$ Hz, 10- $H_{ax,Pip}$), 0.91 (3H, d, $^3J=6.4$ Hz, 14- CH_3). ^{13}C -RMN (100MHz), δ (ppm): 149.29 (2- C_{Ar}), 149.17 (4- C_{Ar}), 126.07 (7- C_{Ar}), 120.19 (5- C_{Ar}), 115.89 (13-CN), 110.74 (6- C_{Ar}), 110.62 (3- C_{Ar}), 62.39 (1'-C), 56.04 (15-O- CH_3), 56.00 (1-O- CH_3), 53.26 (8- C_{Pip}), 47.34 (9- C_{Pip}), 34.40 (12- C_{Pip}), 33.91 (11- C_{Pip}), 30.51 (10- C_{Pip}), 21.83 (14- CH_3).

2-(3,4-dimetoxifenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (3b). A partir de 1.350g (8.18mmol) de 3,4-dimetoxibenzaldehído, 1.055g (10.6mmol) de 4-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA (SiO_2 -O- SO_3H) y 1.03g (15.9mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 132.21%; $C_{16}H_{22}N_2O_2$ (274.36 g/mol); P.f.: 94-95°C. IR (KBr): 2221.63 cm^{-1} (ν - $C\equiv N$), 1249.67 cm^{-1} (ν_{C-O-CH_3}), 863.97 cm^{-1} (ν_{Ar}), 1604.51 cm^{-1} ; 1511.95 cm^{-1} ; 1450.23 cm^{-1} (δ_{Ar}), 2962.18 cm^{-1} ; 2931.32 cm^{-1} (ν_{CH_3}). CG-EM (70eV): $t_R=2.0$ min. $m/z=$ (571.1, $2M^++Na$, 90.66), 248.3 (100), 843.1 (5.96). 1H -RMN ($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 7.09 (1H, dd, $J=8.3$, $J=1.3$, 5- H_{Ar}), 7.00 (1H, d, $^4J=1.5$ Hz, 6- H_{Ar}), 6.85 (1H, d, $^3J=8.3$ Hz, 3- H_{Ar}), 5.24 (1H, s, 1'-H), 3.89 (3H, s, 15-O- CH_3), 3.88 (3H, s, 1-O- CH_3), 2.53 (1H, m, 8- H_{Pip}), 2.52 (1H, m, 9- $H_{ax,Pip}$), 2.08 (1H, td, $J=11.2$, $J=2.3$, 9- $H_{ec,Pip}$), 1.72 (1H, m, 10- $H_{ec,Pip}$), 1.70 (1H, m, 11- $H_{ec,Pip}$), 1.55 (1H, m, 12- $H_{ax,Pip}$), 1.38 (1H, m, 11- $H_{ax,Pip}$), 1.35 (1H, m, 10- $H_{ax,Pip}$), 1.33 (3H, m, 12- $H_{ec,Pip}$), 1.22 (3-H, d, $J=6.1$, 14- CH_3). ^{13}C -RMN (100MHz), δ (ppm): 149.29 (2- C_{Ar}), 149.23 (4- C_{Ar}), 126.73 (7- C_{Ar}), 120.22 (5- C_{Ar}), 115.52 (13-CN), 110.95 (6- C_{Ar}), 110.65 (3- C_{Ar}), 57.06 (1'-C), 56.10 (15-O- CH_3), 56.05 (1-O- CH_3), 55.62 (8- C_{Pip}), 47.77 (9- C_{Pip}), 35.28 (11- C_{Pip}), 25.99 (10- C_{Pip}), 20.54 (14- CH_3), 24.48 (12- C_{Pip}).

2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-il)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (4a). A partir de 1.211g (8.07mmol) de piperonal, 1.047g (10.5mmol) de 4-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA (SiO₂-O-SO₃H) y 0.683g (10.5mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 20.33%; C₁₅H₁₈N₂O₂ (258.32 g/mol); P.f.: 88-89°C. IR (KBr): 2221.63cm⁻¹ (ν—C≡N), 1249.67cm⁻¹ (ν_{C-O-CH₃}), 863.97cm⁻¹(ν_{Ar}), 1604.51cm⁻¹; 1511.95cm⁻¹; 1434.81cm⁻¹(δ_{Ar}), 2931.32cm⁻¹; 2900.47cm⁻¹; 2869.51cm⁻¹(ν_{CH₃}). CG-EM (70eV): t_R=2.0min. m/z= (281.1, M⁺+Na, 3.98), 539.0 (100), 232.3 (50.30). ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz) δ(ppm): 7.03 (1H, dd, J=0.8- J=1.8, 5-H_{Ar}), 7.00 (1H, ddd, J=2.9, J=1.8, J=1, 6-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, ³J=7.9Hz, 3-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 1-H), 4.73 (1H, s, 1'-H), 2.87 (1H, dt, J= 8.5, J= 4.9, 9-H_{ec,Pip}), 2.57 (1H, dt, J= 8.9, J= 3.7, 8-H_{ec,Pip}), 2.50 (1H, td, J=11.2, J=2.7, 9-H_{ax,Pip}), 2.07 (1H, td, J= 11.5, J= 2.7, 8-H_{ax,Pip}), 1.71 (1H, dq, J= 12.5, J= 7, J= 2.8, 11-H_{ec,Pip}), 1.59 (1H, dq, J= 13.0, J= 7.3, J= 3.0, 10-H_{ec,Pip}), 1.42 (1H, m, 12-H_{Pip}), 1.33 (1H, qd, J= 8.1, J= 7.6, J= 4.0, 11-H_{ax,Pip}), 1.11 (1H, qd, J=8.7, J=7.8, J=3.9, 10-H_{ax,Pip}), 0.92 (3H, d, J= 6.4Hz, 14-CH₃). ¹³C-RMN (100MHz), δ(ppm): 148.26 (4-C_{Ar}), 148.10 (2-C_{Ar}), 127.58 (7-C_{Ar}), 121.43 (3-C_{Ar}), 115.79 (13-CN), 108.32 (5-C_{Ar}), 108.16 (6-C_{Ar}), 101.52 (1-O-CH₂-O), 62.42 (1'-H), 53.28 (9-C_{Pip}), 47.37 (8-C_{Pip}), 34.45 (11-C_{Pip}), 33.91 (10-C_{Pip}), 30.53 (12-C_{Pip}), 21.84 (14-CH₃).

2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-il)-2-(2-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo. (4b). A partir de 1.224g (8.15mmol) de piperonal, 1.055g (10.6mmol) de 2-metilpiperidina, 0.840g del catalizador SSA (SiO₂-O-SO₃H) y 1.03g (13.78mmol) de KCN, el producto de reacción se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento de 5.68%; C₁₅H₁₈N₂O₂ (258.32 g/mol); P.f.: 80-81°C. IR (KBr): 2190.78cm⁻¹ (ν—C≡N), 1249.67cm⁻¹ (ν_{C-O-CH₃}), 817.68cm⁻¹(ν_{Ar}), 1604.51cm⁻¹; 1450.23cm⁻¹(δ_{Ar}), 2931.32cm⁻¹; 2854.18cm⁻¹(ν_{CH₃}). CG-EM (70eV): t_R=0.5min. m/z= (281.1, M⁺+Na, 5.51), 539.0 (100), 232.3 (94.39). ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz) δ(ppm): 7.02 (1H, ddd, J=0.9-

J=1.7- J=8.0, 5-H_{Ar}), 6.99 (1H, d, ⁴J=1.6Hz, 6-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, ³J =8.0Hz, 3-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 1-O-CH₂-O), 5.18 (1H, s, 1'-H), 2.54 (1H, m, 8-H_{pip}), 2.52 (1H, m, 9-H_{ec,Pip}), 2.08 (1H, td, J=11.2, J= 2.6, 9-H_{ax,Pip}), 1.71 (1H, m, 10-H_{ec,Pip}), 1.69 (1H, m, 11-H_{ec,Pip}), 1.54 (1H, m, 12-H_{ec,Pip}), 1.38 (1H, m, 11-H_{ax,Pip}), 1.35 (1H, m, 10-H_{ax,Pip}), 1.33 (1H, m, 12-H_{ax,Pip}), 1.20 (3H, d, J=6.1Hz, 14-CH₃). ¹³C-RMN (100MHz), δ(ppm): 148.24 (4-C_{Ar}), 147.92 (2-C_{Ar}), 128.21 (7-C_{Ar}), 121.17 (3-C_{Ar}), 115.43 (13-CN), 108.08 (5-C_{Ar}), 108.01 (6-C_{Ar}), 56.98 (1'-C), 55.54 (8-C_{pip}), 47.71 (9-C_{pip}), 35.29 (11-C_{Pip}), 25.95 (12-C_{Pip}), 24.60 (10-C_{Pip}), 20.55 (14-CH₃), 101.43 (1-OCH₂O).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES.

9.1. SÍNTESIS DE LOS NUEVOS A-AMINONITRILOS ANÁLOGOS DE LA GIRGENSOHNINA.

Para todos los compuestos sintetizados se utilizó la misma relación molar de aldehído: amina (1:1.3), adicionando la cantidad de acetonitrilo (10ml), KCN (1:1.5, amina: KCN), catalizador SSA (0.840g) a los 30 minutos después de la adición del aldehído y la amina, y manteniendo la agitación durante aproximadamente 24 horas, la purificación de estos compuestos se realizó mediante cromatografía en columna de óxido de aluminio (Al_2O_3) ya que en la columna de gel de sílice el compuesto es retenido en la cabeza de la columna lo que no permitió su purificación (Tabla 7).

El rendimiento de los análogos con el grupo metilo ($-\text{CH}_3$) en la posición C-2 de la piperidina fue bajo, esto pudo ser debido a impedimentos estéricos causados por el grupo metilo en la condensación de la amina y el aldehído, o también por la aparición de un segundo centro quiral en esta misma posición de la piperidina, dificultando la purificación de los isómeros. El compuesto **1b** se obtuvo como un aceite amarillo a diferencia de los demás compuestos que se obtuvieron como sólidos cristalinos blancos, pero logro caracterizarse por los métodos espectroscópicos y espectrométricos.

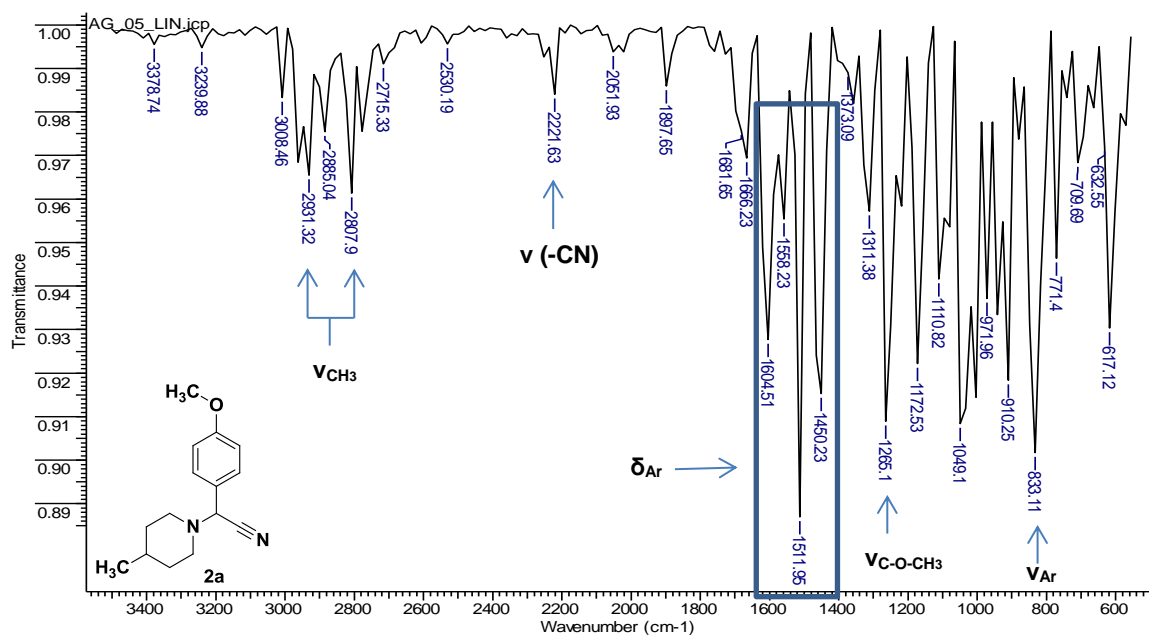
El compuesto **2a** no se purificó por cromatografía en columna debido a que al finalizar la reacción el compuesto cristalizó como un sólido blanco con el mayor rendimiento entre los análogos sintetizados después de la purificación por recristalización con mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo. Las propiedades de los compuestos sintetizados son resumidas en la tabla 7. El análisis de los

resultados de espectroscopía IR mostro para todos los compuestos sintetizados una banda débil entre 2190cm^{-1} y 2222cm^{-1} que pertenece a la tensión del enlace nitrílico ($-\text{C}\equiv\text{N}$) y las bandas características de los enlaces aromáticos y los del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) y metoxilo ($-\text{O}-\text{CH}_3$) (Figura 19).

Tabla 7. Propiedades, rendimientos y señal IR de la función $-\text{CN}$ de los análogos sintetizados.

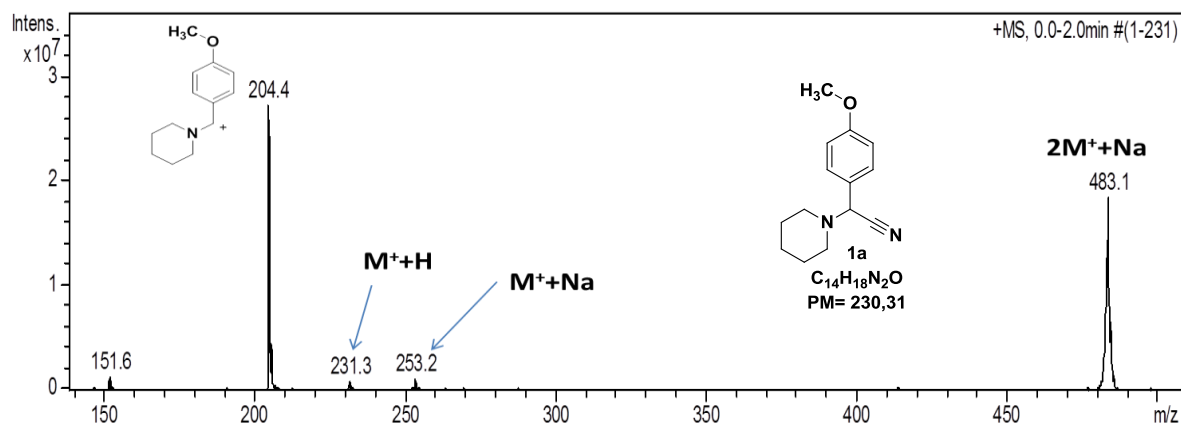
| Molécula | Estado Físico | Color | P.F (°C) | Rendimiento (%) | IR ($-\text{CN}$) (cm^{-1}) |
|-----------|---------------|----------|----------|-----------------|--|
| 1a | Sólido | Blanco | 78-79 | 47.05 | 2222 |
| 1b | Líquido | Amarillo | ----- | 54.44 | 2221.63 |
| 1c | Sólido | Blanco | 79-80 | 43.77 | 2222 |
| 2a | Sólido | Blanco | 95-96 | 74.70 | 2221.63 |
| 2b | Sólido | Crema | 57-58 | 9.41 | 2221.63 |
| 3a | Sólido | Blanco | 87-88 | 41.90 | 2206.21 |
| 3b | Sólido | Crema | 94-95 | 13.21 | 2221.63 |
| 4a | Sólido | Blanco | 88-89 | 20.33 | 2221.63 |
| 4b | Sólido | Crema | 80-81 | 5.68 | 2190.78 |

Figura 19. Espectro IR del análogo 2a.



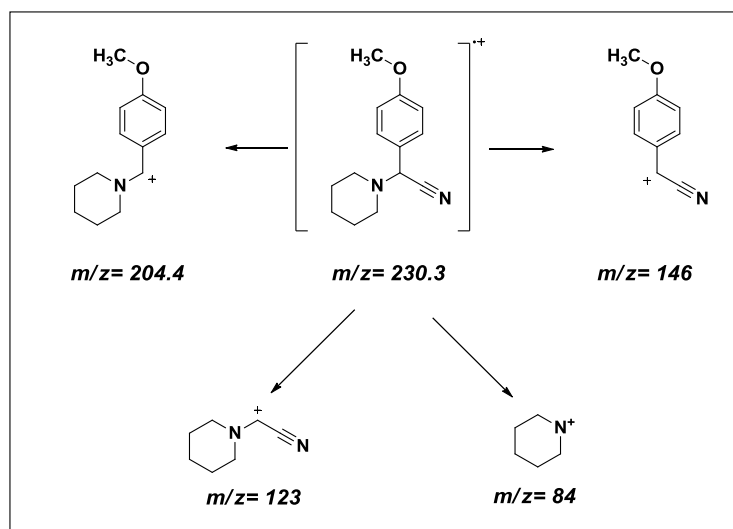
Las estructuras de los compuestos sintetizados se confirmaron también por espectrometría de masas, ya que la relación m/z de los espectros corresponde a la masa nominal de sus fórmulas moleculares condensadas, así como la formación de dímeros del compuesto sintetizado (Figura 20).

Figura 20. Espectro de masas del compuesto 1a.



El análisis de los datos obtenidos a partir de los espectros mostró la fragmentación del enlace nitrílico (-CN) que une la amina heterocíclica con el resto de la molécula, brindando los iones moleculares (Esquema 11).

Esquema 11. Posible ruta de fragmentación del producto 1a.



A continuación se muestra en la tabla las señales observadas en los fragmentogramas y sus posibles rupturas.

Tabla 8. Iones característicos de los análogos sintetizados.

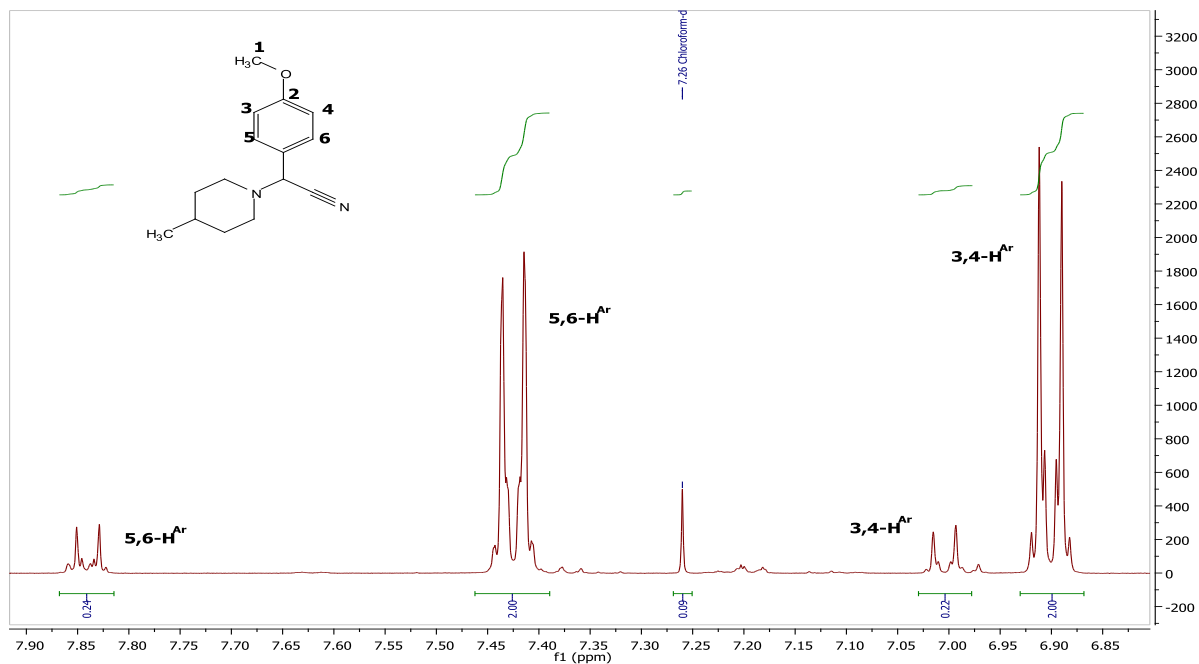
| Molécula | M ⁺ | Φ ₁ | Φ ₂ | Φ ₃ | Φ ₄ | Φ ₅ |
|-----------|----------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1a | 230.3 | 231.3 [M ⁺ +H] | 253.2 [M ⁺ +Na] | 483.1 [2M ⁺ +Na] | 204.4 [M ⁺ -26] | ----- |
| 1b | 216.4 | 217.4 [M ⁺ +H] | 239.2 [M ⁺ +Na] | 455.1 [2M ⁺ +Na] | 190.5 [M ⁺ -26] | ----- |
| 1c | 232.2 | ----- | 255.1 [M ⁺ +Na] | 487.0 [2M ⁺ +Na] | 206.3 [M ⁺ -26] | ----- |
| 2a | 244.3 | ----- | 267.1 [M ⁺ +Na] | 511.1 [2M ⁺ +Na] | 218.3 [M ⁺ -26] | ----- |
| 2b | 244.3 | ----- | ----- | 511.1 [2M ⁺ +Na] | 218.3 [M ⁺ -26] | ----- |
| 3a | 274.3 | 275.2 [M ⁺ +H] | ----- | 572.0 [2M ⁺ +Na] | 248.2 [M ⁺ -26] | ----- |
| 3b | 274.3 | ----- | ----- | 571.1 [2M ⁺ +Na] | 248.2 [M ⁺ -26] | 843.1 [3M ⁺ +Na] |
| 4a | 258.3 | ----- | 281.1 [M ⁺ +Na] | 539.0 [2M ⁺ +Na] | 232.3 [M ⁺ -26] | ----- |
| 4b | 258.3 | ----- | 281.1 [M ⁺ +Na] | 539.0 [2M ⁺ +Na] | 232.2 [M ⁺ -26] | ----- |

La estructura de los productos obtenidos se confirmó por espectroscopia ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

La señales registradas entre 6.80ppm y 7.90ppm se asignaron a los protones aromáticos de la molécula, confirmando esta asignación con las constantes de acoplamiento pertenecientes a los acoplamientos en orto (J= 6-9Hz), meta (1-3Hz) y para (0-1Hz).

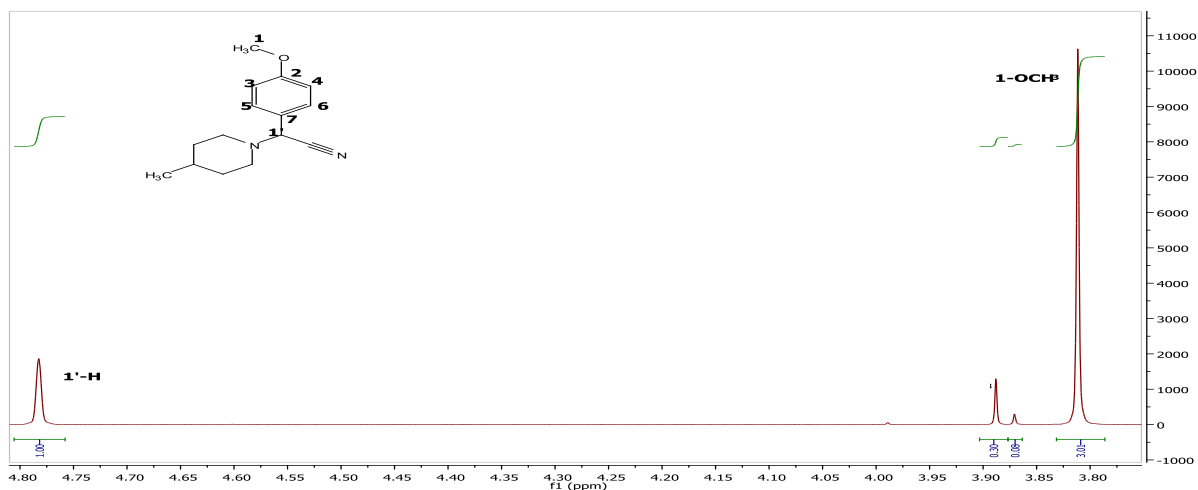
Para la molécula 2a se observa que debido a la presencia del metilo (-CH₃) en la posición 4 de la piperidina, las señales de los aromáticos se duplican, lo que confirma la presencia de diastereoisómeros. (Figura 21).

Figura 21. Señales pertenecientes a los protones aromáticos en el espectro ^1H -RMN de 2a.



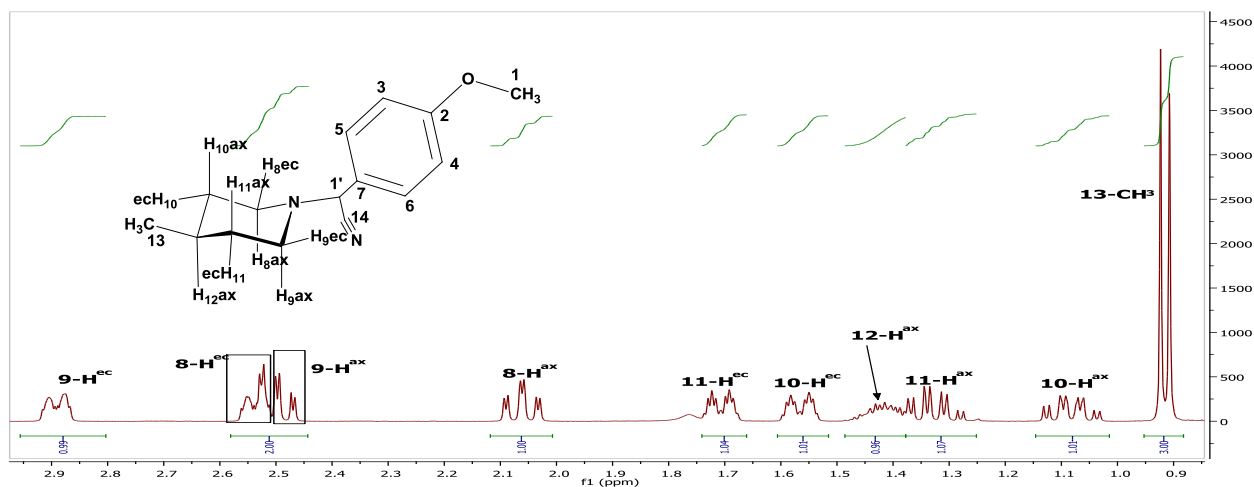
Para todas las moléculas, se observa un singulete entre 4.75ppm y 4.80ppm que se asigna al protón del carbono quiral ($1'\text{-H}$) y de 3.75ppm a 3.80ppm que pertenecen a los protones del sustituyente metoxilo ($-\text{O}-\text{CH}_3$); como se observa en el espectro, la presencia del sustituyente metilo ($-\text{CH}_3$) en la posición 4 de la piperidina causa que se duplique la señal del sustituyente metoxilo ($-\text{O}-\text{CH}_3$) (Figura 22).

Figura 22. Señales del protón del carbono quiral y el grupo metoxilo en el espectro 1H-RMN de 2a.



Los protones axiales y ecuatoriales aparecen como señales independientes en el espectro RMN en la región de 0.9 ppm a 3.0 ppm (Figura 23).

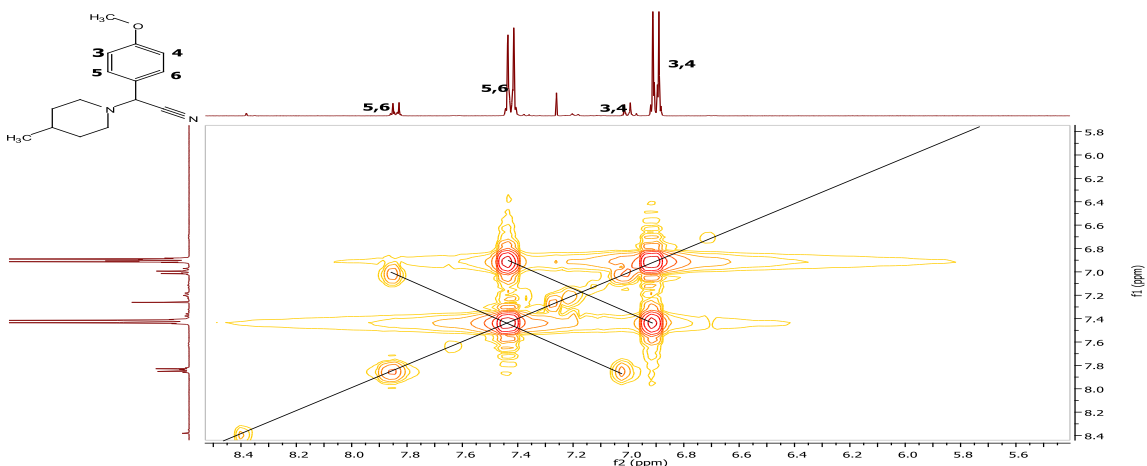
Figura 23. Señales de los protones del fragmento de piperidina en el espectro 1H-RMN de 2a.



Las asignaciones de las señales a cada protón se realizó con la ayuda del espectro bidimensional COSY (Figura 24) y con los valores de las constantes de

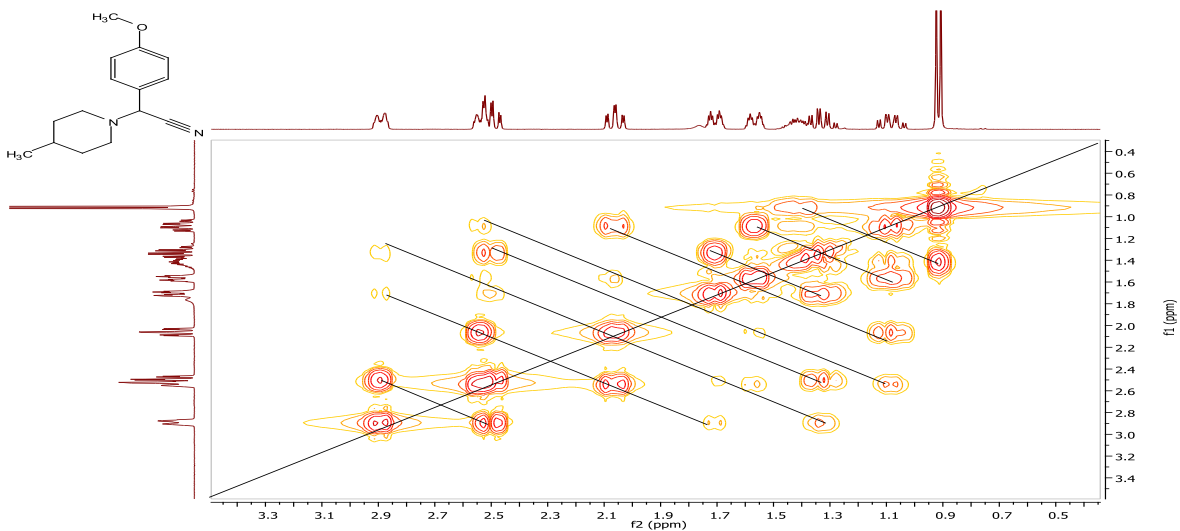
acoplamiento de los protones axiales y ecuatoriales de la piperidina ($J_{ax-ax}=7-12\text{Hz}$, $J_{ax-ec}= 2-5\text{Hz}$, $J_{ec-ec}= 2-5\text{Hz}$).

Figura 24.Región de los protones aromáticos en el espectro bidimensional COSY para 2a.



En la figura anterior se puede observar el acoplamiento entre las dos señales que no registran valor de protones en el espectro ^1H -RMN, confirmando presencia de diastereoisómeros.

Figura 25.Región de los protones de la piperidina en el espectro bidimensional COSY para 2a.



La asignación de los protones a cada carbono se realizó con ayuda del espectro bidimensional HSQC.

En la figura 25 Se observa que cada protón aromático en el espectro ^1H -RMN, incluyendo las señales que no registran protones, pertenece a una señal en el espectro de ^{13}C -RMN.

Figura 26.Región aromática en el espectro bidimensional HSQC para 2a.

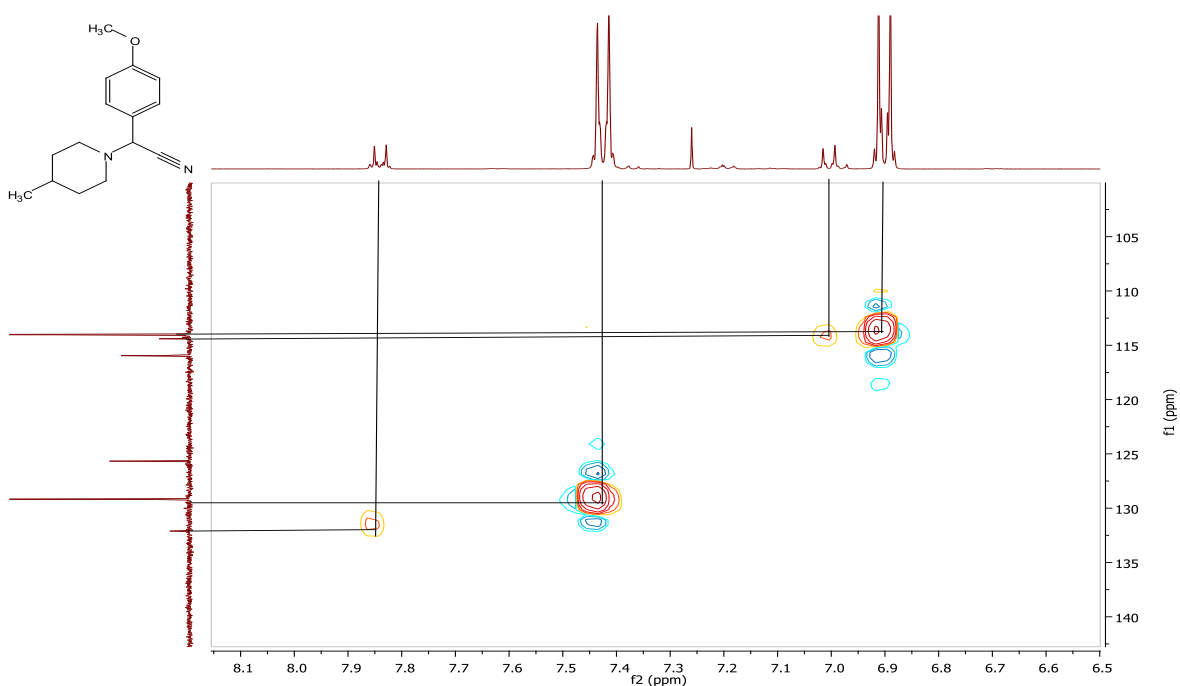
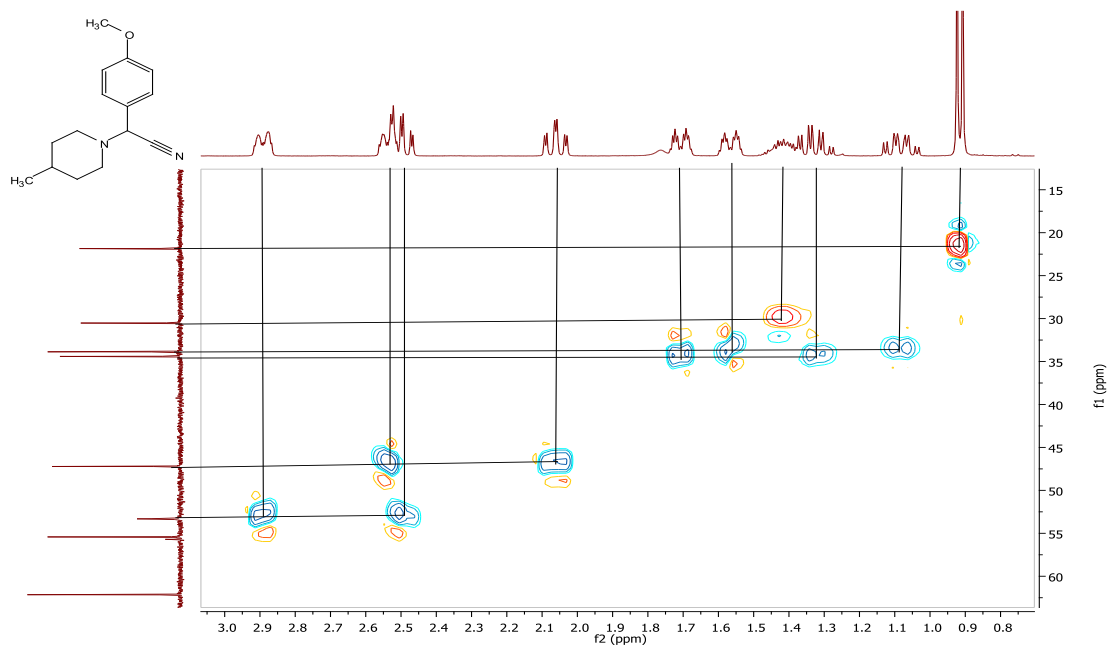
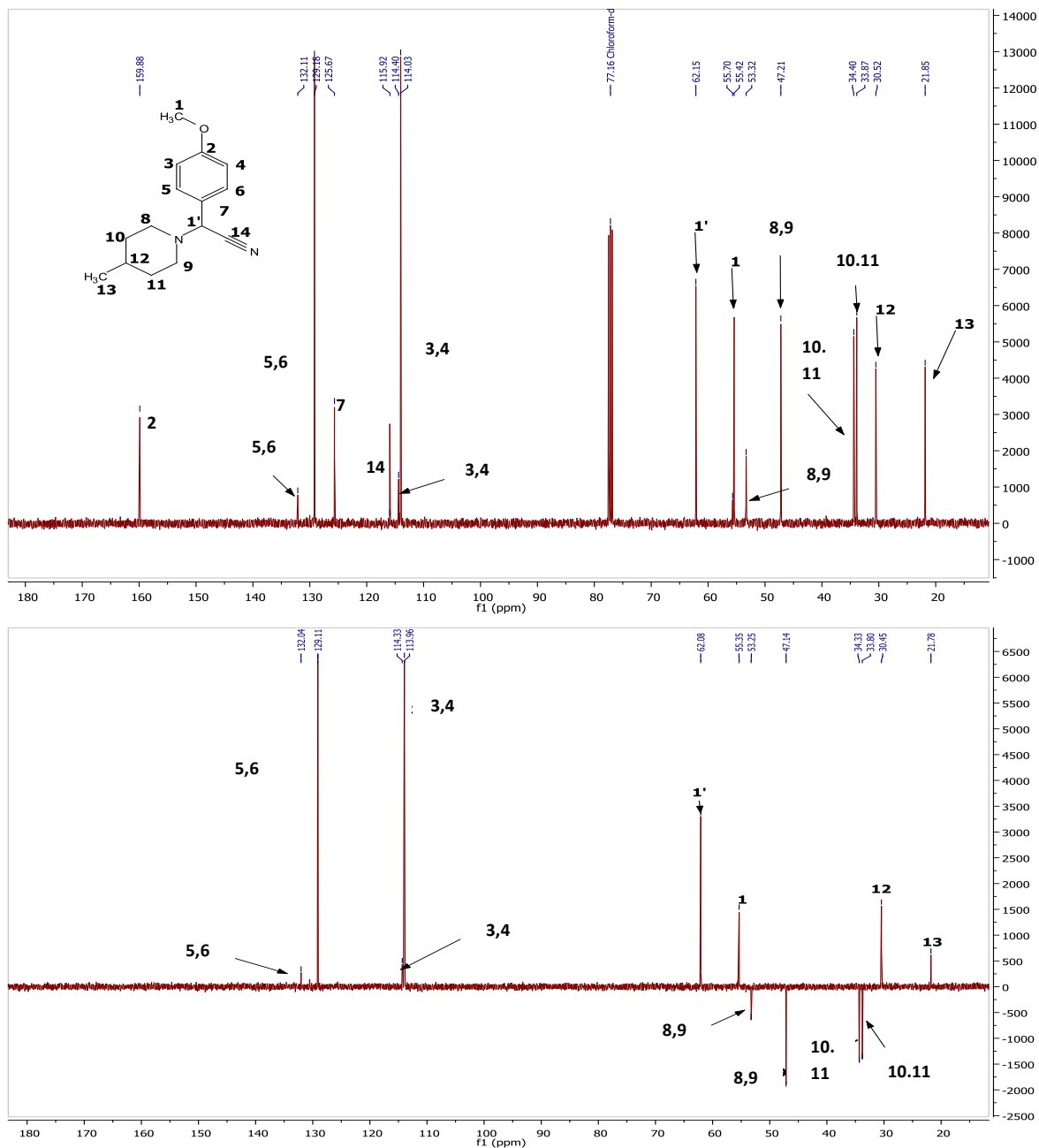


Figura 27.Región de la piperidina en el espectro bidimensional HSQC para 2a.



Con la ayuda de estos espectros bidimensionales, se logró asignar a cada señal del espectro ¹³C-RMN, un carbono de la molécula, la presencia de carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios se confirmó con el espectro DEPT-135 RMN.

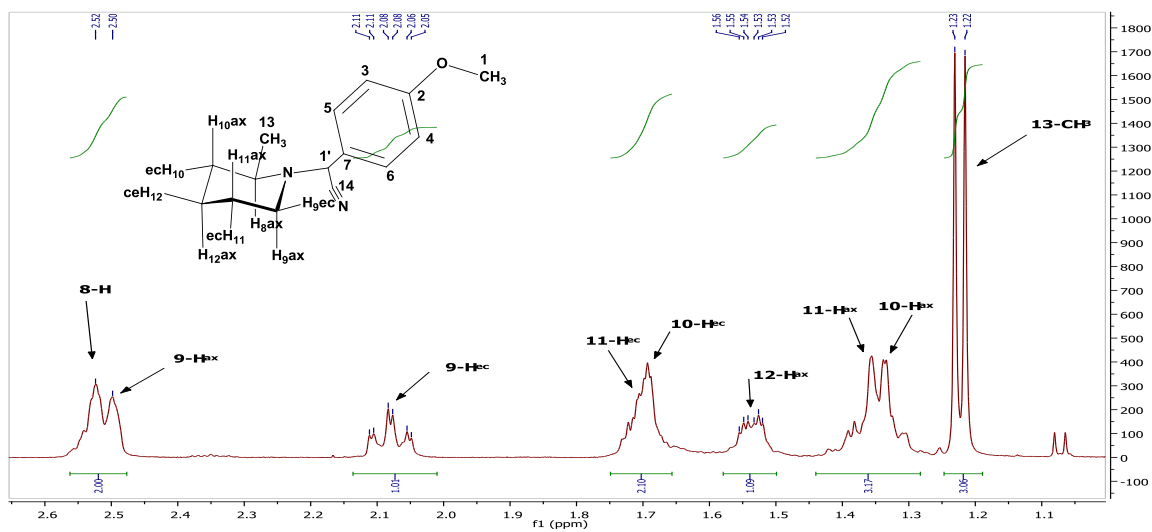
Figura 28. Comparación del espectro ^{13}C -RMN con DEPT-135 RMN para la molécula 2a.



La presencia del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) en la posición 2 de la piperidina dificulta más la asignación de los protones axiales y ecuatoriales ya que las señales se solapan

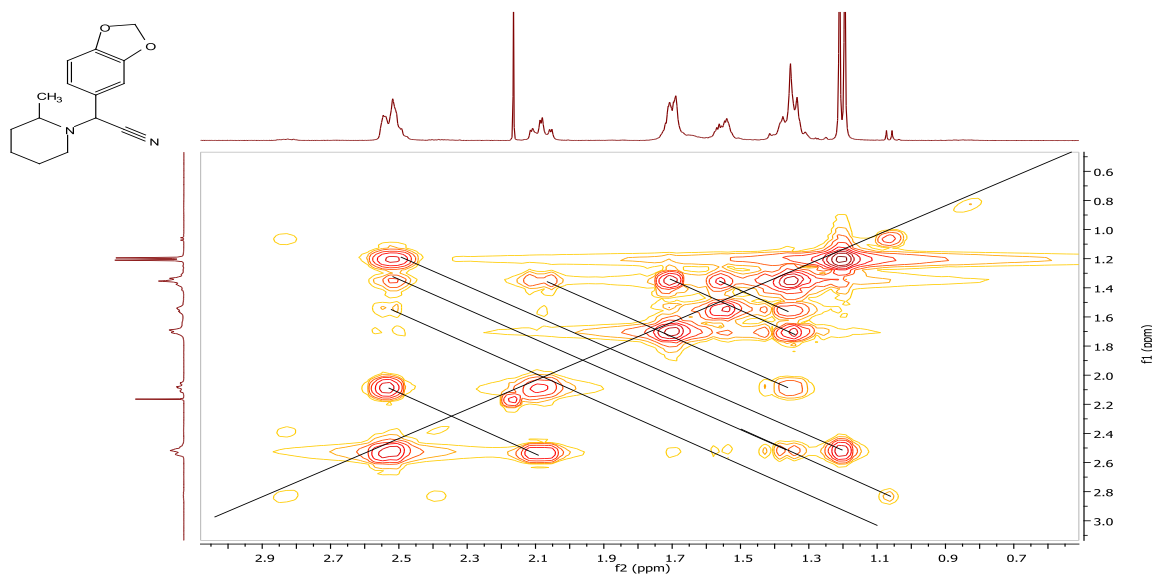
en esta región del espectro, además de la duplicación de la señal del metilo por la presencia de diastereoisómeros (Figura 29).

Figura 29.Región de la piperidina en el espectro ^1H -RMN de la molécula 2b.



La asignación de las señales de los protones de la piperidina se realizó con ayuda del espectro bidimensional COSY de la molécula 4b (Figura 30).

Figura 30.Región de la piperidina en el espectro COSY de la molécula 4b.



Los datos de ^1H RMN y ^{13}C -RMN las moléculas sintetizadas fueron tabulados en las Tablas 9-11.

Tabla 9. Señales en el espectro ^1H de las moléculas 1a-1c.

| Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento J(Hz) de los análogos sintetizados 1a-1c | | | | | | | | | |
|--|---|--|------------------------|--|--------|-----------------------------|---------|------------------------------|--------------|
| | Aromáticos | | Sustituyentes | Heterocíclicos | | | | | 1'- α |
| | 3,4 H | 5,6 H | 1 O-CH ₃ | 8 H | 9 H | 10 H | 11 H | 12 H | |
| 1a | 6.90 dd ³ J=8.8 ⁴ J= 3.0 | 7.43 dd ³ J=8.30 ⁴ J= 2.9 | 3.81 s | 2.51 ddd J=10.7 J=6.9 J= 3.9 | | 1.59 pd J=13 J=6.8 | | 1.47 dd J=5.0 J=5.5 | 4.76 s |
| 1b | 6.90 dd ³ J=8.8 ⁴ J= 3.0 | 7.43 dd ³ J=8.40 ⁴ J= 3.0 | 3.81 s | 2.63 m | | 1.82 m | | | 4.97 s |
| 1c | 6.91 dd ³ J=8.8 ⁴ J= 3.0 | 7.42 dd ³ J=8.60 ⁴ J= 3.0 | 3.81 s | 2.55 m | | 3.70 m | | | 4.75 s |

Tabla 10. Señales en el espectro 1H-RMN de las moléculas 2a-4b.

| Desplazamientos químicos (ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento J(Hz) de los análogos sintetizados 2a-4b | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---|---|--|--|------------------------------------|-----------|
| | Aromáticos | | Sustituyentes | | | | Heterocíclicos | | | | | 1'-α |
| | 3,4 H | 5,6 H | 1 O-CH ₃ | 15 O-CH ₃ | 1 OCH ₂ O | 14 CH ₃ | 8 H | 9 H | 10 H | 11 H | 12 H | |
| 2a | 6.90 dd ³ J=8.8 ⁴ J= 3.0 | 7.43 dd ³ J=8.40 ⁴ J= 3.0 | 3.81 s | | | 0.92 d J= 6.4 | H_{ec} 2.56 m | H_{ec} 2.89 dt J=4.5 J=2.0 | H_{ec} 1.57 qd J=3.0 J= 7.3 | H_{ec} 1.70 qd J=6.9 J= 2.7 | 1.42 m | 4.78 s |
| | | | | | | | H_{ax} 2.06 td J=2.7 J=8.9 | H_{ax} 2.49 td J=2.7 J=8.4 | H_{ax} 1.09 qd J=3.9 J=7.7 J=8.9 | H_{ax} 1.34 qd J=7.6 J=4.0 J=8.4 | | |
| 2b | 6.90 dd ³ J=8.8 ⁴ J= 3.0 J=2.1 | 7.43 dd ³ J=8.5 ⁴ J= 3.2 | 3.81 s | | | 1.22 d J= 6.1 | 2.52 m | H_{ec} 2.08 td J=8.8 J=2.5 | H_{ec} 1.71 m | H_{ec} 1.69 m | H_{ec} 1.33 m | 5.23 s |
| | | | | | | | | H_{ax} 2.50 m | H_{ax} 1.35 m | H_{ax} 1.38 m | H_{ax} 1.54 m | |
| 3a | 3-H_{Ar} 6.84 d ³ J=8.3 | 5-H_{Ar} 5.08 ddd J=1.3 J=5.3 | 3.89 s | 3.88 s | | 0.92 d J= 6.4 | H_{ec} 2.56 m | H_{ec} 2.88 dt J=4.6 J=6.8 | H_{ec} 1.57 dt J=2.7 J=7.7 | H_{ec} 1.70 dt J=2.7 J=7.0 | 1.42 m | 4.78 s |
| | | 6-H_{Ar} 7.0 d | | | | | H_{ax} 2.05 td | H_{ax} 2.50 td | H_{ax} 1.09 qd | H_{ax} 1.33 qd | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|--|--|-----------|-----------|-----------|---------------------|--|--|---|---|------------------------------------|-----------|
| | | J=2.1 | | | | | J=2.6 J=8.8 | J=2.7 J=8.7 | J=4.0 J=7.7 J=8.9 | J=3.9 J=7.7 J=8.3 | | |
| 3b | 3-H_{Ar} 6.85 d ³ J=8.3 | 5-H_{Ar} 7.09 dd J=8.3 J=1.3 | 3.89 s | 3.88 s | | 1.22 d J= 6.1 | 2.53 m | H_{ec} 2.08 td J=11.2 J=2.3 | H_{ec} 1.72 m | H_{ec} 1.70 m | H_{ec} 1.33 m | 5.24 s |
| | | 6-H_{Ar} 7.0 d ⁴ J=1.5 | | | | | | H_{ax} 2.52 m | H_{ax} 1.35 m | H_{ax} 1.38 m | H_{ax} 1.55 m | |
| 4a | 3-H_{Ar} 6.79 d ³ J=7.9 | 5-H_{Ar} 7.03 dd J=1.8 | | | 5.98 s | 0.92 d J= 6.4 | H_{ec} 2.57 dt J=8.9 J=3.7 | H_{ec} 2.87 dt J=8.5 J=4.9 | H_{ec} 1.59 dq J=13.0 J=7.3 J=3.0 | H_{ec} 1.71 dq J=12.5 J=7.0 J=2.8 | 1.42 m | 4.73 s |
| | | 6-H_{Ar} 7.0 ddd J=2.9 J=1.8 | | | | | H_{ax} 2.07 td J=11.5 J=2.7 | H_{ax} 2.50 td J=11.2 J=2.7 | H_{ax} 1.11 qd J=8.7 J=7.8 J=3.9 | H_{ax} 1.33 qd J=8.1 J=7.6 J=4.0 | | |
| 4b | 3-H_{Ar} 6.79 d ³ J=8.0 | 5-H_{Ar} 7.03 ddd J=8.0 J=1.8 | | | 5.98 s | 1.20 d J= 6.1 | 2.54 m | H_{ec} 2.52 m | H_{ec} 1.71 m | H_{ec} 1.69 m | H_{ec} 1.54 m | 5.18 s |
| | | 6-H_{Ar} 6.99 d ⁴ J=1.6 | | | | | | H_{ax} 2.08 td J=11.2 J=2.6 | H_{ax} 1.35 m | H_{ax} 1.38 m | H_{ax} 1.33 m | |

Tabla 11. Señales en el espectro ^{13}C -RMN de las moléculas sintetizadas.

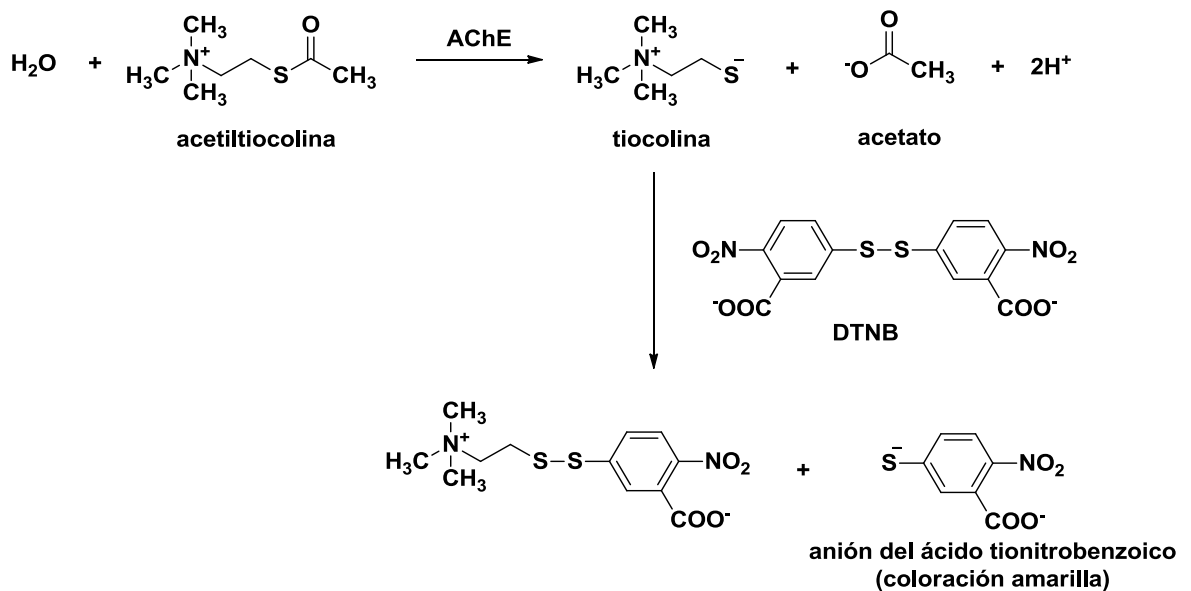
| Desplazamientos químicos de los carbonos (ppm) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------|-------|-------------------------|------|------|------|------|
| | Carbonos aromáticos | | | | | Sustituyentes | | | | | C- α | -CN | Carbonos heterocíclicos | | | | |
| | 2-C | 3-C | 4-C | 5-C | 6-C | 7-C | 1-OCH ₃ | 15-OCH ₃ | 1-OCH ₂ O | 14-CH ₃ | | | 8-C | 9-C | 10-C | 11-C | 12-C |
| 1a | 159.8 | 114.0 | | 129.1 | | 125.5 | 55.3 | | | | 62.6 | 115.9 | 51.0 | | 25.8 | | 24.0 |
| 1b | 159.9 | 114.1 | | 129.0 | | 126.5 | 55.4 | | | | 58.8 | 116.4 | 50.2 | | 23.5 | | |
| 1c | 160.3 | 114.4 | | 129.6 | | 124.7 | 55.7 | | | | 62.1 | 115.8 | 50.2 | | 25.8 | | |
| 2a | 159.8 | 114.0 | 114.4 | 129.1 | 132.1 | 125.6 | 55.4 | | | 21.7 | 62.1 | 115.9 | 47.3 | 53.3 | 33.7 | 34.3 | 30.5 |
| 2b | 159.7 | 114.0 | | 129.1 | | 126.3 | 55.4 | | | 20.5 | 56.7 | 115.6 | 55.6 | 47.6 | 24.6 | 35.3 | 25.9 |
| 3a | 149.2 | 110.6 | 149.1 | 120.1 | 110.7 | 126.0 | 56.0 | 56.0 | | 21.8 | 62.3 | 115.8 | 53.2 | 47.3 | 30.5 | 33.9 | 34.4 |
| 3b | 149.2 | 110.6 | 149.2 | 120.2 | 110.9 | 126.7 | 56.0 | 56.1 | | 20.5 | 57.0 | 115.5 | 55.6 | 47.9 | 25.9 | 35.2 | 24.4 |
| 4a | 148.1 | 121.4 | 148.2 | 108.3 | 108.1 | 127.5 | | | 101.5 | 21.8 | 62.4 | 115.7 | 47.3 | 53.2 | 33.9 | 34.4 | 30.5 |
| 4b | 147.9 | 121.1 | 148.2 | 108.1 | 108.0 | 128.2 | | | 101.4 | 20.5 | 56.9 | 115.4 | 55.5 | 47.7 | 24.6 | 35.2 | 25.9 |

10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

10.1. ENSAYO DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE LA ENZIMA ACHE COMERCIAL (EXTRAÍDA DE LA ANGIULA ELÉCTRICA *Electrophorus electricus*)

El ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa se basa en un método colorimétrico reportado por George Ellman en 1961^[43], este método se basa en la velocidad de formación de la tiocolina generada por la hidrólisis de la acetiltiocolina, para luego reaccionar con el ion 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB), confirmando el progreso de la reacción con una coloración amarilla (Esquema 12).

Esquema 12. Formación del anión del ácido tionitrobenzoico (amarillo) en el método de inhibición de la AChE reportado por Ellman^[43].



Para obtener los diferentes reactivos utilizados en la prueba se prepararon Buffers de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y bibásico (K_2HPO_4) a $\text{pH}= 7$ y

pH=7.8, utilizando el mismo procedimiento reportado por el ministerio de salud de Brasil ^[44].

Para la preparación del sustrato se empleó una solución con NaH₂PO₄, DTNB, yoduro de acetiltiocolina y agua y se mantuvo protegida de la luz.

Para cada molécula se usan 5 diferentes concentraciones para obtener el valor de IC₅₀ y se utilizan microplacas de 96 pozos, distribuyendo cada molécula y los controles tal como se indica en la figura 29, cada color indica una molécula diferente, debido a que se obtuvo poca cantidad de la molécula 4b, a esta no se le realizó prueba de inhibición.

Figura 31. Esquema de la distribución de las concentraciones en la microplaca. C1,C2,C3,C4, C5= concentraciones utilizadas; B= Blanco de las moléculas.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------------------------|-------------------------------|
| A | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | Control reacción enzimática | Blanco reacción enzimática |
| 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 | | |

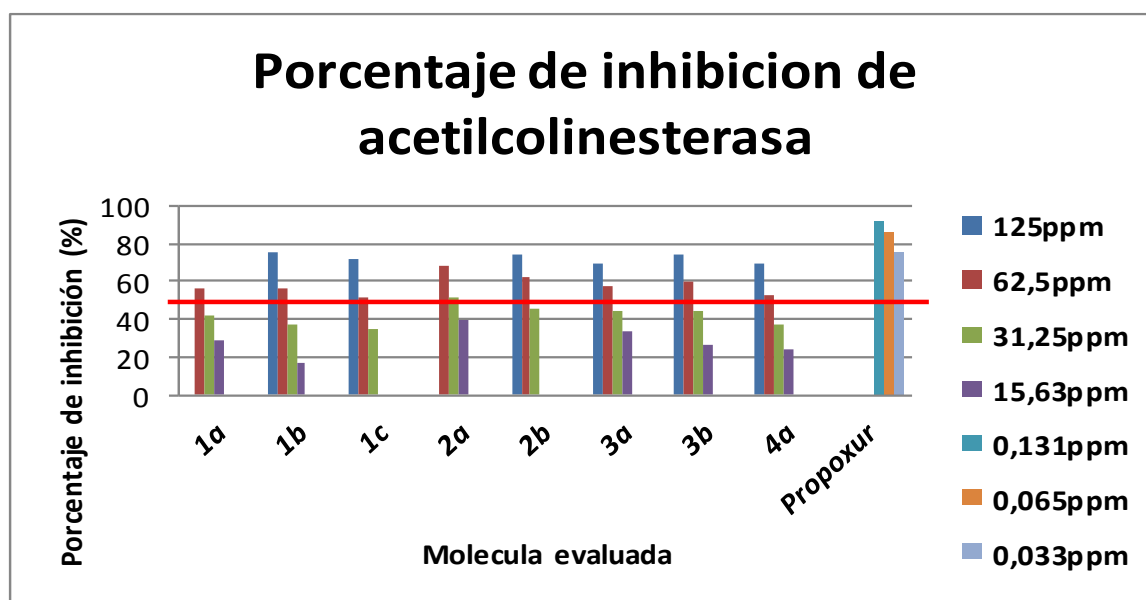
Para cada pozo se adiciona la molécula, buffer, enzima y sustrato en ese orden para un volumen total de 200µl por pozo, después de adicionar la enzima se deja incubar durante treinta minutos con agitación suave y se agrega el sustrato, finalmente, se realiza la lectura de los valores de absorbancia para cada placa a los 3 y 5 minutos después de adicionar el sustrato en un lector de microplacas Versamax.

Además de las moléculas, se realizó un control positivo utilizando Propoxur[®] como inhibidor de la enzima, los valores de IC₅₀ se registran en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de IC₅₀ para las moléculas evaluadas y el propoxur.

| Molécula | PM | IC ₅₀ | IC ₅₀ |
|----------|---------|------------------|------------------|
| | [g/mol] | [ug/mL] | [uM] |
| Propoxur | 209,24 | 0,0150 | 0,07 |
| 1a | 230,31 | 50,05 | 217,32 |
| 1b | 216,28 | 51,64 | 238,74 |
| 1c | 232,28 | 60,25 | 259,40 |
| 2a | 244,00 | 36,31 | 148,80 |
| 2b | 244,00 | 53,84 | 220,65 |
| 3a | 274,36 | 43,78 | 159,55 |
| 3b | 274,36 | 40,00 | 145,80 |
| 4a | 258,32 | 42,11 | 163,02 |

Figura 32. Porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa para las moléculas evaluadas.



Tal como se observa en los resultados, la molécula 2a tiene la concentración más bajo de IC₅₀, generalmente todas las moléculas tienen capacidad de inhibición de la acetilcolinesterasa comercial, y aunque el Propoxur tiene una mayor inhibición (Figura 32), estas moléculas pueden actuar como posibles insecticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa.

10.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE LOS ANÁLOGOS SINTETIZADOS

10.2.1. Mantenimiento de una colonia de *Aedes aegypti*: El mantenimiento de la colonia fue guiado por el investigador del centro de investigación en enfermedades tropicales (CINTROP), el Dr. Jonny Duque, entomólogo y profesor de la facultad de salud de la UIS. Para los bioensayos se utilizaron los estándares reportados por la World Health Organization (WHO); debido a las condiciones de humedad ($80 \pm 5\%$), y temperatura favorable en Bucaramanga para la proliferación del mosquito, esta colonia se mantuvo en un insectario sin climatizar. Para la cría de estos mosquitos, se aplicaron técnicas correspondientes al insecto en su medio natural:

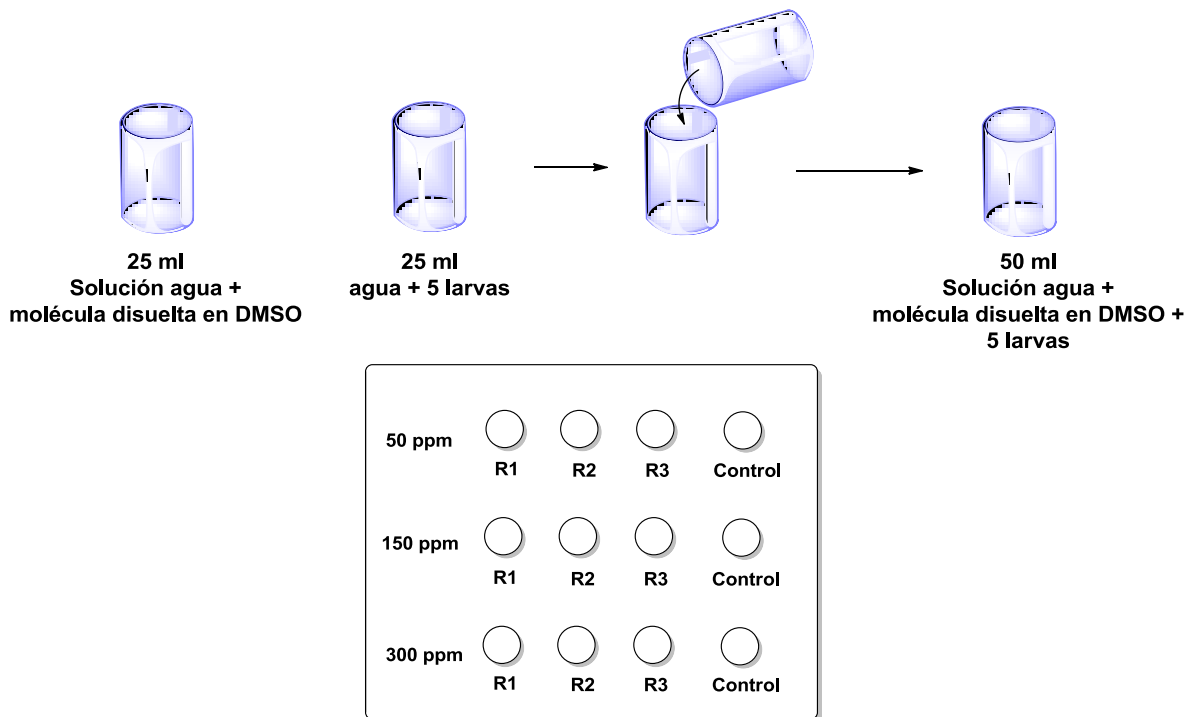
- a. Adultos: Las hembras se alimentaron con rata durante 20 min para la posterior ovoposición. Los adultos machos fueron alimentados con solución de miel del 10 al 20% en un recipiente de vidrio de 100mL en el cual se introdujo una pieza de papel filtro donde la solución asciende por capilaridad.
- b. Huevos: Para la recolección de huevos después de la ovoposición de las hembras, se utilizan recipientes plásticos de 100ml cubiertos con papel filtro y agua comercial (Brisa[®]). Para estimular la ovoposición de las hembras en los recipientes, se añadieron porciones de alimento Nutrafin Basix[®] comercial. Estos recipientes se mantienen en la jaula durante una semana para lograr a maduración de los embriones.
- c. Larvas: Estas se mantuvieron en recipientes plásticos con agua de 40cm de largo por 20cm de ancho y 6cm de alto, y se alimentaron con Nutrafin Basix[®] cada 6 días. Después de alcanzar el estadio de pupa (de 6 a 8 días después de emerger), se introducen en un recipiente con agua en la jaula hasta alcanzar su desarrollo de adulto.

10.2.2. Ensayo de actividad larvicida en *Aedes aegypti*.

Dosis exploratorias: A partir de una solución matriz del producto a evaluar disuelto en dimetilsulfóxido $\leq 1\%$ (DMSO), se toman concentraciones de 50, 150 y 300 ppm para evaluar la actividad insecticida sobre larvas entre tercer y cuarto estadio. Para el ensayo biológico se realizan 3 réplicas y un control para cada concentración a evaluar.

Para las dosis exploratorias se utilizaron 5 larvas por cada replica y 5 larvas para el control, estas se introducen en recipientes plásticos con 25mL de agua, y en otro recipiente plástico se disuelve cada concentración en 25mL de agua, a continuación se agrega el agua con las larvas a cada recipiente que contiene la solución, para de esta manera llegar a un volumen final de 50mL para cada replica. Se realiza un seguimiento de la mortalidad en las larvas a las 2, 24 y 48 horas después del inicio del ensayo Figura 33.

Figura 33. Preparación de las réplicas para el ensayo in vivo de larvas de *Aedes aegypti* (Dosis exploratorias).



Concentraciones múltiples:

Este ensayo se realiza con la molécula que haya tenido concentración letal más baja; se utilizan 10 larvas por cada replica y 10 larvas para el control, estas se introducen en recipientes plásticos con 50mL de agua, y en otro recipiente plástico se disuelve cada concentración en 50mL de agua, a continuación se agrega el agua con las larvas a cada recipiente que contiene la solución, para de esta manera llegar a un volumen final de 100mL para cada replica. Se realiza el mismo seguimiento de mortalidad que en las dosis exploratorias (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados ensayo larvicida para las dosis exploratorias.

| Molécula | 24horas | | | | | | 48horas | | | | | | Control | |
|-----------|---------|----|--------|----|--------|----|---------|----|--------|----|--------|----|---------|---|
| | 50ppm | | 150ppm | | 300ppm | | 50ppm | | 150ppm | | 300ppm | | | |
| | V* | M* | V | M | V | M | V | M | V | M | V | M | V | M |
| 1a | 10 | 5 | 0 | 15 | 0 | 15 | 10 | 5 | 0 | 15 | 0 | 15 | 15 | 0 |
| 1c | 13 | 2 | 5 | 10 | 0 | 15 | 14 | 11 | 4 | 11 | 0 | 15 | 15 | 0 |
| | 50ppm | | 70ppm | | 120ppm | | 50ppm | | 70ppm | | 120ppm | | | |
| 1b | 10 | 5 | 8 | 7 | 1 | 14 | 10 | 5 | 7 | 8 | 0 | 15 | 15 | 0 |
| 2a | 14 | 1 | 0 | 15 | 0 | 15 | 12 | 3 | 0 | 15 | 0 | 15 | 15 | 0 |
| 2b | 12 | 3 | 10 | 5 | 0 | 15 | 12 | 3 | 10 | 5 | 0 | 15 | 15 | 0 |
| 3a | 14 | 1 | 13 | 2 | 11 | 4 | 12 | 3 | 12 | 3 | 10 | 5 | 15 | 0 |
| 3b | 15 | 0 | 14 | 1 | 7 | 8 | 14 | 1 | 13 | 2 | 4 | 11 | 15 | 0 |
| 4a | 13 | 2 | 12 | 3 | 14 | 1 | 13 | 2 | 11 | 4 | 12 | 3 | 15 | 0 |
| 4b | 14 | 1 | 14 | 1 | 5 | 10 | 14 | 1 | 15 | 0 | 5 | 10 | 15 | 0 |

*V= larvas vivas, M= larvas muertas

De las moléculas utilizadas para los ensayos biológicos, la 1a y la 2a tuvieron mayor actividad larvicida, lo que muestra una correlación con la inhibición de la enzima para la molécula 2a, estas moléculas se evaluaron a concentraciones de 38, 50, 70, 90, 100, 115 y 128ppm y para el cálculo de los valores de CL₅₀ y CL₉₈ se empleó el modelo Probit.

Para estas dos moléculas se registró mortalidad después de 2 horas de haber iniciado el ensayo, además de mostrar cambios en la morfología como engrosamiento, reducción del tamaño y cambio de coloración en la cabeza de las larvas.

Estas observaciones y los resultados obtenidos de los bioensayos demostraron que bajo condiciones de laboratorio, las larvas de *Aedes aegypti* son susceptibles a las moléculas 1a y 2a.

Tabla 14. Resultados análisis de Probit para los análogos 1a y 2a.

| Comp. | LC ₅₀ (ppm) (Límites de confianza) | | LC ₉₈ (ppm) (Límites de confianza) | | X ² | |
|-----------------|--|------------------------|--|---------------------------|----------------|------|
| | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| 1a | 50.55 (48.13-52.98) | 48.53 (46.18-50.94) | 86.39 (79.02-97.77) | 82.18 (74.21-95.81) | 3.77 | 2.63 |
| 2a | 69.59 (66.01-73.32) | 64.51 (61.32-67.79) | 139.54 (125.51-160.76) | 122.07 (111.09-138.24) | 4.50 | 3.78 |
| Propoxur | 0.34 (0.26-0.46) | 0.25 (0.18-0.31) | 2.84 (1.54-9.55) | 1.82 (1.07-5.09) | 0.40 | 4.96 |

10.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD INSECTICIDA DE ADULTOS DE *Aedes aegypti*.

Para las moléculas con mayor actividad larvicida se realizaron ensayos insecticidas de adultos de *Aedes aegypti*, utilizando concentraciones de 30, 300 y 1000ppm y 10 adultos en cada botella realizando un control durante dos horas cada 15 minutos y un último control a las 24 horas empleando un control negativo de acetona para cada concentración.

Tabla 15. Resultados del ensayo de actividad adulticida en *Aedes aegypti*.

| Concentración (ppm) 1a. | 2 horas | | 24 horas | | Control (acetona) | |
|-------------------------------|---------|----|----------|----|----------------------|---|
| | V | M | V | M | V | M |
| 30 | 24 | 16 | 7 | 33 | 4 | 6 |
| 300 | 10 | 30 | 0 | 40 | 7 | 3 |
| 1000 | 1 | 39 | 0 | 40 | 6 | 4 |

| Concentración (ppm) 2a. | 2 horas | | 24 horas | | Control (acetona) | |
|-------------------------------|---------|---|----------|----|----------------------|---|
| | V | M | V | M | V | M |
| 30 | 39 | 1 | 23 | 17 | 9 | 1 |
| 300 | 40 | 0 | 19 | 21 | 7 | 3 |
| 1000 | 38 | 2 | 15 | 25 | 9 | 1 |

*V= adultos vivos, M= adultos muertos

Estos resultados demuestran que tanto las larvas como los adultos de *Aedes aegypti* son susceptibles a los análogos de la girsensohnina 1a y 2a.

11. CONCLUSIONES:

Teniendo en cuenta los objetivos alcanzados en el presente trabajo de tesis, se puede concluir que:

Con ayuda del análisis *in silico* usando los softwares Molinspiration y Osiris Property Explorer, se encontró que todas las moléculas tienen buenas propiedades farmacocinéticas, mostrando su biodisponibilidad en el organismo, además de no presentar riesgos para el ser humano.

Se obtuvieron los nueve (9) análogos propuestos en el plan de proyecto con rendimientos aceptables a diferencia de aquellos con el grupo metilo en posición 2 de la piperidina debido a la presencia de diastereoisómeros lo que dificulta su obtención. La estructura de estos compuestos fue confirmada por espectroscopía infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS).

Se desarrolló un protocolo propio de la química verde que consiste en el uso del catalizador soportado en gel de sílice (SSA) el cual se puede recuperar después de su uso en la reacción de Strecker, además de que la reacción se llevó a cabo bajo condiciones suaves.

Para todos los α -aminonitrilos sintetizados se observó inhibición de la enzima acetilcolinesterasa bovina, destacando a la molécula 2a con una concentración de IC_{50} de 36.31ppm, mostrando a estas moléculas como posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Los ensayos insecticidas *in vivo* mostraron que bajo condiciones de laboratorio, las larvas de *Aedes aegypti* son susceptibles a los análogos sintetizados, destacando a los compuestos 1a y 2a como aquellas moléculas con mayor actividad insecticida; con el análisis de Probit se calcularon los valores de IC_{50} de 1a y 2a (50.55ppm y 69.59ppm respectivamente).

Para el ensayo de adultos se mostró actividad insecticida a las dos horas de iniciar el ensayo para las moléculas 1a y 2a, confirmando para la molécula 2a una correlación entre la mortalidad y la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Estos resultados indican a los compuestos sintetizados como posibles insecticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Referencias Bibliográficas:

- [1] World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever, Comprehensive guidelines. New Delhi: World Health Organization Regional publication, SEARO N° 29; 1999.
- [2] Boletín epidemiológico semana 16. Instituto Nacional de Salud, disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2016.pdf>.
- [3] Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653–665.
- [4] Russell, R. J., Claudianos, C., Campbell, P. M., Horne, I., Sutherland, T. D., Oakeshott, J. G. (2004). Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79(3), 84–93.
- [5] BAIRD, Collin. Química ambiental. Ed. Reverte. 2004. p.p. 327-334.
- [6] Vargas Méndez, L., Kouznetsov V., First girsensohnine analogs prepared through InCl_3 -catalyzed Strecker reaction and their bioprospection, *Current Organic Synthesis* 10 (2013) 969-973.
- [7] Carreño Otero, A. L., Vargas Méndez, L. Y., Duque L, J. E., Kouznetsov, V. V. (2014). Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *European journal of medicinal chemistry*, 78, 392–400.
- [8] Piotrowski, M. “Primary or Secondary? Versatile Nitrilases in Plant Metabolism”. *Phytochemistry*. Vol 69 (2008); p. 2655–2667.
- [9] Frehner, M., Scalet, M., Conn, E. E. (1990). Pattern of the Cyanide-Potential in developing fruits, *Plant Physiology*. (94) 28–34.

- [10] C.-H. Mao, Laurens Anderson. (1965). Cyanogenesis in *Sorghum vulgare*. II. Mechanism of the Alkaline Hydrolysis of Dhurrin (p-Hydroxymandelonitrile Glucoside). *Journal of Organic Chemistry*, 30 (2), pp 603–607.
- [11] Nahrstedt, A., Lechtenberg, M., Brinker, A., Seigler, D. S., Hegnauer, R. (1993). 4-hydroxymandelonitrile glucosides, Dhurrin in *Suckleya suckleyana* and Taxiphyllin in *Girgensohnia oppositiflora* (*Chenopodiaceae*). *Phytochemistry*, 33(4), 847–850.
- [12] Lee, J., Zhang, G., Wood, E., Castillo, C. R., Mitchell, A. E. (2013) Quantification of Amygdalin in Nonbitter, Semibitter, and Bitter Almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (61). 7754-7759.
- [13] Shragg, T. A.; Albertson, T. E.; Fisher, C. J., Jr. (1982) Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. *West. Journal of Medicine*, 136, 65–69.
- [14] Li, Jie Jack. Name reactions, a collection of detailed reaction mechanisms. Ed. Springer. 2006. 3 ed. 579-580.
- [15] Lee, K.-S., H.-S., Hwang, C.-Y. (2012). An Efficient Synthesis of Nitriles from Aldoximes Using Diethyl Phosphorocyanidate under Mild Conditions. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(10), 3173–3174.
- [16] Kobayashi, S., Ishitani, H. (1999). Catalytic enantioselective addition to imines. *Chemical reviews*, 99(5), 1069–94.
- [17] Nakamura, S., Sato, N., Sugimoto, M., Toru, T. (2004). A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et₂AlCN. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(9), 1513–1516.
- [18] Martínez, R., Ramón, D. J., Yus, M. (2005). Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, 46(49), 8471–8474.
- [19] Takamura, M., Hamashima, Y., Usuda, H., Kanai, M., Shibasaki, M. (2000). A catalytic asymmetric strecker-type reaction promoted by Lewis acid-Lewis base bifunctional catalyst. *Chemical pharmaceutical bulletin*, 48(10), 1586–92.

- [20] Corey, E. J., Grogan, M. J. (1999). Enantioselective synthesis of alpha-amino nitriles from N-benzhydryl imines and HCN with a chiral bicyclic guanidine as catalyst. *Organic letters*, 1(1), 157–60.
- [21] Saidi, M. R., Azizi, N. (2004). A Novel and Efficient Method for the Synthesis of α – Aminonitriles by the Reaction of Aminals with Trimethylsilyl Cyanide Catalyzed by Iodine, *Journal of Iranian Chemical Society*, 1(2), 136–140.
- [22] Surya, K. (2005), Cobalt (II) chloride catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*; 1(8).
- [23] Vachal, P., Jacobsen, E. N. (2002). Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(34), 10012–4.
- [24] Wang, J., Liu, X., Feng, X. (2011). Asymmetric Strecker Reactions. *Chemical Reviews*. 111. 6947–6983.
- [25] Ranu, Brindaban C. Dey, Subendu S. Hajra, Alakananda. (2002). Indium Trichloride Catalyzed One-Step Synthesis of α -Aminonitriles by a Three-Component Condensation of Carbonyl Compounds, Amines and Potassium Cyanide. *Tetrahedron*. 58. 2529-2532.
- [26] Hajipour, Abdol Reza. Dehbane, Ifa Mahboobi. (2012) An efficient one-pot synthesis of α -amino nitriles using ecofriendly Lewis-acidic ionic liquid choline chloride. $2ZnCl_2$. *Iranian Journal of catalysis* 2(4), 147-151.
- [27] Dekamin, M. G., Azimoshan, M., Sharifi, A., Maleki, A. (n.d.). Facile and One-Pot Synthesis of α -Aminonitriles by Strecker Reaction Catalyzed by [BMIM] [PINO] as a New Ionic Liquid, 2–7.
- [28] Kathiravan, M.K. et. al. (2012). A Rapid and Facile Synthesis of α -Amino Nitrile. *Chemistry Journal*. 2. (6). 199-205.
- [29] Ali, M. (2001). Silica sulfuric acid / $NaNO_2$ as a novel heterogeneous system for production of thionitriles and disulfides under mild conditions, *Tetrahedron*, 57, 9509–9511.

- [30] Shaabani, A., Maleki, A. (2007). Cellulose sulfuric acid as a bio-supported and recyclable solid acid catalyst for the one-pot three-component synthesis of α -amino nitriles. *Applied Catalysis A: General*, 331, 149–151.
- [31] Wu, H., Shen, Y., Fan, L., Wan, Y., Shi, D. (2006). Solid silica sulfuric acid (SSA) as a novel and efficient catalyst for acetylation of aldehydes and sugars. *Tetrahedron*, 62(34), 7995–7998.
- [32] Martínez, R., Ramón, D. J., Yus, M. (2005). Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, 46(49), 8471–8474.
- [33] Darras, F. H., Pockes, S., Huang, G., Wehle, S., Strasser, A., Wittmann, H.-J., Nimczick, M., et al. (2014). Synthesis, biological evaluation, and computational studies of Tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH3 receptor antagonists. *ACS chemical neuroscience*, 5(3), 225–42.
- [34] Kozikowski, A. P., Campiani, G., Sun, L.-Q., Wang, S., Saxena, A., Doctor, B. P. (1996). Identification of a More Potent Analogue of the Naturally Occurring Alkaloid Huperzine A. Predictive Molecular Modeling of Its Interaction with AChE. *Journal of the American Chemical Society*, 118(46), 11357–11362.
- [35] Lipinski, C. a. (2001). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 44(1), 235–49.
- [36] Hubbard R.E. (2006). Structure-based drug discovery: An overview. *RSC Biomolecular Sciences*. p.p. 142-143.
- [37] Lipinski, C. a, Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3–26.
- [38] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615–23.

- [39] M, E. P. P., Wang, Y., Chackalamannil, S., Hu, Z., Greenlee, W. J., Clader, J., Lachowicz, J. E. (2002). Improving the Oral Efficacy of CNS Drug Candidates: Discovery of Highly Orally, 45(25), 0–3.
- [40] Molinspiration cheminformatics, calculation of molecular properties and prediction of bioactivity, disponible en: <http://www.molinspiration.com/>.
- [41] Molecular property explorer: Osiris property explorer, Thomas Sander, disponible en: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.
- [42] Ali, M. (2001). Silica sulfuric acid / NaNO₂ as a novel heterogeneous system for production of thionitrites and disulfides under mild conditions, 57, 9509–9511.
- [43] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Francisco, S. (1961). A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- [44] Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Metodologia para Quantificação de atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1.^a edição – 2006. p.p. 27-39.

Bibliografía:

- Ali, M. (2001). Silica sulfuric acid / NaNO₂ as a novel heterogeneous system for production of thionitrites and disulfides under mild conditions, 57, 9509–9511.
- Ali, M. (2001). Silica sulfuric acid / NaNO₂ as a novel heterogeneous system for production of thionitrites and disulfides under mild conditions, Tetrahedron, 57, 9509–9511.
- BAIRD, Collin. Química ambiental. Ed. Reverte. 2004. p.p. 327-334.
- Boletín epidemiológico semana 16. Instituto Nacional de Salud, disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2016.pdf>.
- C.-H. Mao, Laurens Anderson. (1965). Cyanogenesis in Sorghum vulgare. II. Mechanism of the Alkaline Hydrolysis of Dhurrin (p-Hydroxymandelonitrile Glucoside). Journal of Organic Chemistry, 30 (2), pp 603–607.
- Carreño Otero, A. L., Vargas Méndez, L. Y., Duque L, J. E., Kouznetsov, V. V. (2014). Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. European journal of medicinal chemistry, 78, 392–400.
- Corey, E. J., Grogan, M. J. (1999). Enantioselective synthesis of alpha-amino nitriles from N-benzhydryl imines and HCN with a chiral bicyclic guanidine as catalyst. Organic letters, 1(1), 157–60.
- Darras, F. H., Pockes, S., Huang, G., Wehle, S., Strasser, A., Wittmann, H.-J., Nimczick, M., et al. (2014). Synthesis, biological evaluation, and computational studies of Tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH3 receptor antagonists. ACS chemical neuroscience, 5(3), 225–42.

- Dekamin, M. G., Azimoshan, M., Sharifi, A., Maleki, A. (n.d.). Facile and One-Pot Synthesis of α -Aminonitriles by Strecker Reaction Catalyzed by [BMIM] [PINO] as a New Ionic Liquid, 2–7.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Francisco, S. (1961). A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Frehner, M., Scalet, M., Conn, E. E. (1990). Pattern of the Cyanide-Potential in developing fruits, *Plant Physiology*. (94) 28–34.
- Hajipour, Abdol Reza. Dehbane, Ifa Mahboobi. (2012) An efficient one-pot synthesis of α -amino nitriles using ecofriendly Lewis-acidic ionic liquid choline chloride. $2ZnCl_2$. *Iranian Journal of catalysis* 2(4), 147-151.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653–665.
- Hubbard R.E. (2006). Structure-based drug discovery: An overview. *RSC Biomolecular Sciences*. p.p. 142-143.
- Kathiravan, M.K. et. al. (2012). A Rapid and Facile Synthesis of α -Amino Nitrile. *Chemistry Journal*. 2. (6). 199-205.
- Kobayashi, S., Ishitani, H. (1999). Catalytic enantioselective addition to imines. *Chemical reviews*, 99(5), 1069–94.
- Kozikowski, A. P., Campiani, G., Sun, L.-Q., Wang, S., Saxena, A., Doctor, B. P. (1996). Identification of a More Potent Analogue of the Naturally Occurring Alkaloid Huperzine A. Predictive Molecular Modeling of Its Interaction with AChE. *Journal of the American Chemical Society*, 118(46), 11357–11362.
- Lee, J., Zhang, G., Wood, E., Castillo, C. R., Mitchell, A. E. (2013) Quantification of Amygdalin in Nonbitter, Semibitter, and Bitter Almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (61). 7754-7759.

- Lee, K.-S., H.-S., Hwang, C.-Y. (2012). An Efficient Synthesis of Nitriles from Aldoximes Using Diethyl Phosphorocyanidate under Mild Conditions. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(10), 3173–3174.
- LI, Jie Jack. Name reactions, a collection of detailed reaction mechanisms. Ed. Springer. 2006. 3 ed. 579-580.
- Lipinski, C. a, Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3–26.
- Lipinski, C. a. (2001). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 44(1), 235–49.
- M, E. P. P., Wang, Y., Chackalamannil, S., Hu, Z., Greenlee, W. J., Clader, J., Lachowicz, J. E. (2002). Improving the Oral Efficacy of CNS Drug Candidates: Discovery of Highly Orally, 45(25), 0–3.
- Martínez, R., Ramón, D. J., Yus, M. (2005). Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, 46(49), 8471–8474.
- Martínez, R., Ramón, D. J., Yus, M. (2005). Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, 46(49), 8471–8474.
- Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Metodologia para Quantificação de atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1.^a edição – 2006. p.p. 27-39.
- Molecular property explorer: Osiris property explorer, Thomas Sander, disponible en: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.
- Molinspiration cheminformatics, calculation of molecular properties and prediction of bioactivity, disponible en: <http://www.molinspiration.com/>.
- Nahrstedt, A., Lechtenberg, M., Brinker, A., Seigler, D. S., Hegnauer, R. (1993). 4-hidroxymandelonitrile glucosides, Dhurrin in *Suckleya suckleyana*

and Taxiphyllin in *Girgensohnia oppositiflora* (Chenopodiaceae).

Phytochemistry, 33(4), 847–850.

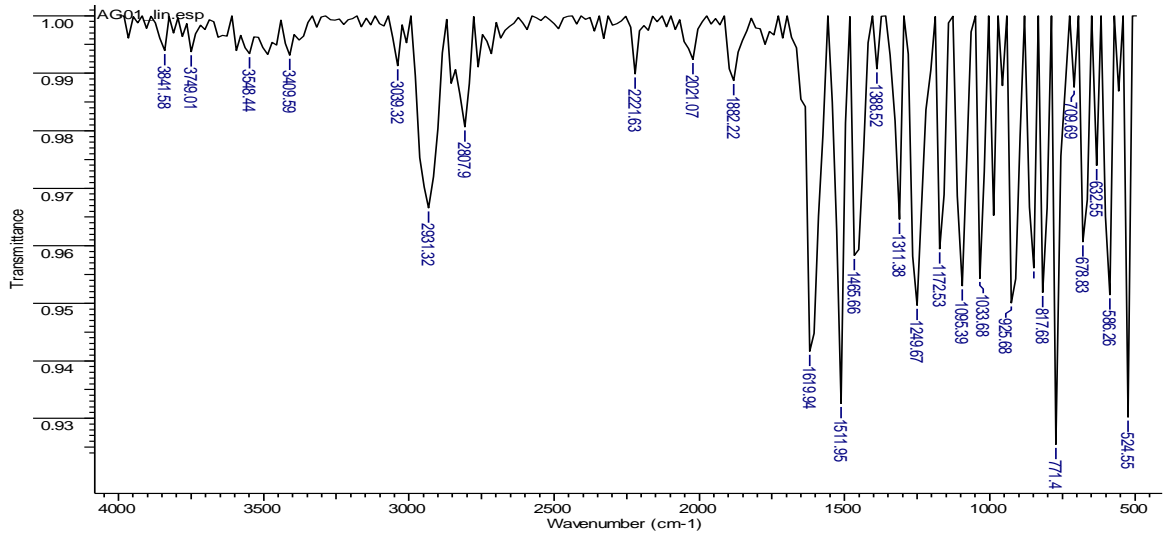
- Nakamura, S., Sato, N., Sugimoto, M., Toru, T. (2004). A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et₂AlCN. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(9), 1513–1516.
- Piotrowski, M. “Primary or Secondary? Versatile Nitrilases in Plant Metabolism”. *Phytochemistry*. Vol 69 (2008); p. 2655–2667.
- Ranu, Brindaban C. Dey, Subendu S. Hajra, Alakananda. (2002). Indium Trichloride Catalyzed One-Step Synthesis of α -Aminonitriles by a Three-Component Condensation of Carbonyl Compounds, Amines and Potassium Cyanide. *Tetrahedron*. 58. 2529-2532.
- Russell, R. J., Claudianos, C., Campbell, P. M., Horne, I., Sutherland, T. D., Oakeshott, J. G. (2004). Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79(3), 84–93.
- Saidi, M. R., Azizi, N. (2004). A Novel and Efficient Method for the Synthesis of α - Aminonitriles by the Reaction of Amins with Trimethylsilyl Cyanide Catalyzed by Iodine, *Journal of Iranian Chemical Society*, 1(2), 136–140.
- Shaabani, A., Maleki, A. (2007). Cellulose sulfuric acid as a bio-supported and recyclable solid acid catalyst for the one-pot three-component synthesis of α -amino nitriles. *Applied Catalysis A: General*, 331, 149–151.
- Shragg, T. A.; Albertson, T. E.; Fisher, C. J., Jr. (1982) Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. *West. Journal of Medicine*, 136, 65–69.
- Surya, K. (2005), Cobalt (II) chloride catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*; 1(8).
- Takamura, M., Hamashima, Y., Usuda, H., Kanai, M., Shibasaki, M. (2000). A catalytic asymmetric strecker-type reaction promoted by Lewis acid-Lewis base bifunctional catalyst. *Chemical pharmaceutical bulletin*, 48(10), 1586–92.

- Vachal, P., Jacobsen, E. N. (2002). Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(34), 10012–4.
- Vargas Méndez, L., Kouznetsov V., First girgensohnine analogs prepared through InCl_3 -catalyzed Strecker reaction and their bioprospection, *Current Organic Synthesis* 10 (2013) 969-973.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615–23.
- Wang, J., Liu, X., Feng, X. (2011). Asymmetric Strecker Reactions. *Chemical Reviews*. 111. 6947–6983.
- World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever, Comprehensive guidelines. New Delhi: World Health Organization Regional publication, SEARO N° 29; 1999.
- Wu, H., Shen, Y., Fan, L., Wan, Y., Shi, D. (2006). Solid silica sulfuric acid (SSA) as a novel and efficient catalyst for acetylation of aldehydes and sugars. *Tetrahedron*, 62(34), 7995–7998.

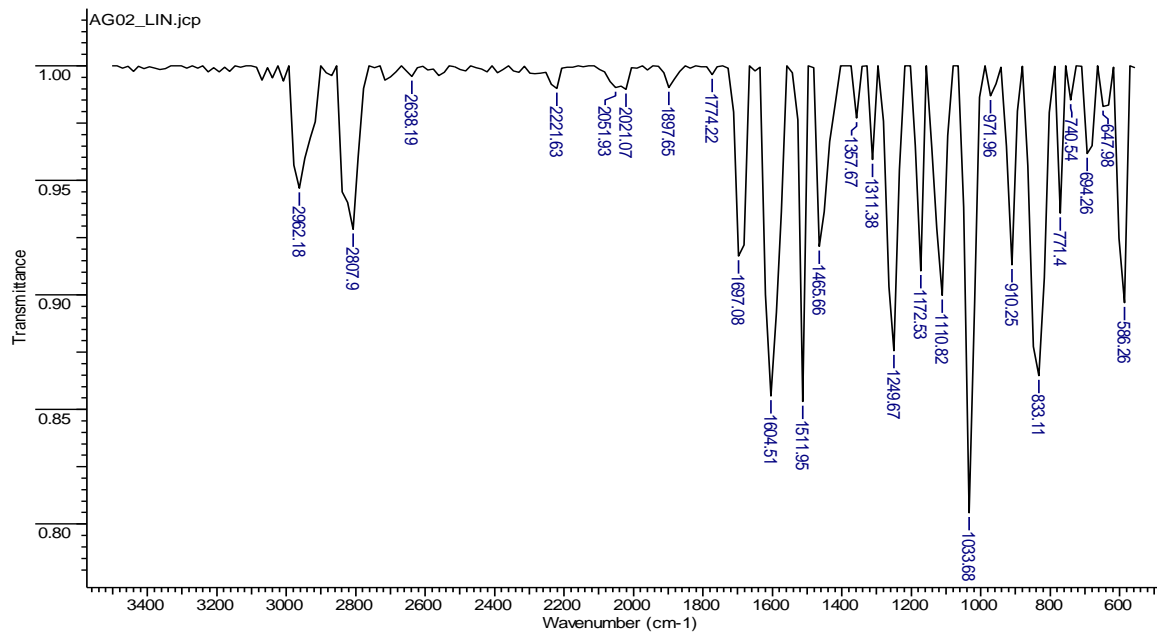
ANEXOS I.

Espectros IR de los análogos sintetizados

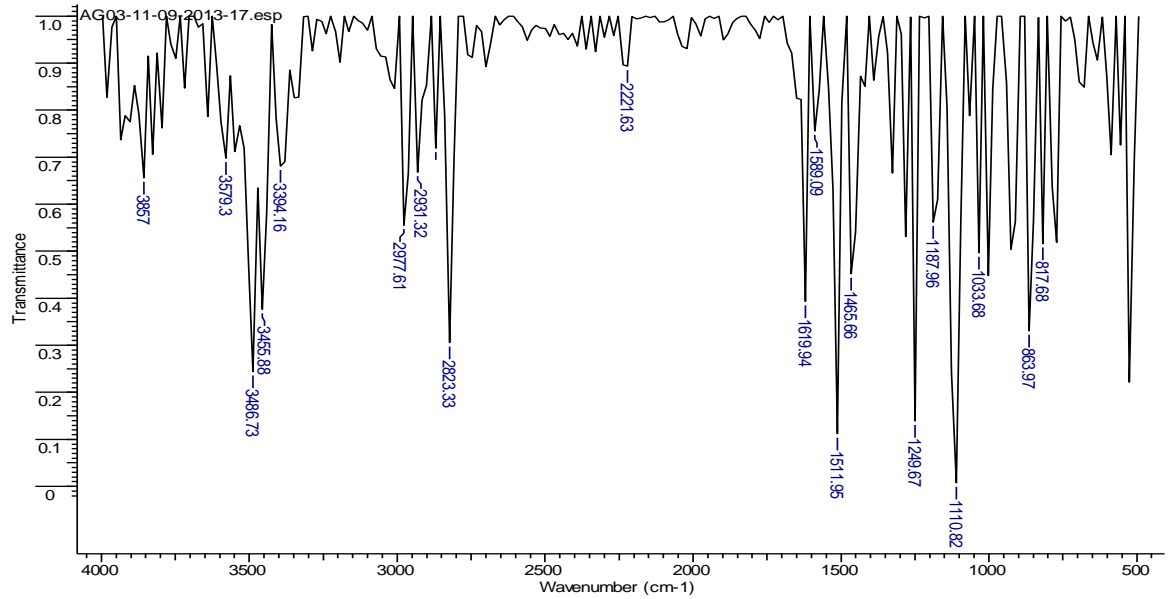
Anexo A 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILLO 1a.



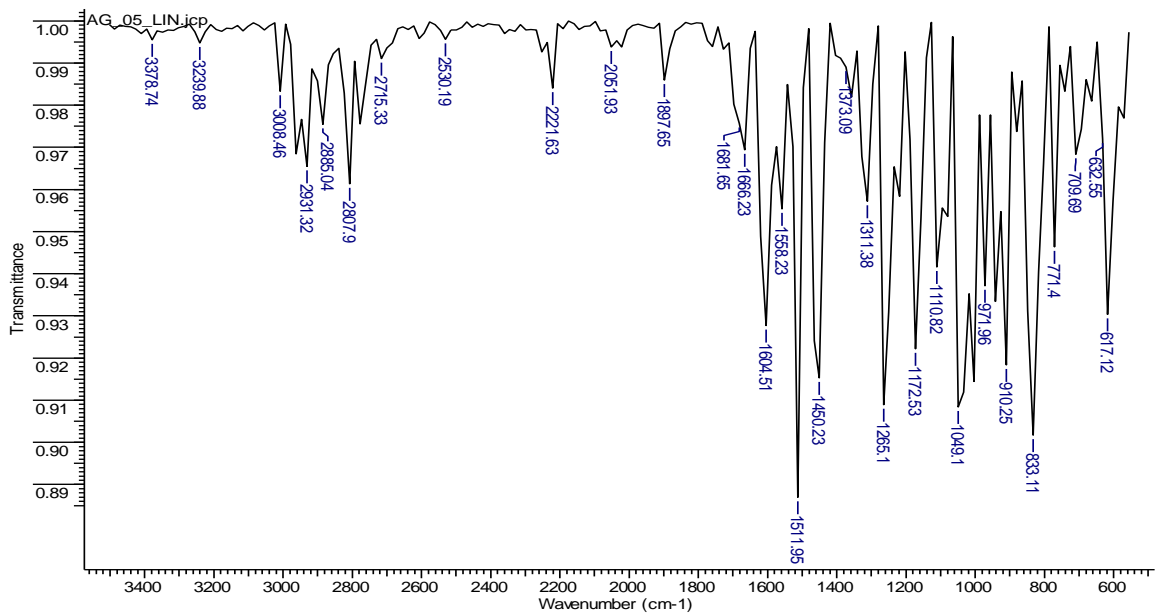
Anexo B 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIRROLIDIN-1-IL) ACETONITRILLO 1b.



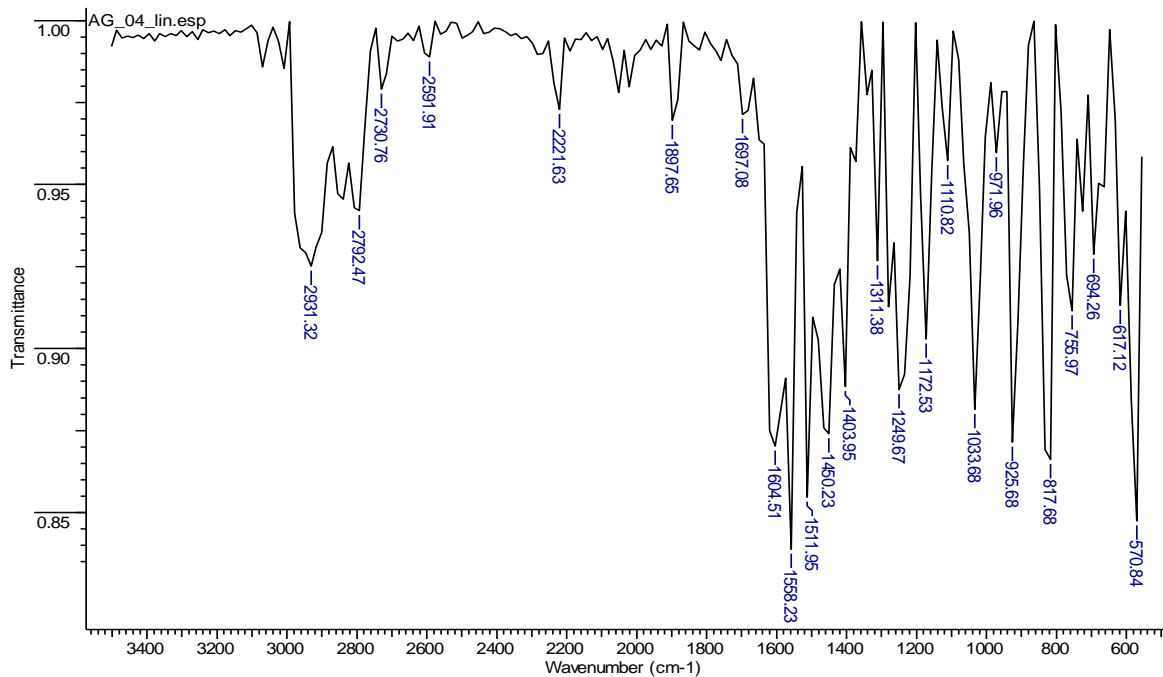
Anexo C 2-(4-METOXIFENIL)-2- MORFOLINOACETONITRILO. 1c.



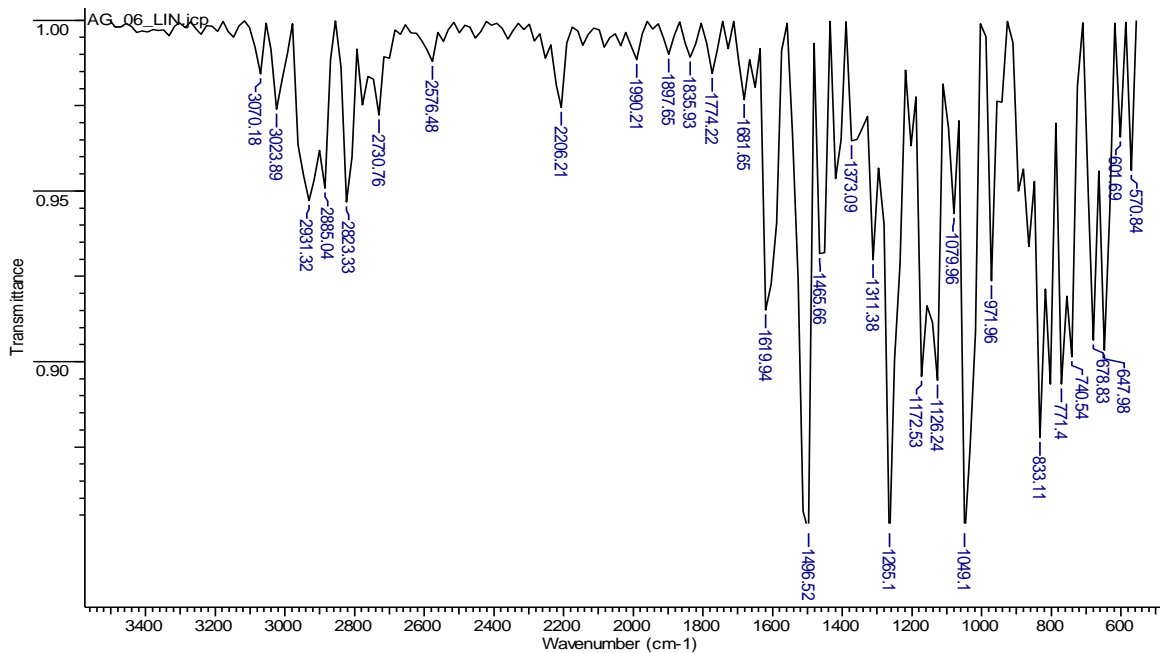
Anexo D 2-(4-METOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2a.



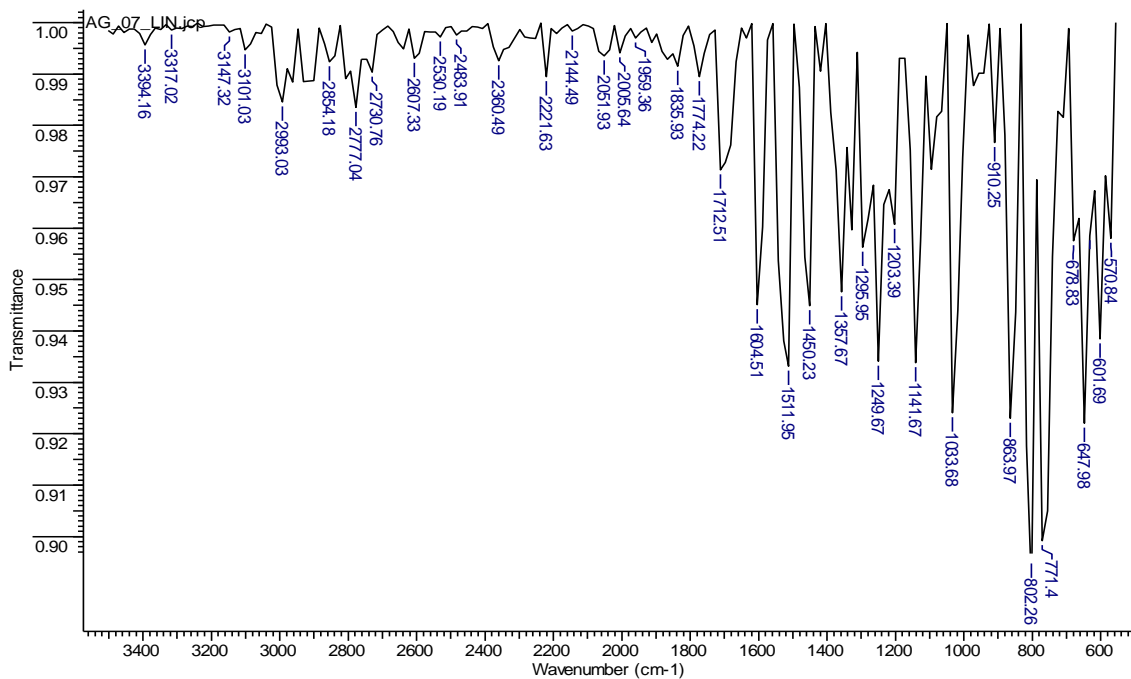
Anexo E 2-(4-METOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2b.



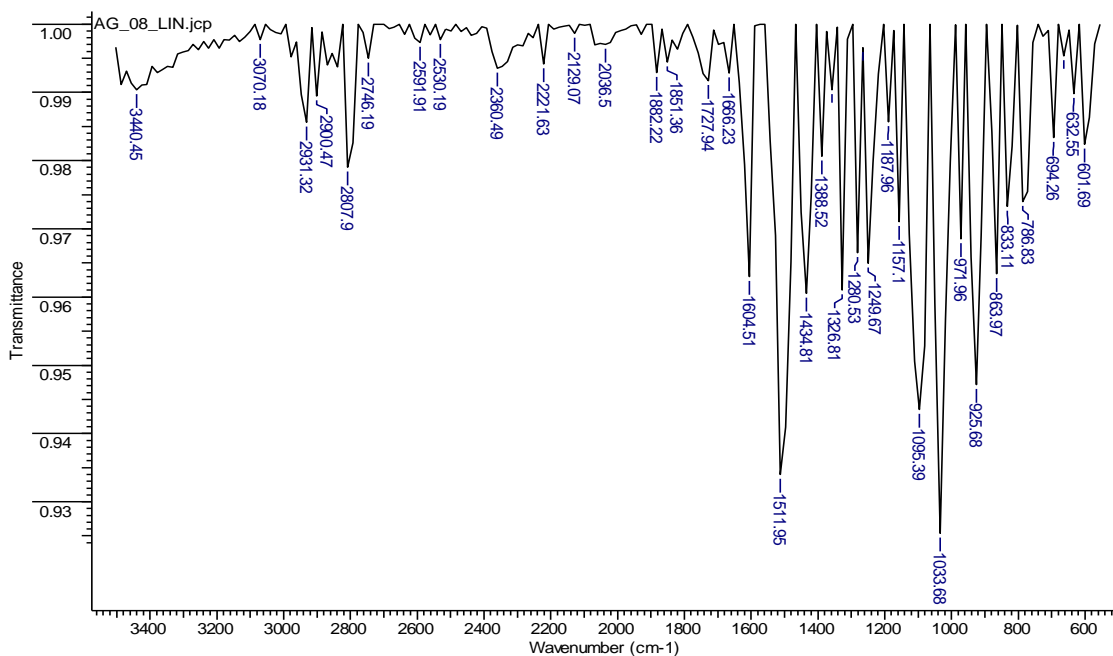
Anexo F 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3a.



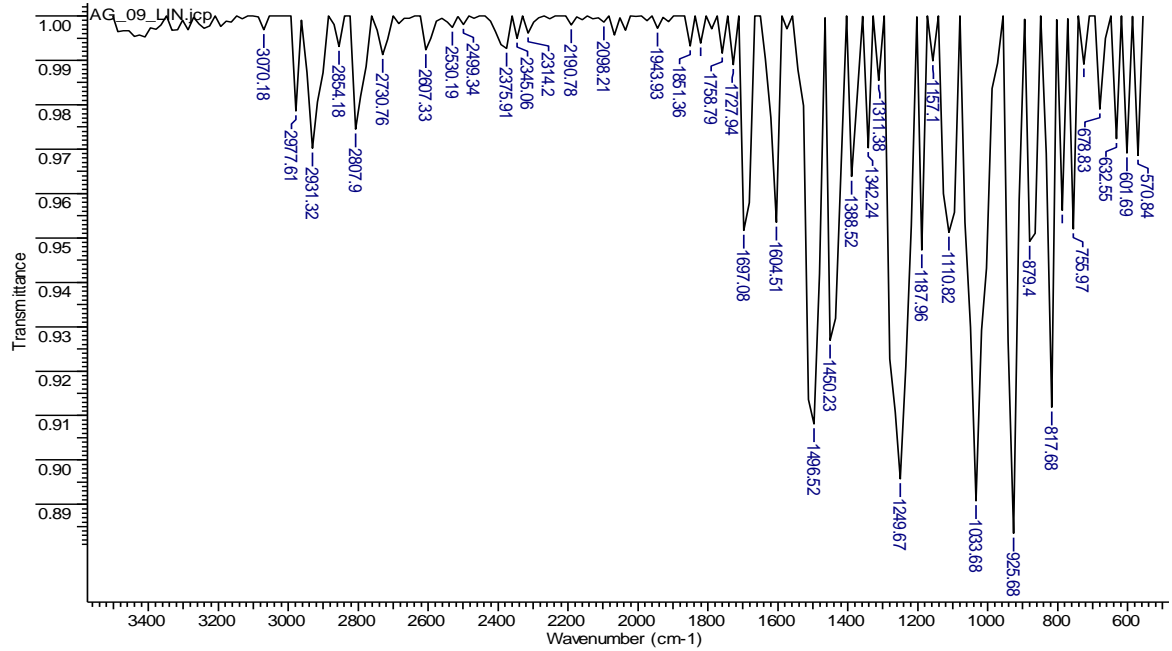
Anexo G 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILLO. 3b.



Anexo H 2-(BENZO [D] [1,3] DIOXOL-5-IL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILLO. 4a.



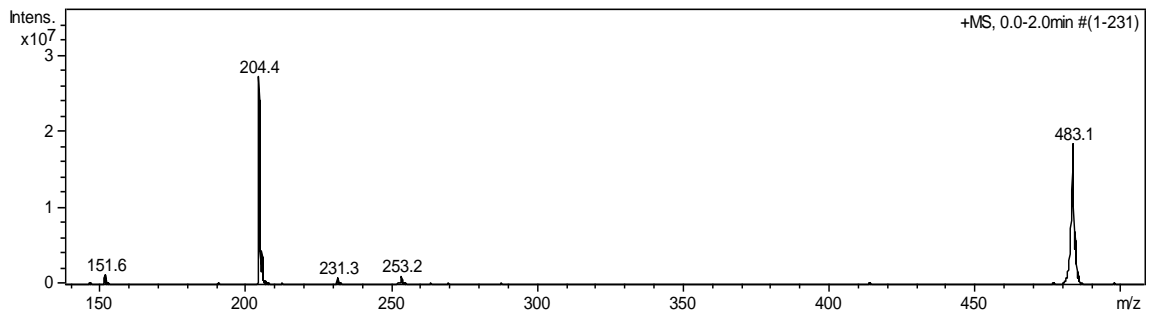
**Anexo I 2-(BENZO [D] [1,3] DIOXOL-5-IL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL)
ACETONITRILO. 4b.**



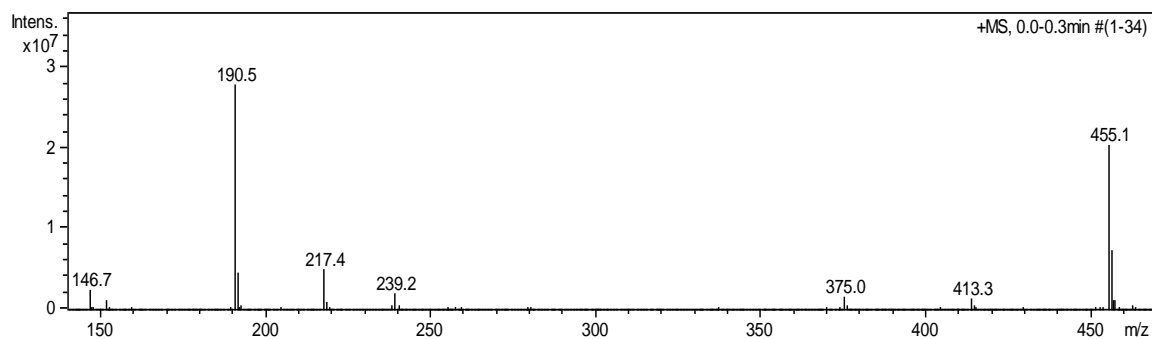
Anexo II.

Fragmentogramas de los análogos sintetizados

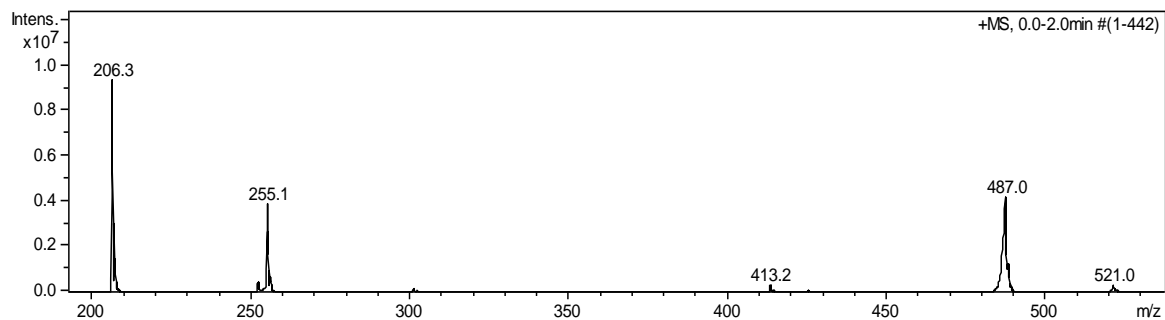
Anexo A 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1a.



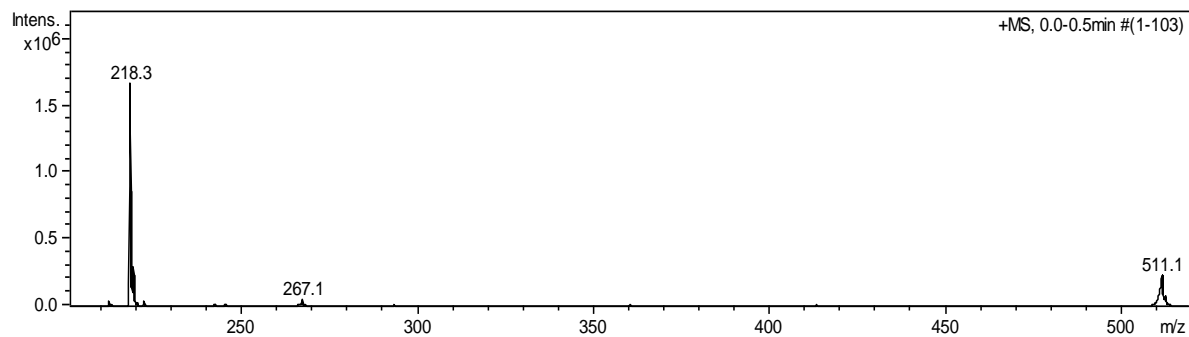
Anexo B 2-(4-METOXIFENIL)-2-(PIRROLIDIN-1-IL) ACETONITRILO 1b.



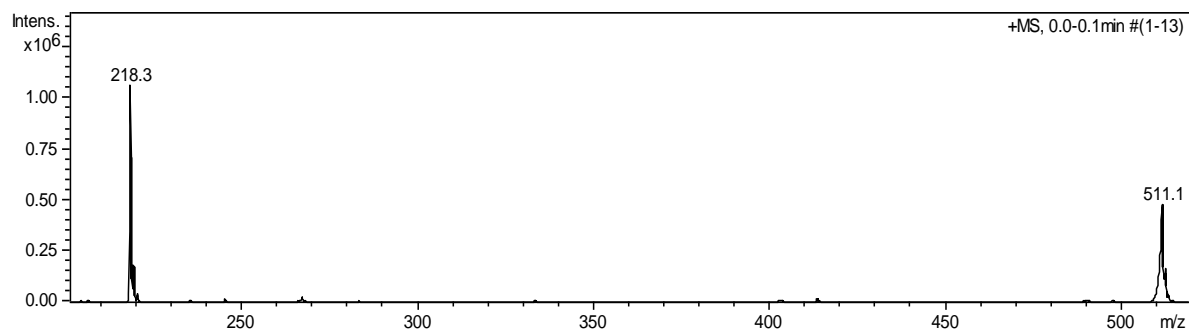
Anexo C 2-(4-METOXIFENIL)-2- MORFOLINOACETONITRILO. 1c.



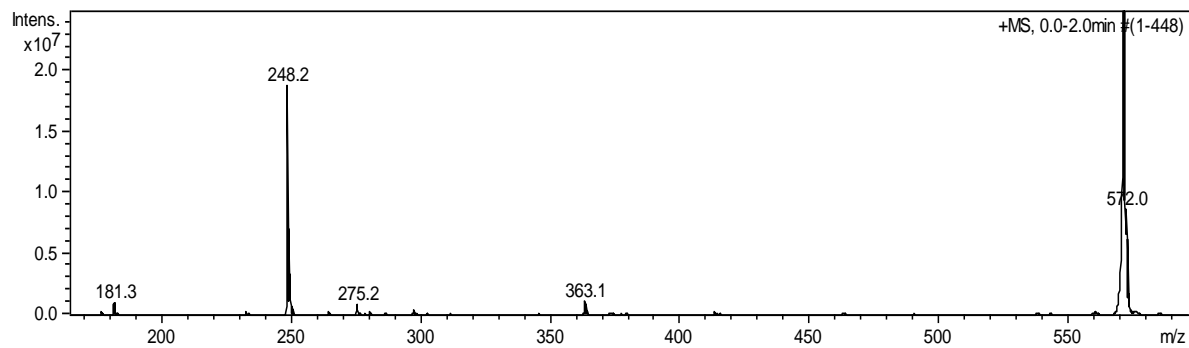
Anexo D 2-(4-METOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2a.



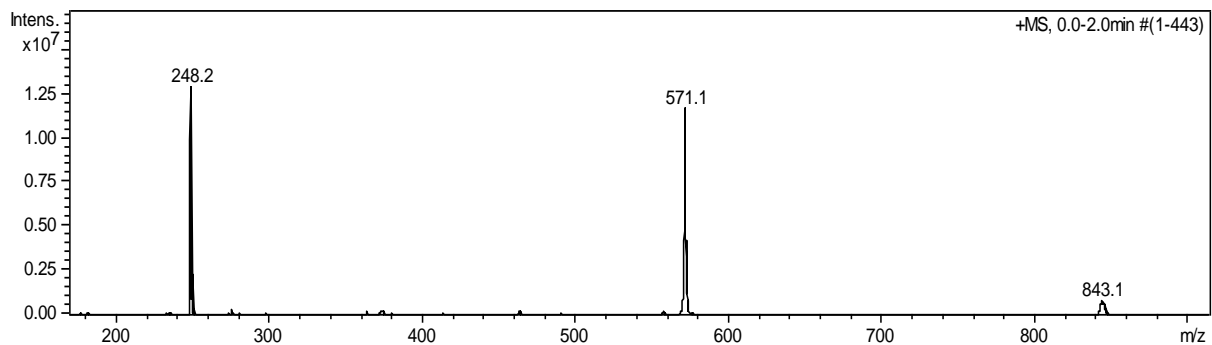
Anexo E 2-(4-METOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 2b.



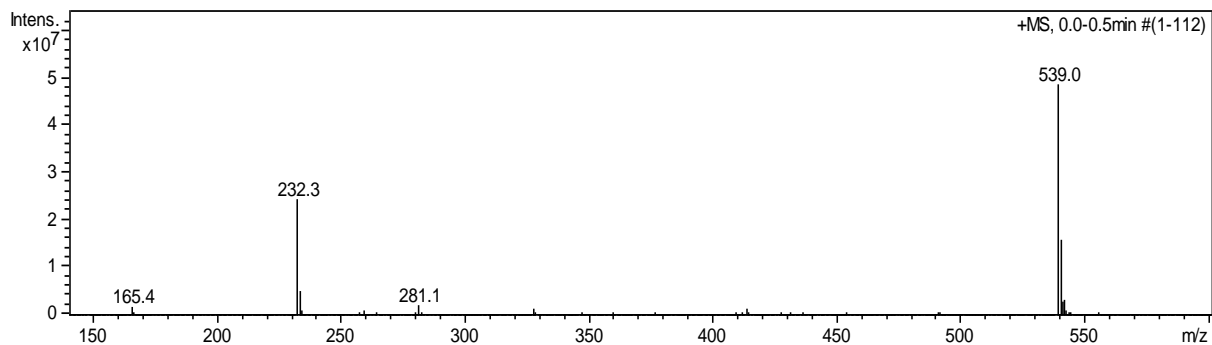
Anexo F 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3a.



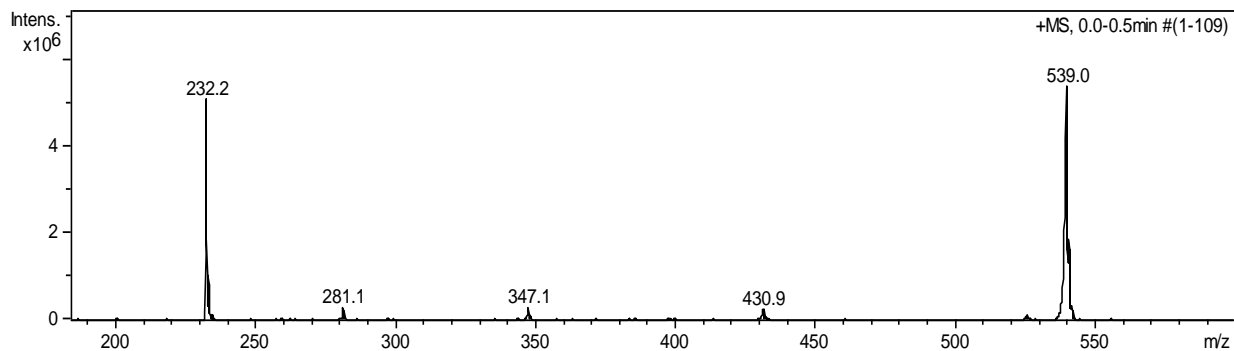
Anexo G 2-(3,4-DIMETOXIFENIL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 3b.



Anexo H 2-(BENZO [D] [1,3]DIOXOL-5-IL)-2-(4-METILPIPERIDIN-1-IL) ACETONITRILO. 4a.



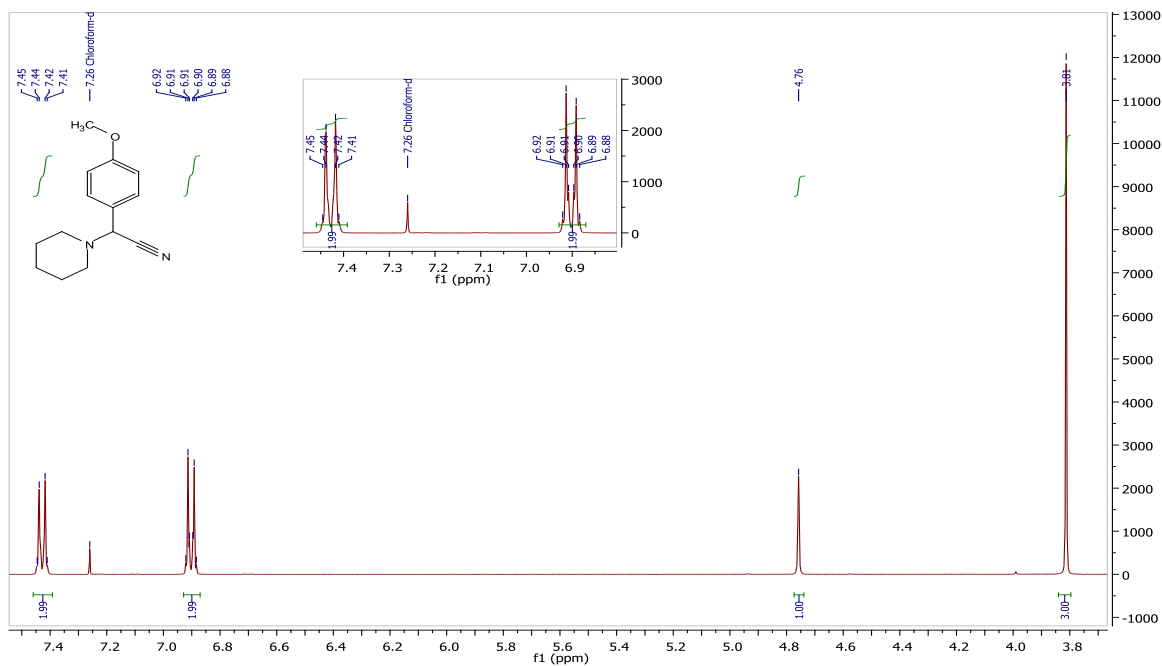
**Anexo I 2-(BENZO [D] [1,3]DIOXOL-5-IL)-2-(2-METILPIPERIDIN-1-IL)
ACETONITRILO. 4b.**



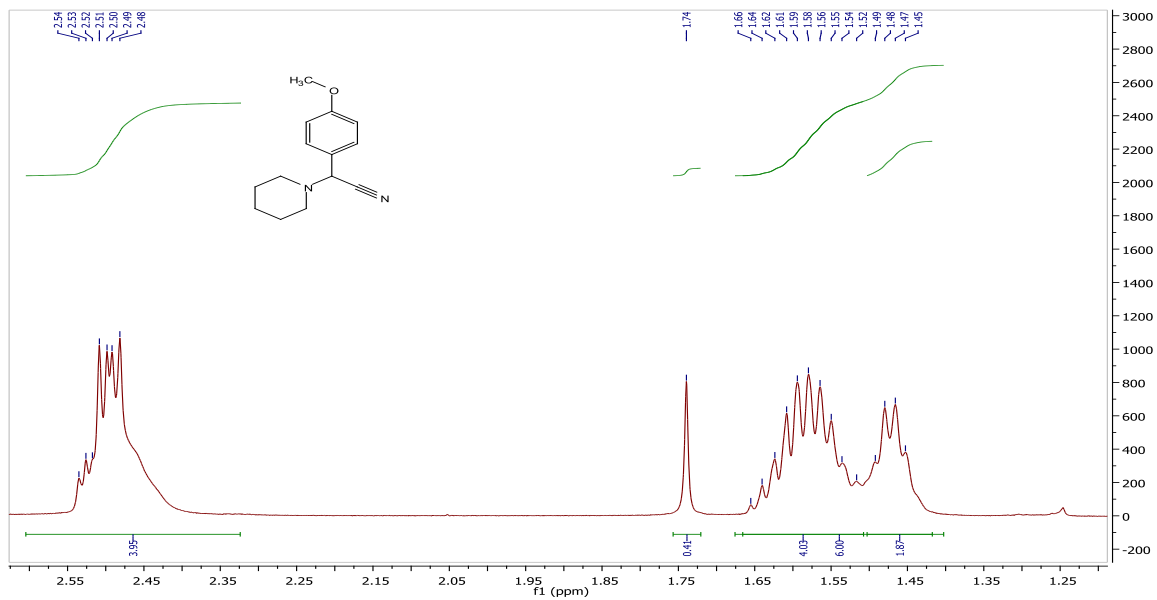
Anexos III.

Espectros RMN de los análogos sintetizados.

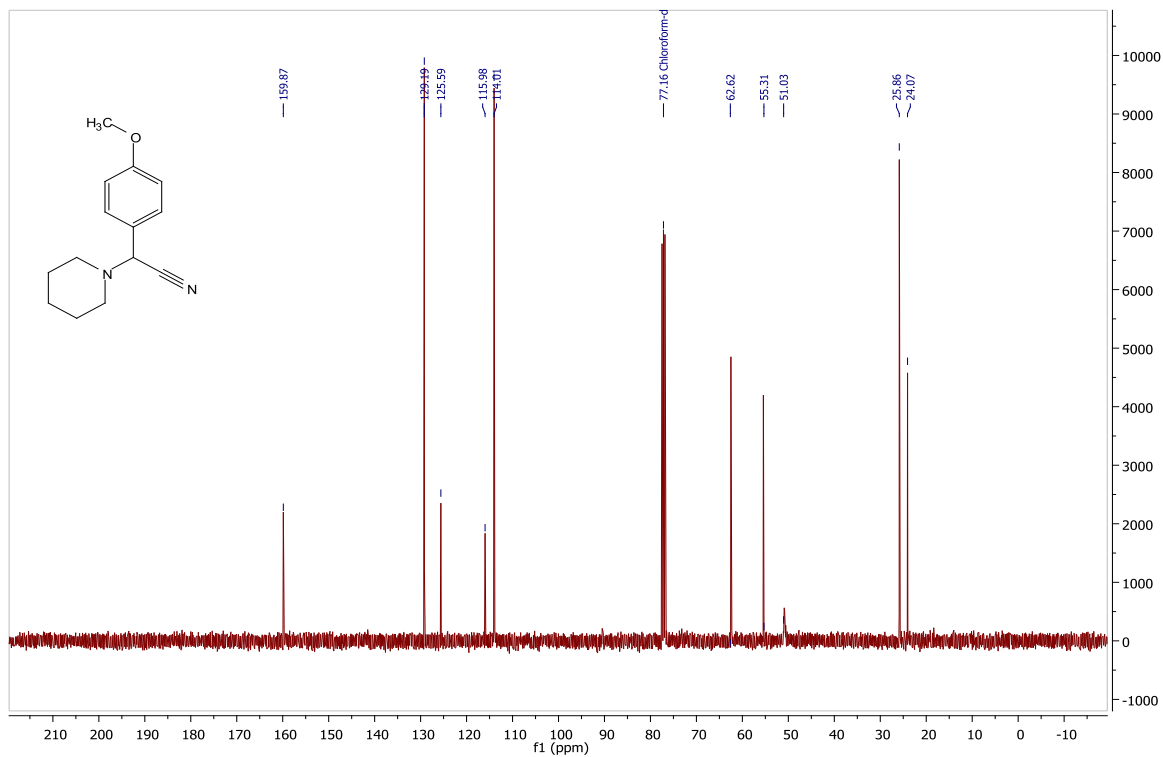
Anexo A Región aromática espectro ¹H-RMN para 1a.



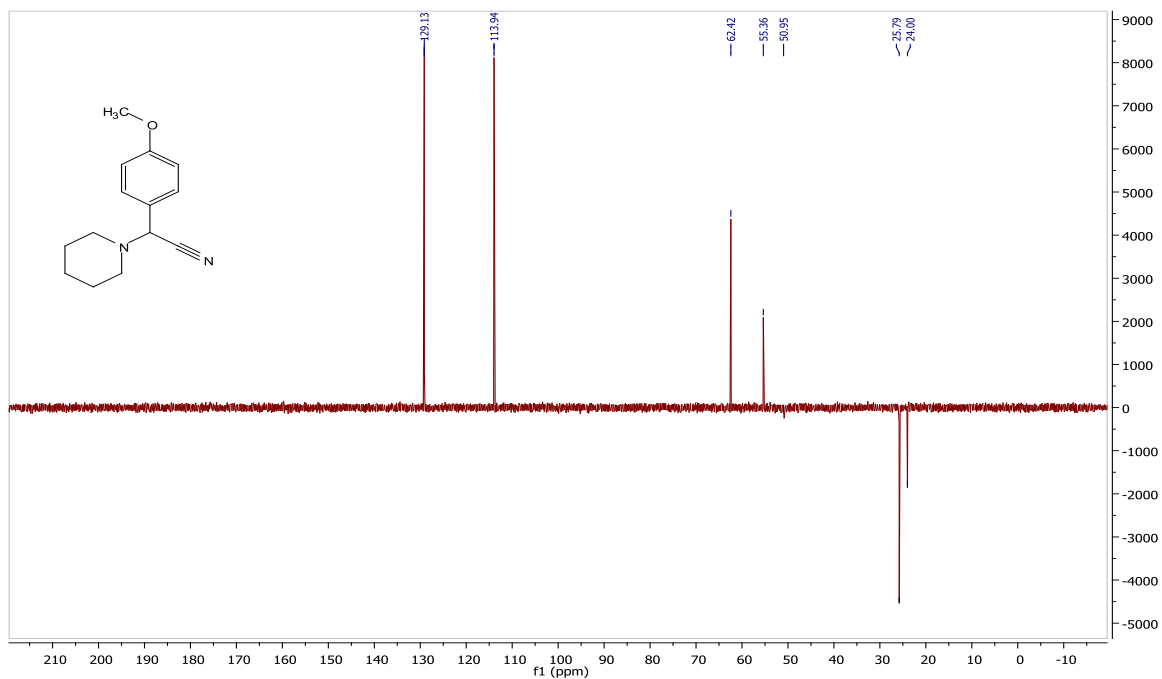
Anexo B Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para **1a**.



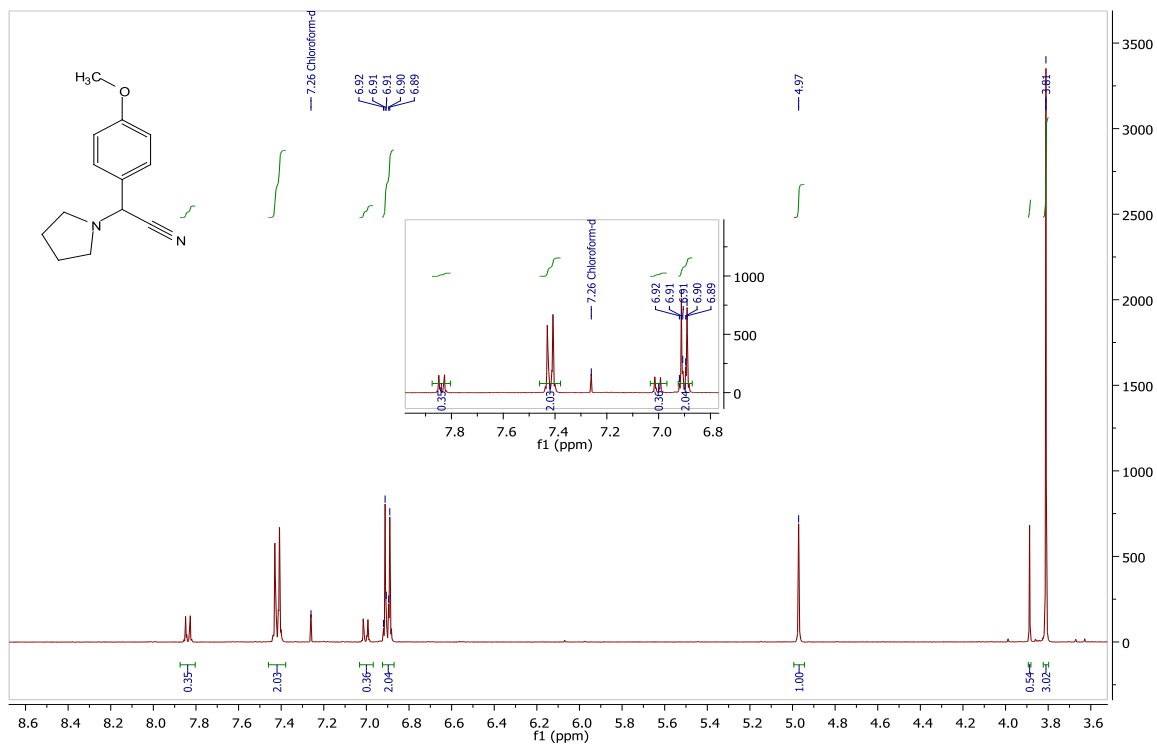
Anexo C Espectro ^{13}C -RMN para **1a**.



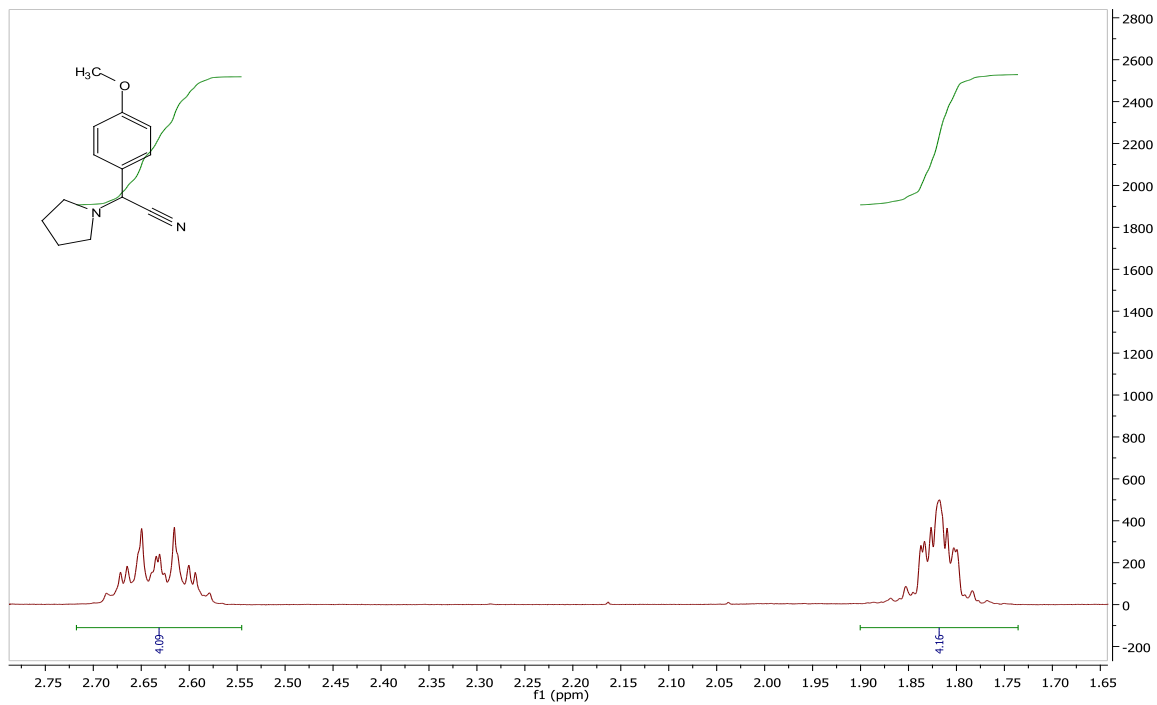
Anexo D Espectro DEPT-135 para 1a.



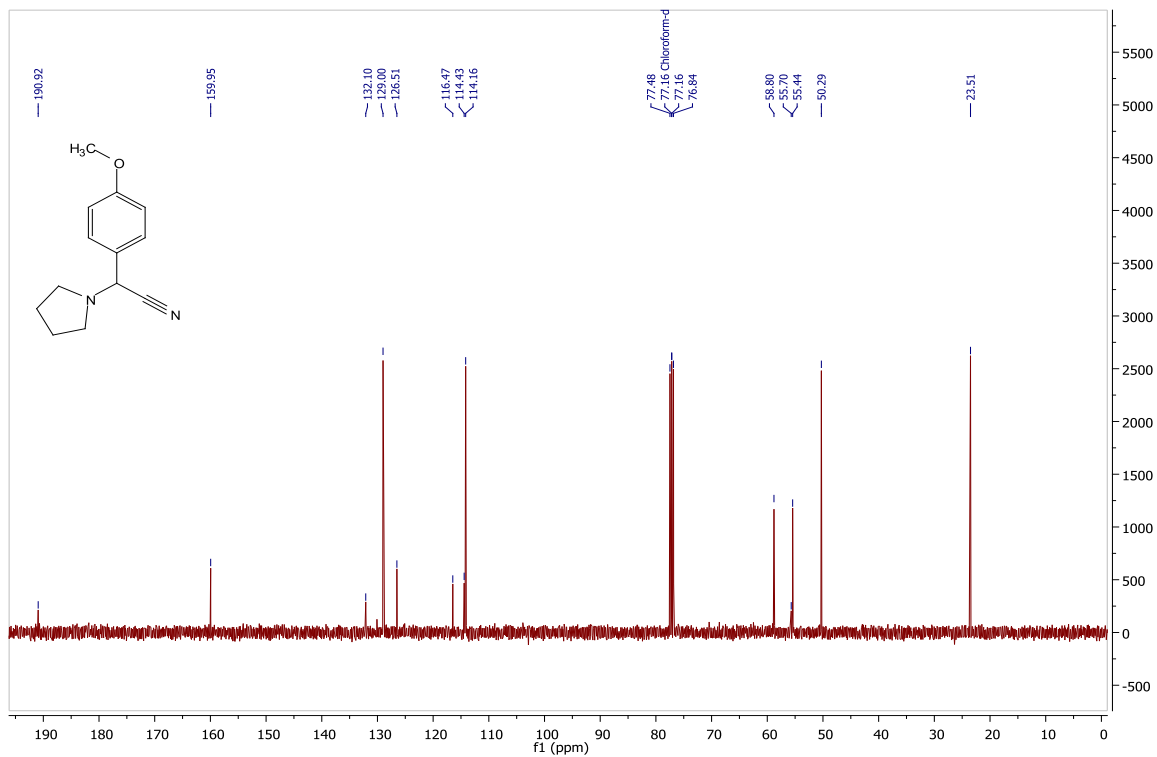
Anexo E Región aromática espectro ¹H-RMN para 1b.



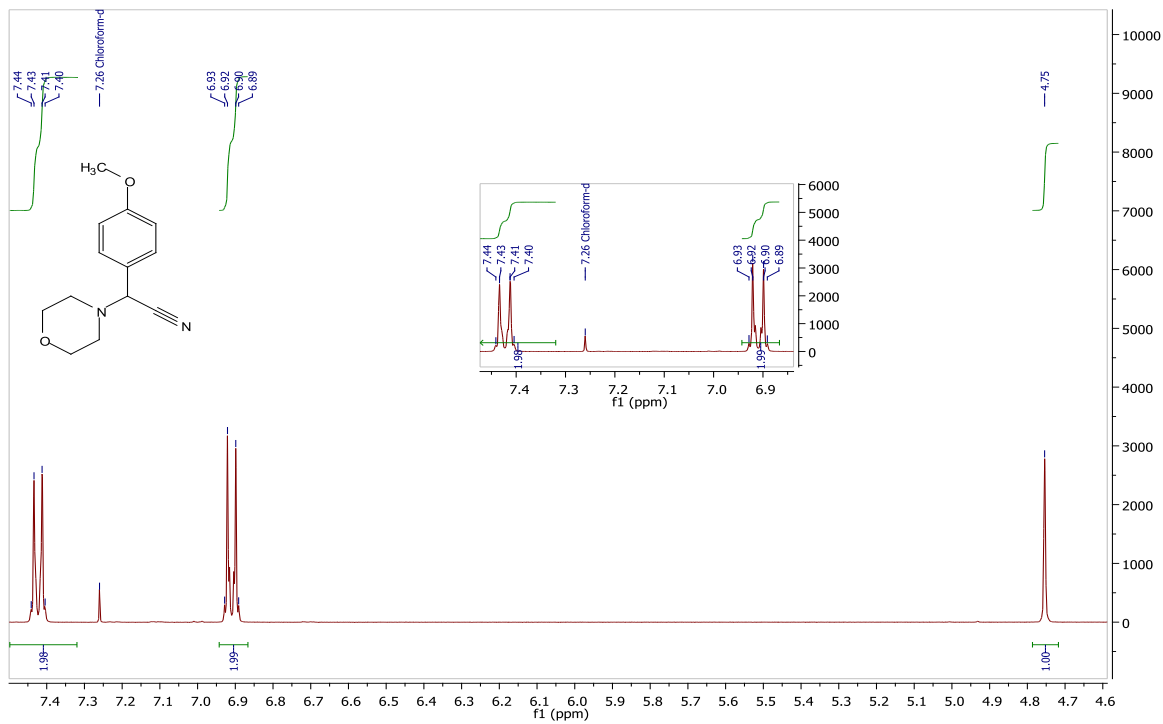
Anexo F Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para **1b**.



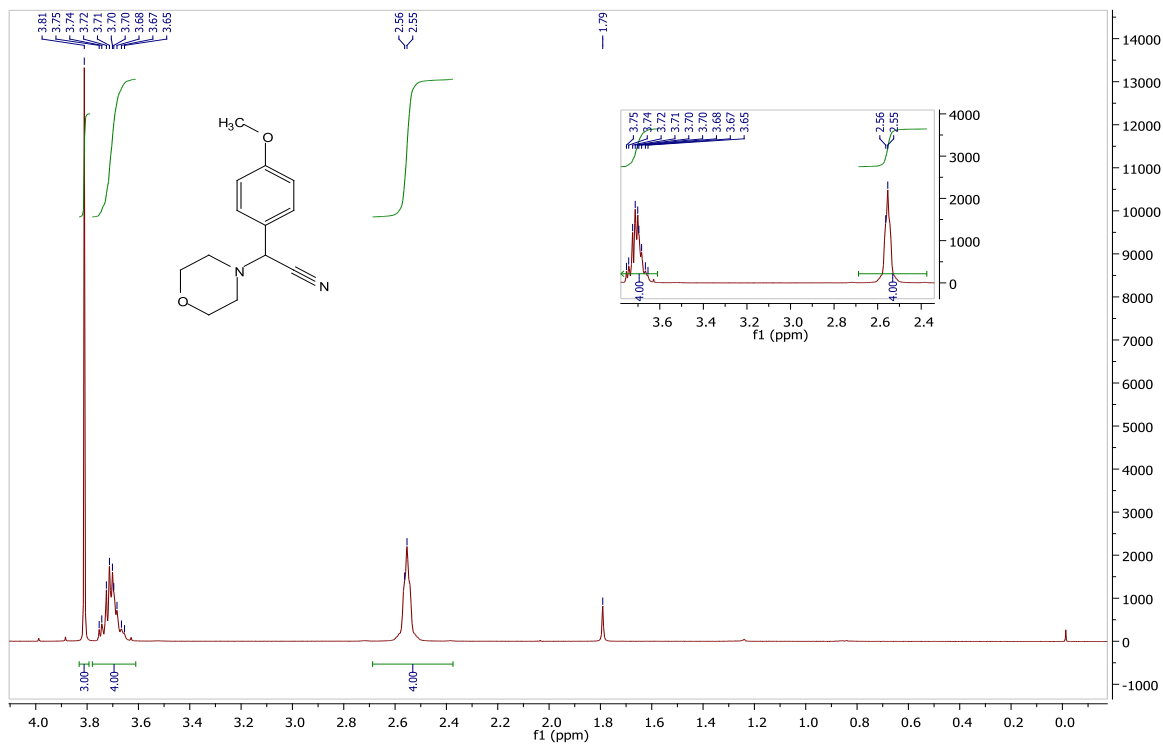
Anexo G Espectro ^{13}C -RMN para **1b**.



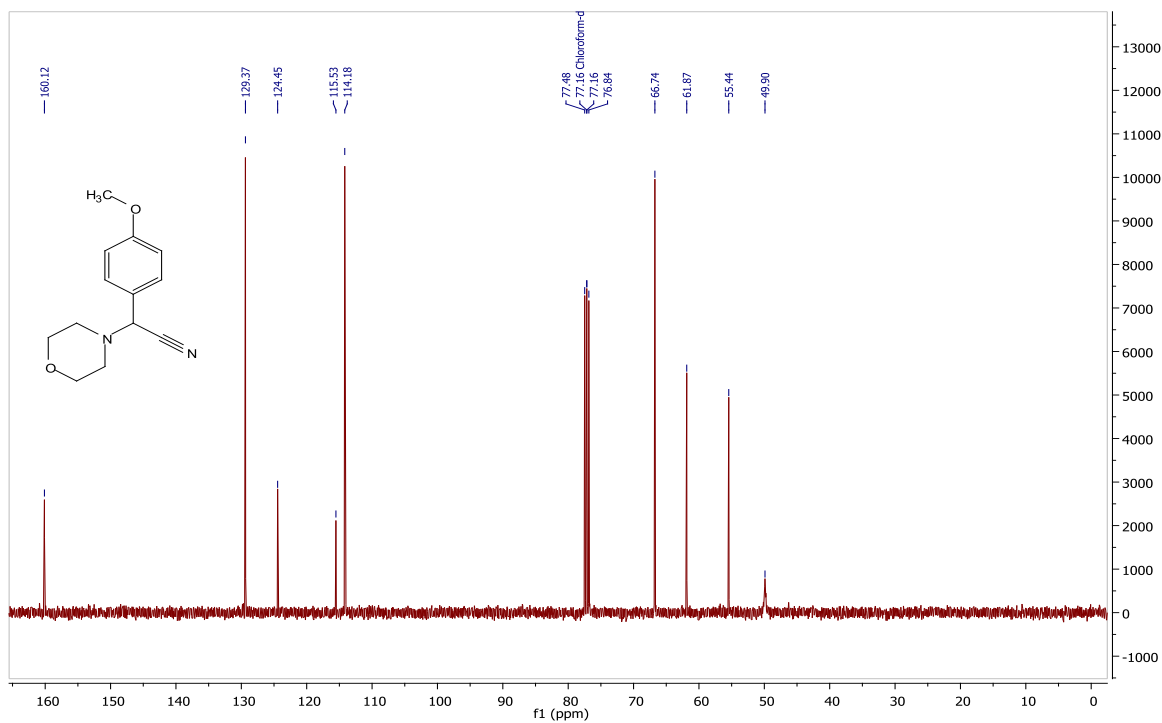
Anexo H Región aromática espectro ^1H -RMN para 1c.



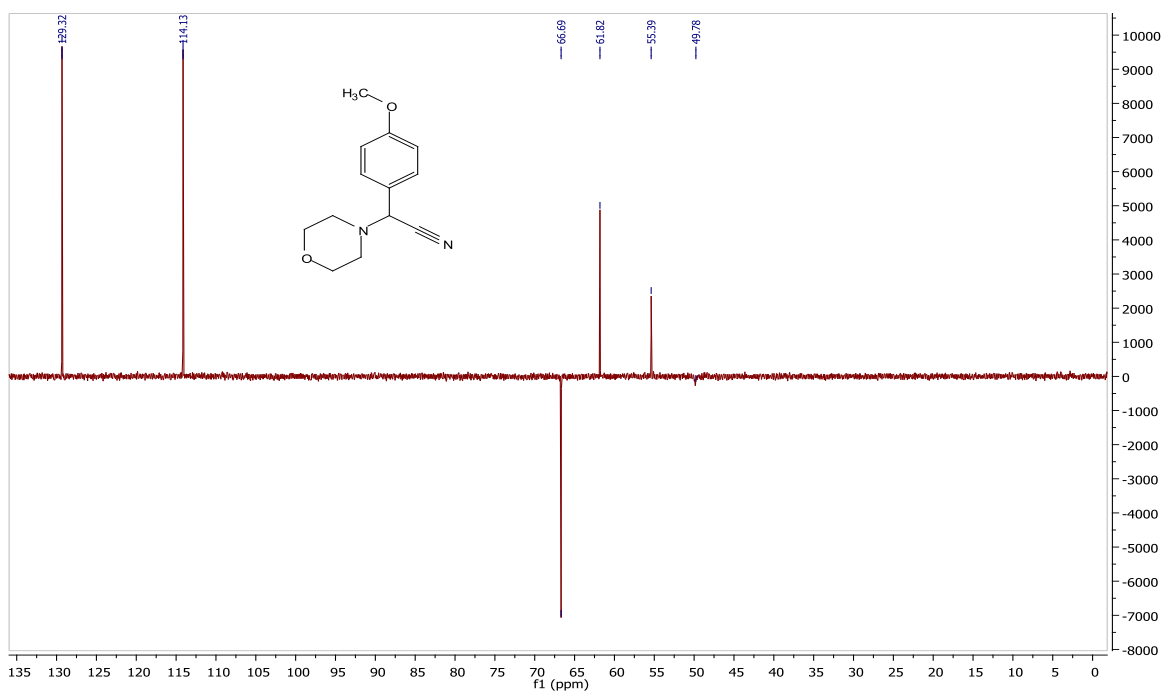
Anexo I Región heterocíclica espectro ^1H -RMN para 1c.



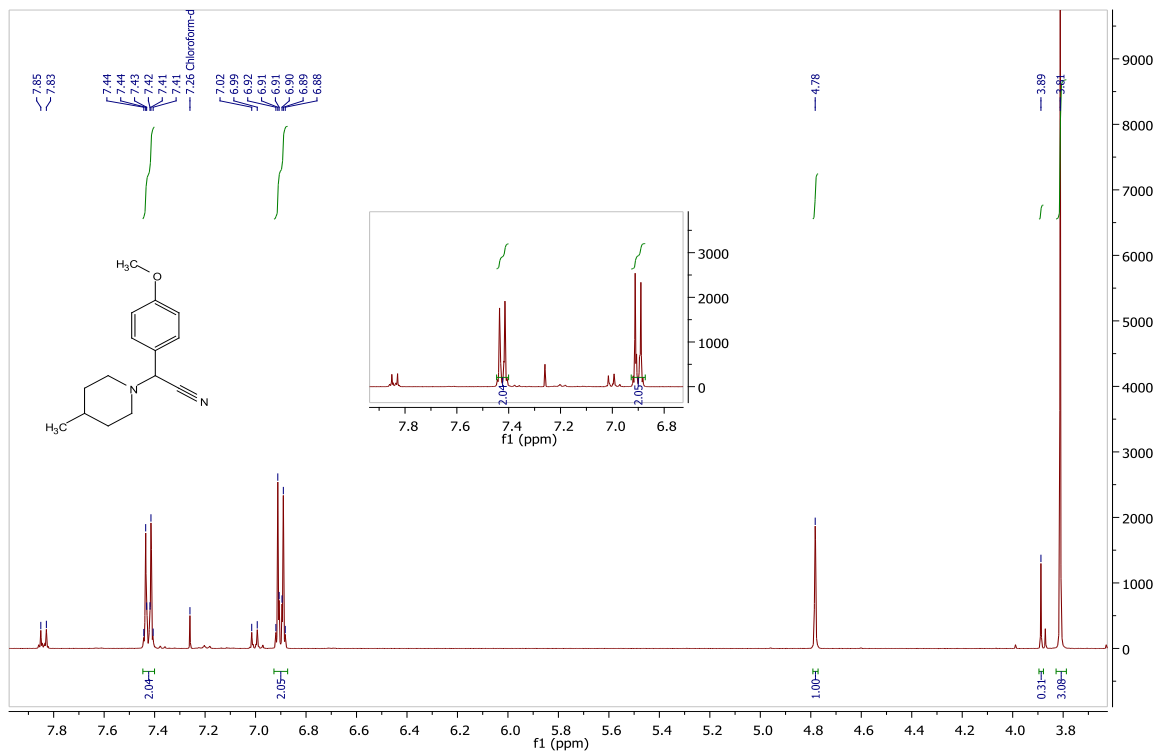
Anexo J Espectro ^{13}C -RMN para 1c.



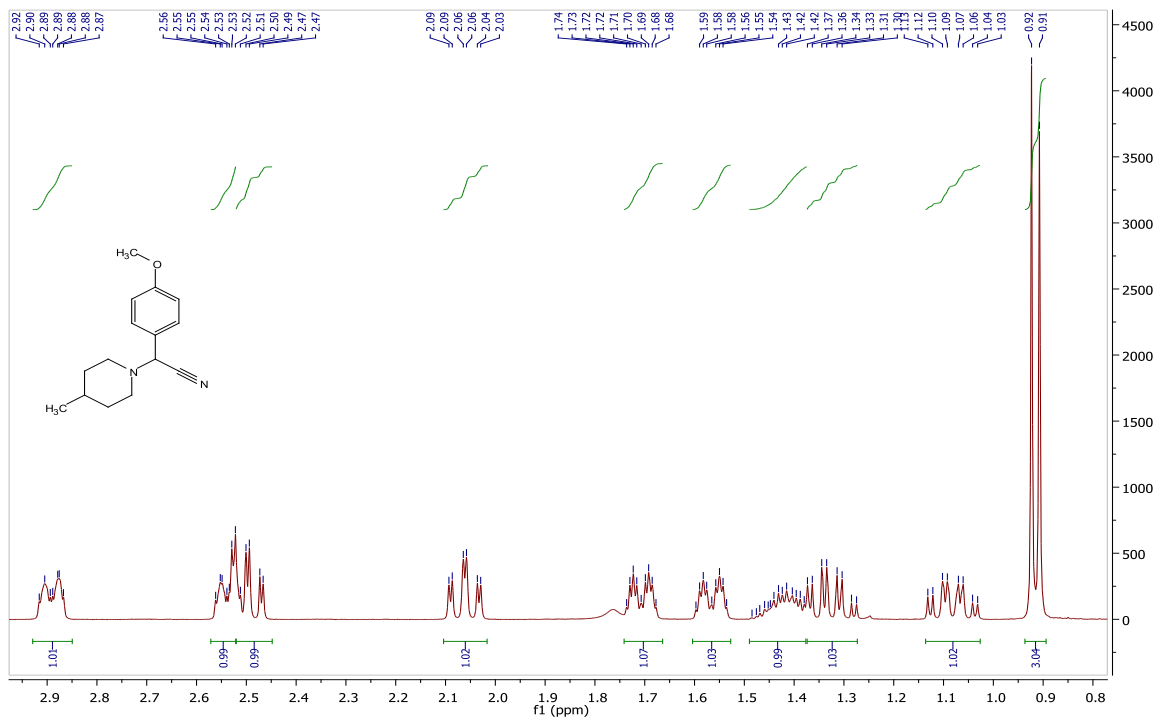
Anexo K Espectro DEPT-135 para 1c.



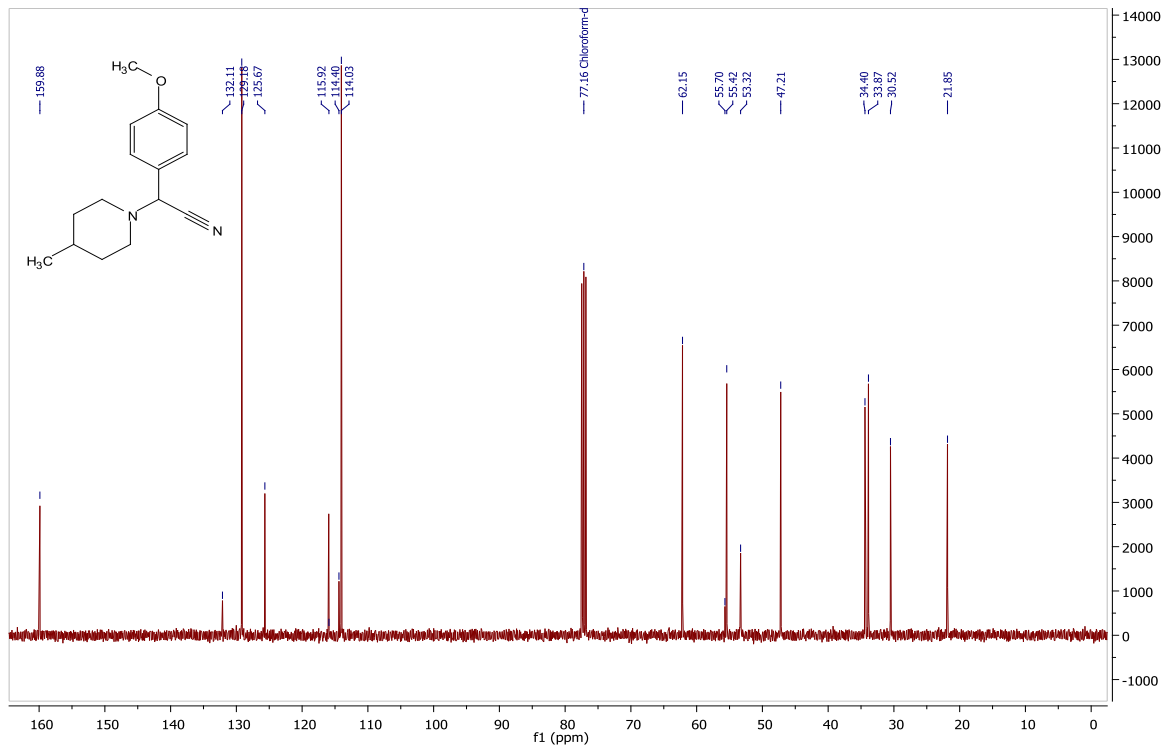
Anexo L Región aromática espectro $^1\text{H-RMN}$ para **2a**.



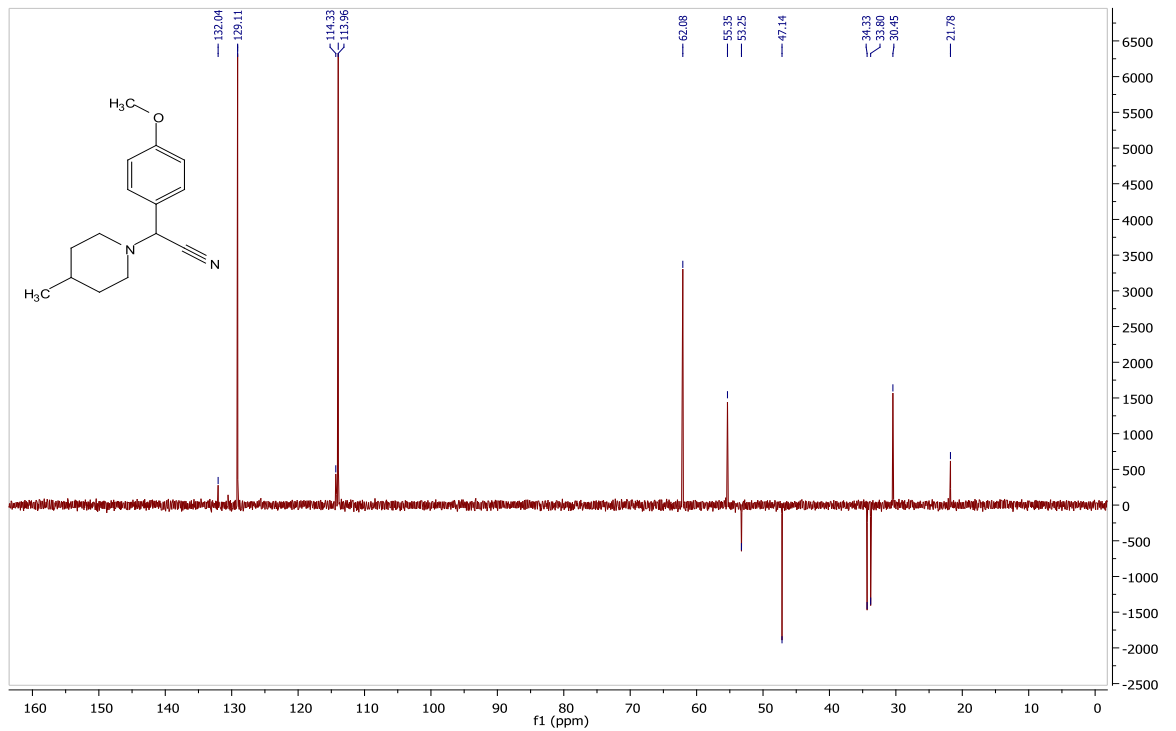
Anexo M Región heterocíclica espectro $^1\text{H-RMN}$ para **2a**.



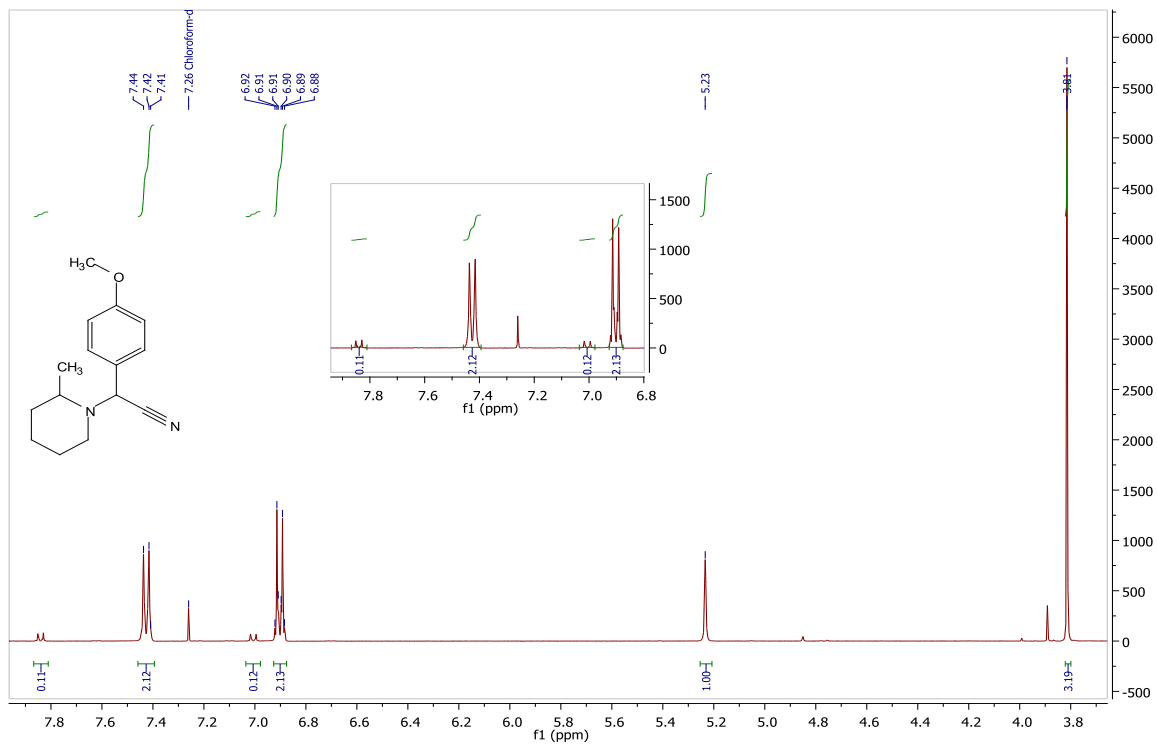
Anexo N Espectro ^{13}C -RMN para 2a.



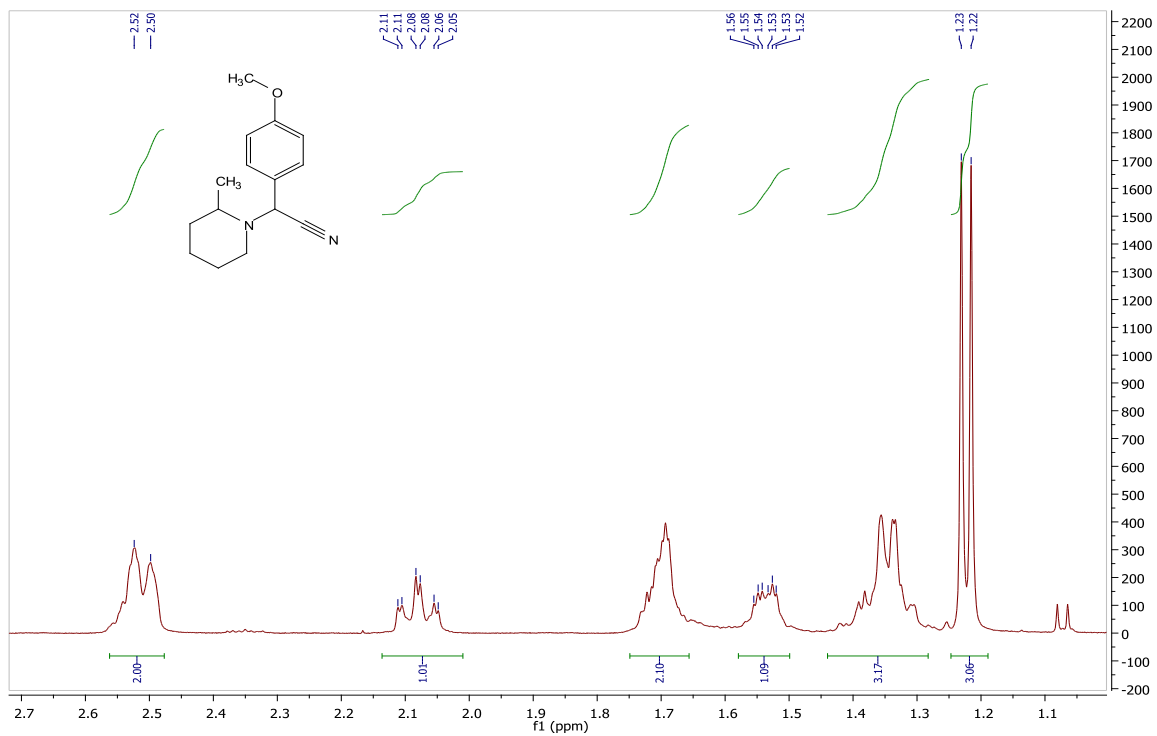
Anexo O Espectro DEPT-135 para 2a



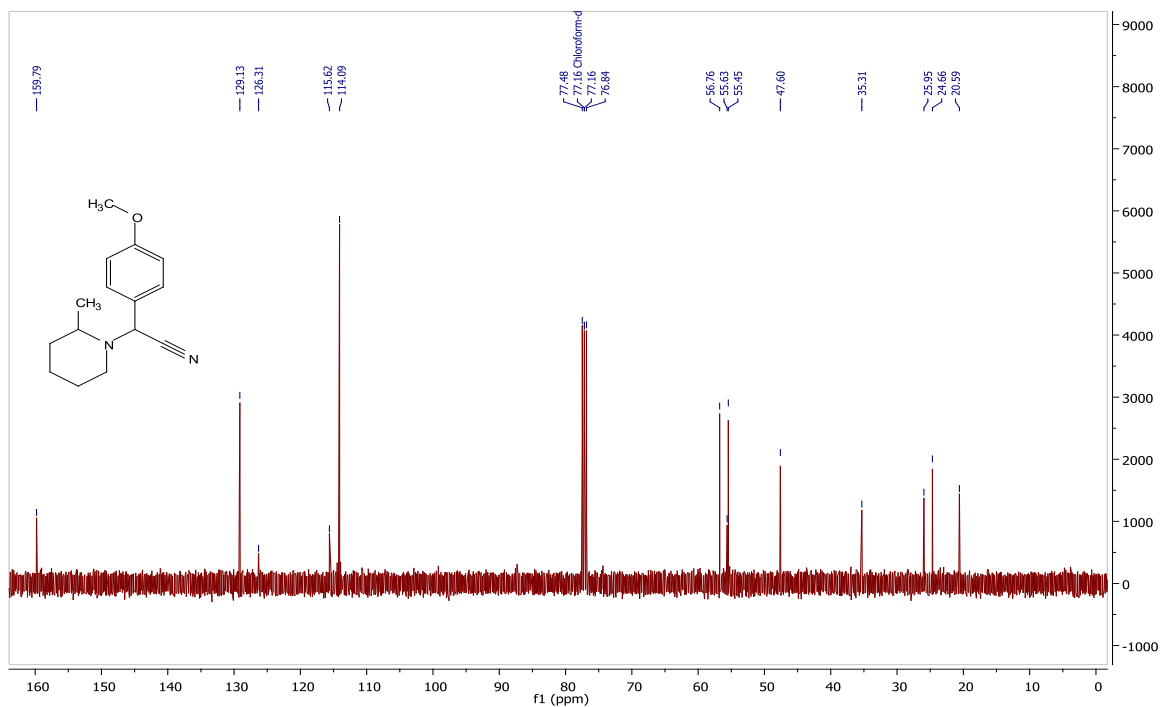
Anexo P Región aromática espectro $^1\text{H-RMN}$ para **2b**.



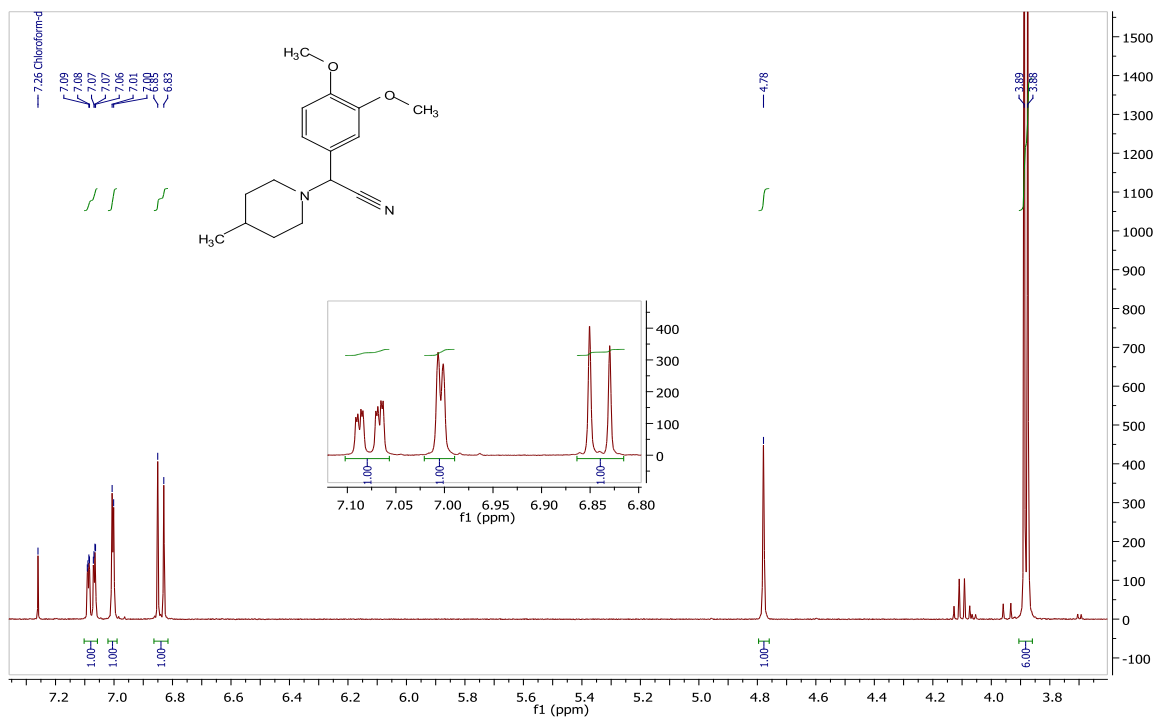
Anexo Q Región heterocíclica espectro $^1\text{H-RMN}$ para **2b**.



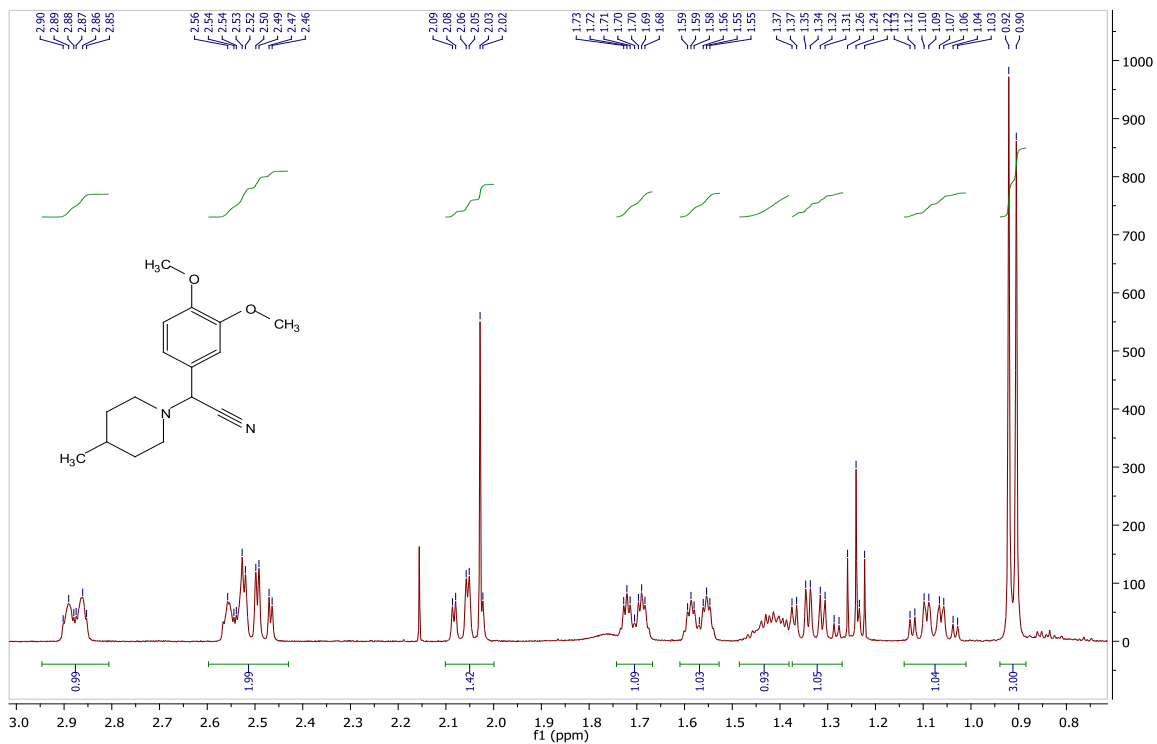
Anexo R Espectro ^{13}C -RMN para 2b.



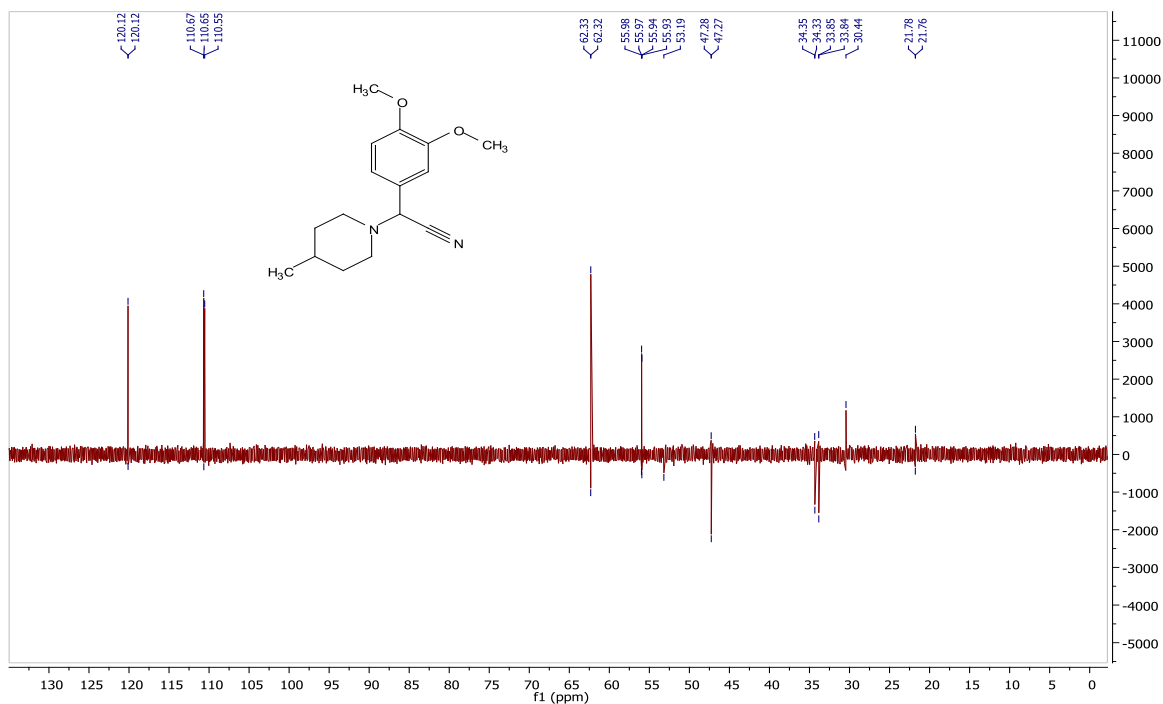
Anexo S Región aromática espectro ^1H -RMN para 3a



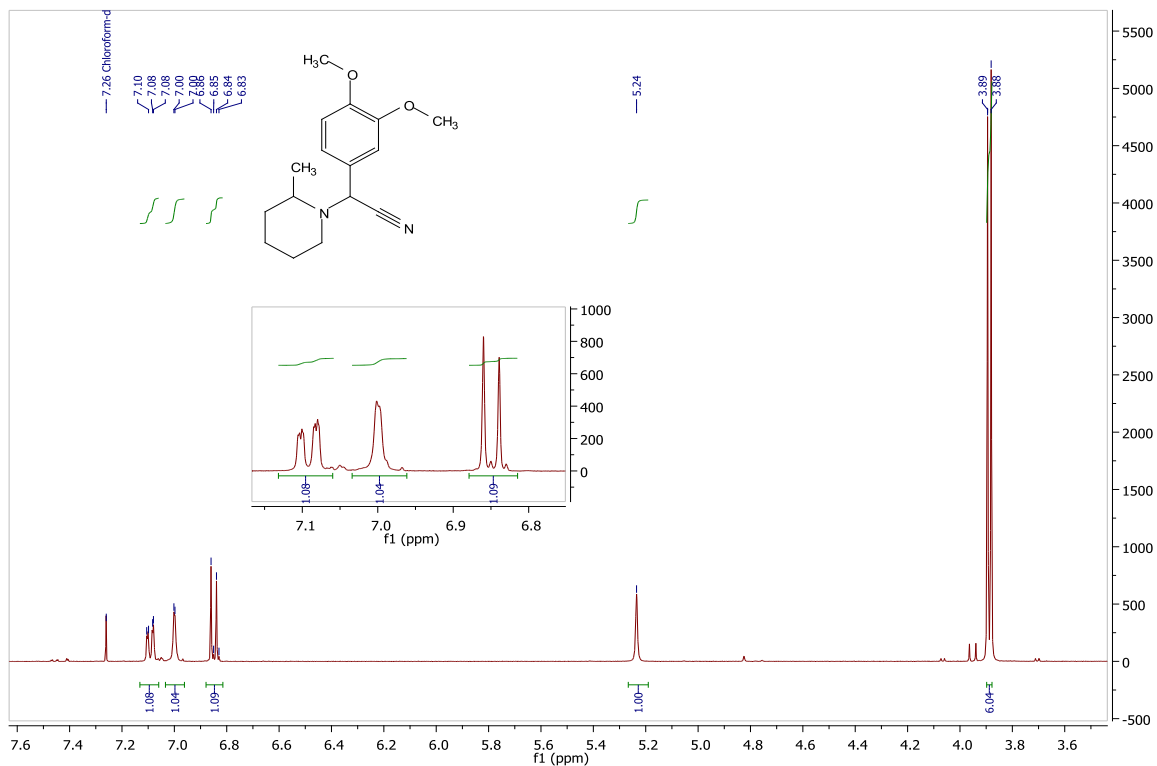
Anexo T Región heterocíclica espectro ¹H-RMN para 3a.



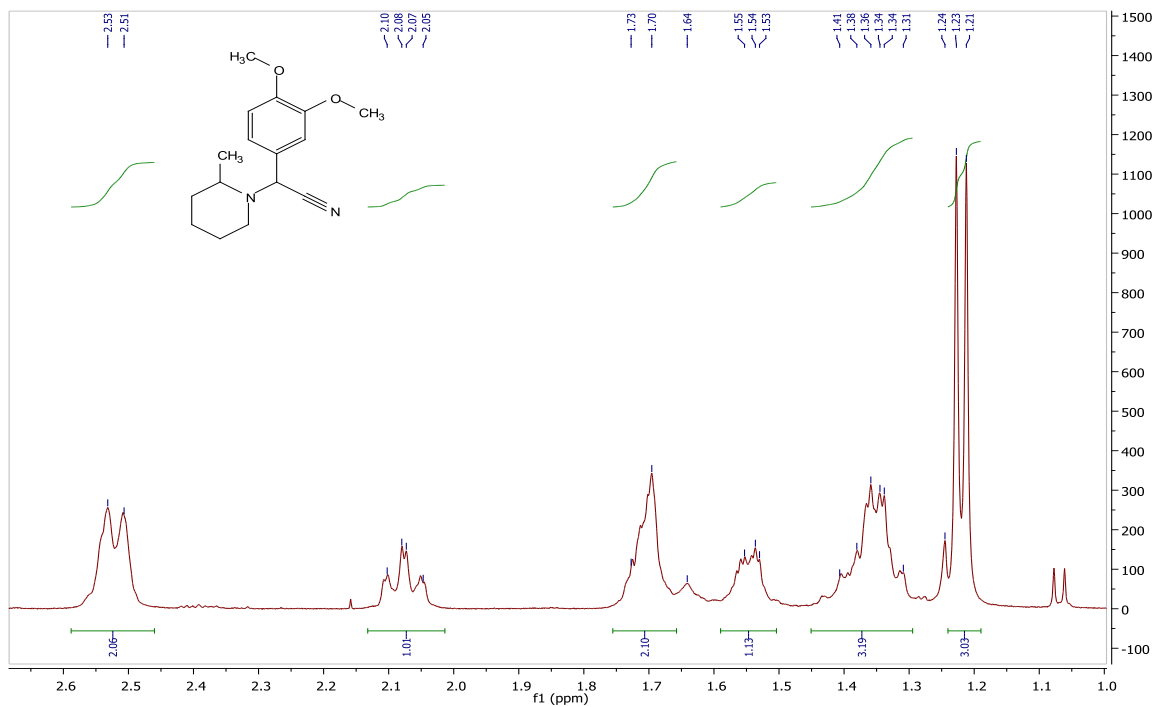
Anexo U Espectro ¹³C-RMN para 3a.



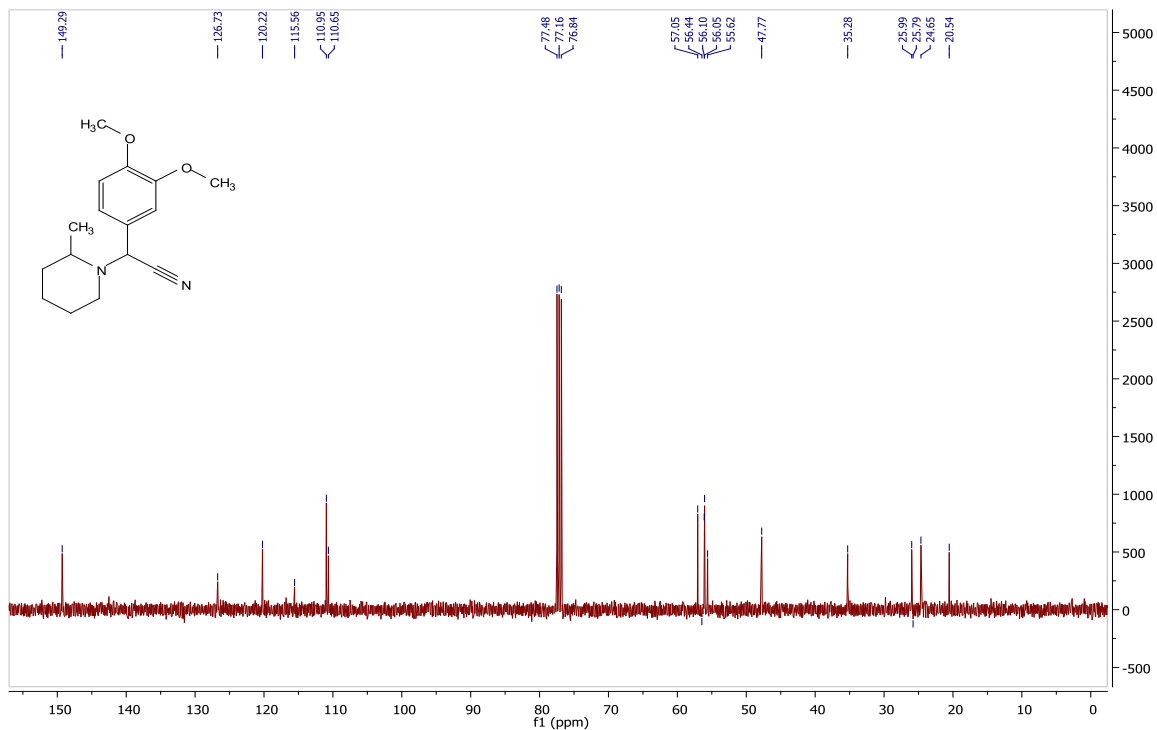
Anexo V Región aromática espectro $^1\text{H-RMN}$ para **3b**.



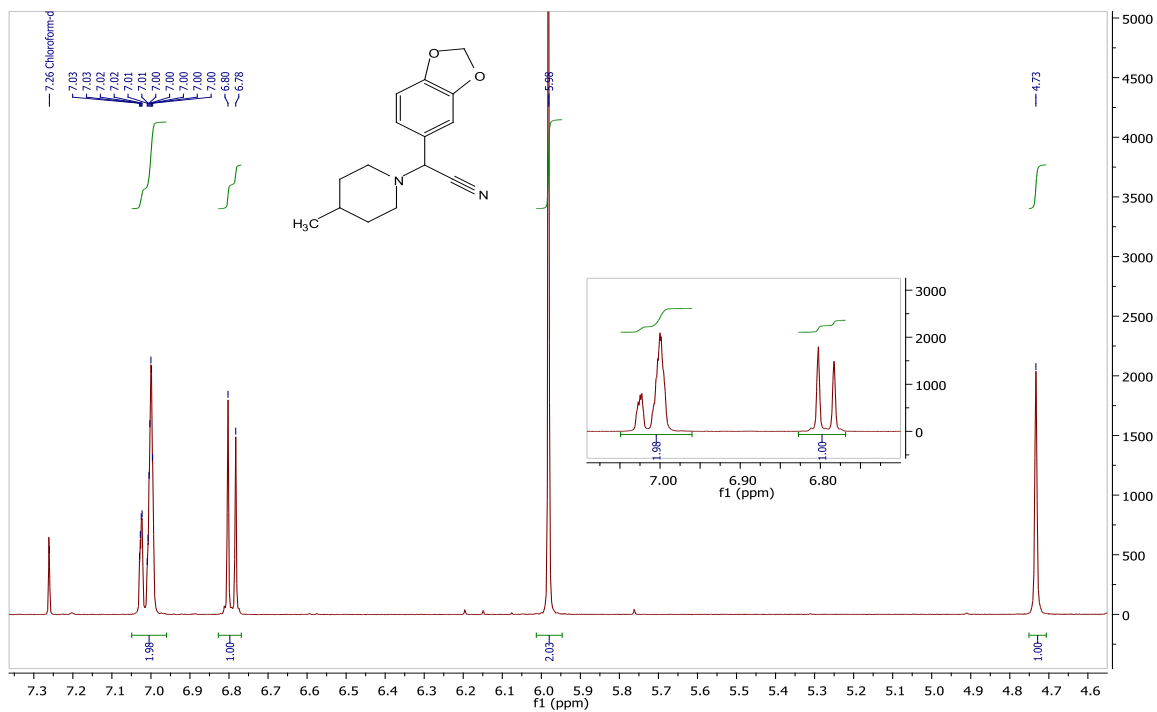
Anexo W Región heterocíclica espectro $^1\text{H-RMN}$ para **3b**.



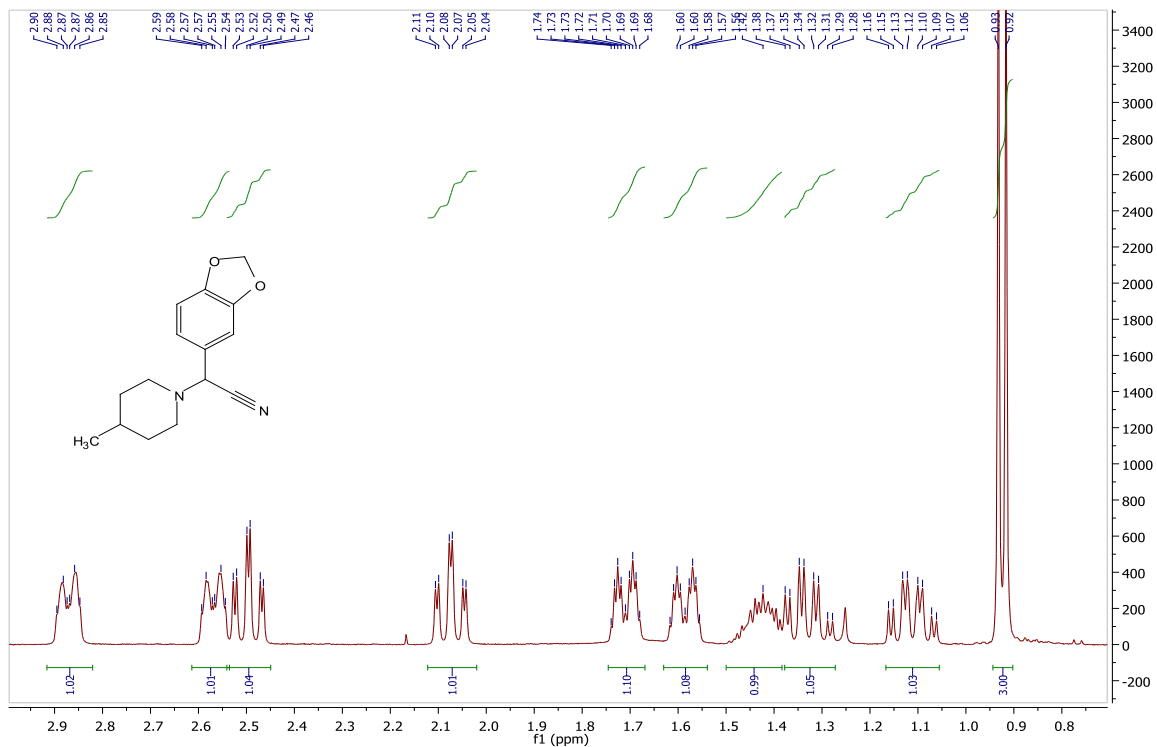
Anexo X Espectro ^{13}C -RMN para 3b.



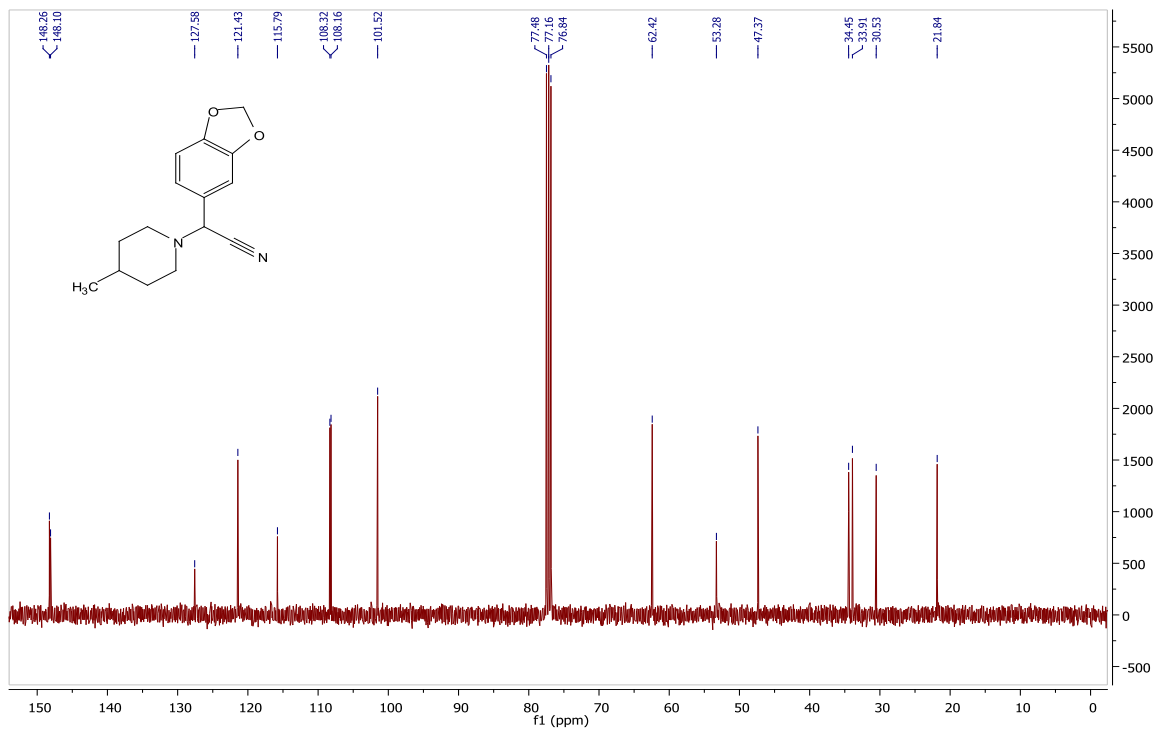
Anexo Y Región aromática espectro ^1H -RMN para 4a.



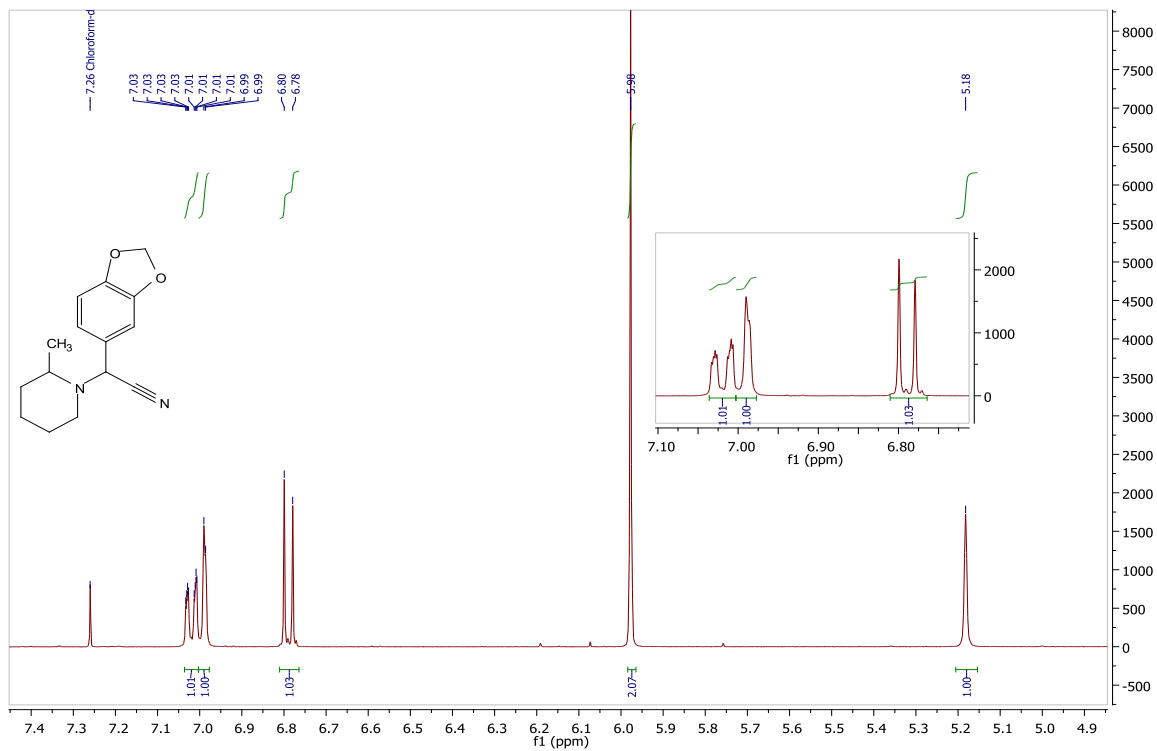
Anexo Z Región heterocíclica espectro ¹H-RMN para 4a.



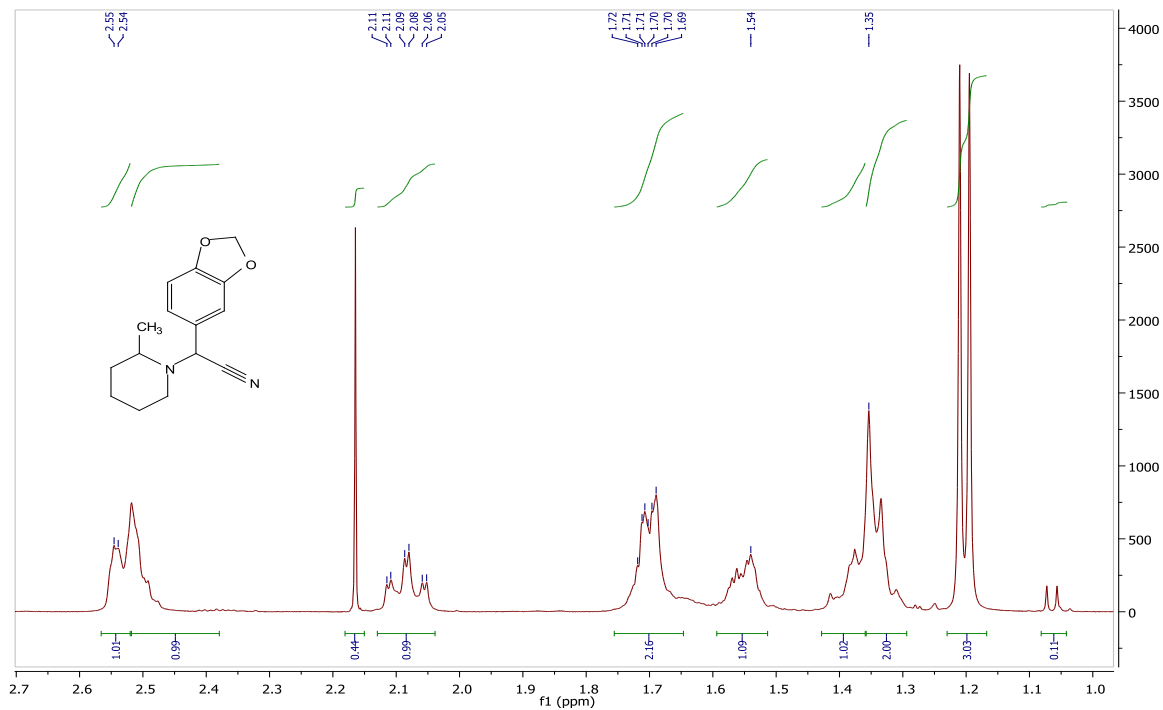
Anexo A1 Espectro ¹³C-RMN para 4a.



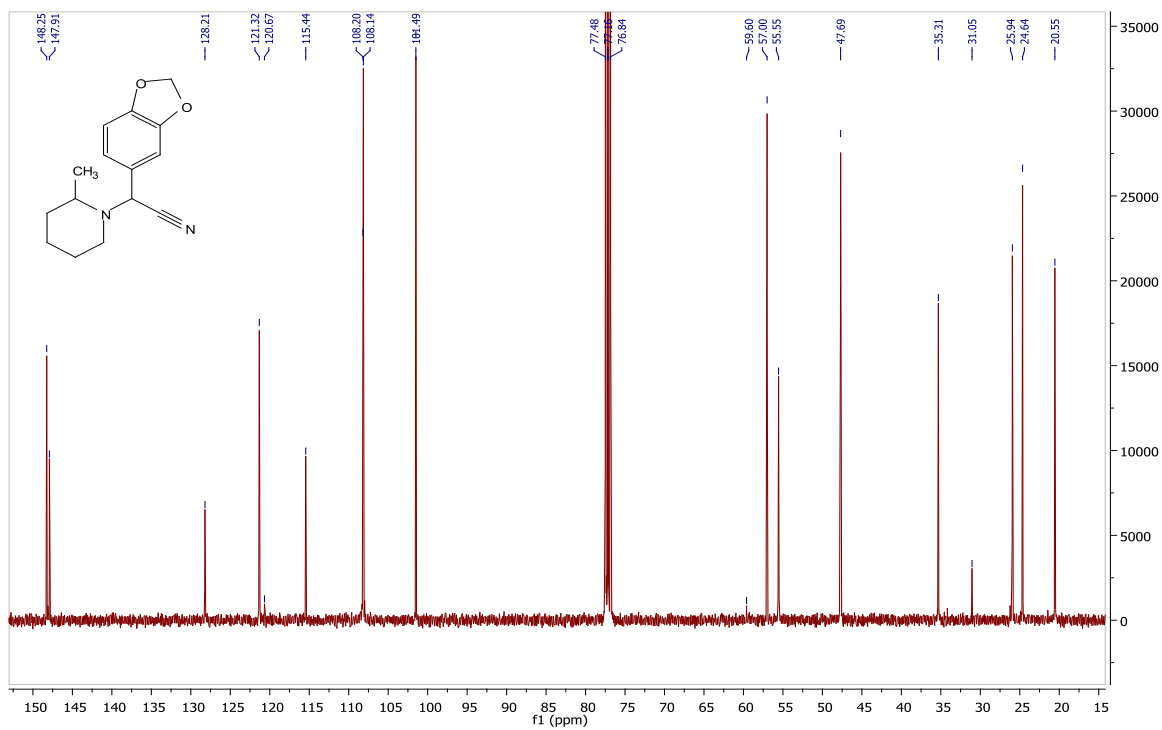
Anexo A2 Región aromática espectro ¹H-RMN para 4b.



Anexo A3 Región heterocíclica espectro ¹H-RMN para 4b.



Anexo A4 Espectro ^{13}C -RMN para 4b.



Anexo A5 Espectro DEPT-135 para 4b.

