DISEÑO Y SÍNTESIS DE α-AMINONITRILOS, ANÁLOGOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, COMO NUEVOS INSECTICIDAS: EVALUACIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN A NIVEL DE INHIBICIÓN DE LA AChE Y BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL SOBRE VECTORES DE DENGUE Y CHAGAS

AURORA LISETTE CARREÑO OTERO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE QUÍMICA DOCTORADO EN QUÍMICA BUCARAMANGA 2018

DISEÑO Y SÍNTESIS DE α-AMINONITRILOS, ANÁLOGOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, COMO NUEVOS INSECTICIDAS: EVALUACIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN A NIVEL DE INHIBICIÓN DE LA AChE Y BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL SOBRE VECTORES DE DENGUE Y CHAGAS

AURORA LISETTE CARREÑO OTERO, Qca. MSc.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL TÍTULO DE DOCTOR EN QUÍMICA

Director: VLADIMIR V. KOUZNETSOV Doctor en Química, *DSc.* Codirector: JONNY E. DUQUE L. Doctor en Entomología

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE QUÍMICA DOCTORADO EN QUÍMICA BUCARAMANGA 2018 "A pesar de tu fugaz exístencia dejaste una huella indisoluble que, en muchos sentidos y aspectos, me cambió. Por siempre aquí, hasta en el más recóndito lugar de mi ser."

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y hacer un reconocimiento a todas aquellas personas que contribuyeron para que fuera posible la realización de este trabajo de investigación:

En primer lugar, a Oscar Leonardo, por su amor, paciencia y comprensión durante este trabajo, por su apoyo y valentía. A toda mi familia especialmente a mami, por su amor abnegado, por su fuerza para afrontar tantas cosas, gracias por todo lo que soy y todo lo que no.

A mis directores de tesis, Doctores Vladimir V. Kouznetsov y Jonny Duque, por la confianza depositada en mi y por creer en mi trabajo, por su paciencia, comprensión y apoyo durante todo el proceso, donde aprendí que todo es posible si se trabaja con humildad y con disciplina.

A los profesores de la Universidad Industrial de Santander, Universidad Federal de Paraná, Universidad de los Andes y Universidad Católica de Chile y a los compañeros del CINTROP y del GIBIM involucrados en el desarrollo de este trabajo, por su dedicación, por permitirme desarrollar mis ideas, acompañarme y alentarme en cada paso.

A mis amigos, la familia que elegimos, a mis compañeros del CODEIM, por estar siempre en las buenas, en las malas y en las peores. A Karime Luna, Rosita, Arnold, Fausto, Camilo, Maito, Anita, Andrés y Alix por ser mis complices y mis mejores apoyos en los momentos mas difíciles.

Por la financiación de este trabajo a COLCIENCIAS a través de la Beca doctoral convocatoria 567 del 2012 y al Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, Francisco José de Caldas, proyecto codigo 110265740528 - convocatoria 624 del 2014 y a la Universidad Industrial de Santander.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
1. REACCIONES MULTICOMPONENTES COMO ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS	
PARA LA DIVERSIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS.	29
1.1. IMINAS EN LAS REACCIONES MULTICOMPONENTES (RMCS)	31
1.1.1. Comportamiento de las iminas como electrófilos.	34
1.1.2. Reacción de Mannich.	34
1.1.3. Naturaleza nucleofílica de las iminas en RMCs.	38
1.1.4. Iminas como azadienos en RMCs.	41
1.1.5. Iminas como dienófilos en RMCs.	44
1.2. REACCIÓN DE STRECKER: ANTECEDENTES	47
1.2.1. Fuentes de cianuro.	49
1.2.2. Catalizadores empleados.	51
1.3. REFERENCIAS	52
2. SÍNTESIS "ONE-POT" DE α -AMINONITRILOS SUSTITUIDOS, ANÁLOGOS A	۱L
ALCALOIDE NATURAL GIRGENSOHNINA, VÍA LA REACCIÓN DE STRECKER D	Е
TRES COMPONENTES.	59
2.1. RESUMEN	59
2.2. INTRODUCCIÓN	60
2.3. EXPERIMENTAL	63
2.3.1. Diseño racional: virtual screening y propiedades moleculares.	63
2.3.2. Consideraciones generales.	68
2.3.3. Obtención del precursor acetona cianhídrina.	70
2.3.4. Preparación del catalizador ácido soportado en gel de sílice SSA.	70
2.3.5. Procedimiento general para la síntesis de derivados α -aminonitrílicos.	71
2.3.6. Colección de datos de polvo de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetor	nitrilo
25.	94
2.3.7. Colección de datos de monocristal de 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-	-
(dimetilamino)fenil)acetonitrilo 64.	94
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
2.5. CONCLUSIONES	118

2.6. REFERENCIAS	119
3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO Y DOCKING MOLECULAR DE ANÁ	LOGOS
DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA COMO INHIBIDORES DE LA ENZIMA	
ACETILCOLINESTERASA ACHE.	126
3.1. RESUMEN	126
3.2. INTRODUCCIÓN	127
3.3. EXPERIMENTAL	132
3.3.1. Procedimiento general para la síntesis de derivados $lpha$ -aminonitrílicos.	132
3.3.2. Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.	134
3.3.3. Acoplamiento molecular.	135
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
3.5. CONCLUSIONES	155
3.6. REFERENCIAS	156
4. EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD IN VIVO E IN VITRO DE ANÁLOGOS DE LA	4
GIRGENSOHNINA FRENTE A DIFERENTES MODELOS ANIMALES.	161
4.1. RESUMEN	161
4.2. INTRODUCCIÓN	162
4.2.1. Aedes aegypti: vector transmisor del dengue, Zika y chikungunya.	163
4.2.2. Rhodnius prolixus: vector transmisor del mal de Chagas.	164
4.2.3. Estrategias para el control de vectores.	165
4.3. EXPERIMENTAL	169
4.3.1. Consideraciones generales: especie Aedes aegypti.	169
4.3.2. Consideraciones generales: especie Rhodnius prolixus.	170
4.3.3. Análogos del alcaloide girgensohnina empleados en los ensayos.	170
4.3.4. Evaluación insecticida in vivo sobre larvas de A. aegypti.	172
4.3.5. Actividad de las enzimas detoxificantes extraídas de larvas tratadas	172
4.3.6. Evaluación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.	177
4.3.7. Evaluación insecticida in vivo sobre ninfas de R. prolixus	180
4.3.8. Determinación de las CL50 de análogos de girgensohnina sobre embrione	s de
pez cebra.	182
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	183
4.4.1 Actividad de los análogos sobre larvas y LC_{50} .	183
4.4.2. Actividad de las enzimas detoxificantes extraídas de larvas tratadas	185

4.4.3. Evaluación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	196
4.4.4. Evaluación insecticida in vivo sobre ninfas de R. prolixus	206
4.4.5. Determinación de las CL_{50} de análogos de girgensohnina sobre embr	iones de
pez cebra.	212
4.5. CONCLUSIONES	214
4.6. REFERENCIAS	215
5. CONCLUSIÓN	226
5.1. CONCLUSIÓN GENERAL	226
5.2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	226
BIBLIOGRAFÍA	229

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos calculados para la girgensohnina 1 y los aminonitrilos	
propuestos 2-71.	64
Tabla 2. Características fisicoquímicas de la girgensohnina 1 y sus análogos 2-71.	99
Tabla 3. Parámetros obtenidos por DRX de polvo para el compuesto 25 .	114
Tabla 4. Parámetros y refinamiento para el α -aminonitrilo 64 .	115
Tabla 5. Parámetros geométricos para las interacciones intermoleculares de 64.	116
Tabla 6. Características de los compuestos 72 - 84 .	136
Tabla 7. Valores IC ₅₀ encontrados para los compuestos 1 - 84 .	138
Tabla 8. Energías de acoplamiento encontrados para los análogos evaluados.	145
Tabla 9. Análogos seleccionados para las evaluaciones biológicas.	171
Tabla 10. Componentes mayoritarios de <i>Cymbopogon flexuosus</i> CFEO.	173
Tabla 11. Valores de LC ₅₀ de los análogos evaluados.	183
Tabla 12. Cuantificación de la actividad enzimática de AChE, MFO y GST en la cepa	
Rock.	186
Tabla 13. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas en la cepa Rock.	186
Tabla 14. Cuantificación de la actividad enzimática de AChE, MFO y GST en la cepa	
WSant.	187
Tabla 15. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas en la cepa WSan	t.187
Tabla 16. Porcentajes de inhibición de la AChE en homogenizado de larvas y adultos.	192
Tabla 17. Efecto de los compuestos 7, 10, 13 y 16 sobre la cadena de transporte de	
electrones mitocondrial.	198
Tabla 18. Mortalidad causada por las moléculas evaluadas en ninfas NI.	208
Tabla 19. LD ₅₀ para el compuesto 11 y los controles empleados en el ensayo.	209
Tabla 20. LC_{50} mg/L de los análogos evaluados sobre embriones de pez cebra.	212
Tabla 21. Cambios observables en los embriones a 96 hpf.	214

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Reactividad de las iminas.	32
Figura 2. Productos farmacéuticos que contienen fragmentos a-aminonitrilicos.	47
Figura 3. Ejemplos de moléculas bioactivas naturales y sintéticas.	95
Figura 4. $lpha$ -Aminonitrilos inspirados por un alcaloide natural.	96
Figura 5. Espectro infrarrojo del compuesto 4 .	104
Figura 6. Espectros de masas y posibles fragmentaciones para 37 , 40 y 45 .	105
Figura 7. lones característicos ESI-EM para los compuestos 2 , 10 y 31 .	106
Figura 8. Espectros de RMN ¹ H de los compuestos 19 y 38 .	107
Figura 9. Espectros de RMN ¹ H de los compuestos 52 y 61 .	108
Figura 10. Espectro de RMN 1H del compuesto 68 .	109
Figura 11. Representación de los posibles acoplamientos para las 4-metilpiperidinas.	110
Figura 12. Representación de los posibles acoplamientos para las 4-metilpiperidinas.	111
Figura 13. Espectro ¹ H- ¹³ C HSQC del compuesto 4 .	112
Figura 14. Espectro RMN-13C y DEPT-135 para el compuesto 10 .	113
Figura 15. Patrón de difracción de rayos X en polvo de 25 .	114
Figura 16. Estructura molecular de 64 y su asignación obtenida (50% de probabilidad	de
elipsoides).	116
Figura 17. Interacciones C-H…N formando dímeros del compuesto 64 .	117
Figura 18. Interacciones C-H··· π produciendo cintas en zig-zag del compuesto 64.	118
Figura 19. Empaquetamiento del compuesto 64 a lo largo del eje b.	118
Figura 20. Sitio activo de la AChE.	128
Figura 21. Disposición del donepecilo en el sitio activo de la AChE.	131
Figura 22. Identificación de motivos estructurales en los sistemas evaluados.	136
Figura 23. Análogo con el mayor valor de inhibición encontrado.	142
Figura 24. Superposición de estructuras de la cadena A y sitio activo de la AChE:	
Electrophorus electricus EeAChE (1C2O naranja), Homo sapiens (1B41 púrpura), M	us
musculus (1KU6 verde), Bungarus fasciatus (4QWW rojo); Tetronarce californica (1E	A5
azul) y <i>Anopheles gambiae</i> (5X61 cian).	143
Figura 25. Procesamiento estructural del análogo 11 .	144

Figura 26. Modos de unión del donepecilo y la galantamina en la AChE.	147
Figura 27. Comparación de residuos que participan en las interacciones con modos de	Э
unión similares a A. donepecilo y B. galantamina.	148
Figura 28. Interacciones del compuesto 55 en el sitio activo.	149
Figura 29. Interacciones en el sitio activo de análogos con su fragmento	
tetrahidroquinolínico orientado hacia A. la profundidad de la cavidad y B. hacia el PAS	del
sitio activo (observado solo para los enantiómeros del compuesto 28).	150
Figura 30. Energías de acoplamiento e interacciones encontradas para los enantiómen	ros
del compuesto 27.	151
Figura 31. Interacciones de los diferentes diasteroisómeros (RS, SR y RR) del compue	esto
46.	152
Figura 32. Distancias de interacción de los compuestos 2 (Ala204 a 1.80 Å) y 7 (Ser12	25 a
2.05 Å).	153
Figura 33. Interacciones del compuesto 73 en el sitio activo de la AChE.	154
Figura 34. Interacción del compuesto A. 11 con Ser125 no observada en B. 79.	154
Figura 35. Interacciones de los enantiómeros del compuesto 60: A. isómero R y B.	
isómero S.	155
Figura 36. Agentes agroquímicos empleados contra insectos vectores.	167
Figura 37. Porcentaje de inhibición de la AChE de larvas Rock (A) y WSant (B) tratada	IS.
	188
Figura 38 Perfil de actividad de MFO de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.	188
Figura 39. Perfil de actividad de GST de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.	189
Figura 40. Perfil de actividad de p-NPA esterasas de larvas Rock (A) y WSant (B)	
tratadas.	189
Figura 41. Perfil de actividad de α -esterasas de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.	190
Figura 42. Perfil de actividad de β -esterasas de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.	190
Figura 43. Efecto de los análogos evaluados en la formación del radical superóxido.	200
Figura 44. Actividad de la enzima catalasa.	201
Figura 45. Actividad de la enzima glutationa peroxidasa.	202
Figura 46. Actividad de la glutationa reductasa.	203
Figura 47. Evaluación tópica sobre terguitos.	207

Figura 48. A. Evaluación tópica sobre esternitos. B. Evaluación sobre superficies tratadas.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacciones multicomponentes más reconocidas	30
Esquema 2. Reacciones multicomponentes de Strecker y Ugi.	31
Esquema 3. Reactividad reversible observada en las iminas.	33
Esquema 4. Reactividad de las iminas frente al malononitrilo.	33
Esquema 5. Ataque nucleófilo a sistemas carbonilos e iminas.	34
Esquema 6. Síntesis de 1,3-diaril-5-espirohexahidropirimidinas vía condensación one-	pot.
	35
Esquema 7. Reacción de tres componentes nitro-Mannich/lactamización.	36
Esquema 8. Síntesis de imidazo [1,2- <i>a</i>]piridinas vía RMC.	36
Esquema 9. Síntesis de derivados 1-H-5-arilbenzo[f]pirano[3,4-c]quinolínicos.	37
Esquema 10. Condensación one-pot de tres componentes bajo condiciones libres de	
catalizador.	38
Esquema 11. Nucleofilicidad de las iminas.	38
Esquema 12. Síntesis de derivados del pirrol.	39
Esquema 13. Síntesis de derivados del imidazol.	39
Esquema 14. Preparación de propargilaminas empleando Cul como catalizador.	40
Esquema 15. Síntesis de pirroles vía reacción de Wittig intramolecular.	40
Esquema 16. Obtención de estructuras poliheterocíclicas	41
Esquema 17. Cicloadición [4+2] de iminas y alquenos.	41
Esquema 18. Empleo de norbornenos como dienófilos en la reacción de Povarov.	42
Esquema 19. Cicloadición [4+2] empleando InCl3 o Sc(OTf)3 como catalizador.	43
Esquema 20. Generación de N-aril lactamas vía reacción de Povarov.	43
Esquema 21. Síntesis de sistemas 1,4-dihidropiridinicos usando CAN como catalizado	r. 44
Esquema 22. Reacción aza Diels-Alder con generación de aldiminas in situ.	45
Esquema 23. Obtención de derivados de la dihidropiridin-4-ona usando sales de In ³⁺ c	omo
catalizador.	45
Esquema 24. Síntesis de sistemas piperidínicos funcionalizados.	46
Esquema 25. Mecanismo propuesto para la generación de los sistemas piperidínicos.	46
Esquema 26. Generación de $lpha$ -aminonitrilos vía reacción de Strecker.	47
Esquema 27. Obtención de α -aminonitrilos vía reacción de Strecker oxidativa	48

Esquema 28. Ruta sintética de la reacción de Strecker empleando TMSCN.	50
Esquema 29. Generación de α -aminonitrilos vía generación aldiminas.	51
Esquema 30. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.	71
Esquema 31. Mecanismo de reacción propuesto.	98
Esquema 32. Mecanismo simplificado de la degradación de la acetilcolina en el	sitio activo
de la AChE.	129
Esquema 33. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.	132
Esquema 34. Obtención de los compuestos 72 - 78 bajo condiciones verdes.	133
Esquema 35. Obtención de los compuestos 79 - 84 vía aminación reductiva.	133
Esquema 36. Generación del anión TNB.	137
Esquema 37. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.	171

ESPECIFICACIONES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO:

Diseño y síntesis de α -aminonitrilos, análogos del alcaloide girgensohnina, como nuevos insecticidas: Evaluación de su mecanismo de acción a nivel de inhibición de la AChE y bioenergética mitocondrial sobre vectores de Dengue y Chagas

AUTOR:

Aurora Lisette Carreño Otero, Qca., MSc.

DIRECCIÓN DEL PROYECTO:

Director: Prof. Vladimir V. Kouznetsov, PhD., DSc.

Co-director: Prof. Jonny Edward Duque PhD.

ENTIDADES FINANCIADORAS:

Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, *LQOBio*, Universidad Industrial de Santander *UIS* y Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación *COLCIENCIAS* a través del programa de Apoyo a Doctorados Nacionales Convocatoria 567-2012 y a través de la Convocatoria 657-2014 para Proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud.

PRODUCTOS:

- Artículos completos publicados en revistas internacionales:

1. Andrés G. Rueda, Aurora L. Carreño Otero, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov "Synthesis of new α -amino nitriles with insecticidal action on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)" Rev. Brasil. Entomol. 62 (2018) 112–118.

2. Aurora L. Carreño Otero, Angela Maria Palacio-Cortes, Mario Antonio Navarro-Silva, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny Edward Duque Luna "Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girgensohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil" Comparative Biochemistry and Physiology. Part C-Toxicology 204 (2018) 14 - 25.

3. Mayra A. Borrero Landazabal, Aurora L. Carreño Otero, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque Luna, Stelia C. Mendez-Sanchez "Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α-aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae" Pesticide Biochemistry and Physiology 144 (2018) 64-70.

4. Aurora L. Carreño Otero, Jose Hernando Quintana Mendoza, Jose Antonio Henao Martinez, Vladimir V. Kouznetsov, José Miguel Delgado, Graciela Díaz de Delgado "Structure determination of 2-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1h)-yl)-2-[4- (dimethylamino)phenyl]acetonitrile, an α -amino nitrile obtained by a modified Strecker reaction" Journal Of Chemical Crystallography 48 (2017) 1-7.

 Jose Hernando Quintana Mendoza, Jose Antonio Henao Martinez, Aurora L. Carreño Otero, Vladimir V. Kouznetsov "Synthesis and X-ray diffraction data of 2morpholino-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acetonitrile, (C₁₅H₂₀N₂O₄)". Powder Diffraction 2 (2016) 149-152.

 Aurora L. Carreño Otero, Leonor Y. Vargas Mendez, Jonny E. Duque L., Vladimir
 V. Kouznetsov "Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girgensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever".
 European Journal of Medicinal Chemistry 78 (2014) 392-400.

- Artículo completo publicado en revista nacionales:

1. Edwin R. Escobar, Aurora L. Carreño Otero, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque, "Toxicidad y afectación en la locomoción de Triatoma dimidiata (Latreille 1811) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) tratados con análogos de

girgensohnina". *Revista Salud UIS* 50 (2018) 205-213. DOI: 0.18273/revsal.v50n3-2018005.

2. Juliana Cuadros, Aurora L. Carreño Otero, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov, "Insecticidal action of synthetic girgensohnine analogs and essential oils on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)". *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud* 37 (2017) 50-58. DOI: 10.7705/biomedica.v37i0.3379.

- Trabajos presentados en eventos científicos internacionales:

1. "Síntesis, evaluación biológica *in vitro* sobre AChE y estudios de docking molecular de nuevos α-aminonitrílicos análogos del alcaloide girgensohnina". En: XXI Simposio Nacional de Química Orgánica (2017). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. (Poster).

2. "Design and synthesis of new nicotine and girgensohnine analogs based on the α -aminonitrile backbone and their biological evaluation on *Aedes aegypti* mosquitoes" En: 46th World Chemistry Congress, 40a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly (2017). Sao Pablo, Brazil. (Ponencia oral).

3. "Structure determination of new alkaloid-like α -aminonitrile compound obtained by the Strecker reaction" En: 46th World Chemistry Congress, 40a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly (2017). Sao Pablo, Brazil. (Poster).

4. "Susceptibility of natural and synthetic molecules, capable of inhibiting the enzyme acetylcholinesterase in vitro, on enzymes involved in insecticide mechanism". En:
82nd Annual Meeting of American Mosquito Control Association AMCA (2016).
Savannah, Georgia, USA. (Ponencia oral).

5. "Design and synthesis of new α -aminonitriles via Strecker reaction. Search of molecules with insecticide action and its effect on the mosquito *Stegomyia aegypti*, the vector of dengue disease and Chikungunya". En: 81st annual meeting of American Mosquito Control Association AMCA (2015). New Orleans, Louisiana, USA. (Ponencia Oral).

- Trabajos presentados en eventos científicos nacionales:

1. "Estudio de las interacciones receptor - ligando de análogos de girgensohnina sobre AChE Mediante Acoplamiento Molecular". En: XVII Congreso Colombiano de Química (2017). Bucaramanga, Santander.

2."Acción de moléculas sintéticas y naturales sobre sistemas enzimáticos en larvas de *Aedes aegypti*". En: 43º Congreso Sociedad Colombiana de Entomología - SOCOLEN (2016). Manizales, Colombia.

3. "Efecto insecticida de análogos sintéticos de girgensohnina y aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre *Rhodnius prolixus* (S.) (Hemiptera: Reduviidae)". En: I Congreso Nacional de Ciencias Biologicas (2015). Bucaramanga, Colombia.

4. "Obtención de nuevos α-aminonitrilos vía reacción de Strecker: Búsqueda de moléculas con acción insecticida e inhibición de la AChE en *Aedes aegypti*". En: 42 del Congreso De La Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN (2015). Medellin, Colombia.

5."Efecto insecticida de análogos sintéticos de girgensohnina y aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre *Rhodnius prolixus* S. (Hemiptera:Reduviidae)". En: 42 del Congreso De La Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN (2015). Medellin, Colombia.

6."α-Aminonitrilos, análogos de girgensohnina como potenciales inhibidores de la AChE: su actividad enzimática *in vitro* y actividad larvicida sobre *Aedes aegypti*".

En: Primer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2 (2014). Bogota, Colombia.

7."Evaluación de la actividad insecticida del aceite esencial *Cymbopogon Flexuosus* y analogos sinteticos del alcaloide Girgensohnina en ninfas de I y V estadio de *Rhodnius prolixus*". En: 1er Simposio Internacional en Biotecnología y Agroindustria (2014). Bucaramanga, Colombia.

8. "Análogos sintéticos de girgensohnina y aceite esencial *Cymbopogon flexuosus* como nuevos insecticidas sobre *Rhodnius prolixus* S. (Hemipera: Reduviidae)". En:
41 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (2014). Cali, Colombia.

ORIENTACIONES CONCLUIDAS:

1. Evaluación de la actividad insecticida e inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de 24 análogos sintéticos del alcaloide girgensohnina en huevos y ninfas de i (ni) y v (nv) estadío de *Rhodnius prolixus* 1859 (Hemíptera: Reduviidae: triatominae). Universidad Industrial de Santander - UIS. Estado: Tesis pregrado concluida, Biología (2016-2017). Persona orientada: Juan Pablo Pabón González, Dirigió como: Tutora.

2. Estudio del mecanismo de acción de alcaloides análogos a la girgensohnina sobre el metabolismo energético mitocondrial de larvas de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). Universidad Industrial de Santander - UIS. Estado: Tesis pregrado concluida, Química (2014-2016). Persona orientada: Mayra Alejandra Borrero Landazábal, Dirigió como: Codirectora.

3. Diseño y síntesis de nuevos α-amino nitrilos 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. Universidad Industrial de Santander
UIS. Estado: Tesis de pregrado concluida, Química (2013-2015). Persona orientada: Andrés Gilberto Rueda Jaimes, Dirigió como: Codirectora.

ESTANCIAS:

- Internacionales

1. Universidade Federal do Paraná, en el Laboratorio de Entomología Médica e Ecotoxicologia dirigido por el Dr. Mário Antonio Navarro da Silva. Junio - Julio de 2015. "Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girgensohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil". Curitiba-Brazil.

2. Pontificia Universidad Católica de Chile, en el laboratorio de Laboratorio de Diseño y Síntesis del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, dirigido por la Dra. Flavia Zacconi. Febrero - Agosto de 2017. "Análisis computacional, diseño de librería virtual, interacción ligando-proteína y Docking molecular". Santiago de Chile-Chile.

- Nacional

1. Universidad de los Andes, Laboratorio de Neurociencias y Ritmos Circadianos dirigido por la Dra. Verónica Akle. Diciembre de 2016- Enero de 2017. "Evaluación de análogos de girgensohnina sobre embriones de pez cebra *Danio rerio*." Bogotá-Colombia.

RESUMEN

TÍTULO: Diseño y síntesis de α -aminonitrilos, análogos del alcaloide girgensohnina, como nuevos insecticidas: Evaluación de su mecanismo de acción a nivel inhibición de la AChE y bioenergética mitocondrial sobre vectores de Dengue y Chagas[†]

AUTOR: CARREÑO OTERO, Aurora Lisette.[‡]

PALABRAS CLAVES: Reacción de Strecker, catalizador SSA, girgensohnina, αaminonitrilos, insectos vectores, enzimas detoxificantes, enzima acetilcolinesterasa, actividad insecticida, evaluación enzimática, modelos de evaluación *in vivo*.

A través de los años, la química orgánica se ha establecido como una poderosa ciencia experimental al brindar la posibilidad de acceder a un amplio número de sustancias de origen sintético y natural, las cuales han encontrado una amplia variedad de aplicaciones a nivel farmacéutico, biológico, bioquímico, industrial y agrícola, entre otras. Realizando una variación sobre la metodología reportada por Vargas y Kouznetsov, se usó el alcaloide girgensohnina como modelo natural en el diseño y generación de nuevas series de α -aminonitrilos mediante el uso de la reacción de Strecker catalizada por SSA entre benzaldehídos sustituidos, heterociclos nitrogenados y fuentes de cianuro.

Los resultados de inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* y los de actividad insecticida *in vivo* determinados para las moléculas sintetizadas, llevaron a proponer a los sistemas generados como tácticas viables para abordar los problemas socio-económicos de salud pública como son el control de vectores. Se realizaron ensayos biológicos para evaluar su acción sobre diferentes estadios del mosquito *A. aegypti* y sobre los instares ninfales I y V de triatominos de *R. prolixus* encontrando valores de CL₅₀ inferiores a 100 mg L⁻¹. Para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos sobre los vectores previamente citados, se evaluó la bioenergética mitocondrial en larvas y la actividad de las enzimas detoxificantes modificando la metodología existente para mosquitos adultos.

En conclusión, las condiciones de química verde, la simplicidad y la eficacia del procedimiento sintético empleado para la generación de los α -aminonitrilos no solo permitieron su preparación a gran escala sino su evaluación tanto *in vivo* e *in vitro* sobre diferentes modelos de insectos contribuyendo con el estudio y elucidación de su mecanismo de acción.

[†] Tesis Doctoral

[‡] Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Kouznetsov, V. V.

ABSTRACT

TITLE: Design and synthesis of α -aminonitriles, girgensohnine alkaloid analogs, as new insecticides: Evaluation of its mechanism of action as AChE inhibitor and its behavior on the mitochondrial bioenergetics on dengue and Chagas vectors.³

AUTHOR: CARREÑO OTERO, Aurora Lisette.⁴

KEYWORDS: Strecker reaction, SSA catalyst, girgensohnine, α -aminonitriles, vectors, detoxification enzymes, acetylcholinesterase enzyme, insecticidal activity, enzymatic evaluation, *in vivo* evaluation models.

Over the years, organic chemistry has established itself as a powerful experimental science providing the possibility of accessing a large number of substances of synthetic and natural origin, which have found a wide variety of applications at the pharmaceutical, biological, biochemical, industrial and agricultural, among others.

Girgensohnine alkaloid was used as a natural model in the design and generation of new series of α -aminonitriles. Using a variation on the Strecker methodology reported by Vargas and Kouznetsov, a catalyzed by SSA between substituted benzaldehydes, nitrogen heterocycles and cyanide sources was used for the generation of the molecules of interest.

Inhibition results on *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase AChE and *in vivo* insecticidal activity determined for the synthesized molecules, led to propose these new generated systems as viable tactics to address socio-economic problems of public health such as vector control. Biological tests were conducted to evaluate its action on different stages of the *A. aegypti* mosquito and on the nymphic instars I and V of *R. prolixus* triatomines finding LC₅₀ values lower than 100 mg L⁻¹. For determination of the mechanism of action of these compounds on the previously mentioned vectors, mitochondrial bioenergetics on larvae and the activity of detoxifying enzymes were evaluated modifying the existing methodologies for adult mosquitoes.

In conclusion, the green chemistry conditions, the simplicity and the efficiency of the synthetic procedure used for the generation of the α -aminonitriles not only allowed its preparation on a large scale but its evaluation both *in vivo* and *in vitro* on different models of insects and enzymes contributing to the study and elucidation of its mechanism of action.

³ Research Work

⁴ Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Research advisor: Kouznetsov, V.V.

INTRODUCCIÓN

Previo al siglo XIX, la química se enfocaba en el estudio y aislamiento de sustancias naturales encontradas principalmente en las plantas, con las que se buscaba dar tratamiento a dolencias siendo esta la única fuente de medicación. Un avance significativo se logró después de que en 1828 Friedrich Wöhler sintetizara la urea, demostrando que era posible la obtención, en el laboratorio, de productos encontrados en los organismos vivos. Este hecho impulso la síntesis de diferentes compuestos orgánicos incluso aquellos que no se encontraban de forma natural y aun así presentaban alguna actividad biológica.

Apoyada en el desarrollo de técnicas para la caracterización estructural de estas nuevas moléculas y protocolos para su evaluación biológica, la síntesis orgánica se convirtió en una de las herramientas más destacadas y la base del desarrollo y progreso de la humanidad. Con aportes significativos que van desde medicinas para el tratamiento o prevención de enfermedades, agroquímicos para la protección de cultivos y el suministro de alimentos, hasta materiales y fibras sintéticas para dar abrigo y refugio, no es una sorpresa entonces que la expectativa de vida ascendiera de los 30 años a mediados del siglo XIX hasta cerca de los 70 años para finales del siglo XX.

Es así que la química orgánica sintética se ha centrado desde siempre no solo en el descubrimiento de los beneficios de los productos naturales, sino también en el desarrollo de nuevas técnicas y métodos que permiten la síntesis de productos bioactivos. La escasa presencia de estos productos de forma natural en la corteza, hojas, frutos y semillas de las plantas mantiene a todo químico orgánico en la búsqueda de nuevas metodologías que permitan replicar lo que la naturaleza produce de forma magnífica. De esta manera se observó una aceleración en el desarrollo de la química medicinal ya que la síntesis orgánica generaba los conocimientos en torno a los métodos de construcción de entidades químicas con propiedades privilegiadas, mientras que la bioquímica ofrecía información en torno

al funcionamiento de los sistemas biológicos y su respuesta frente a las moléculas generadas. Este avance mancomunado permitió generar librerías moleculares determinando los derivados o familias de productos que podían ser explotados y a su vez podrían ser utilizados como moléculas cabezas de serie para su aplicación en diferentes campos como en las ciencias biomédicas.

Este estudio particular y la determinación de las sustancias naturales responsables de las actividades biológicas observadas llevaron a determinar que muchas de ellas se presentaban como sistemas heterocíclicos nitrogenados denominados alcaloides. Aunque son un grupo muy diverso de estructuras moleculares, estos metabolitos secundarios se derivan generalmente de los aminoácidos L-lisina, L-ornitina, L-tirosina, L-triptófano, L-histidina, L-fenilalanina, de los ácidos nicotínico y antranílico, del acetato o por procesos de transaminación a partir de las vías de acetato, shikimato y mevalonato. Su estudio permitió reconocer que alcaloides similares pueden tener no solo rutas biosintéticas bastante diferentes sino también variadas e intensas acciones fisiológicas.

La determinación del rol de un alcaloide en la planta que lo genera le permite a la química sintética no solo determinar su estructura sino desarrollar metodologías que permitan su obtención en mayores cantidades a las encontradas de forma natural. Determinar o generar protocolos para lograr su síntesis supone grandes beneficios, principalmente permite también la generación de nuevos sistemas con modificaciones estructurales buscando potenciar su acción y además permite su estudio y evaluación sobre diferentes sistemas biológicos. Estos conocimientos han permitido brindar soluciones a problemas de importancia a nivel mundial que afectan tanto directa como indirectamente a los seres vivos.

El surgimiento de nuevas enfermedades, además de las existentes, que no cuentan con tratamientos completamente efectivos, como diferentes tipos de cáncer, enfermedades parasitarias y virales, continúan estimulando la interfaz entre la química orgánica y la bioquímica. Entre los padecimientos que aquejan

especialmente a países en desarrollo se cuentan los transmitidos por insectos vectores como los mosquitos y los triatominos.

En el caso de los mosquitos, aunque individuos del género *Culex* y *Anopheles* son responsables de transmitir enfermedades importantes como el virus del Nilo Occidental, la filariasis, encefalitis virales y la malaria, son aquellos del género *Aedes* los más comunes y los de mayor relevancia en la salud pública mundial. Dos especies importantes de este grupo taxonómico, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, los cuales son responsables de transmitir los virus que causan fiebre dengue, fiebre amarilla, chikungunya, y virus del Zika.

Referente a los triatominos, son insectos responsables de transmitir protozoos flagelados del género *Trypanosoma*, agentes causantes de la enfermedad parasitaria del mal de Chagas. Debido a que generalmente se presenta de forma asintomática y que los fármacos Nifurtimox y Benznidazol solo son efectivos en la fase aguda de la enfermedad, alrededor del 30% de los pacientes desarrollan daño cardíaco y alrededor de un 10% sufren transtornos motores gastrointestinales.

Debido a que tanto el dengue como el mal de Chagas están entre las 18 enfermedades denominadas desatendidas u olvidadas, estas enfermedades representan un problema grave de salud en 17 países de America. Ademas, la incidencia de nuevas enfermedades como el chikungunya y el Zika plantea nuevos desafíos para la salud pública en todos los países tropicales y subtropicales del planeta.

En busca de soluciones viables a problemas de salud publica que afectan a nuestra población, como los previamente expuestos, el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular LQOBio se encuentra comprometido con la búsqueda de soluciones viables a problemas de gran impacto, incursionando en el campo de la química sintética de productos naturales y sus derivados y en el de química medicinal con el desarrollo y consolidación de metodologías que permiten la obtención de moléculas

con diferentes actividades biológicas como las antifúngicas, antiparasitarias y anticancerígenas.

Este es el caso del alcaloide natural girgensohnina, metabolito secundario encontrado en el arbusto *Girgensohnia oppositiflora* (Fam. Chenopoidaceae). Este metabolito, como fue reportado por Vargas y Kouznetsov en el 2013, presenta actividad inhibitoria moderada sobre la enzima acetilcolinesterasa AChE, proteina encargada de la degradación del neurotransmisor acetilcolina. El uso de moléculas antropogénicas con esta actividad son empleadas como insecticidas buscando disminuir las poblaciones de artropodos vectores de diferentes enfermedades. Buscando contribuir con el control de padecimientos causados por insectos como los mosquitos y triatominos, este proyecto buscó la generación de librerías de nuevos y diversos α -aminonitrilos y planteó diferentes ensayos biológicos *in vitro* para evaluar su acción sobre diferentes estadios del mosquito *Aedes aegypti* y sobre los instares ninfales I y V de triatominos *Rhodnius prolixus*. Finalmente, se involucraron cálculos computacionales y ensayos *in vivo* de las moléculas más activas con lo que se contribuyó con el estudio del mecanismo de acción de las moléculas entropatos.

El presente trabajo ha sido estructurado en 4 capítulos, cada uno de las cuales presenta su propia estructura soportada en los diferentes artículos publicados productos de esta investigación. Mientras que en el primer capítulo se incluye una revisión de los fundamentos teóricos de la investigacion, los capítulos siguientes presentan los resultados obtenidos referentes a la síntesis y caracterización de las moléculas obtenidas, a las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* realizadas y a los cálculos computacionales donde se evaluó la interacción receptor-ligando de los análogos generados sobre la enzima AChE.

Capítulo primero: Reacciones multicomponentes como estrategias de síntesis para la diversificación estructural de moléculas orgánicas.

Capítulo segundo: Síntesis "*one-pot*" de α -aminonitrilos sustituidos, análogos al alcaloide natural girgensohnina, vía la reacción de Strecker de tres componentes.

Capítulo tercero: Evaluación biológica *in vitro* y docking molecular de análogos del alcaloide girgensohnina como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa AChE.

Capítulo cuarto: Evaluación la actividad *in vivo* e *in vitro* de análogos de la girgensohnina frente a diferentes modelos animales.

1. REACCIONES MULTICOMPONENTES COMO ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS PARA LA DIVERSIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS.

Las reacciones multicomponentes (RMCs), investigadas desde hace más de dos décadas, se consideran una estrategia sintética de gran importancia debido a su alta eficiencia, facil ejecución y economía atómica (Esquema 1).^{1,2} Comparadas con las reacciones orgánicas convencionales, las RMCs presentan grandes ventajas, como su alta convergencia, que permite disminuir los tiempos de reacción y ofrece productos con gran complejidad estructural.³ Este tipo de reacciones proveen un nuevo enfoque hacia la síntesis eficiente de nuevas bibliotecas de compuestos y a andamios altamente funcionalizados, siendo reconocida por su alta relevancia en el descubrimiento de fármacos, sintesis total y bioconjugación.⁴ La planificación de la síntesis de productos bajo RMCs junto con la predicción *in silico* e *in vitro* de sus propiedades biológicas es una nueva y poderosa herramienta para el descubrimiento de fármacos.^{5,6}

Las RMCs se han clasificado en tres tipos diferentes: las de tipo I donde se presenta un equilibrio entre las diferentes subreacciones incluidas en la que se forma el producto final y generalmente las constituyen tres componentes que forman sus productos a partir de aminas, compuestos carbonílicos y compuestos nucleofílicos neutros o aniones de ácidos débiles. Como ejemplos de estas RMCs se tienen a las reacciones de Strecker y de Mannich. En las clasificadas como tipo II, como las reacciones de Hantzsch, Biginelli y Bucherer-Bergs, tanto los aductos como los intermediarios se encuentran en equilibrio y el compuesto final se obtiene como resultado de una reacción irreversible y a veces, secuencial (reacción de Ugi). Las RMCs de tipo III, con pocos ejemplos en la química preparativa, son empleadas por

las células en diferentes procesos bioquímicos debido a que el producto final se forma como resultado de reacciones reversibles secuenciales. Los productos generados empleando RMCs están fuertemente condicionados por la naturaleza de los disolventes, los catalizadores, las concentraciones y tipo de precursores, haciendo que la optimización de las condiciones de reacción sea más exigente en comparación con aquellas necesarias para reacciones secuenciales. Esta exigencia adquiere gran importancia debido a que, en la actualidad, varias reacciones multicomponentes se emplean para la síntesis de series de compuestos con potenciales aplicaciones en el desarrollo de fármacos y en la ciencia de materiales.⁷



Esquema 1. Reacciones multicomponentes más reconocidas

1.1. IMINAS EN LAS REACCIONES MULTICOMPONENTES (RMCS)

Desde la primera reacción multicomponente, reportada en 1850 por Adolph Strecker para la síntesis de α -aminonitrilos, las iminas están involucradas en varias RMCs, como las reacciones de Hantzsch reportada en 1882, Biginelli en 1893, Mannich en 1912 y Ugi en 1959 (Esquema 2).^{8,9} Las RMCs basadas en iminas (como sustrato o intermediario) continúan ganando una atención considerable ya que compuestos que presentan nitrógeno en su estructura se encuentran en la naturaleza, son biológicamente activos y se ha encontrado que estas unidades nitrogenadas juegan importantes roles en su bioactividad.

Esquema 2. Reacciones multicomponentes de Strecker y Ugi.



Existe una gran disponibilidad comercial de cientos de aminas y aldehídos con los cuales se pueden acceder a un gran número de intermediarios imínicos que pueden llevar a la generación de andamios de diversidad molecular. Por esto, las iminas son consideradas bloques de construcción versátiles en RMCs para la síntesis drigida a la diversidad (DOS) y son indispensables para los estudios de relación estructura-actividad (SAR).¹⁰

Las iminas exhiben un comportamiento químico interesante en las reacciones multicomponentes. Su átomo de nitrógeno rico en electrones no solo puede actuar

como un nucleófilo sino también se comportan como grupos carbonil electrofílicos enmascarados en presencia de buenos C-nucleófilos brindando productos tipo Mannich. La electrofilicidad de las iminas pueden incrementarse protonando su nitrógeno usando ácidos de Brønsted y Lewis e incluso también pueden usarse como azadienos (cuando R_3 es arilo) o incluso como dienófilos en reacciones de cicloadición (Figura 1).¹¹

Figura 1. Reactividad de las iminas.



Aunque su reactividad es alta, frecuentemente reaccionan con marcada selectividad en casos específicos, ya que ésta depende de tanto los componentes de la reacción, así como de la naturaleza de los sustituyentes presentes en la amina y aldehídos de las que proceden. El equilibrio de la reacción controla la formación de la imina, la cual se da eliminando agua para de esta manera dirigirla a los productos. La imina formada puede ser fácilmente hidrolizada adicionando agua y cantidades catalíticas de ácidos. Ademas de la hidrólisis, las iminas también pueden participar en otros dos tipos de reacción controladas por el equilibrio como lo son las de intercambio y metátesis (Esquema 3). Esquema 3. Reactividad reversible observada en las iminas.



Un ejemplo de su alta reactividad se observó cuando Choudhury y colaboradores trataron de realizar una reacción de tres componentes tipo Mannich empleando malononitrilo.¹¹ Encontraron que en lugar del producto tipo Mannich se generaba un producto diferente debido a la condensación de Knoevenagel, lo que llevo a concluir que la imina formada era hidrolizada por el ácidos de Lewis empleado como catalizador y el aldehído libre reaccionaba entonces con el malononitrilo para brindar dicho producto (Esquema 4).

Esquema 4. Reactividad de las iminas frente al malononitrilo.



1.1.1. Comportamiento de las iminas como electrófilos. El comportamiento químico del del doble enlace C=N es comparable al observado en C=O. Cuando un nucleófilo ataca un sistema carbonílico se requiere muy poca energía para distorsionar la polaridad del enlace π debido a que el átomo de oxígeno es más electronegativo y acomoda mejor la carga. Se puede, sin embargo, activar la imina por tratamiento con cantidades catalíticas de un ácido para generar un catión iminio, producido por la protonación del nitrógeno de la imina, el cual es un electrófilo altamente reactivo y el ataque sobre esta carga positiva genera como intermediario una especie neutra (Esquema 5). Debido a la necesidad protonar el sistema, las iminas son menos electrofílicas que los aldehídos y las cetonas.

Esquema 5. Ataque nucleófilo a sistemas carbonilos e iminas.



1.1.2. Reacción de Mannich. Las iminas actúan como electrófilos en la mayoría de las RMCs. Entre estas reacciones, la reacción de Mannich es una de las reacciones de tres componentes más ampliamente usadas debido a que es posible la formación de enlaces C-C. Esta característica la convirtió en una de las reacciones más importantes y fundamentales en la síntesis orgánica.¹² La reacción de Mannich involucra un aldehído no enolizable, una amina primaria o secundaria y un compuesto carbonilo enolizable para generar compuestos β -aminocarbonilos, los cuales son intermediarios importantes para, por ejemplo, la síntesis de productos naturales y farmacéuticos.^{13,14}

La síntesis de N-heterociclos que involucran la iminas en RMCs han ganado popularidad en la comunidad científica. Liang y colaboradores reportaron en 2007

la síntesis sencilla y eficiente de 1,3-diaril-5-espirohexahidropirimidinas <u>1</u> vía condensación *one pot* entre anilinas, formaldehído y ciclohexanonas en presencia de (*S*)-prolina como organocatalizador.¹⁵ En este caso seis moléculas están involucradas y seis nuevos enlaces covalentes generan productos bicíclicos (Esquema 6).

Esquema 6. Síntesis de 1,3-diaril-5-espirohexahidropirimidinas vía condensación one-pot.



Dixon y colaboradores reportaron la reacción de tres componentes nitro-Mannich/lactamización en cascada entre aldehídos, aminas y un nitro ester (Esquema 7).¹⁶ Se encontró que la imina formada intercambiaba un protón con el nitroalcano acídico, lo que sugirió que el par **A** era reactivado y entonces se daba el producto **B** por una adición tipo Mannich. Finalmente, el ataque nucleofílico de la amina sobre la función ester de B lleva a la lactamización irreversible que ofreció el producto esperado <u>2</u> con una alta diastereoselectividad. Esquema 7. Reacción de tres componentes nitro-Mannich/lactamización.



El carácter electrofílico de las iminas también fue explorada por Liu y colaboradores para obtener imidazo[1,2-*a*]piridinas <u>3</u> vía la RMC de 2-aminopiridinas, aldehídos y alquinos en presencia del sistema CuSO₄/TsOH como catalizador (Esquema 8).¹⁷ El ataque nucleofílico del alquino sobre la imina generó la propargilamina y seguidamente un ataque nucleofílico intramolecular del nitrógeno en el anillo de piridina sobre el triple enlace y la isomerización aromática del intermediario cíclico brindó el producto final. Esta metodología no es adecuada cuando se emplean sustratos que contiene sustituyentes hidroxilos, dialquilamínicos o bromados.

Esquema 8. Síntesis de imidazo [1,2-a]piridinas vía RMC.



Los sistemas heterocíclicos que contienen un núcleo de quinolina han encontrado una amplia aplicación en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de receptores de la hormona concentradora de melanina, enfermedades proliferativas celulares, encefalopatías espongiformes transmisibles, tumores malignos como el cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de intestino grueso, e infecciones bacterianas en mamíferos. La reacción tipo Mannich que involucra aldehídos aromáticos, naftalen-2-amina y tetrahidropiran-4-ona bajo condiciones de reflujo y en presencia de cantidades catalíticas de yodo generó los derivados 1-H-5arilbenzo[f]pirano[3,4-c]quinolínicos $\underline{4}$, en lugar de los β -aminocetonas generalmente obtenidas (Esquema 9).¹⁸

Esquema 9. Síntesis de derivados 1-H-5-arilbenzo[f]pirano[3,4-c]quinolínicos.



De acuerdo con el mecanismo propuesto, el enol formado de la tetrahidropiran-4ona ataca la base de Schiff activada con yodo, el cual sufre una ciclación intramolecular de Friedel-Crafts y su subsecuente deshidratación brindando una dihidroquinolina, la cual es seguidamente oxidada por el aire para ofrecer los productos aromatizados 1-H-5-arilbenzo[f]pirano[3,4-c]quinolínicos.

El uso de ácidos organoborónicos en la reacción de Mannich, reportada en 1993 por Petasis y colaboradores involucró la condensación *one-pot* de tres componentes entre un ácido aril o alquil borónico, una amina y un aldehído a temperatura ambiente para generar aminas sustituidas.¹⁹ Una mejora significativa a esta metodología, publicada por Mandai *et al.*, empleó varios 2-piridinecarbaldehídos con aminas secundarias y ácido borónico, bajo condiciones libres de catalizador, para generar los derivados deseados <u>5</u> con rendimientos superiores al 96% (Esquema 10).²⁰

Esquema 10. Condensación one-pot de tres componentes bajo condiciones libres de catalizador.



1.1.3. Naturaleza nucleofílica de las iminas en RMCs. El cáracter nucleofílico de las iminas se debe al par de electrones libres que presenta el átomo de nitrógeno. Cuando los sustituyentes de las iminas son especies ricas en electrones y el sustrato de la reacción es deficiente de electrones como los cloruros de acilo, la imina exhibe su nucleofilicidad para ofrecer los cloruros N-aciliminio correspondientes (Esquema 11).

Esquema 11. Nucleofilicidad de las iminas.



Arndtsen y colaboradores desarrollaron variadas RMCs donde el primer paso es el ataque nucleofílico de la imina sobre los cloruros de acilo deficientes de electrones seguida por una adición de tres componentes, brindando una librería de moléculas con potenciales actividades biológicas. La reacción multicomponente de iminas, cloruros de acilo y alquinos en presencia de un catalizador de paladio y monóxido de carbono es una aproximación conveniente para acceder a diversos derivados del pirrol (Esquema 12).²¹ En esta reacción, la sal aciliminio experimenta una adición oxidativa con el paladio y se incorpora entonces el monóxido de carbono proporciona un intermediario de paladio altamente activo. La eliminación del HCI de este intermediario brinda un producto cíclico y su isómero ceteno acíclico, para que finalmente se de la adición 1,3-dipolar a alquinos para formar los pirroles deseados **6**.
Esquema 12. Síntesis de derivados del pirrol.



Usando una estrategia similar, demostraron que una amplia variedad de derivados <u>7</u> del imidazol pueden ser generados a partir de la RMC de dos iminas diferentes y cloruros de ácido en presencia de Pd/CO (Esquema 13).²² Los imidazoles han encontrado gran utilidad en una amplia gama de áreas incluyéndolos como núcleos importantes para el diseño de fármaco por ejemplo, como inhibidores de la angiotensina II, como agentes antiinflamatorios y anticancerígenos, como polímeros conjugados y funcionales, productos naturales y complejos de coordinación y también se ha encontrado que estos productos sirven como precursores de disolventes iónicos ambientalmente amigables y como ligandos de carbenos.

Esquema 13. Síntesis de derivados del imidazol.



Arndtsen y colaboradores publicaron también una estrategia eficiente de tres componentes usando iminas con alquinos y RCOCI para preparar las propargilamidas <u>8</u>, usando Cul como catalizador (Esquema 14).²³ Entre las ventajas que presenta esta metodología está el uso de una amplia variedad de iminas, no solamente ricas o pobres en electrones sino también aquellas derivadas de heteroarilaldehídos, entre otros.

Esquema 14. Preparación de propargilaminas empleando Cul como catalizador.



Este proceso transcurre rápidamente con Cul como catalizador y proporciona un método de acoplamiento de tres componentes eficiente para preparar propargilamidas. El acoplamiento también puede ser diversificado para permitir la formación propargilaminas protegidas con el uso de cloroformiatos.

En el caso en el que se emplean iminas α , β -insaturadas y cloruros de acilo en presencia de trifenilfosfina se obtuvieron pirroles **9** vía eliminación del óxido de fosfina seguida de una ciclación (Esquema 15).²⁴ Esta reacción procede vía una reacción de Wittig intramolecular y provee un amplio rango de pirroles en un solo paso.

Esquema 15. Síntesis de pirroles vía reacción de Wittig intramolecular.



De igual forma, empleando una reacción multicomponente ambientalmente amigable tipo domino, se obtuvieron estructuras poliheterocíclicas (pirrolopiperazínicos y azaesteroidales) con potencial sintético y biológico. (Esquema 16).²⁵ Esta metodología involucró cuatro diferentes reacciones, a saber: I. adición de Michael, II. formación de la aldimina, III. adición nucleofílica que lleva a un intermediario eno-iminio y IV. ciclación tipo Pictet-Spengler.

Esquema 16. Obtención de estructuras poliheterocíclicas



1.1.4. Iminas como azadienos en RMCs. El desarrollo de nuevas, versátiles y eficientes metodologías para la síntesis de N-heterociclos ha sido desde siempre de suma importancia para la comunidad científica. La reacción aza-Diels-Alder, por ejemplo, la cicloadición [4+2] de iminas con alquenos, es una de las estrategias más ampliamente usadas para la generación de sistemas N-heterocíclicos (tetrahidroquinolinas sustituidas) en un solo paso. Esta reacción es conocida como la reacción de Povarov y sus productos son derivados quinolínicos <u>11</u> (Esquema 17).

Esquema 17. Cicloadición [4+2] de iminas y alquenos.



En esta reacción, el alqueno debe ser un sistema rico en electrones, lo que significa que los grupos funcionales unidos al alqueno deben ser capaz de donar electrones. La reacción de Povarov requiere ácidos de Lewis, como el trifluoruro de boro, para activar la imina. Es necesario el empleo de dienófilos ricos en electrones y su mecanismo se puede racionalizar por dos modelos mecanísticos, uno que envuelve un mecanismo [4+2] concertado asincrónico o un mecanismo paso a paso. Tanto las aldiminas aromáticas como las N-alquil aldiminas pueden emplearse como compuestos azadienos. La formación de aldiminas con aldehídos alifáticos se

complica debido a su fácil hidrolisis y a su tendencia a experimentar condensaciones aldólicas o polimerizaciones en condiciones ácidas.

El dienófilo en la reacción de imino Diels-Alder (reacción de Povarov) esta usualmente limitado a alquenos activos y ricos en electrones. Esta limitación puede ser superada introduciendo la tensión de un anillo en el dienófilos. Smith y colaboradores han demostrado que biciclos moderadamente tensionados como los norbornenos reaccionan con N-arilaminas formadas *in situ* empleando ácidos de Lewis BF₃·OEt₂, como catalizadores, obteniendose los productos <u>12</u> deseados (Esquema 18).²⁶

Esquema 18. Empleo de norbornenos como dienófilos en la reacción de Povarov.



Lavilla y colaboradores exploraron la actividad catalítica de los ácidos de Lewis InCl₃ y Sc(OTf)₃, para las reacciones de cicloadición [4+2] entre iminas generadas *in situ* y dihidropiridinas.²⁷ Bajo esta metodología se emplearon diferentes sustituyentes unidos al nitrógeno dihidropiridínico y en la posición C-3 se utilizaron diferentes grupos electroatractores como el CN, CO₂Me, CONH₂ genererando tetrahidroquinolinas <u>13</u> y <u>14</u> altamente sustituidas con buenos rendimientos (Esquema 19).

Esquema 19. Cicloadición [4+2] empleando InCl3 o Sc(OTf)3 como catalizador.



Buscando expandir la versatilidad sintética de la reacción de Povarov, e mismo grupo empleó 3,4-dihidro-6-metil-2H-piran-2-ona, un enol ester como el alqueno rico en electrones en la reacción de Povarov (Esquema 20).²⁸ El tratamiento de este enol ester con *p*-toluidina y glioxalato de etilo empleando Sc(OTf)₃ como catalizador en MeCN y a temperatura ambiente, brindaron inesperadamente las N-aril lactamas **<u>15</u>**. Estos trabajos demuestran que los productos generados en las reacciones multicomponentes de derivados de aldehídos, aminas y alquenos, varían con el comportamiento químico de todos los participantes en la reacción.

Esquema 20. Generación de N-aril lactamas vía reacción de Povarov.



Shidharan y colaboradores reportaron el uso de un catalizador CAN como un método conveniente para obtener sistemas 1,4-dihidropiridinicos usando reacciones multicomponentes 1-azadienicas.²⁹ En este caso al 1-azadieno produciendo *in situ*, por la condensación de aminas aromáticas se adicionó un compuesto β -dicarbonílico generando los derivados de las 1,4-dihidropiridinas <u>16</u> con buenos rendimientos (Esquema 21). Encontraron que el uso de aminas alifáticas o aldehídos α , β -insaturados diferentes a derivados del cinamaldehído resultaron en

masas de reacción complejas obteniendo solo pequeñas cantidades del producto deseado.

Esquema 21. Síntesis de sistemas 1,4-dihidropiridinicos usando CAN como catalizador.



1.1.5. Iminas como dienófilos en RMCs. La reacción de iminas como dienófilos con dienos es una herramienta poderosa para la construcción rápida de heterociclos nitrogenados de seis miembros altamente funcionalizados, como piperidinas y tetrahidroquinolinas. Usualmente, para esta reacción se hace necesario el uso de dienos activados como el dieno Danishefsky o iminas sustituidas con grupos electro atractores. En general, la reactividad de las iminas como dienófilos en muy baja, aunque esta desventaja se solventa empleando diferentes ácidos de Lewis. Así, la reacción de iminas y varios dienos en reacciones aza-Diels-Alder catalizadas por ácidos es considerada como una estrategia versátil para la sintesis dirigida a la diversidad molecular DOS (Diversity Oriented Synthesis).

Akiyama y colaboradores han demostrado que en presencia de agua, las aldiminas pueden ser generadas *in situ* de forma espontánea y la reacción aza-Diels-Alder se da sin problemas para proporcionar el producto de cicloadición con buenos rendimiento (Esquema 22).³⁰ Bajo este protocolo se pueden obtener aldiminas derivadas de aldehídos alifáticos.

Esquema 22. Reacción aza Diels-Alder con generación de aldiminas in situ.



Alaimo y colaboradores reportaron la reacción *one pot* de tres componentes empleando nitroarenos, aldehídos y dienos Danishefsky usando indio tanto como agente reductor como catalizador para la generación *in situ* de ln³⁺ y así acceder a las dihidropiridin-4-onas <u>18</u>.³¹ En este proceso, el ln³⁺ que se genera cataliza la reacción de cicloadición en una secuencia *one pot* tándem. En su mecanismo, el ln⁰ en presencia de NH₄Cl genera lnCl₃ como producto de reacción, y es este ácido de Lewis el que promueve la reacción aza-Diels-Alder entre la imina y el dieno agregado (Esquema 23).

Esquema 23. Obtención de derivados de la dihidropiridin-4-ona usando sales de In³⁺ como catalizador.



Khan y colaboradores desarrollaron una metodología para acceder a piperidinas altamente funcionalizadas <u>19</u> combinando aldehídos aromáticos, aminas y compuestos 1,3-dicarbonilicos en presencia de cantidades catalíticas de bromuro de bromodimetilsulfónio, donde la imina generada *in situ* actúa como dienófilos (Esquema 24).³²

Esquema 24. Síntesis de sistemas piperidínicos funcionalizados.



El mecanismo propuesto en el caso de los β -cetoesteres, donde R es un grupo metil, inicia con la enamina formada por la reacción con la amina. Esta enamina puede entonces reaccionar con el aldehído aromático para generar un producto tipo Knoevenagel, el cual tiene una tendencia espontanea de tautomerización bajo condiciones ácidas, para brindar el enlace intramolecular de hidrógeno de la enamina generada. Este enlace de hidrógeno junto con su alta conjugación es la fuerza motriz para esta tautomerización (Esquema 25).

Esquema 25. Mecanismo propuesto para la generación de los sistemas piperidínicos.



1.2. REACCIÓN DE STRECKER: ANTECEDENTES⁵

Conocida como la primera reacción multicomponente, desarrollada en 1850 por Adolph Strecker, la reacción que lleva su nombre es la más antigua ruta sintética para la producción de α -aminoácidos, los cuales se obtienen como resultado de la condensación entre un aldehído, una amina y NaCN en fase ácida, seguida de una hidrólisis básica (Esquema 26).^{33,34}

Esquema 26. Generación de α -aminonitrilos vía reacción de Strecker.

Los α-aminonitrilos han demostrado ser intermediarios versátiles en la síntesis de aminoácidos naturales o sintéticos, péptidos, amidas y además de una variada cantidad de heterociclos nitrogenados. Los productos de Strecker han sido empleados como precursores para la síntesis de productos farmacéuticos notables como el ecteinascidin-743, la ftalascidina-650 y la saframicina A (Figura 2).³⁵⁻³⁸





⁵ Aunque la reacción de Strecker se cataloga como una RMC de tipo I, al igual que la reacción de Mannich, debido a la relevancia que esta reacción tuvo en esta investigación se presenta el siguiente apartado.

Modificaciones realizadas a la metodología clásica de Strecker como variaciones en la fuente de cianuro, condiciones de reacción, compuestos carbonílicos y aminas utilizadas, la convirtieron en una ruta muy atractiva al brindar productos de gran importancia tanto a escala de laboratorio como a escala industrial.³⁹ Es así que su fiabilidad, disponibilidad de los materiales de partida y su versatilidad la convirtieron en un importante proceso para la obtención de productos de interés químico (como herbicidas y agentes quelantes), biológico (como aminoácidos) y farmacológico (como analgésicos y antimicóticos).^{8,40}

La formación de estos productos generalmente se da a través de la adición nucleofílica de la amina al carbono carbonilo en medio ácido, brindando una imina, cuando se emplean aminas primarias, o un ion iminio, en el caso de las aminas secundarias, inclusive las cíclicas. Las iminas también pueden ser generadas por la oxidación de aminas secundarias. Zhu y colaboradores describieron una reacción de Strecker oxidativa que permitió la cianación directa de *p*-metoxifenilaminas protegidas empleando complejos de vanadio como catalizadores y TBHP como agente oxidante.⁴¹ La cianación ocurre sobre el carbono α teniendo ya sea un grupo alquilo o uno aromático. Se sugiere que el catalizador de vanadio es activado por el TBHP el cual se coordina con la amina para realizar una transferencia de un solo electrón del centro de nitrógeno rico en electrones al complejo de vanadio generado, seguidamente la homólisis O-O y la abstracción C-H brinda el ion iminio que reacciona con el cianuro para generar los α -aminonitrilos (Esquema 27).

Esquema 27. Obtención de *a*-aminonitrilos vía reacción de Strecker oxidativa



1.2.1. Fuentes de cianuro. Al ser la cianación de iminas una importante herramienta para la construcción de moléculas en las que se encuentran dos átomos de nitrógeno funcionalizados, la exploración de fuentes de cianuro más seguras y eficientes sigue presentándose como un objetivo para el desarrollo de nuevas metodologías.^{42,43} Entre los inconvenientes que surgen al emplear fuentes de cianuro como ácido HCN, (EtO)₂P(O)CN, Et₂AICN y Bu₃SnCN, se cuentan principalmente las fuertes condiciones de reacción y la complejidad en su manejo.⁴⁴ La manipulación del HCN gaseoso y de los líquidos inestables y tóxicos (EtO)₂P(O)CN, Et₂AICN, Bu₃SnCN y TMSCN (cianuro de trimetilsililo) es muy engorrosa haciendose necesarias condiciones de seguridad especiales y más exigentes para su uso a pequeña y gran escala.^{45,46}

Aunque para el TMSCN su desventaja se centra en su costo y adquisición, cabe resaltar las ventajas que ofrece, ya que en muchas reacciones no se requiere el uso de catalizadores ácidos para promover la reacción (Esquema 28). Como condición se utilizan aldehídos y aminas aromáticas y se emplean disolventes orgánicos polares (MeCN, tolueno o CH₂Cl₂) que mejoran considerablemente la solubilidad de los precursores empleados.^{47,48} En estos casos los rendimientos son excelentes (75-99%) facilitando el aislamiento y purificación de los productos finales. Los derivados cianohidríntrimetilsilílicos no se detectan, permitiendo afirmar que el TMSCN no es lo suficientemente nucleofílico para reaccionar con el precursor carbonílico.

Esquema 28. Ruta sintética de la reacción de Strecker empleando TMSCN.



Empleando en la reacción de Strecker aldehídos y cetonas bajo condiciones catalíticas suaves y libres de metales, Nammalwar y colaboradores sintetizaron una serie de 30 α-aminonitrilos. Las iminas generadas entre el compuesto carbonílico y las aminas se llevó a cabo usando NH₄Cl al 30 mol% a 90°C y condiciones de microondas usando TMSCN, reduciendo considerablemente el tiempo de reacción a unos pocos minutos.⁴⁹ El estudio de disolventes realizado en esta investigación demostró que los mayores rendimientos se obtenían al emplear MeCN o etanol como medios de reacción.

La búsqueda de mejores y más seguras fuentes de cianuro condujo a la generación y empleo de la acetona cianhídrina (CN(OH)CMe₂). Este compuesto, utilizado en las industrias químicas y metalúrgicas como agente acomplejante en el refinado y separación de metales al igual que en la de plásticos y caucho, es producido a partir de la reacción de acetona con NaCN en presencia de ácido sulfúrico. Sipos y colaboradores generaron, *in situ*, alanos de aldiminas por la adición de hidruro de diisobutilaluminio a los nitrilos empleados, los cuales brindaron las iminas correspondientes al reaccionar con (*S*)-(-)-1-feniletilamina.⁵⁰ La adición nucleofílica de las iminas en presencia de cantidades catalíticas de trietilamina y usando como fuente de cianuro a la acetona cianhídrina, brindaron los α -aminonitrilos esperados (Esquema 29). El empleo de variados alquil-, aril y arilalquilnitrilos demostraron la importancia de los factores estéricos cuando se busca la síntesis de α -aminonitrilos.

Esta conclusión fue soportada en el hecho de que, al emplear cianuro de alilo, acrilonitrilo y cinamonitrilo, no se observó el producto esperado.

Esquema 29. Generación de α-aminonitrilos vía generación aldiminas.



1.2.2. Catalizadores empleados. Al igual que con las fuentes de cianuro y hasta cierto punto debido a ellas, se han empleado y desarrollado diversos tipos de catalizadores. Su implementación ha permitido, en muchos casos, mejoras significativas en los rendimientos y tiempos de reacción.^{51,52} Entre estos catalizadores y debido a su economía, simplicidad operacional, estabilidad al encontrarse con pequeñas cantidades de agua y amplio rango de disolventes a usar, sobresalen ácidos de Lewis como InCl₃,^{53,54} BiCl₃,⁵⁵ CoCl₂,⁵⁶ Cu(OTf)₂ y NiCl₂.⁵⁷

Desde hace algunos años, los catalizadores heterogéneos soportados sobre gel de sílice o alúmina han emergido en la metodología orgánica sintética debido a aspectos tanto ambientales como económicos e industriales (química verde). Entre los catalizadores ácidos más usados se tienen los obtenidos a partir de gel de sílice o alúmina y HF, H₂SO₄, HClO₄ y H₃PO₄, los cuales ofrecen incrementos en las velocidades de reacción, fácil manejo, mayor selectividad y en la mayoría de los casos un tratamiento más sencillo de la masa de reacción. Además, disminuyen los problemas de corrosión de plantas y reactores a escala industrial y su reusabilidad es uno sus beneficios más importantes haciéndolos muy atractivos para su aplicabilidad comercial.⁵⁸⁻⁶⁰ Chen y colaboradores demostraron que después de la

recuperación por filtrado y lavado con CH₂Cl₂, el catalizador podía ser empleado sin perder actividad catalítica hasta por tres ciclos. Estudios más recientes mostraron que si el filtrado y lavado se realiza con CHCl₃ y el secado se realiza a una temperatura no mayor a 60°C, el catalizador puede ser utilizado, por lo menos, durante cinco ciclos más sin ninguna disminución de su actividad.

1.3. REFERENCIAS

[1] I. Ugi, A. Dömling, W. Hörl, Multicomponent reactions in organic chemistry, Endeavour. 18 (1994) 115–122.

[2] A. Dömling, I. Ugi, Multicomponent Reactions with Isocyanides, Angew. Chemie. 39 (2000) 3168–3210.

[3] V. Estévez, M. Villacampa, J.C. Menéndez, Multicomponent reactions for the synthesis of pyrroles, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 4402.

[4] A. Váradi, T.C. Palmer, R.N. Dardashti, S. Majumdar, Isocyanide-based multicomponent reactions for the synthesis of heterocycles, Molecules. 21 (2016) 1–22.

[5] L. Weber, Multi-component reactions and evolutionary chemistry, Drug Discov. Today. 7 (2002) 143–147.

[6] A. Dömling, W. Wang, K. Wang, Chemistry and biology of multicomponent reactions, Chem. Rev. 112 (2012) 3083–3135.

[7] I. Ugi, The alpha-Addition of Immonium lons and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1 (1962) 8–21.

[8] H. Gröger, Catalytic enantioselective Strecker reactions and analogous syntheses., Chem. Rev. 103 (2003) 2795–828.

[9] A. Strecker, Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper;, Ann. Chem. Pharm. 75 (1850) 27–45.

[10] J.E. Biggs-Houck, A. Younai, J.T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 371–382.

[11] L.H. Choudhury, T. Parvin, Recent advances in the chemistry of imine-based multicomponent reactions (MCRs), Tetrahedron. 67 (2011) 8213–8228.

[12] S.G. Subramaniapillai, Mannich reaction: A versatile and convenient approach to bioactive skeletons, J. Chem. Sci. 125 (2013) 467–482.

[13] F. Davis, Y. Zhang, G. Anilkumar, Asymmetric synthesis of the quinolizidine alkaloid (-)-epimyrtine with intramolecular Mannich cyclization and N-sulfinyl α -amino β -ketoesters, J. Org. Chem. 68 (2003) 8061–8064.

[14] H. Wu, Y. Shen, L.Y. Fan, Y. Wan, P. Zhang, C.F. Chen, W.X. Wang, Stereoselective synthesis of amino ketones via direct Mannich-type reaction catalyzed with silica sulfuric acid, Tetrahedron. 63 (2007) 2404–2408.

[15] H. Wei, Z. Yan, Y. Niu, G. Li, Y. Liang, New Light on an Old Story: Facile and Efficient Synthesis of 1,3-Diaryl-5-spirohexahydro- pyrimidines via a Six-Molecule, Three-Component Mannich-Type Reaction, J. Org. Chem. (2007) 8600–8603.

[16] S.M.C. Pelletier, P.C. Ray, D.J. Dixon, Nitro-Mannich/Lactamization cascades for the direct stereoselective synthesis of pyrrolidin-2-ones, Org. Lett. 11 (2009) 4512–4515.

[17] P. Liu, L.S. Fang, X. Lei, G.Q. Lin, Synthesis of imidazo[1,2a]pyridines via three-component reaction of 2-aminopyridines, aldehydes and alkynes, Tetrahedron Lett. 51 (2010) 4605–4608.

[18] X.S. Wang, Q. Li, J.R. Wu, S.J. Tu, Efficient method for the synthesis of pyranoquinoline, thiopyranoquinoline, thienoquinoline, and naphtho[2,7]naphthyridine derivatives catalyzed by iodine, J. Comb. Chem. 11 (2009) 433–437.

[19] N. Petasis, I. Akritopoulou, The boronic acid mannich reaction: A new method for the synthesis of geometrically pure allylamines, Tetrahedron Lett. 34 (1993) 583–586.

[20] H. Mandai, K. Murota, T. Sakai, An improved protocol for Petasis reaction of 2-pyridinecarbaldehydes, Tetrahedron Lett. 51 (2010) 4779–4782.

[21] R. Dhawan, B. Arndtsen, Palladium-Catalyzed Multicomponent Coupling of Alkynes, Imines, and Acid Chlorides: A Direct and Modular Approach to Pyrrole Synthesis, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 468–469.

[22] A.R. Siamaki, B. Arndtsen, A direct, one step synthesis of imidazoles from imines and acid chlorides: A palladium catalyzed multicomponent coupling approach, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 6050–6051.

[23] D. Black, B. Arndtsen, Copper-catalyzed coupling of imines, acid chlorides, and alkynes: A multicomponent route to propargylamides, Org. Lett. 6 (2004) 1107–1110.

[24] Y. Lu, B. Arndtsen, A direct phosphine-mediated synthesis of pyrroles from acid chlorides and α , β -unsaturated imines, Org. Lett. 11 (2009) 1369–1372.

[25] F. Liéby-Muller, T. Constantieux, J. Rodriguez, Highly efficient access to original polycyclic pyrrolopiperazine scaffolds by a three-component reaction with 1,3-dicarbonyls, Synlett. (2007) 1323–1325.

[26] C.D. Smith, J.I. Gavrilyuk, A.J. Lough, R. a. Batey, Lewis acid catalyzed threecomponent hetero-Diels-Alder (Povarov) reaction of N-arylimines with strained norbornene-derived dienophiles, J. Org. Chem. 75 (2010) 702–715.

[27] R. Lavilla, M.C. Bernabeu, I. Carranco, J.L. Díaz, Dihydropyridine-based multicomponent reactions. Efficient entry into new tetrahydroquinoline systems through Lewis acid-catalyzed formal [4 + 2] cycloadditions, Org. Lett. 5 (2003) 717–720.

[28] N. Isambert, M. Cruz, M.J. Arévalo, E. Gómez, R. Lavilla, Enol esters: Versatile substrates for mannich-type multicomponent reactions, Org. Lett. 9 (2007) 4199–4202.

[29] V. Sridharan, P.T. Perumal, C. Avendaño, J.C. Menéndez, A new threecomponent domino synthesis of 1,4-dihydropyridines, Tetrahedron. 63 (2007) 4407– 4413.

[30] T. Akiyama, J. Takaya, H. Kagoshima, Bronsted acid-catalyzed aza-Diels-Alder reaction of Danishefsky's diene with aldimines generated in situ from aldehydes and amines in aqueous media, Tetrahedron Lett. 40 (1999) 7831–7834.

[31] P.J. Alaimo, R. O'Brien, A.W. Johnson, S.R. Slauson, J.M. O'Brien, E.L. Tyson, A.L. Marshall, C.E. Ottinger, J.G. Chacon, L. Wallace, C.Y. Paulino, S. Connell, Sustainable synthetic methods: Domino construction of dihydropyridin-4-ones and β -amino esters in aqueous ethanol, Org. Lett. 10 (2008) 5111–5114.

[32] A.T. Khan, T. Parvin, L.H. Choudhury, Effects of substituents in the β -position of 1,3-dicarbonyl compounds in bromodimethylsulfonium bromide-catalyzed multicomponent reactions: A facile access to functionalized piperidines, J. Org. Chem. 73 (2008) 8398–8402.

[33] M. North, Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins, Tetrahedron: Asymmetry 14 (2003) 147–176.

[34] D. Stout, L. Black, W. Matier, Asymmetric Strecker Synthesis: Isolation of Pure Enantiomers and Mechanistic Implications, J. Org. Chem. 48 (1983) 5369– 5373.

[35] C. Najera, J.M. Sansano, Catalytic asymmetric synthesis of alpha-amino acids., Chem. Rev. 107 (2007) 4584–4671.

[36] S.P. Pathare, K.G. Akamanchi, Sulfated tungstate: a green catalyst for Strecker reaction, Tetrahedron Lett. 53 (2012) 871–875.

[37] K.W. Bentley, β-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids, Nat. Prod.Rep. 19 (2002) 332–356.

[38] C.R. Razafindrabe, S. Aubry, B. Bourdon, M. Andriantsiferana, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire, Synthesis of (±)-phthalascidin 650 analogue: New synthetic route to (±)-phthalascidin 622, Tetrahedron. 66 (2010) 9061–9066.

[39] C. Cativiela, M.D. Díaz-de-Villegas, Recent progress on the stereoselective synthesis of acyclic quaternary α-amino acids, Tetrahedron: Asymmetry. 18 (2007) 569–623.

[40] A.R. Katritzky, H. Yang, S.K. Singh, Preparation of tertiary alkyl carbinamines, propargylamines, and alpha-heteroarylamines by ketone-based aminoalkylation., J. Org. Chem. 70 (2005) 286–90.

[41] C. Chen, C. Zhu, J.B. Xia, Vanadium-catalyzed oxidative Strecker reaction: α-C-H cyanation of para-methoxyphenyl (PMP)-protected primary amines, Tetrahedron Lett. 55 (2014) 232–234.

[42] G. Jenner, R. Ben Salem, J.C. Kim, K. Matsumoto, Effect of pressure on the Strecker synthesis of hindered α -aminonitriles from ketones and aromatic amines, Tetrahedron Lett. 44 (2003) 447–449.

[43] M.L. Kantam, K. Mahendar, B. Sreedhar, B.M. Choudary, Synthesis of αamino nitriles through Strecker reaction of aldimines and ketoimines by using nanocrystalline magnesium oxide, Tetrahedron. 64 (2008) 3351–3360.

[44] L. Resnick, R.J. Galante, A practical synthesis of 3-ethyl-l-norvaline, Tetrahedron: Asymmetry. 17 (2006) 846–849.

[45] A. Heydari, S. Khaksar, M. Tajbakhsh, Trifluoroethanol as a metal-free, homogeneous and recyclable medium for the efficient one-pot synthesis of α -amino nitriles and α -amino phosphonates, Tetrahedron Lett. 50 (2009) 77–80.

[46] S. Nakamura, N. Sato, M. Sugimoto, T. Toru, A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et 2AICN, Tetrahedron Asymmetry. 15 (2004) 1513–1516.

[47] R. Martínez, D.J. Ramón, M. Yus, Catalyst-free multicomponent Strecker reaction in acetonitrile, Tetrahedron Lett. 46 (2005) 8471–8474.

[48] P. Vachal, E.N. Jacobsen, Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the Strecker reaction, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 10012–4.

[49] B. Nammalwar, C. Fortenberry, R. a. Bunce, Synthesis of α -aminonitriles under mild catalytic, metal-free conditions, Tetrahedron Lett. 55 (2014) 379–381.

[50] S. Sipos, I. Jablonkai, One-pot synthesis of α-aminonitriles from alkyl and aryl cyanides: a Strecker reaction via aldimine alanes, Tetrahedron Lett. 50 (2009) 1844– 1846.

[51] A. Heydari, A. Arefi, S. Khaksar, R.K. Shiroodi, Guanidine hydrochloride: An active and simple catalyst for Strecker type reaction, J. Mol. Catal. A Chem. 271 (2007) 142–144.

[52] A. Shaabani, A. Rahmati, E. Farhangi, Z. Badri, Silica sulfuric acid promoted the one-pot synthesis of trisubstituted imidazoles under conventional heating conditions or using microwave irradiation, Catal. Commun. 8 (2007) 1149–1152.

[53] M. Anniyappan, D. Muralidharan, P.T. Perumal, J.J. Vittal, Indium(III) chloride catalyzed in situ generation of enamines and cyclization with imines: a novel route for synthesis of hexahydroxanthene-9-N-arylamines, Tetrahedron. 60 (2004) 2965–2969.

[54] B.C. Ranu, S.S. Dey, A. Hajra, Indium trichloride catalyzed one-step synthesis of α -amino nitriles by a three-component condensation of carbonyl compounds, amines and potassium cyanide, Tetrahedron. 58 (2002) 2529–2532.

[55] S.K. De, R. a. Gibbs, Bismuth trichloride catalyzed synthesis of α -aminonitriles, Tetrahedron Lett. 45 (2004) 7407–7408.

[56] S.K. De, Cobalt(II) chloride catalyzed one-pot synthesis of alphaaminonitriles., Beilstein J. Org. Chem. 1 (2005) 1-8.

[57] J. Tulinsky, B.V. Cheney, S. a. Mizsak, W. Watt, F. Han, L. a. Dolak, T. Judge,
R.B. Gammill, Novel asymmetric synthesis of atropisomeric 6-aryl pyrazinones via an unusual chirality transfer process, J. Org. Chem. 64 (1999) 93–100.

[58] D.M. Pore, M.S. Soudagar, U.V. Desai, T.S. Thopate, P.P. Wadagaonkar, Potassium phosphate or silica sulfuric acid catalyzed conjugate addition of thiols to α , β -unsaturated ketones at room temperature under solvent-free conditions, Tetrahedron Lett. 47 (2006) 9325–9328.

[59] H.R. Shaterian, M. Ghashang, M. Feyzi, Silica sulfuric acid as an efficient catalyst for the preparation of 2H-indazolo[2,1-b]phthalazine-triones, Appl. Catal. A Gen. 345 (2008) 128–133.

[60] I. Mohammadpoor-Baltork, V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, M.A. Zolfigol, M. Abdollahi-Alibeik, A.R. Khosropour, H. Kargar, S.F. Hojati, Silica sulfuric acid: A versatile and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of oxazolines and imidazolines under various reaction conditions, Catal. Commun. 9 (2008) 894–901

2. SÍNTESIS "ONE-POT" DE α -AMINONITRILOS SUSTITUIDOS, ANÁLOGOS AL ALCALOIDE NATURAL GIRGENSOHNINA, VÍA LA REACCIÓN DE STRECKER DE TRES COMPONENTES.

Artículos publicados del capítulo:

Andrés G. Rueda, Aurora L. Carreño Otero, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov. Revista Brasileira de Entomologia, 62 (2018) 112–118.

Aurora L. Carreño Otero, José H. Quintana, José Antonio Henao, Vladimir V. Kouznetsov, José Miguel Delgado, Graciela Díaz de Delgado. Journal of Chemical Crystallography, 48 (2017) 1-7.

Jose H. Quintana Mendoza, J. A. Henao, Aurora L. Carreño Otero, Vladimir V. Kouznetsov,. Powder Diffraction, 2 (2016) 149-152.

Aurora L. Carreño Otero, Leonor Y. Vargas Méndez, Jonny E. Duque L., VladimirV. Kouznetsov. European Journal of Medicinal Chemistry, 78 (2014) 392-400.

2.1. RESUMEN

Las reacciones de condensación multicomponente *one pot* son una importante herramienta para la generación eficiente de librerías orientadas a la diversidad. La adición de nucleófilos a enlaces imínicos generados *in situ* se presenta como un proceso útil para la generación de moléculas que contienen nitrógeno tales como aminas, aminonitrilos, aminofosfonatos y diferentes compuestos de interés. Entre estos se destacan los α -aminonitrilos, clase importante y muy útil de productos

intermedios, que se emplean como precursores en la síntesis de α -aminoácidos, diversos compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y moléculas bioactivas. El alcaloide girgensohnina se empleó como un modelo natural en el diseño de una nueva serie de α -aminonitrilos. Los parámetros ADMETox calculados para los análogos diseñados revelaron buenos perfiles farmacocinéticos indicando sus características lipofílicas. A través de la reacción clásica de Strecker de tres componentes se emplearon benzaldehídos comerciales, aminas heterocíclicas secundarias y una fuente de cianuro logrando la síntesis tanto el alcaloide natural como de 70 α -aminonitrilos análogos con buenos rendimientos. Las reacciones procedieron eficientemente empleando SSA como catalizador sólido a temperatura ambiente. Los α -aminonitrilos esperados fueron purificados y sus características estructurales determinadas por técnicas espectroscópicas. El protocolo empleado mostró ser eficiente al emplear aldehídos aromáticos y aminas secundarias heterocíclicas.

2.2. INTRODUCCIÓN

Entre los más de 50000 productos naturales estudiados hasta el año 2000, algo más de 12000 moléculas son clasificadas como alcaloides, compuestos producidos por el metabolismo secundario de organismos vivos, marcados con prominente bioactividad y acompañada numerosas veces de toxicidad.^{1,2} La afirmación que sostiene "200 años de investigación no han sido suficientes para explicar la compleja conexión entre los alcaloides y la vida", se ve apoyada por el creciente número de investigaciones acerca de estos metabolitos, los cuales llegan a más de 100000 comunicaciones y artículos publicados, aumentando cada año con cientos de trabajos adicionales.³

La gran variedad, en muchas ocasiones complejidad y propiedades biológicas de las estructuras de los alcaloides han intrigado durante mucho tiempo a los científicos de diferentes ramas de investigación. Debido al alto costo que supone para la planta

la generación de estas moléculas, por ejemplo como mecanismo de defensa química, es recurrente encontrar en una misma molécula diferentes fragmentos bioactivos que permiten su interacción con varias diana moleculares.^{4,5} Si bien identificar la actividad biológica de un alcaloide específico y su rol dentro de un organismo vivo ha llevado a estudiar y entender el por qué son producidos y degradados, determinar su estructura le ha permitido a investigadores sintéticos proponer rutas para su generación.⁶

Dentro del amplio arsenal de metabolitos secundarios, específicamente aquellos que contienen nitrógeno, existe un grupo de compuestos que exhiben al fragmento nitrílico como característica estructural particular. El estudio de estos compuestos, clasificados como cianogénicos, ha generado numerosas publicaciones que buscan determinar, aclarar y consolidar las diversas hipótesis que se tienen acerca de sus rutas biosintéticas, funciones y roles en el desarrollo y sostén de las plantas que los poseen. Por ejemplo, mientras se han encontrado niveles de ácido prúsico (HCN) en diferentes plantas superiores no cianogénicas, en plantas como la *Hevea brasiliensis,* con un porcentaje mayor al 80% de compuestos cianogénicos, no se detecta la generación de HCN.⁷

La mayoría de información disponible que involucra el estudio de compuestos cianogénicos se centra en aquellos con uno o más fragmentos glucosídicos, denominados glucósidos cianogénicos. La amigdalina presente en las almendras, semillas de melocotón, cerezas y ciruelas, la prunasina en las ciruelas negras y las manzanas, la linamarina y la lotaustralina en algunas especies de trigo y yuca, y el dhurrin que se encuentra en el sorgo, centeno y trigo, son algunos ejemplos de esta familia de compuestos.^{8–14} Aún más extraño, intrigante y difícil de explicar es la presencia en la naturaleza de metabolitos sin el fragmento glucosídico, como el alcaloide girgensohnina, el cual exhibe similitudes estructurales con el glucosído cianogénico dhurrin.

La girgensohnina es un metabolito cianogénico presente en la *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae) extraído con un rendimiento de no más del 0,05%. La escasez de este alcaloide de manera natural se ha evidenciado en trabajos que buscaron su extracción y aislamiento, pero informaron su ausencia en el material evaluado.^{15,16} Diferentes factores como la baja proporción de compuestos cianogénicos no glucosídicos en la naturaleza y su uso como mecanismo de defensa química contra insectos y herbívoros, los resultados desalentadores alcanzados al tratar de aislar a la girgensohnina y su clasificación como α -aminonitrilo llevaron a la búsqueda de estrategias sintéticas para su generación.

Aunque su elucidación estructural se remonta a 1946, solo hasta el 2013 Vargas y colaboradores del LQOBio reportaron la síntesis de este alcaloide y de sus primeros análogos α -aminonitrílicos empleando la reacción de Strecker. Se utilizó piperidina, *p*-hidroxibenzaldehído, NaCN y cantidades catalíticas de InCl₃, obteniéndose el alcaloide natural con un rendimiento del 76%.¹⁷ Bajo esta metodología y empleando piperonal, *p*-hidroxibenzaldehído y piperidinas sustituidas se sintetizaron tres nuevos análogos. La evaluación de su acción inhibitoria sobre la enzima AChE y su capacidad antioxidante mostraron que el análogo sintetizado empleando piperonal inhibía a la AChE en un mayor grado que la girgensohnina. Este resultado indicó que el alcaloide natural podría convertirse en un compuesto líder, el cual, sujeto a transformaciones químicas, podría ofrecer nuevos análogos con bioactividades más potentes.

De acuerdo con las características de los α -aminonitrilos anteriormente expuestas y a los resultados encontrados para el alcaloide girgensohnina, nuestro estudio se centró en: i) el diseño de α -aminonitrilos a partir de la estructura de girgensohnina; ii) la determinación y análisis de sus propiedades ADMETox *in silico*, con base en la regla de Lipinski y iii) la preparación de una quimioteca de nuevos análogos del alcaloide girgensohnina.

2.3. EXPERIMENTAL

2.3.1. Diseño racional: virtual screening y propiedades moleculares. Se realizó un estudio computacional de todos los compuestos propuestos para predecir sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME-Tox). Se determinaron tanto sus parámetros de Lipinski así como de descriptores de área de la superficie polar (TPSA) y número de enlaces rotables (NER) empleando los recursos en línea Molinspiration, ALOGPS y OsirisWarrior software (1).^{18,19} Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos calculados para la girgensohnina 1 y los aminonitrilos propuestos 2-71.



Comp.	R1	R2	R₃	n	x	R4	R₅	Formula	РМ	LogP	LogS	nON	nOHN H	NER	tPSA
									≤500	≤5	-4≤-2	≤10	≤5	≤10	≤140
1	Н	OH	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216.28	2.05	-2.77	3	1	2	47.26
2	Н	OMe	Н	1	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O$	230.32	2.38	-3.10	3	0	3	36.26
3	Н	OMe	Н	1	CH_2	Me	Н	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.33	2.63	-3.42	3	0	3	36.26
4	н	OMe	Н	1	CH ₂ Me	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.34	2.63	-3.42	3	0	3	36.27
5	Н	OMe	Н	1	CH_2	Н	ОН	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	1.51	-2.46	4	1	3	56.49
6	Н	OMe	Н	0	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216,28	2.05	-2.79	3	0	3	36.26
7	н	OMe	Н	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28	1.46	-2.31	4	0	3	45.49
8	н	OMe	Н	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_{3}O$	245.32	1.54	-2.39	4	0	3	39.50
9	н	OMe	Н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275.35	1.06	-2.11	5	1	5	59.73
10	н	OMe	Н	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O$	278.35	3.09	-4.29	3	0	3	36.26
11	н	OMe	OMe	1	CH_2	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	260.33	2.33	-3.22	4	0	4	45.49
12	Н	OMe	OMe	1	CH_2	Ме	Н	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.36	2.59	-3.54	4	0	4	45.49
13	н	OMe	OMe	1	CH ₂ Me	Н	н	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.36	2.58	-3.54	4	0	4	45.49
14	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	н	ОН	C15H20N2O3	276.33	1.47	-2.58	5	1	4	65.72

15	Н	OMe	OMe	0	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	1.99	-2.91	4	0	4	45.49
16	н	OMe	OMe	1	0	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	262.30	1.40	-2.44	5	0	4	54.72
17	н	OMe	OMe	1	NMe	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275.35	1.45	-2.51	5	0	4	48.73
18	н	OMe	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₃	305.37	1.00	-2.23	6	1	6	68.96
19	н	OMe	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.37	3.02	-4.40	4	0	4	45.49
20	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	н	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	290.36	2.29	-3.34	5	0	5	54.72
21	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Ме	н	$C_{17}H_{24}N_2O_3$	304.38	2.56	-3.66	5	0	5	54.72
22	OMe	OMe	OMe	1	CH ₂ Me	Н	н	$C_{17}H_{24}N_2O_3$	304.38	2.56	-3.66	5	0	5	54.72
23	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	ОН	$C_{16}H_{22}N_2O_4$	306.36	1.43	-2.70	6	1	5	74.95
24	OMe	OMe	OMe	0	CH_2	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_3$	276.33	1.94	-3.03	5	0	5	54.72
25	OMe	OMe	OMe	1	0	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_4$	292.33	1.36	-2.56	6	0	5	63.95
26	OMe	OMe	OMe	1	NMe	Н	Н	$C_{16}H_{23}N_3O_3$	305.37	1.42	-2.63	6	0	5	57.96
27	OMe	OMe	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{17}H_{25}N_3O_4$	335.40	0.96	-2.35	7	1	7	78.19
28	OMe	OMe	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{20}H_{22}N_2O_3$	338.40	2.97	-4.52	5	0	5	54.72
29	н	OCH ₂ O	-	1	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	244.29	2.22	-3.00	4	0	2	45.49
30	н	OCH ₂ O	-	1	CH_2	Me	Н	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32	2.49	-3.32	4	0	2	45.49
31	н	OCH ₂ O	-	1	CH ₂ Me	Н	Н	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32	2.49	-3.32	4	0	2	45.49
32	н	OCH ₂ O	-	1	CH ₂	Н	ОН	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	260.29	1.33	-2.36	5	1	2	65.72
33	н	OCH ₂ O	-	0	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{14}N_2O_2$	230.26	1.90	-2.69	4	0	2	45.49
34	н	OCH ₂ O	-	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	246.26	1.28	-2.22	5	0	2	54.72
35	н	OCH ₂ O	-	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{17}N_3O_2$	259.30	1.34	-2.29	5	0	2	48.73
36	н	OCH ₂ O	-	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{19}N_3O_3$	289.33	0.87	-2.01	6	1	4	68.96
37	н	OCH ₂ O	-	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{16}N_2O_2$	292.33	2.91	-4.18	4	0	2	45.49
38	н	ОН	OMe	1	CH ₂	Н	н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	2.03	-2.88	4	1	3	56.49
39	Н	ОН	OMe	1	CH ₂	н	ОН	C14H18N2O3	262.30	1.12	-2.24	5	2	3	76.72

40	н	OH	OMe	0	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28	1.71	-2.57	4	1	3	56.49
41	Н	ОН	OMe	1	0	Н	н	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248.28	1.10	-2.10	5	1	3	65.72
42	Н	ОН	OMe	1	NMe	Н	н	$C_{14}H_{19}N_3O_2$	261.32	1.17	-2.17	5	1	3	59.73
43	Н	ОН	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	$C_{15}H_{21}N_3O_3$	291.35	0.72	-1.89	6	2	5	79.96
44	Н	ОН	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O_2$	294.35	2.73	-4.06	4	1	3	56.49
45	Н	OMe	ОН	1	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	2.03	-2.88	4	1	3	56.49
46	Н	OMe	ОН	1	CH ₂	Н	ОН	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	262.30	1.11	-2.24	5	2	3	76.72
47	Н	OMe	ОН	0	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28	1.69	-2.57	4	1	3	56.49
48	Н	OMe	ОН	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248.28	1.09	-2.10	5	1	3	65.72
49	Н	OMe	OH	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_3O_2$	261.32	1.17	-2.17	5	1	3	59.73
50	Н	OMe	OH	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_3$	291.35	0.69	-1.89	6	2	5	79.96
51	Н	OMe	OH	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O_2$	294.35	2.71	-4.06	4	1	3	56.49
52	Н	OBz	Н	1	CH_2	Н	Н	$C_{20}H_{22}N_2O$	306.40	3.77	-4.93	3	0	5	36.26
53	Н	OBz	Н	0	CH ₂	Н	Н	$C_{19}H_{20}N_2O$	292.37	3.45	-4.61	3	0	5	36.26
54	Н	OBz	Н	1	0	Н	Н	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.37	2.84	-4.14	4	0	5	45.49
55	Н	OBz	Н	1	Ph	Н	-	$C_{24}H_{22}N_2O$	354.44	4.44	-6.08	3	0	5	36.26
56	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3$	243.35	2.52	-3.16	2	0	3	30.27
57	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH ₂	Me	Н	$C_{16}H_{23}N_3$	257.37	2.80	-3.48	2	0	3	30.27
58	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH ₂ Me	Н	Н	$C_{16}H_{23}N_3$	257.37	2.81	-3.48	2	0	3	30.27
59	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Н	OH	$C_{15}H_{21}N_{3}O$	259.35	1.64	-2.52	3	1	3	50.5
60	Н	N(Me) ₂	Н	0	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_3$	229.32	2.18	-2.85	2	0	3	30.27
61	Н	N(Me) ₂	Н	1	0	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_{3}O$	245.32	1.59	-2.37	3	0	3	39.5
62	Н	N(Me) ₂	Н	1	NMe	Н	Н	$C_{15}H_{22}N_4$	258.36	1.66	-2.45	3	0	3	33.51
63	Н	N(Me) ₂	Н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{16}H_{24}N_4O$	288.39	1.18	-2.17	4	1	5	53.74
64	Н	N(Me) ₂	н	1	Ph	Н	-	C ₁₉ H ₂₁ N ₃	291.39	3.19	-4.34	2	0	3	30.27

65	Н	CI	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{15}CIN_2$	234.72	2.98	-3.60	2	0	2	27.03
66	н	Cl	н	0	CH_2	Н	Н	$C_{12}H_{13}CIN_2$	220.70	2.66	-3.29	2	0	2	27.03
67	н	CI	н	1	0	н	н	C ₁₂ H ₁₃ CIN ₂ O	236.70	2.01	-2.81	3	0	2	36.26
68	Н	Cl	н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{15}CIN_2$	282.77	3.67	-4.79	2	0	2	27.03
69	н	Н	н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{16}N_2$	248.32	3.11	-4.17	2	0	2	27.03
70	н	ОН	Н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{16}N_2O$	264.32	2.72	-3.95	3	1	2	47.26
71	1-Ph	-	Н	1	Ph	Н	-	$C_{21}H_{18}N_2$	298.38	4.03	-5.54	2	0	2	27.03

PM: Peso molecular (g/mol); LogP: coeficiente de partición n-octanol-agua; LogS: solubilidad acuosa; nON: aceptores de enlaces de hidrógeno (expresados como la suma de Ns y Os); nOHNH: donadores de enlaces de hidrógeno (expresados como la suma de OHs y NHs); NER: número de enlaces rotables y TPSA: área de superficie polar topológica.

2.3.2. Consideraciones generales. Los precursores empleados se adquirieron de las casas comerciales Merck, Sigma-Aldrich y J.T. Baker. Los aldehídos sólidos se usaron sin previa purificación mientras que las aminas y los aldehídos líquidos se destilaron antes de su uso. Todos los disolventes anhidros se secaron y purificaron mediante técnicas estándar justo antes de su uso. El progreso de las reacciones se controló usando cromatografía en capa fina sobre placas de alúmina Silufol UV 254 TLC. La cromatografía en columna se llevó a cabo usando gel de alúmina (100-200) y una mezcla apropiada de éter de petróleo/acetato de etilo para la elución.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato de punto de fusión de Fisher Johns. Los análisis elementales se realizaron en un analizador PerkineElmer 2400 Series II. Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro Lumex Infralum FT-02 y los valores se expresan como v_{max} cm⁻¹. Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890a Serie II con un detector selectivo de masas HP 5972 con un sistema de datos MS ChemStation de HP para la identificación de EM a 70 eV utilizando una columna capilar de 60 m recubierta con HP-5 [5% de fenilpoli(dimetilsiloxano)]. Los espectros RMN de ¹H y ¹³C se midieron en un espectrómetro Bruker AM-400 (400 MHz RMN ¹H y 100 MHz RMN ¹³C), usando CDCl₃ o DMSO-d6 como disolventes. TMS se usó como un estándar interno. Los cambios químicos (δ) y los valores *J* se informan en ppm y Hz, respectivamente. En los espectros DEPT-135, las señales de los carbonos CH₃ y CH como positivas (+) y CH₂ se muestran negativas (-). Los carbonos cuaternarios no se muestran.

El patrón de difracción de polvo se registró a temperatura ambiente (298 K) en un difractómetro Bruker D8 Advance trabajando en la geometría de Bragg-Brentano usando radiación CuK α (λ = 1,541 84 Å), operando a 40 kV y 40 mA. El patrón se registró en pasos de 0.0156° (20), de 5° hasta 50° a 0.8 s/step⁻¹. El difractómetro estaba equipado con ranuras de Soller primaria y secundaria de 2,5°, rendija de divergencia de 0,6 mm, filtro de Ni de 0,02 mm y un detector LynxEye.

Para el estudio de difracción de rayos X de monocristal se seleccionó un prisma amarillo bajo el microscopio y se cortó en un fragmento con dimensiones de 0,200 x 0,200 x 0,200 mm. Luego se montó en un MicroLoop MiTeGen de doble espesor de 200 µm unido a un cabezal de goniómetro XYZ. El conjunto se transfirió a un difractómetro Rigaku XtaLAB PRO equipado con un detector Pilatus 200 K y una óptica SHINE (monocromador de grafito curvo). La recolección de los datos de intensidad se llevó a cabo a 293 K con radiación MoK α ($\lambda = 0.71075$ Å) desde un tubo sellado y el difractómetro operando a 50 kV y 40 mA. Se recolectó un total de 720 imágenes en dos conjuntos de datos (360 imágenes cada uno) con 20 = - 19.9306° y ω = 0° como valores iniciales y valores λ / χ de 0° / 45° y 90° / 45°, respectivamente. Las imágenes se recogieron en pasos de 0,50° en ω con un tiempo de exposición por imagen de 25.00 s. La distancia entre el cristal y el detector se optimizó a 45.2051 mm. No se observó descomposición del cristal durante la recolección de datos.

Los parámetros de la celda unitaria final se determinaron a partir de las posiciones de 3143 reflexiones en el rango $1,9^{\circ} \le \theta \le 23,2^{\circ}$ y posteriormente se refinaron mediante mínimos cuadrados. La absorción, la forma, el factor de escala, entre otras correcciones, se realizaron mediante una rutina de exploración múltiple utilizando una función de forma basada en armónicos esféricos. El paquete CrystalClear-SM Expert se utilizó para la recopilación de datos, determinación, integración y reducción de celdas unitarias. La estructura se resolvió con SHELXT y se refinó mediante mínimos cuadrados de matriz completa con SHELXL, implementado dentro del software OLEX2. Las posiciones y los parámetros de desplazamiento anisotrópico se refinaron para todos los átomos que no son de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno se identificaron en el mapa de Fourier diferente y se refinaron utilizando un modelo de conducción con su Uiso igual a 1.2Ueq del átomo de carbono (átomos de carbono aromáticos, secundarios y terciarios) a los que están unidos. A los átomos de hidrógeno de los grupos metilo se les asignó Uiso = 1.3Ueq

del átomo de carbono correspondiente. Diamond 2.1e. se usó para gráficos. Platon y enCIFer se utilizaron para la validación de estructuras y la edición de CIF.

2.3.3. Obtención del precursor acetona cianhídrina. A un balón provisto de un embudo de adición, un condensador, un termómetro y agitación constante, se adicionó una disolución de cianuro de sodio (15.12 g), acetona (30 mL) y agua (36 mL). Posteriormente se adicionó lentamente una disolución de H₂SO₄ al 40% por espacio de 1.5 horas a 15 °C. Después de completarse la adición, la disolución ácida se agitó por 20 min. más hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se decantó la disolución, se extrajo con éter etílico y se dejó sobre sulfato de sodio por 2 horas después de lo cual se concentró y se destiló a presión reducida. El producto final (19.53 g) se almacenó protegido de la luz a -5 °C para su posterior uso. La acetona cianhídrina se obtuvo con un rendimiento del 75% como un líquido incoloro. IR (KBr): 3410 _{V(O-H)}, 2245 _{V(CN)}, 1373 _{V(C-N)} cm⁻¹. Fórmula empírica: C₄H₇NO (P.M. 85.11 g/mol). Las demás características están de acuerdo con los datos referidos en la literatura.^{20,21}

2.3.4. Preparación del catalizador ácido soportado en gel de sílice SSA. Se cargó un baloón de fondo redondo con gel de sílice (15.0 g) y se acondicionó un sistema de agitación y una trampa de gases para observar el burbujeo característico producto del desprendimiento de gas (HCI) durante la reacción. el ácido clorosulfónico (5.83 g) se agregó gota a gota lentamente a temperatura ambiente hasta que no se observó generación de gases. Se dejó el sistema por media hora más, obteniendo 19.2 g de catalizador ácido sólido de color blanco, el cual fue almacenado a temperatura ambiente.^{22,23} La cantidad de H⁺ en el catalizador se determina por titulación ácido-base. La liberación de H₃O⁺ se titula con una solución de NaOH estándar calculándose así la cantidad de H⁺ como 0.05 g de catalizador soportado/0.13 mmoles.

2.3.5. Procedimiento general para la síntesis de derivados αaminonitrílicos. Los análogos se sintetizaron usando una reacción de Strecker modificada de la siguiente manera: En un balón de fondo redondo de 100 mL de capacidad y dos bocas, acoplado a un condensador, se depositó una mezcla equimolar de benzaldehído (1 mmol) y amina cíclica (1,1 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se añadieron entonces la fuente de cianuro seleccionando entre KCN (método A) y acetona cianhídrina (método B) (1,5 mmol) y el catalizador SSA (1: 1 en peso) empleando acetonitrilo como disolvente (15-20 mL) a temperatura ambiente (16-24 h) (Esquema 30).

Esquema 30. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.



El progreso de la reacción se monitoreó por TLC (éter: acetato de etilo, 10: 1). A continuación, la mezcla de reacción se filtró y evaporó del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina (100-200 mesh) eluyendo con éter de petróleo: acetato de etilo (15:1) para proporcionar sólidos blancos con puntos de fusión definidos.

- 2-(4-Hidroxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**1**). Sólido blanco; P.f. 115-117 °C; Rto: a. 68%, b. 73%; IR (KBr): 2232 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 9.61 (1H, sa, OH), 7.22 (2H, d, J = 8.5 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.80 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.11 (1H, s, 1-H), 2.40 (4H, m, 2-H_{pip} y 6-H_{pip}), 1.51 (4H, m, 3-H_{pip} y 5-H_{pip}), 1.39 (2H, m, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 157.5, 128.9 (2C), 123.6, 116.2, 115.2 (2C), 60.9, 50.0 (2C), 25.2 (2C), 23.6; CG-EM (70 eV): t_R = 18.9 min, m/z = 216 (M^{+•}, 17), 132 (48), 85 (15), 84 (100), 77 (12); análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O: C, 72.19; H, 7.46; N, 12.95 - 2-(4-Metoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**2**). Sólido blanco; P.f. 78-79 °C; Rto: a. 66%; IR (KBr): 2222, 1250, 849, 818 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (2H, dd, *J* = 8.3, 2.9 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.76 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.51 (4H, ddd, *J* = 10.7, 6.9, 3.9 Hz, 2,6-H_{pip}), 1.59 (4H, pd, *J* = 13.0, 6.8 Hz, 3,5-H_{pip}), 1.47 (2H, dd, *J* = 5.5, 5.5 Hz, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 159.9, 129.2 (2C), 125.6, 116.0, 114.0 (2C), 62.6, 55.3, 51.0 (2C), 25.9 (2C), 24; ESI-EM: m/z = 483.1 (2M^{+•} + Na), 253.2 (M^{+•} + Na), 231.3 (M^{+•} + H), 204.4; análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O: C, 73.01; H, 7.88; N, 12.16.

- 2-(4-Metoxifenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**3**). Sólido blanco; P.f. 57-58 °C; Rto: a. 66%; IR (KBr): 2931, 2221, 1604, 1511, 1450, 1249, 817 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (2H, dd, J = 8.5, 3.2 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.23 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.52 (1H, m, 2-H_{Pip}), 2.50 (1H, m, 6-H_{ax,pip}), 2.08 (1H, td, J = 8.8, 2.5 Hz, 6-H_{eq,pip}), 1.71 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.69 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.54 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.38 (1H, m, 5-H_{ax,pip}), 1.35 (1H, m, 3-H_{ax,pip}), 1.33 (1H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.22 (3-H, d, J = 6.1 Hz, 2-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 159.8, 129.1 (2C), 126.3, 115.6, 114.1 (2C), 56.8, 55.6, 55.5, 47.6, 35.3, 25.9, 24.7, 20.6; ESI-EM: m/z = 511.1 (2M^{+•} + Na), 218.3; análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O: C, 73.74; H, 8.25; N, 11.47.

- 2-(4-Metoxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**4**). Sólido blanco; P.f. 95-96 °C; Rto: a. 88%; IR (KBr): 2931, 2885, 2221, 1604, 1511, 1450, 1265, 833 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (2H, dd, J = 8.4, 3.2 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.89 (1H, dt, J = 4.5, 2.0 Hz, 6-H_{eq,pip}), 2.56 (1H, m, 2-H_{eq,pip}), 2.49 (1H, dd, J = 11.2, 2,6 Hz, 6-H_{ax,pip}), 2.06 (1H, td, J = 11.40, 2.7 Hz, 2-H_{ax,pip}), 1.70 (1H, dq, J = 5.9, 2.6 Hz, 5-H_{eq,pip}), 1.57 (1H, qd, J = 5.9, 3.0 Hz, 3-H_{eq,pip}), 1.42 (1H, m, 4-H_{Pip}), 1.34 (1H, ddd, J = 11.5, 4.0, 4.0 Hz, 5-H_{ax,pip}), 1.09 (1H, ddd, J = 12.0, 4.0, 3.9 Hz, 3-H_{ax,pip}), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, 4-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz): δ 160.1, 129.4 (2C), 125.9, 116.2, 114.6 (2C), 62.4,

55.6, 53.5, 47.4, 34.6, 34.1, 30.7, 22.1; ESI-EM: m/z = 511.1 ($2M^{+\bullet}$ + Na), 267.1 ($M^{+\bullet}$ + Na), 218.3; análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O: C, 73.74; H, 8.25; N, 11.47.

- 2-(3-Hidroxipiperidin-1-il)-2-(4-metoxifenil)acetonitrilo (**5**). Líquido amarillo; Rto: a. 40%; IR (KBr): 2221, 1604, cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.40 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 6.91 (2H, m, 3,5-H_{Ar}), 4.79 (1H, s, 1-H), 3.81 (4H, m, OCH₃ y 3-H_{pip}), 2.55 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 2.26 (1H, sa, OH), 1.77 (2H, m, 5-H_{pip}), 1.55 (2H, m, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz): δ 160.3, 129.4 (2C), 125.1, 115.7, 114.4 (2C), 66.72, 62.1, 57.4, 55.6, 49.9, 31.9, 21.77; ESI-EM: m/z = 515.6 (2M^{+•} + Na), 269.3 (M^{+•} + Na), 247.3 (M^{+•} + H), 219.3 (M^{+•} - CN), 146.0; análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₂: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37.

- 2-(4-Metoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**6**). Líquido amarillo; Rto: a. 63%; IR (KBr): 2221, 1249 cm⁻¹. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (2H, dd, *J* = 8.4, 3.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.90 (2H, dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.97 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.63 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.82 (4H, m, 3,4-H_{pir}); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 190.9, 159.9, 132.1, 129.0, 126.5, 116.5, 114.4, 114.2, 58.8, 55.7, 55.4, 50.3, 23.5. ESI-EM: m/z = 455.1 (2M^{+•} + Na), 239.2 (M^{+•} + Na), 217.4 (M^{+•} + H), 190.5; análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O: C, 72.19; H, 7.46; N, 12.95.

- 2-(4-Metoxifenil)-2-morfolinoacetonitrilo (7). Sólido blanco; P.f. 79-80 °C; Rto: a. 57%; IR (KBr): 2222, 1250, 1188 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (2H, dd, J = 8.6, 3.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.91 (2H, dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 2.55 (4H, m, 2,6-H_{morf}), 3.70 (4H, m, 3,5-H_{morf}). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 160.4, 114.5 (2C), 124.7, 115.9, 129.6 (2C), 67.0 (2C), 62.1, 55.7, 50.3 (2C). ESI-EM: m/z = 487.0(2M^{+•} + Na), 255.1 (M^{+•} + Na), 206.3; análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O₂: C, 67.22; H, 6.94; N, 12.06.

- 2-(4- Metoxifenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (8). Sólido blanco; P.f. 118-119 °C; Rto: a. 58%; IR (KBr): 2222, 1250 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (2H, dd, *J* = 8.9, 3.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.89 (2H, dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.76 (1H, s,

1-H), 3.80 (3H, s, OCH₃), 2.43 (8H, m, 2-6-H_{pipz}), 2.26 (3H, s, 7-H_{N-Me}). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 160.7, 129.81 (2C), 125.50, 116.1, 114.5 (2C), 61.6, 55.5, 54.9 (4C), 46; ESI-EM: m/z = 513.1 (2M^{+•} + Na), 268.1 (M^{+•} + Na), 246.3 (M^{+•} + H), 219.3; análisis calculado para C₁₄H₁₉N₃O: 68.54; H, 7.81; N, 17.13.

- 2-(4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il)-2-(4-metoxifenil)acetonitrilo (**9**). Sólido blanco; P.f. 101-102 °C; Rto: a. 56%; IR (KBr): 2222 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (2H, dt, *J* = 8.3, 3.0, 0.8 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.91 (2H, dd, *J* = 8.8, 3.1 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.79 (1H, s, 1-H), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.60 (2H, m, 8- H_{pipz}), 2.57 (11H, m, 2-7-H_{pipz} y - OH) ; RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 160.3, 129.5 (2C), 125.1, 115.9, 114.4 (2C), 61.8, 59.3, 58.0, 55.7, 52.8 (4C); ESI-EM: m/z = 573.7 (2M^{+•} + Na), 298.4 (M^{+•} + Na), 249.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃O₂: C, 65.43; H, 7.69; N, 15.26.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-metoxifenil)acetonitrilo (**10**). Sólido blanco; P.f. 98-99 °C; Rto: a. 56%; IR (KBr): 2221 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz, 2,6-H_{Ar}), 7.15 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 7,00 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.94 (2H, dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.02 (1H, s, 1-H), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.76 (2H, s, 1-H_{THIQ}), 2.90 (4H, m, 3-4- H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 160.8, 134.4, 134.3, 129.8 (2C), 129.4, 127.2, 127.0, 126.4, 125.5, 116.1, 114.7 (2C), 61.8, 55.5, 52.4, 47.5, 29.3; ESI-EM: m/z = 579.0 (2M^{+•} + Na), 301.1 (M^{+•} + Na), 279.1 (M^{+•} + H), 252.2; análisis calculado para C₁₈H₁₈N₂O: C, 77.67; H, 6.52; N, 10.06.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**11**). Sólido blanco; P.f. 60-62 °C; Rto: a. 72%, b. 75%; IR (KBr): 2229, 1250 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.16 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 4.38 (1H, s, 1-H), 2.95 (6H, s, 3,4-OCH₃), 1.72-1.54 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 0.79-0.64 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 0.59 (2H, d, J = 5.2 Hz, 4-H_{pip}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 149.9, 149.0, 126.8, 120. 8, 117.1, 112.4, 112.0, 62.1, 56.4 (2C), 51.1 (2C), 26.2 (2C), 24.6; CG-EM (70 eV): t_R = 20.7 min, m/z = 260 (M^{+•}, 6),
132 (48), 85 (15), 84 (100), 77 (12); análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O₂: C, 69.20; H, 7.74; N, 10.76.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**12**). Sólido blanco; P.f. 94-95 °C; Rto: a. 91%; IR (KBr): 2221, 1604, 1511, 1450, 1249 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (1H, dd, J = 8.3, 1.3 Hz, 6-H_{Ar}), 7.00 (1H, d, J = 1.5 Hz, 2-H_{Ar}), 6.85 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 5.24 (1H, s, 1-H), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.53 (1H, m, 2-H_{Pip}), 2.52 (1H, m, 6-H_{ax,pip}), 2.08 (1H, td, J=11.2 Hz, J=2.3 Hz, 6-H_{eq,pip}), 1.72 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.70 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.55 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.38 (1H, m, 5-H_{ax,pip}), 1.35 (1H, m, 3-H_{ax,pip}), 1.33 (3H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.22 (3-H, d, J = 6.1 Hz, 2-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 149.3, 126.7, 120.2, 115.5, 110.9, 110.6, 57.1, 56.1, 56.0, 55.6, 55.2, 47.8, 35.3, 26.0, 24.6, 20.5; ESI-EM: m/z = 843.1 (3 M^{+•} + H), 571.1 (2M^{+•} + Na), 248.3; análisis calculado para C₁₆H₂₂N₂O₂: C, 70.04; H, 8.08; N, 10.21.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**13**). Sólido blanco; P.f. 88-87 °C; Rto: a. 82%; IR (KBr): 2206, 1619, 1465 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.08 (1H, ddd, *J* = 8.3, 1.3, 0.8 Hz, 6-H_{Ar}), 7.00 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 2-H_{Ar}), 6.84 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.88 (1H, dt, *J* = 6.8, 4.6 Hz, 6-H_{eq,pip}), 2.56 (1H, m, 2-H_{eq,pip}), 2.50 (1H, td, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 6-H_{ax,pip}), 2.05 (1H, td, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 2-H_{ax,pip}), 1.70 (1H, dt, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 5-H_{eq,pip}), 1.57 (1H, dt, *J* = 7.7, 2.7 Hz, 3- H_{eq,pip}), 1.42 (1H, m, 4-H_{Pip}), 1.33 (1H, qd, *J* = 8.3, 7.7, 3.9 Hz, 5-H_{ax,pip}), 1.09 (1H, qd, *J* = 8.9, 7.7, 4.0 Hz, 3-H_{ax,pip}), 0.91 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 4-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 149.3, 149.2, 126.1, 120.2, 115.9, 110.7, 110.6, 62.4, 56.1, 56.0, 53.3, 47.3, 34.4, 33.9, 30.5, 21.8. ESI-EM: m/z = 571.1 (2M^{+•} + Na), 275.2 (M^{+•} + H), 248.3; análisis calculado para C₁₆H₂₂N₂O₂: C, 70.04; H, 8.08; N, 10.21.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(3-hidroxipiperidin-1-il)acetonitrilo (14). Sólido blanco; P.f.
71-72 °C; Rto: a. 41%; IR (KBr): 2206 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.06 (1H, ddd, *J* = 8.3, 2.2, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.95 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.84 (1H, d, *J* = 8.3)

Hz, 5-H_{Ar}), 4.79 (1H, s, 1-H), 3.87 (6H, s, OCH₃), 2.56 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.84 (1H, m, 4-H_{pip}), 1.71 (1H, m, 5-H_{pip}), 1.54 (2H, m, 4,5-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 149.7, 149.5, 125.5, 120.5, 115.7, 111.1, 110.8, 66.3, 62.4, 60.7, 56.3 (2C), 50.8, 31.9, 21.8; ESI-EM: m/z = 575.1 (2M^{+•} + Na), 299.1 (M^{+•} + Na), 277.2 (M^{+•} + H), 250.2; análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O₃: C, 65.20; H, 7.30; N, 10.14.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**15**). Sólido blanco; P.f. 69-70 °C; Rto: a. 56%, b. 58%; IR (KBr): 2229, 1273 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.27 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 4.62 (1H, s, 1-H), 3.06 (6H, s, 3,4-OCH₃), 1.88-1.77 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.04-1.01 (4H, m, 3,4-H_{pir}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.2, 150.1, 128.1, 120.8, 118.0, 112.8, 112.4, 58.9, 56.8 (2C), 50.9 (2C), 24.1 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 19.4 min, m/z = 246 (M^{+•}), 177 (29), 176 (100), 151 (6), 146 (6), 70 (34); análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₂: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37.

- 2-(3,4- Dimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo (**16**). Sólido blanco; P.f. 95-96 °C; Rto: a. 75%, b. 78%; IR (KBr): 2229, 1281, 1111 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.17 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 4.43 (1H, s, 1-H), 2.95 (6H, s, 3,4-OCH₃), 2.79 (4H, sa, 3,5-H,morf), 1.68 (2H, m, 6-H morf), 1.63-1.52 (2H, m, 2-H morf); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.1, 149.8, 125.9, 121.1, 117.0, 112.4, 112.2, 66.9, 61.6 (2C), 56.5 (2C), 50.4 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 21.0 min, m/z = 262 (M^{+•}), 177 (23), 176 (100), 86 (38), 56 (29); análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₃: C, 64.10; H, 6.92; N, 10.68.

- 2-(3,4- Dimetoxifenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**17**). Sólido blanco; P.f. 71-73 °C; Rto: a. 71%, b. 73%; IR (KBr): 2220, 1247 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.06 (1H, ddd, J = 8.3, 2.1, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.98 (1H, d, J = 2.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.83 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 4.76 (1H, s, 1-H), 3.87 (6H, s, 3,4-OCH₃), 2.74-2.16 (11H, m, 2-7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 149.6, 149.4, 125.6, 120.6, 115.8, 111.0, 110.9, 62.0, 56.2, 56.2, 55.1, 46.2 (4C); CG-EM (70 eV): t_R = 21.0 min,

m/z = 275 (M⁺•, 28), 176 (10), 99 (100), 70 (14), 56 (34); análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃O₂: C, 65.43; H, 7.69; N, 15.26.

- 2-(3,4-Dimetoxifenil)-2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)acetonitrilo (**18**). Líquido amarillo; Rto: a. 63%; IR (KBr): 2220, 1247 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.07 (1H, ddd, J = 8.3, 2.1, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.98 (1H, d, J = 2.1 Hz, 2-H_{Ar}), 6.84 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 3.88 (6H, s, 3,4-OCH₃), 3.60 (2H, td, J = 5.5, 0.6 Hz, 8-H_{pipz}), 2.74-2.16 (11H, m, 2-7-H_{pipz} y -OH); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 149.7, 149.5, 125.4, 120.6, 115.8, 111.0, 110.9, 62.0, 59.4, 58.0, 56.2 (2C), 52.8 (4C); ESI-EM: m/z = 633.1 (2M^{+•} + Na), 328.1 (M^{+•} + Na), 306.2 (M^{+•} + H), 279.2, 176.4; análisis calculado para C₁₆H₂₃N₃O₃: C, 62.93; H, 7.59; N, 13.76.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(3,4-dimetoxifenil)acetonitrilo (**19**). Sólido blanco; P.f. 99-100 °C; Rto: a. 52%, b. 50%; IR (KBr): 2220, 1247 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.16 (4H, m, 6-H_{Ar} y 5,7-H_{THIQ}), 7.08 (1H, d, J = 2.1 Hz, 2-H_{Ar}), 7.01 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.89 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 5.02 (1H, s, 1-H), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃), 3.88 (3H, s, 4-OCH₃), 3.78 (2H, s, 1-H_{THIQ}), 2.89 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 149.8, 149.6, 134.1 (2C), 129.1, 127.0, 126.8, 126.1, 125.7, 120.5, 115.9, 111.0, 110.7, 62.2, 56.3 (2C), 52.8 (4C), 47.5, 29.7; CG-EM (70 eV): t_R = 32.0 min, m/z = 308 (M⁺⁺, 3), 282 (10), 177 (47), 176 (91), 132 (100); análisis calculado para C₁₉H₂₀N₂O₂: C, 74.00; H, 6.54; N, 9.08.

- 2-(3,4,5-Trimetoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**20**). Sólido blanco; P.f. 115-117 °C; Rto: a. 87%, b. 83%; IR (KBr): 2221,1231 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.76 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1-H), 3.87 (6H, s, 3,5-OCH₃), 3.84 (3H, s, 4-OCH₃), 2.59-1.68 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.68-1.53 (4H, m, 3-5-H_{pip}),1.48 (2H, dd, J = 10.8, 5.2 Hz 4-H_{pip}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.6 (2C), 138.2, 129.4, 116.0, 104.8 (2C), 63.3, 61.2, 56.5 (2C), 51.2 (2C), 26.1 (2C), 24.2; CG-EM (70 eV): t_R = 21.2 min, m/z = 290 (M^{+•}), 207 (63), 206 (100), 192 (12), 176 (32), 84 (50); análisis calculado para C₁₆H₂₂N₂O₃: C, 66.18; H, 7.64; N, 9.65. - 2-(2-Metilpiperidin-1-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo (**21**). Sólido blanco; P.f. 62-63 °C; Rto: a. 70%; IR (KBr): 2216, 1620, 1465 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 5.23 (1H, s, 1-H), 3.86 (9H, s, OCH₃), 2.53 (1H, m, 2-H_{pip}), 2.51 (1H, m, 6-H_{ax,pip}), 2.08 (1H, td, J = 11.6, 2.7 Hz, 6- H_{eq,pip}), 1.71 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.70 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.57 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.41 (1H, m, 5-H_{ax,pip}), 1.40 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.39 (1H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.21 (3H, d, J = 6.4 Hz, 2-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 153.66 (2C), 138.1, 130.1, 115.7, 104.8 (2C), 61.2, 57.7, 56.5 (2C), 55.8, 48.2, 35.4, 26.2, 24.9, 20.7; ESI-EM: m/z = 631.8 (2M^{+•} + Na), 327.0 (M^{+•} + Na), 305.4 (M^{+•} + H), 278.0 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₇H₂₄N₂O₃: C, 67.08; H, 7.95; N, 9.20.

- 2-(4-Metilpiperidin-1-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo (**22**). Sólido blanco; P.f. 12-103 °C; Rto: a. 72%; IR (KBr): 2206, 1619, 1465 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 3.86 (9H, s, OCH₃), 2.88 (1H, m, 6-H_{eqpip}), 2.58 (1H, m, 2-H_{eq,pip}), 2.52 (1H, tt, J = 10.8, 3.0 Hz, 6- H_{ax,pip}), 2.07 (1H, tt, J = 11.2, 2.6 Hz, 2-H_{ax,pip}), 1.72 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.60 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.44 (1H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.34 (1H, ddd, J = 11.4, 4.0 Hz, 5-H_{ax,pip}), 1.11 (1H, ddd, J = 11.7, 3.5 Hz, 3-H_{ax,pip}), 0.93 (3H, d, J = 6.0 Hz, 4-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 153.7 (2C), 138.3, 129.5, 116.00, 104.9 (2C), 63.0, 61.2, 56.5, 53.5, 47.8, 41.3, 34.6, 34.2, 30,7, 22.0; ESI-EM: m/z = 631.8 (2M^{+•} + Na), 327.4 (M^{+•} + Na), 278.0 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₇H₂₄N₂O₃: C, 67.08; H, 7.95; N, 9.20.

2-(3-Hidroxipiperidin-1-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo (23). Sólido blanco;
P.f. 127-128 °C; Rto: a. 52%; IR (KBr): 2206, 1619, 1465 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6.71 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 3.85 (6H, s, 7,9-OCH₃), 3.83 (3H, s, 8-OCH₃), 2.70 (1H, m, 3-H_{pip}), 2.19 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.86 (1H, m, 4-H_{pip}), 1.74 (1H, m, 5-H_{pip}), 1.54 (2H, m, 4,5-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 153.7 (2C), 138.5, 128.7, 115.5, 105.0 (2C), 66.9, 62.77, 61.2, 56.5, 50.8, 31.9, 21.9; ESI-EM: m/z = 635.7 (2M^{+•} + Na), 329.4 (M^{+•} + Na), 307.4 (M^{+•} + H), 280.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₆H₂₂N₂O₄: C, 62.73; H, 7.24; N, 9.1.

- 2-(3,4,5-Trimetoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**24**). Sólido blanco; P.f. 91-93 °C; Rto: a. 86%, b. 82%; IR (KBr): 2220, 1235 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.73 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 4.97 (1H, s, 1-H), 3.87 (6H, s, 3,5-OCH₃), 3.84 (3H, s, 4-OCH₃), 2.71-2.59 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.89-1.78 (4H, m, 3,4-H_{pir}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.7 (2C), 138.3, 130.1, 116.5, 104.8 (2C), 61.2, 59.8, 56.5 (2C), 50.6 (2C), 23.8 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 20.0 min, m/z = 276 (M^{+•}), 207 (68), 206 (100), 192 (15), 176 (39), 70 (21); análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O₃: C, 65.20; H, 7.30; N, 10.14.

- 2-(3,4,5-Trimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo (**25**). Sólido blanco; P.f. 137-139 °C; Rto: a. 83%, b. 77%; IR (KBr): 2224,1248 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6,400 MHz) δ (ppm): 6.74 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 4.74 (1H, s, 1-H), 3.87 (6H,s, 3,5-OCH₃), 3.83 (3H, s, 4-OCH₃), 3.79-3.66 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 2.68-2.43 (4H, m, 2,6-H_{morf}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.7 (2C), 138.5, 128.2, 115.5, 105.1 (2C), 66.9 (2C), 62.8, 61.2, 56.5 (2C), 50.3 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 21.3 min, m/z = 292 (M^{+•}), 207 (52), 206 (100), 176 (14), 86 (20), 66 (14); análisis calculado para C₁₅H₂₀N₂O₄: C, 61.63; H, 6.90; N, 9.58.

- 2-(3,4,5-Trimetoxifenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**26**). Sólido blanco; P.f. 117-118 °C; Rto: a. 73%, b. 69%; IR (KBr): 2221,1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.73 (2H, d, J = 0.5 Hz, 2,6-H_{Ar}), 4.76 (1H, s, 1-H), 3.86 (6H, s, 3,5-OCH₃), 3.83 (3H, s, 4-OCH₃), 2.78-2.14 (11H, m, 2-6-H_{pip} y H-_{N-CH3}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.7 (2C), 138.4, 128.8, 115.6, 104.9 (2C), 62.4, 61.2, 56.5 (2C), 55.1 (2C), 46.2; CG-EM (70 eV): t_R = 22.1 min, m/z = 305 (M^{+•}), 305(26), 206 (16), 99 (100), 70 (14), 56 (31); análisis calculado para C₁₆H₂₃N₃O₃: C, 62.93; H, 7.59; N, 13.76.

2-(4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo (27). Sólido blanco; P.f. 117-118 °C; Rto: a. 69%; IR (KBr): 2221,1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.73 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 4.77 (1H, s, 1-H), 3.86 (6H, s, 3,5-

OCH₃), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.60 (2H, t, J = 5.3 Hz, 8-H_{pipz}), 2.63-2.53 (11H, m, 2-2-7-H_{pipz} y -OH). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.7 (2C), 138.4, 128.6, 115.6, 104.9 (2C), 62.4, 61.1, 59.4, 58.0, 56.5 (2C), 52.8 (4C); ESI-EM: m/z = 693.8 (2M^{+•} + Na), 336.0 (M^{+•} + H), 309.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₇H₂₅N₃O₄: C, 60.88; H, 7.51; N, 12.53.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo (**28**). Sólido blanco; P.f. 133-134 °C; Rto: a. 62%; IR (KBr): 2221,1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.15 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 7.04 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.83 (2H, s, 2,6-H_{Ar}), 5.02 (1H, s, 1-H), 3.88 (9H, s, 3-5-OCH₃), 3.79 (2H, m, 1-H_{THIQ}), 2.95 (2H, m, 4,-H_{THIQ}), 2.82 (2H, m, 3,-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 153.8 (2C), 138.4, 134.0 (2C), 129.1, 128.9, 126.9, 126.8, 126.2, 115.7, 104.8 (2C), 62.5, 61.2, 56.5 (2C), 53.0, 47.5, 29.6; CG-EM (70 eV): t_R = 33.9 min, m/z = 339 (M^{+•}), 206 (70), 132 (100), 192 (18), 176 (40); análisis calculado para C₂₀H₂₂N₂O₃: C, 70.99; H, 6.55; N, 8.28.

- 2-(3,4-Dioximetillenfenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**29**). Sólido blanco; P.f. 74-75 °C; Rto: a. 72%, b. 71%; IR (KBr): 2229, 1257 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.12 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 5.24 (2H, s, 3-OCH₂O), 4.36 (1H, s, 1-H), 1.70-1.52 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 0.77-0.62 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 0.58 (2H, d, J = 5.1 Hz, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.6, 148.4, 128.4, 121.9, 117.0, 108.9, 108.8, 102.4, 62.0, 51.1 (2C), 26.2 (2C), 24.6 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 20.0 min, m/z = 244 (M^{+•}), 161 (24), 160 (100), 84 (85); análisis calculado para C₁₄H₁₆N₂O₂: C, 68.83; H, 6.60; N, 11.47.

- 2-(3,4-Metilendioxifenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**30**). Sólido blanco; P.f. 80-81 °C; Rto: a. 68%; IR (KBr): 2190, 1604, 1249 cm⁻¹. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.02 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.7, 0.9 Hz, 6-H_{Ar}), 6.99 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, 2-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 5-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 3-OCH₂O), 5.18 (1H, s, 1-H), 2.54 (1H, m, 2-H_{pip}), 2.52 (1H, m, 6-H_{eq,pip}), 2.08 (1H, td, *J* = 11.2, 2.6 Hz, 6-H_{ax,pip}), 1.71 (1H, m, 3-H_{eq,pip}),

1.69 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.54 (1H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.38 (1H, m, 5-H_{ax,pip}), 1.35 (1H, m, 3-H_{ax,pip}), 1.33 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.20 (3H, d, J = 6.1 Hz, 2-CH₃). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 148.2, 147.9, 128.2, 121.2, 115.4, 108.1, 108.0, 101.5, 57.0, 55.5, 47.7, 35.3, 25.9, 24.6, 20.6. ESI-EM: m/z = 539.0 (2M^{+•} + Na), 281.1 (M^{+•} + Na), 232.3; análisis calculado para C₁₅H₁₈N₂O₂: C, 69.74; H, 7.02; N, 10.84.

- 2-(3,4-Metilendioxifenil)-2-(4-metilpiperidin-1-il) acetonitrilo (**31**). Sólido blanco; P.f. 88-89 °C; Rto: a. 81%; IR (KBr): 2221, 1604, 1249, 863 cm⁻¹. RMN-¹H (400 MHz CDCl₃): δ 7.03 (1H, dd, J = 1.8, 0.8 Hz, 6-H_{Ar}), 7.00 (1H, ddd, J = 2.9, 1.8 1.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, J = 7.9 Hz, 5-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 3-OCH₂O), 4.73 (1H, s, 1-H), 2.87 (1H, dt, J = 8.5, 4.9 Hz, 6-H_{eq,pip}), 2.57 (1H, dt, J = 8.9, 3.7 Hz, 2-H_{eq,pip}), 2.50 (1H, td, J = 11.2, 2.7 Hz, 6-H_{ax,pip}), 2.07 (1H, td, J = 11.5, 2.7 Hz, 2-H_{ax,pip}), 1.71 (1H, dq, J = 12.5, 7.0, 2.8 Hz, 5-H_{eq,pip}), 1.59 (1H, dq, J = 13.0, 7.3, 3.0 Hz, 3-H_{eq,pip}), 1.42 (1H, m, 4-H_{Pip}), 1.33 (1H, qd, J = 8.1 7.6, 4.0 Hz, 5-H_{ax,pip}), 1.11 (1H, qd, J = 8.7, 7.8, 3.9 Hz, 3-H_{ax,pip}), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, 4-CH₃). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 148.3, 148.1, 127.6, 121.4, 115.8, 108.3, 108.2, 101.5, 62.4, 53.3, 47.4, 34.5, 33.9, 30.5, 21.8. ESI-EM: m/z= 539.0 (2M⁺⁺ + Na), 281.1 (M⁺⁺ + Na), 232.3; análisis calculado para C₁₅H₁₈N₂O₂: C, 69.74; H, 7.02; N, 10.84.

- 2-(*Benzo[d]*[1,3]*dioxol-5-il*)-2-(3-*hidroxipiperidin-1-il*)*acetonitrilo* (**32**). Sólido amarillo claro; P.f. 91-92 °C; Rto: a. 42%; IR (KBr): 2190, 1604, 1249 cm⁻¹. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 6.98 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.6, 0.9 Hz, 5-H_{Ar}), 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, 2-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 6-H_{Ar}), 5.98 (2H, d, J = 1.4 Hz, 3-OCH₂O), 4.74 (1H, s, 1-H), 3.82 (1H, dq, m, *J* = 9.1, 3.1 Hz, 3-H_{pip}), 2.58 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 2.22 (1H, s, -OH), 1.84 (1H, m, 4-H_{pip}), 1.72 (1H, m, 4-H_{pip}), 1.55 (1H, m, 5-H_{pip} RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 148.5 (2C), 126.9, 121.7, 115.6, 108.1, 108.4 (2C), 101.8, 66.3, 62.3, 57.2, 51.0, 31.8, 21,8; ESI-EM: m/z = 543.0 (2M^{+•} + Na), 283.1 (M^{+•} + Na), 261.2 (M^{+•} + H), 234.3; análisis calculado para C₁₄H₁₆N₂O₃: C, 64.60; H, 6.20; N, 10.76. - 2-(3,4-Dioximetilenfenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**33**). Sólido blanco; P.f. 55-56 °C; Rto: a. 62%, b. 54%; IR (KBr): 2229, 1257 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.12 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 5.23 (2H, s, 3-OCH₂O), 4.51 (1H, s, 1-H), 1.78-1.71 (2H, m, 2-H_{pir}), 1.69-1.63 (2H, m, 5-H_{pir}), 0.92 (4H, m, 3,4-H_{pir}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.6, 148.4, 129.3, 121.8, 117.6, 109.0, 108.8, 102.3, 58.5, 50.6 (2C), 23.8 (2C). CG-EM (70 eV): t_R = 18.3 min, m/z = 230 (M^{+•}), 161 (23), 160 (100), 70 (20); análisis calculado para C₁₃H₁₄N₂O₂: C, 67.81; H, 6.13; N, 12.17.

- 2-(3,4-Dioximetilenfenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo (**34**). Sólido blanco; P.f. 118-119 °C; Rto: a. 78%, b. 79%; IR (KBr): 1250, 1119 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.13 (3H, m, 2,5,6-H_{Ar}), 5.24 (2H, s, 3-OCH₂O), 4.43 (1H, s, 1-H), 2.83-2.72 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 1.74-1.64 (2H, m, 6-H_{morf}), 1.61-1.53 (2H, m, 2-H_{morf}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.7, 148.6, 127.5, 122.3, 116.8, 109.0, 109.0, 102.4, 66.8, 61.5 (2C), 50.4 (2C). CG-EM (70 eV): t_R = 20.3 min, m/z = 246 (M^{+•}) 161 (21), 160 (100), 102 (14), 86 (69), 56 (64); análisis calculado para C₁₃H₁₄N₂O₃: C, 63.40; H, 5.73; N, 11.38.

- 2-(3,4-Dioximetilenfenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**35**). Sólido blanco; P.f. 84-86 °C; Rto: a. 68%, b. 71%; IR (KBr): 2227, 1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.00 (1H, ddd, J = 8.0, 1.8, 0.9 Hz, 6-H_{Ar}), 6.97 (1H, dd, J = 1.3, 0.5 Hz, 2-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, J = 8.0 Hz, 5-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 3-OCH₃O), 4.73 (1H, s, 1-H), 2.72-2.19 (11H, m, 2-7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.5, 148.4, 127.1, 121.8, 115.7, 108.5, 108.4, 101.8, 61.9, 55.1 (2C), 46.2; CG-EM (70 eV): t_R = 20.2 min, m/z = 259 (M^{+•}, 31), 160 (19), 99 (100), 70 (14), 56 (35); análisis calculado para C₁₄H₁₇N₃O₂: C, 64.85; H, 6.61; N, 16.20.

- 2-(*Benzo*[*d*][1,3]*dioxo*I-5-*i*I)-2-(4-(2-*hidroxieti*I)*piperazin*-1-*i*I)*acetonitrilo* (**36**). Sólido blanco; P.f. 129-130 °C; Rto: a. 68%; IR (KBr): 2221,1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.00 (1H, ddd, J = 8.0, 1.8, 0.8 Hz, 6-H_{Ar}), 6.97 (1H, d, J = 1.8 Hz, 2-H_{Ar}), 6.79 (1H, d, J = 8.0 Hz, 5-H_{Ar}), 5.98 (2H, s, 3-OCH₃O), 4.73 (1H, s,

1-H), 3.60 (2H, t, J = 5.5, 0,6 Hz, 8- H_{pipz}), 2.56 (11H, m, 2-7- H_{pipz} y -OH); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.5 (2C), 126.9, 121.8, 115.7, 108.5 (2C), 101.8, 62.0, 59.4, 58.0, 52.8 (4C); ESI-EM: m/z = 601.1 (2M^{+•} + Na), 312.1 (M^{+•} + Na), 290.1 (M^{+•} + H), 263.2; análisis calculado para C₁₅H₁₉N₃O₃: C, 62.27; H, 6.62; N, 14.52.

- 2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (**37**). Sólido blanco; P.f. 106-107 °C; Rto: a. 50%; IR (KBr): 2221,1247 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.11 (4H, m, 6 H_{Ar} y 5-7-H_{THIQ}), 7.06 (1H, d, J = 1.8 Hz, 2- H_{Ar}), 7.00 (1H, dd, J = 8.0, 2.3 Hz, 8-H_{THIQ}), 6.83 (1H, d, J = 8.0 Hz, 5-H_{Ar}), 6.00 (2H, q, J = 1.4 Hz, 7-H_{Ar}), 4.96 (1H, s, 1-H), 3.75 (2H, s, 1-H y 7-H_{Ar}), 2.90 (4H, m, 3-4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.6 (2C), 134.0 (2C), 129.1, 127.1, 126.9, 126.7, 126.2, 121.7, 115.8, 108.5 (2C), 101.8, 62.1, 52.6, 47.8, 29.58; CG-EM (70 eV): t_R = 31.4 min, m/z = 292 (M⁺⁺, 13), 266 (7), 160 (70), 132 (100); análisis calculado para C₁₈H₁₆N₂O₂: C, 73.95; H, 5.52; N, 9.58.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**38**). Sólido blanco; P.f. 133-135 °C; Rto: a. 72%, b. 65%; IR (KBr): 2230,1248 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.04 (1H, ddd, J = 8.2, 2.1, 0.8 Hz, 6-H_{Ar}), 7.00 (1H, d, J = 2.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.91 (1H, d, J = 8.2 Hz, 5-H_{Ar}), 5.72 (1H, sa, -OH), 4.75 (1H, s, 1-H), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃), 2.58-2.41 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.68-1.45 (6H, m, 3-5-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 146.9, 146.2, 125.6, 121.2, 116.2, 114.6, 110.4, 63.0, 56.4, 51.3 (2C), 26.1 (2C), 24.3; CG-EM (70 eV): t_R = 23.6 min, m/z = 246 (M^{+•} + 19), 162 (80), 163 (19), 85 (19), 84 (100); análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₂: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-(3-hidroxipiperidin-1-il)acetonitrilo (**39**). Líquido crema; Rto: a. 43%; IR (KBr): 2230,1248 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.01 (1H, dt, J = 8.2, 2.0 Hz, 6-H_{Ar}), 6.95 (1H, d, J = 1.8 Hz, 2-H_{Ar}), 6.90 (1H, dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 5-H_{Ar}), 4.77 (1H, s, 1-H), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 3.83 (1H, m, 3-H_{pip}), 2.58 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.79 (2H, m, 4a,5a-H_{pip}), 1.56 (2H, m, 4b,5b-H_{pip}); RMN-

¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.1, 146.5, 124.9, 121.3, 115.8, 114.8, 110.5, 66.9, 62.5, 62.4, 56.4, 50.0, 32.0, 21.8; ESI-EM: m/z = 547.6 (2M^{+•} + Na), 285.1 (M^{+•} + Na), 263.1 (M^{+•} + H), 236.1; análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₃: C, 64.10; H, 6.92; N, 10.68.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (40). Sólido blanco; P.f. 118-119 °C; Rto: a. 71%, b. 70%; IR (KBr): 2217, 1232 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.01 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 6-H_{Ar}), 6.98 (1H, d, J = 1.8 Hz, 2-H_{Ar}), 6.89 (1H, d, J = 8.1 Hz, 5-H_{Ar}), 4.95 (1H, s, 1-H), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃), 2.70-2.58 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.89-1.76 (4H, m, 3,4-H_{pir}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.0, 146.3, 126.3, 121.0, 117.0, 114.7, 110.3, 59.4, 56.3, 50.6 (2C), 23.7 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 20.1 min, m/z = 232 (M^{+•}), 207 (38), 206 (33), 138 (48), 137 (100), 70 (73); análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O₂: C, 67.22; H, 6.94; N, 12.06.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-morfolinoacetonitrilo (**41**). Sólido blanco; P.f. 107-109 °C; Rto: a. 72%, b. 68%; IR (KBr): 2236 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.02 (1H, ddd, J = 8.2, 2.1, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.98 (1H, d, J = 2.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.90 (1H, d, J = 8.2 Hz, 5-H_{Ar}), 4.73 (1H, s, 1-H), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃), 3.79-3.64 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 2.63-2.49 (4H, m, 2,6-H_{morf}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.1, 146.5, 124.4, 121.5, 115.7, 114.8, 110.6, 66.9 (2C), 62.4, 56.3, 50.2 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 23.9 min, m/z = 248 (M^{+•}, 29), 162 (100), 87 (24), 86 (55), 56 (39); análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O₃: C, 62.89; H, 6.50; N, 11.28.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**42**). Sólido blanco; P.f. 151-153 °C; Rto: a. 61%, b. 61%; IR (KBr): 2247, 1219 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 6.02 (1H, d, J = 1.7 Hz, 2-H_{Ar}), 5.95 (1H, dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 6-H_{Ar}), 5.91 (1H, d, J = 8.1 Hz, 5-H_{Ar}), 4.28 (1H, s, 1-H), 2.87 (3H, s, 3-OCH₃), 1.73-1.21 (11H, m, 2-7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 148.7, 148.0, 124.9, 121.3, 117.3, 116.3, 112.6, 61.4, 56.6, 55.4 (2C), 46.6; CG-EM (70 eV): t_R = 24.6 min, m/z = 261 (M⁺•, 37), 162 (46), 99 (20), 56 (36), 44 (21), 42 (16); análisis calculado para C₁₄H₁₉N₃O₂: C, 64.35; H, 7.33.

- 2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)acetonitrilo (**43**). Sólido blanco; P.f. 116-117 °C; Rto: a. 51%; IR (KBr): 2247, 1219 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.02 (1H, ddd, J = 8.2, 2.0, 0.6 Hz, 6-H_{Ar}), 6.97 (1H, d, J = 2.0 Hz, 2-H_{Ar}), 6.89 (1H, d, J = 8.2 Hz, 5-H_{Ar}), 4.76 (1H, s, 1-H), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 3.61 (2H, t, J = 5.5 Hz, 8-H_{pipz}), 2.57 (10H, m, 2-7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.1, 146.5, 124.8, 121.3, 115.9, 114.8, 110.5, 62.0, 59.4, 58.0, 56.3, 52.8; ESI-EM: m/z = 605.1 (2M^{+•} + Na), 314.1 (M^{+•} + Na), 292.2 (M^{+•} + H), 265.3; análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃O₃: C, 61.84; H, 7.27; N, 14.42.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acetonitrilo (44).Sólido blanco; P.f. 135-136 °C; Rto: a. 46%; IR (KBr): 2247, 1219 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.15 (4H, m, 6-H_{Ar} y 5,7-H_{THIQ}), 7.08 (1H, d, J = 1.9 Hz, 2-H_{Ar}), 7.01 (1H, dd, J = 7.9 Hz, 8-H_{THIQ}), 6.95 (1H, d, J = 8.2 Hz, 5-H_{Ar}), 5.80 (1H, sa, -OH), 5.00 (1H, s, 1-H), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃), 3.79 (2H, s, 1-H_{THIQ}), 2.89 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.6, 147.0, 134.4 (2C), 129.4, 127.2, 127.0, 126.5, 125.4, 121.5, 116.2, 115.0, 110.6, 62.1, 56.2, 52.6, 47.4, 29.3; CG-EM (70 eV): t_R = 27.1 min, m/z = 294(M^{+•}), 269 (10), 163 (70), 138 (26), 137 (57), 133 (15), 132 (100), 104 (18); análisis calculado para C₁₈H₁₈N₂O₂: C, 73.45; H, 6.16; N, 9.52.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**45**).Sólido blanco; P.f. 93-95 °C; Rto: a. 70%, b. 71%; IR (KBr): 2232, 1248 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.09 (1H, dd, J = 2.2, 0.6 Hz, 2-H_{Ar}), 7.02 (1H, ddd, J = 8.3, 2.2, 0.8 Hz, 6-H_{Ar}), 6.83 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 4.72 (1H, s,1-H), 3.89 (3H, s, 4-OCH₃), 2.58-2.34 (4H, m, 2,6-H_{pip}),1.66-1.51 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 1.51-1.41 (2H, dd, J = 10.8, 5.2 Hz 4-H_{pip}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.1, 146.1, 126.9, 119.8, 116.1, 114.4, 110.5, 62.8, 56.3, 51.1 (2C), 26.1 (2C), 24.3; CG-EM (70 eV): t_R = 21.5 min, m/z = 246 (M^{+•}), 221 (24), 137 (100), 98 (20), 84 (77); análisis calculado para $C_{14}H_{18}N_2O_2$: C, 68.27; H, 7.37; N, 11.37.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2-(3-hidroxipiperidin-1-il)acetonitrilo (**46**). Sólido crema; P.f. 135-136 °C; Rto: a. 46%; IR (KBr): 2232, 1248 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.04 (1H, t, J = 2.2 Hz, 2-H_{Ar}), 7.00 (1H, m, 6-H_{Ar}), 6.84 (1H, dd, J = 8.3, 2.6 Hz, 5-H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1-H), 3.90 (3H, s, 4-OCH₃), 3.83 (1H, m, 3-H_{pip}), 2.55 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.74 (2H, m, 4a,5a-H_{pip}), 1.57 (2H, m, 4b,5b-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.4, 146.3, 126.2, 119.8, 115.7, 114.4, 110.7, 66.3, 62.3, 56.5, 56.3, 51.0, 31.9, 21.8; ESI-EM: m/z = 547.1 (2M^{+•} + Na), 263.2 (M^{+•} + H), 258. 2; análisis calculado para C₁₄H₁₈N₂O₃: C, 64.10; H, 6.92; N, 10.68.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**47**). Sólido blanco; P.f. 93-95 °C; Rto: a. 71%, b. 65%; IR (KBr): 2220, 1218 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.06 (1H, d, J = 2.2 Hz, 2-H_Ar), 7.00 (1H, ddd, J = 8.3, 2.2, 0.7 Hz, 6-H_Ar), 6.82 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_Ar), 4.94 (1H, s, 1-H), 3.88 (3H, s, 4-OCH₃), 2.69-2.57 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.85-1.77 (4H, m, 3,4-H_{pir}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.2, 146.1, 127.6, 119.5, 116.6, 114.3, 110.7, 59.0, 56.3, 50.5 (2C), 23.6 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 20.7 min, m/z = 232 (M^{+•}), 207 (20), 137 (100), 84 (22), 70 (50); análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O₂: C, 67.22; H, 6.94; N, 12.06.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)- 2-(morfolin-1-il)acetonitrilo (**48**). Sólido blanco; P.f. 142-143 °C; Rto: a. 76%, b. 71%; IR (KBr): 2238, 1249 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.07 (1H, d, J = 2.2 Hz, 2-H_{Ar}), 7.01 (1H, ddd, J = 8.3, 2.2, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.84 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 5.90 (1H, sa, 3-OH), 4.72 (1H, s,1-H), 3.89 (3H, s, 4-OCH₃), 3.78-3.62 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 2.66-2.45 (4H, m, 2,6-H_{morf}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.4, 146.2, 125.7, 120.0, 115.7, 114.5, 110.6, 67.0 (2C), 62.2, 56.3, 50.1 (2C); CG-EM (70 eV): t_R = 21.9 min, m/ z = 248 (M^{+•}, 16), 162 (100) 163 (23), 86 (57), 56 (37); análisis calculado para C₁₃H₁₆N₂O₃: C, 62.89; H, 6.50; N, 11.28.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**49**). Sólido blanco; P.f. 167-169 °C; Rto: a. 63%, b. 64%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.03 (1H, dd, J = 2.2 Hz, 2-H_{Ar}), 6.98 (1H, ddd, J = 8.3, 2.2, 0.7 Hz, 6-H_{Ar}), 6.82 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 4.72 (1H, s, 1-H), 3.88 (3H, s, 4-OCH₃), 2.74-2.30 (8H, m, 2-6-H_{pipz}), 2.28 (3H, s, 7-H_{pipz}). RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.6, 146.4, 126.2, 119.8, 115.8, 114.7, 110.7, 61.7, 56.3, 55.0 (2C), 46.1; CG-EM (70 eV): t_R = 22.6 min, m/z = 261 (M^{+•}), 236 (67), 165 (47), 137 (100), 99 (62), 56 (47); análisis calculado para C₁₄H₁₉N₃O₂: C, 64.35; H, 7.33; N, 16.08.

- 2-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)acetonitrilo (**50**). Sólido blanco; P.f. 103-104 °C; Rto: a. 42%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.21 (1H, dt J = 8.3, 2.9, 0.6 Hz, 2-H_{Ar}), 6.69 (2H, dt, J = 8.3, 3.0 Hz, 6-H_{Ar}), 4.74 (1H, s, 1-H), 3.59 (2H, m, 8-H_{pipz}), 2.96 (6H, s, 7-H_{pipz}), 2.55 (11H, m, 2-7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.0, 129.2 (2C), 120.1, 116.2, 112.3, 61.9, 59.4, 58.0, 52.8 (2C), 40.7; ESI-EM: m/z = 605.1 (2M^{+•} + Na), 314.2 (M^{+•} + Na), 292.2 (M^{+•} + H), 265.2; análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃O₃: C, 61.84; H, 7.27; N, 14.42.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acetonitrilo (**51**). Sólido blanco; P.f. 96-97 °C; Rto: a. 47%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.13 (4H, m, 2,6-H_{Ar} y 5,7-H_{THIQ}), 6.99 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.87 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5-H_{Ar}), 5.75 (1H, sa, -OH), 4.94 (1H, s, 1-H), 3.92 (2H, s, 7-H_{Ar}), 3.76 (2H, s, 1-H_{THIQ}), 2.89 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 147.4, 146.3, 134.0 (2C), 129.0, 126.9, 126.8, 126.4, 126.1, 119,8, 115.8, 114.4, 110.8, 62.0, 56.3, 52.6, 47.8, 29.6; CG-EM (70 eV): t_R = 27.9 min, m/z = 294 (M^{+•}), 268 (14), 138 (35), 132 (100), 104 (15); análisis calculado para C₁₈H₁₈N₂O₂: C, 73.45; H, 6.16; N, 9.52.

- 2-(4-(Benciloxi)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**52**). Sólido blanco; P.f. 88-89 °C; Rto: a. 87%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.39 (7H, m, 2,6-H_{Ar} y 2-6-H_{Bz}), 7.00 (2H, dt, J = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.08 (2H, s, CH₂-Bz), 4.76 (1H, s, 1-H), 2.52 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.60 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 1.49 (2H, m, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 159.3, 137.0, 129.4 (2C), 128.9 (2C), 128.4, 127.8 (2C), 126.2, 116.1, 115.2 (2C), 70.4, 62.7, 51.1 (2C), 26.1 (2C), 24.3; ESI-EM: m/z = 635.8 (2M⁺⁺ + Na), 329.4 (M⁺⁺ + Na), 280.4 (M⁺⁺ - CN); análisis calculado para C₂₀H₂₂N₂O: C, 78.40; H, 7.24; N, 9.14.

- 2-(4-(Benciloxi)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**53**). Sólido blanco; P.f. 81-82 °C; Rto: a. 82%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.42 (7H, m, 2,6-H_{Ar} y 2-6-H_{Bz}), 6.99 (2H, dt, J = 8.6, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.07 (2H, s, CH₂-Bz), 4.98 (1H, s, 1-H), 2.64 (4H, m, 2,5-H_{pip}), 1.83 (4H, m, 3,4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 159.3, 137.0, 129.2 (2C), 129.1, 129.0 (2C), 128.4, 127.8 (2C), 116.6, 115.3, 70.4, 59.0, 50.5 (2C), 23.7 (2C); ESI-EM: m/z = 607.7 (2M^{+•} + Na), 266.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₉H₂₀N₂O: C, 78.05; H, 6.89; N, 9.58.

- 2-(4-(Benciloxi)fenil)-2-morfolinoacetonitrilo (**54**). Sólido blanco; P.f. 138-139 °C; Rto: a. 78%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.39 (7H, m, 2,6-H_{Ar} y 2,6-H_{Bz}), 7.00 (2H, dt, J = 8.8, 2.1 Hz, 3,5-H_{Ar}), 5.07 (2H, s, CH₂-Bz), 4.76 (1H, s, 1-H), 3.72 (4H, m, 2,5-H_{pip}), 2.57 (4H, m, 2,6-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 159.6, 136.9, 129.6 (2C), 129.0 (2C), 128.4, 127.8 (2C), 124.9, 115.7 (2C), 115.3, 70.4, 67.0, 62.1, 46.8; ESI-EM: m/z = 639.7 (2M^{+•} + Na), 331.4.4 (M^{+•} + Na), 282.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₉H₂₀N₂O₂: C, 74.00; H, 6.54; N, 9.08.

- 2-(4-(Benciloxi)fenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (**55**). Sólido blanco; P.f. 105-106 °C; Rto: a. 83%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.52 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 7.39 (5H, m, 2-6-H_{Ar}), 7.14 (3H, m, 25-7-H_{pip}), 7.02 (3H, m, 8-H_{THIQ} y 3,5-H_{Ar}), 5.10 (2H, s, CH₂-Bz), 5.02 (1H, s, 1-H), 3.77 (2H, m, 1-H_{THIQ}), 2.90 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 159.4, 136.9, 134.0, 133.9, 129.4 (2C), 129.0, 128.9 (2C), 128.4, 127.8, 126.9, 126.7, 126.2,

125.6, 115.9, 115.4, 70.4, 61.9, 52.6, 47.7, 29.6; ESI-EM: m/z = 355.4 (M^{+•} + H), 328.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para $C_{24}H_{22}N_2O$: C, 81.33; H, 6.26; N, 7.90.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**56**). Sólido blanco; P.f. 77-78 °C; Rto: a. 43%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.35 (2H, dt, J = 8.9, 3.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.70 (2H, dt, J = 8.8, 3.1 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.73 (1H, s, 1-H), 2.97 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.52 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.59 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 1.47 (2H, dd, J = 10.6, 5.3 Hz, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.3, 129.4 (2C), 121.2, 116.8, 112.5 (2C), 62.6, 50.8 (2C), 40.5 (2C), 25.8 (2C), 24.0; ESI-EM: m/z = 509.1 (2M^{+•} + Na), 266.1 (M^{+•} + Na), 244.2 (M^{+•} + H), 217.3, 159.5; análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃: C, 74.03; H, 8.70; N, 17.27.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**57**). Sólido blanco; P.f. 98-99 °C; Rto: a. 41%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.33 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 6.70 (2H, dt, J = 8.8, 3.2 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 2.99 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.92 (1H, m, 2-H_{pip}), 2.62 (1H, m, 6-H_{ax,pip}), 2.08 (1H, td, J = 11.6, 2.7 Hz, 6- H_{eq,pip}), 1.71 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.70 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.57 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.40 (2H, m, 3,5-H_{ax,pip}), 1.39 (1H, m, 4-H_{eq,pip}), 1.21 (3H, d, J = 6.4 Hz, 2-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.9, 129.2 (2C), 121.1, 116.5, 112.4 (2C), 62.5, 53.4, 47.5, 40.7 (2C), 34.7, 34.2, 30.8, 22.1; ESI-EM: m/z = 637.7 (2M⁺⁺ + Na), 280.0 (M⁺⁺ + Na), 231.4 (M⁺⁺ - CN); análisis calculado para C₁₆H₂₃N₃: C, 74.67; H, 9.01; N, 16.33.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo (**58**). Sólido blanco; P.f. 101-102 °C; Rto: a. 62%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.34 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 6.70 (2H, dt, J = 8.8, 3.2 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1-H), 2.97 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.89 (1H, dt, J = 11.0, 4.5 Hz, 6-H_{eq,pip}), 2.60 (1H, dt, J = 10.6, 4.5 Hz, 2-H_{eq,pip}), 2.48 (1H, td, J = 11.3, 2.8 Hz, 6-H_{ax,pip}), 2.05 (1H, td, J = 11.6, 2.8 Hz, 2-H_{ax,pip}), 1.70 (1H, m, 5-H_{eq,pip}), 1.57 (1H, m, 3-H_{eq,pip}), 1.43 (1H, m, 4-H_{ax,pip}), 1.32 (1H, ddd, J = 11.8, 4.0 Hz, 5-H_{ax,pip}) 1.08 (1H, ddd, J = 12.0, 4.1 Hz, 3H_{ax,pip}), 0.92 (1H, d, J = 6.3 Hz, 4-CH₃); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.9, 129.1 (2C), 121.1, 116.5, 112.4 (2C), 62.4, 53.4, 47.5, 40.7 (2C), 34.6, 34.2; ESI-EM: m/z = 637.7 (2M^{+•} + Na), 280.4 (M^{+•} + Na), 231.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₆H₂₃N₃: C, 74.67; H, 9.01; N, 16.33.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(3-hidroxipiperidin-1-il)acetonitrilo (**59**). Sólido blanco; P.f. 230-231 °C; Rto: a. 41%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.33 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 6.69 (2H, m, 3,5-H_{Ar}), 4.75 (1H, s, 1-H), 2.97 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.86 (1H, m, 3-H_{pip}), 2.56 (4H, m, 2,6-H_{pip}), 1.30 (4H, m, 3,5-H_{pip}),; RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.0, 129.1 (2C), 120.1, 116.2, 112.4 (2C), 62.5, 61.7, 51.4, 46.1, 44.7 (2C), 35.2, 24.9; ESI-EM: m/z = 541.7 (2M^{+•} + Na), 260.35 (M^{+•} - CN), 217.3; análisis calculado para C₁₅H₂₁N₃O: C, 69.47; H, 8.16; N, 16.20.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**60**). Líquido amarillo; Rto: a. 46%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.33 (2H, dt, J = 8.5, 2.1 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.69 (2H, dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.93 (1H, s, 1-H), 2.95 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.63 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.81 (4H, m, 3,5-H_{pir}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.9, 128.8 (2C), 121.8, 116.9, 112.4 (2C), 59.0, 50.4 (2C), 40.7 (2C), 23.6 (2C); ESI-EM: m/z = 481.6 (2M^{+•} + Na), 229.3 (M^{+•} + H); análisis calculado para C₁₄H₁₉N₃: C, 73.33; H, 8.35; N, 18.32.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-morfolinoacetonitrilo (**61**). Sólido blanco; P.f. 67-68 °C; Rto: a. 60%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.33 (2H, dt, J = 8.5, 3.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.69 (2H, dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.71 (1H, s, 1-H), 3.71 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 2.97 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.56 (4H, m, 2,6-H_{morf}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.5, 129.6 (2C), 119.9, 116.3, 112.5 (2C), 66.92 (2C), 62.0, 49.9 (2C), 40.4 (2C); ESI-EM: m/z = 513.1 (2M^{+•} + Na), 268.1 (M^{+•} + Na), 246.2 (M^{+•} + H), 219.3, 159.5; análisis calculado para C₁₄H₁₉N₃O: C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13 - 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetonitrilo (**62**). Sólido blanco; P.f. 62-63 °C; Rto: a. 53%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.32 (2H, dt, J = 8.5, 3.4 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.68 (2H, dd, J = 8.9, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.72 (1H, s, 1-H), 2.95 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.51 (8H, m, 2-6-H_{pipz}), 2.27 (3H, s, 7-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 150.9, 129.2 (2C), 120.3, 116.2, 112.3 (2C), 61.7, 55.1 (4C), 46.2, 40.4 (2C); ESI-EM: m/z = 539.3 (2M^{+•} + Na), 232.3 (M^{+•} + H), 159.5; análisis calculado para C₁₅H₂₂N₄: C, 69.73; H, 8.58; N, 21.69.

- 2-(4-(Dimetilamino)fenil)-2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)acetonitrilo (**63**). Sólido blanco; P.f. 99-100 °C; Rto: a. 48%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.32 (2H, dt, J = 8.3, 2.9, 0.6 Hz, 2,6-H_{Ar}), 6.69 (2H, dt, J = 8.8, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.74 (1H, s, 1-H), 3.59 (2H, m, 8-H_{pipz}), 2.96 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.55 (11H, m, 2-7-H_{pipz} y -OH); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.0, 129.2 (2C), 120.1, 116.2, 112.3 (2C), 61.8, 59.4, 58.0, 52.8 (4C), 40.7 (2C); ESI-EM: m/z = 599.8 (2M^{+•} + Na), 262.4 (M^{+•} - CN), 159.5; análisis calculado para C₁₆H₂₄N₄O: C, 66.64; H, 8.39; N, 19.43.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)acetonitrilo (**64**). Sólido blanco; P.f. 106-107 °C; Rto: a. 63%; IR (KBr): 2222, 1080 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.43 (2H, dt, J = 8.4, 3.0, 0.6 Hz, 2,6-H_{Ar}), 7.13 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 7.0 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.74 (2H, dd, J = 8.9, 3.0 Hz, 3,5-H_{Ar}), 4.99 (1H, s, 1-H), 3.77 (2H, s, 1-H_{THIQ}), 2.99 (6H, s, -N(CH₃)₂), 2.88 (4H, m, 3,4-H_{pipz}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 151.0, 134.2, 134.1, 129.3 (2C), 129.0, 127.0, 126.6, 126.1, 120.4, 116.3, 112.4 (2C), 62.0, 52.6, 47.6, 40.7 (2C), 29.6; ESI-EM: m/z = 605.1 (2M^{+•} + Na), 314.1 (M^{+•} + Na), 265.1, 159.5; análisis calculado para C₁₉H₂₁N₃: C, 78.32; H, 7.26; N, 14.42.

- 2-(4-Clorofenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo (**65**). Sólido blanco; P.f. 76-77 °C; Rto: a. 68%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.48 (2H, m, 3,5-H_{Ar}), 7.36 (2H, dt, J = 8.6, 2.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 4.77 (1H, s, 1-H), 2.49 (4H, t, J = 5.0 Hz, 2,6-H_{pip}), 1.66 (4H, m, 3,5-H_{pip}), 1.48 (2H, m, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 135.0, 132.5, 129.4 (2C), 129.2 (2C), 115.6, 62.7, 51.2 (2C), 26.1 (2C), 24.2; ESI-EM: m/z = 492.4 (2M^{+•} + Na), 256.5 (M^{+•} + Na), 207.5 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₃H₁₅CIN₂: C, 66.52; H, 6.44; CI, 15.10; N, 11.93.

- 2-(4-Clorofenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo (**66**). Sólido blanco; P.f. 153-154 °C; Rto: a. 61%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.46 (2H, m, 3,5-H_{Ar}), 7.35 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 5.01 (1H, s, 1-H), 2.63 (4H, m, 2,5-H_{pir}), 1.82 (4H, m, 3,4-H_{pir}), 1.48 (2H, m, 4-H_{pip}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 135.0, 133.1, 131.2 (2C), 129.7 (2C), 116.0, 50.5 (2C), 23.7 (2C); ESI-EM: m/z = 221.7 (M^{+•} + H), 194.7 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₂H₁₃ClN₂: C, 65.31; H, 5.94; Cl, 16.06; N, 12.69.

- 2-(4-Clorofenil)-2-morfolinoacetonitrilo (**67**). Sólido blanco; P.f. 65-66 °C; Rto: a. 61%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.48 (2H, d, J = 8.4 Hz, 3,5-H_{Ar}), 7.38 (2H, d, J = 8.5 Hz, 2,6-H_{Ar}), 4.78 (1H, s, 1-H), 3.71 (4H, m, 3,5-H_{morf}), 2.56 (4H, t, J = 4.4 Hz, 2,6-H_{morf}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 135.4, 131.4, 129.6 (2C), 129.4 (2C), 115.1, 66.9, 62.1 (2C), 50.2 (2C); ESI-EM: m/z = 496.5 (2M^{+•} + Na), 259.7 (M^{+•} + Na), 237. (M^{+•} + H), 210.7 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₂H₁₃CIN₂O: C, 60.89; H, 5.54; CI, 14.98; N, 11.84.

- 2-(4-Clorofenil)-2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo (**68**). Sólido blanco; P.f. 93-94 °C; Rto: a. 76%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.57 (2H, m, 3,5-H_{Ar}), 7.41 (2H, dt, J = 8.6, 2.0 Hz, 2,6-H_{Ar}), 7.16 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 7.00 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 5.04 (1H, s, 1-H), 3.77 (2H, dd, *J* = 20.2 Hz, 1-H_{THIQ}), 2.90 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 135.3, 133.9, 133.7, 132.0, 129.5 (2C), 129.4 (2C), 129.1, 126.9, 126.8, 126.2, 115.3, 61.9, 52.7, 47.8, 29.5; ESI-EM: m/z = 588.5 (2M^{+•} + Na), 283.7 (M^{+•} + H), 256 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₇H₁₅ClN₂: C, 72.21; H, 5.35; Cl, 12.54; N, 9.91. - 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-fenilacetonitrilo (**69**). Sólido blanco; P.f. 78-79 °C; Rto: a. 80%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.62 (2H, m, 2,6-H_{Ar}), 7.43 (3H, m, 3-5-H_{Ar}), 7.15 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 7.00 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 5.09 (1H, s, 1-H), 3.79 (2H, dd, J = 17,7 Hz, 1-H_{THIQ}), 2.92 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 133.7, 133.6, 133.0, 129.1, 128.9 (2C), 128.8, 127.9, 126.7, 126.5, 125.9, 115.4, 62.2, 52.4, 47.6, 29.3; ESI-EM: m/z = 519.1 (2M^{+•} + Na), 271.3 (M^{+•} + Na), 249.3 (M^{+•} + H), 222.3 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₁₇H₁₆N₂: C, 82.22; H, 6.49; N, 11.28.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-hidroxifenil)acetonitrilo (**70**). Sólido blanco; P.f. 129-130 °C; Rto: a. 67%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 7.43 (2H, d, J = 8.4 Hz, 2,6- H_{THIQ}), 7.13 (3H, m, 5-7-H_{THIQ}), 6.99 (1H, m, 8-H_{THIQ}), 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3,5- H_{THIQ}), 4.99 (1H, s, 1-H), 4.71 (1H, sa, OH), 3.75 (2H, m, 1- H_{THIQ}), 2.89 (4H, m, 3,4-H_{THIQ}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 156.7, 133.9, 133.8, 129.7 (2C), 129.1, 126.9, 126.8, 126.2, 116.1, 116.0, 61.9, 52.6, 47.8, 29.5; ESI-EM: m/z = 551.6 (2M⁺⁺ + Na), 287.3 (M⁺⁺ + Na), 238.3 (M⁺⁺ - CN); análisis calculado para C₁₇H₁₆N₂O: C, 77.25; H, 6.10; N, 10.60.

- 2-(3,4-Dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(naftalen-1-il)acetonitrilo (**71**). Sólido blanco; P.f. 133-134 °C; Rto: a. 81%; IR (KBr): 2232, 1236 cm⁻¹; RMN-¹H (DMSO-d6, 400 MHz) δ (ppm): 8.17 (1H, m, 8-H_{naf}), 7.90 (3H, m, 4,5,7-H_{naf}), 7.52 (3H, m, 6-H_{naf} y 7,8- H_{THIQ}), 7.11 (3H, m, 5-6-H_{THIQ} y 3- H_{naf}), 7.01 (1H, m, 2-H_{naf}), 5.67 (1H, s, 1-H), 3.97 (1H, d, J = 14.5 Hz, 1a-H_{naf}), 2.87 (1H, d, J = 14.4 Hz, 1b-H_{naf}); RMN-¹³C (100 MHz) δ (ppm): 134.1, 133.9, 133.7, 131.0, 130.3, 128.7, 128.6, 128.2, 126.9, 126.8, 126.6, 126.4, 125.8, 124.8, 123.9, 115.4, 60.9, 52.3, 47.2, 29.4; ESI-EM: m/z = 619.3 (2M^{+•} + Na), 321.4 (M^{+•} + Na), 299.4 (M^{+•} + H), 272.4 (M^{+•} - CN); análisis calculado para C₂₁H₁₈N₂: C, 84.53; H, 6.08; N, 9.39. 2.3.6. Colección de datos de polvo de 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo 25. El compuesto 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(morfolin-1il)acetonitrilo 25 se trituró y se tamizó hasta un tamaño de grano inferior a 38 µm. El patrón de difracción de polvo se registró a temperatura ambiente (298 K) en un difractómetro BRUKER D8 ADVANCE trabajando en la geometría de Bragg-Brentano usando radiación CuK α (λ = 1.541 84 Å), operando a 40 kV y 40 mA). El difractómetro estuvo equipado con ranuras de Soller primaria y secundaria de 2.5°, rendija de divergencia de 0,6 mm, filtro de Ni de 0.02 mm y un detector LynxEye. Se utilizó el programa Powder X para eliminar el fondo, suavizar el perfil y eliminar el componente K α 2. Se utilizó el método de segunda derivada para determinar las posiciones e intensidades observadas de los picos. La indexación del patrón se realizó con el programa DICVOL06 con un error absoluto de 0.03 ° (20).

2.3.7. Colección de datos de monocristal de 2-(3,4dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)acetonitrilo 64. Un solo cristal del compuesto 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil) acetonitrilo 64 obtenido en 2 días por evaporación controlada de una solución en mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo (30:1) a 25 °C, demostró ser de calidad apropiada para estudios de difracción de rayos X de cristal único. Esto permitió confirmar la fórmula estructural propuesta de la molécula 64 y la determinación de sus interacciones C-H···N y C-H··· π .

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al disponer de un nutrido conjunto de aldehídos aromáticos y aminas cíclicas secundarias de diferentes compañías químicas, que al variarlas podrían generar numerosos α-aminonitrilos, su selección se apoyó en principios diseño racional e hibridación molecular. El método más común de diseño racional inicia con la búsqueda de un compuesto líder, que se basa, por lo general, en un sustrato natural, metabolito secundario que exprese alguna actividad biológica potente. La ventaja

ofrecida por los resultados de la evaluación biológica de la girgensohnina y los reportes de correlación entre la estructura molecular y la actividad biológica de moléculas bioactivas se empleó como mecanismo seleccionador (Figura 3).





La revisión de entidades con acción biológica como alcaloides y candidatos a fármacos (Figura 4)²⁴⁻³³ permitió la limitación de la lista de posibles precursores a los aldehídos aromáticos benzaldehído, 1-naftaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, 4metoxibenzaldehído. 3,4-dimetoxibenzaldehído, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído. piperonal, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído, 4-(benciloxi)benzaldehído, 4-(dimetilamino)benzaldehído y 4-clorobenzaldehído) y las aminas secundarias cíclicas piperidina, 2-metilpiperidina, 4-metilpiperidina, 3hidroxipiperidina, pirrolidina, morfolina, N-metilpiperazina, 1-(2hidroxietil)piperazina, y 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina. Antes de su síntesis se evaluaron sus parámetros fisicoquímicos empleando diferentes propiedades fisicoquímicas seleccionando 70 análogos para su evaluación.34-36 Cabe señalar que estos parámetros fisicoquímicos y algunos descriptores adicionales como el área de superficie polar topológica tPSA, número de enlaces rotables NER y solubilidad en agua LogS) han demostrado ser útiles para predecir las propiedades biológicas tanto de nuevos agentes farmacológicos, como de nuevas sustancias agroquímicas.^{37,38}

Figura 4. α-Aminonitrilos inspirados por un alcaloide natural.



Los resultados obtenidos mostraron que los α -aminonitrilos, producto de la combinación de los precursores propuestos, incluido el alcaloide girgensohnina, presentan perfiles farmacocinéticos aceptables y cumplen con los diferentes parámetros establecidos por las reglas de Lipinski y demás descriptores (peso molecular PM = 216.28-354.44 g/mol, logP = 0.69-4.44, número de enlaces aceptores de hidrógeno nON = 2-7, número de enlaces donadores de hidrógeno nOHNH = 0-2, NER = 2-7 y tPSA = 27.03-79.96) (Tabla 1).

En general, aunque se observa que los α -aminonitrilos **1-71** son moléculas lipofílicas, al mostrar valores de logP por debajo de 5, cabe esperar que las moléculas con fragmentos tetrahidroisoquinolilo y 4-(benciloxi)fenilo se distribuyan preferentemente en áreas hidrofóbicas como las bicapas lipídicas. Esta baja solubilidad acuosa se observa también en los resultados de LogS donde se obtuvieron valores inferiores a -4.0. Cabe mencionar que cerca del 20% de moléculas activas empleadas como fármacos presentan valores Log S estimados menores a -4, como los encontrados para este grupo moléculas.

La predicción de riesgos toxicológicos mostró alerta baja para los compuestos **3**, **12**, **21**, **30** y **57** (precursor amínico 2-metilpiperidina) con respecto al riesgo irritante y para los compuestos **65** a **68** (precursor 4-clorobenzaldehído) con respecto al riesgo reproductivo. Si bien ninguna de las moléculas propuestas mostró riesgos mutagénicos, las moléculas **56** a **64** indicaron alerta alta en riesgo tumorigénico,

debido a la semejanza del fragmento N,N-dimetilaminofenilo con los encontrado en el filtro PAINS (Pan Assay Interference Compounds), identificado como anil_di_alk_B y D y señalados por la escasa funcionalización de su grupo arilo.³⁹⁻⁴³

Luego, para la planificación de la preparación de los α -aminonitrilos se seleccionaron las fuentes de cianuro y catalizadores a emplear en la reacción de Strecker de tres componentes.⁴⁴ Aunque esta reacción se ha estudiado ampliamente usando diferentes metales complejos y ácidos y bases de Lewis, la búsqueda de metodologías más verdes a dirigido sus esfuerzos al empleo de catalizadores ácidos sólidos, donde sobresale el ácido sulfúrico soportado sobre gel de sílice SSA.^{45–50} Entre sus ventajas se destacan su fácil preparación y manejo, baja toxicidad y amplio rango de tolerancia a variados disolventes además de ser un catalizador recuperable y reutilizable.

Entre las fuentes de cianuro empleadas en la reacción de Strecker las sales inorgánicas, como los cianuros de sodio NaCN y potasio KCN, se emplean regularmente debido a la ventaja que supone el trabajo con estos sólidos en comparación con el HCN gaseoso y los líquidos inestables y tóxicos (EtO)₂P(O)CN, Et₂AICN y Bu₃SnCN.^{51,52} También se destacan el cianuro de trimetilsililo, debido a que promueve en muchos casos esta reacción sin el empleo de catalizadores, y la acetona cianhídrina, compuesto líquido estable de fácil manejo y generación.⁵³

Con estos antecedentes y de acuerdo con las tendencias modernas de química sintética y criterios verdes para reducir y eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente, se evaluaron diferentes protocolos de síntesis encontrados en la literatura. Los reportes de síntesis de Strecker empleando agua como disolvente y otras libres de disolventes, así como las que se reportan sin el empleo de catalizadores, fueron evaluadas.

Empleando como precursores al 3,4-dimetoxibenzaldehído, piperonal, piperidina, pirrolidina y morfolina, las moléculas **11**, **15**, **16**, **29**, **33** y **34** se buscaron obtener

empleando agua como disolvente y en ausencia del catalizador SSA sin observarse la generación del producto esperado. Cuando no se usó disolvente en la reacción, se observó la formación de la imina como un sólido, por lo que para la adición del KCN, también sólido, se hizo necesario el empleo de disolvente. Finalmente, la reacción en MeCN sin el catalizador SSA no generó los productos de interés.

En forma general se ha reportado que durante el mecanismo de reacción que sigue el proceso descubierto por Strecker se dan dos adiciones nucleofílicas así, en la primera etapa se genera la imina correspondiente a la adición nucleofílica de la amina al compuesto carbonílico seguida de la eliminación (E) del agua y luego, la adición nucleofílica del ion cianuro para atrapar *in situ* la imina formada (Esquema 31).

Esquema 31. Mecanismo de reacción propuesto.



Debido al mecanismo que sigue esta reacción se ha encontrado que esta se favorece en presencia de catalizadores que activen a los precursores en lugar del empleo, por ejemplo, de promotores que faciliten la formación del cianuro. Esto se pudo corroborar al tratar de obtener los productos α -aminonitrílicos empleando ferrocianuro de potasio con cloruro de benzoilo como promotor en etanol, sin la generación de los sistemas esperados con rendimientos comparables a los brindados al usar SSA como catalizador.

Teniendo en cuenta lo encontrado, se establecieron como las mejores condiciones el empleo del catalizador sólido SSA y como fuentes de cianuro a la acetona cianhidrina y el cianuro de potasio KCN. Bajo este protocolo sintético, en MeCN a temperatura ambiente durante 16-24 h, se generó la librería de compuestos propuesta como cristales claros con puntos de fusión definidos o líquidos amarillos (Tabla 2). De acuerdo con los resultados y teniendo en cuenta la naturaleza del componente imínico precursor, los mejores rendimientos fueron obtenidos para los compuestos que presentaron fragmentos piperidínicos, metil-piperidínicos y morfolínicos en sus estructuras. En el caso de la evaluación de los grupos arilos sobresalen los compuestos di- y trimetoxi sustituidos y los compuestos **52-55** con el grupo benciloxil en la posición C-4 del anillo aromático. La 3-hidroxipiperidina, entre los precursores amínicos, y el 4-(dimetilamino)benzaldehído, entre los benzaldehídos empleados, brindaron los rendimientos más bajos. Se encontró que los grupos electroatractores (-OH) unidos al anillo de piperidina y grupos electrodonores en la posición C-4 del arilo (-OCH₃ y -N(CH₃)₂), disminuían drásticamente la generación de los α -aminonitrilos de interés.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la girgensohnina 1 y sus análogos 2-71.



Comp	R.	R	R	n	Y	R.	R.	Aspecto	РМ	Rend. ^a	P. F.	
comp.	IX1	112	13		Λ	184	115	Азреско	g/mol	%	°C	
1	н	ОН	н	1	CH	н	н	Cristales	216 28	68	115-117	
•		on			0112			blancos	210.20	00	110 117	
2	ц	OMo	ц	1	СЦ.	ц	ц	Cristales	230 32	66	P. F. °C 115-117 78-79 57-58 95-96 	70 70
Z		Ome		1	OH2			blancos	200.02	00	10-13	
2	ы	OMo	ц	1	CH.	Мо	ц	Cristales	244 22	66	57 50	
3	п	Ome	п	I		we	п	blancos	244.33	3 66	57-50	
4	ы	OMo	ц	1	СЦ	ц	Мо	Cristales	244 24	00	05.06	
4	п	Ome	п	I		п	we	blancos	244.34	66 88	90-90	
F		0144		4			011	Líquido	246.20	40		
5	п	Oivie	п	I		п	н он amarillo		amarillo 246.30 40	40		
c	ы		ц	0	сц	ц	ц	Líquido	216 29	62		
0	п	OMe	п	U		п	п	amarillo	210,28	03		

7	н	OMe	Н	1	0	н	Н	Cristales blancos	232.28	57	79-80
8	Н	OMe	н	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	245.32	58	118-119
9	Н	OMe	н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	Cristales blancos	275.35	56	101-102
10	Н	OMe	н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	278.35	56	98-99
11	н	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	260.33	72	60-62
12	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	Ме	н	Cristales blancos	274.36	91	94-95
13	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	Me	Cristales blancos	274.36	82	88-87
14	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	ОН	Cristales blancos	276.33	41	71-72
15	Н	OMe	OMe	0	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	246.30	56	69-70
16	Н	OMe	OMe	1	0	Н	н	Cristales blancos	262.30	75	95-96
17	Н	OMe	OMe	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	275.35	71	71-73
18	Н	OMe	ОМе	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	Líquido amarillo	305.37	63	
19	Н	OMe	ОМе	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	308.37	52	99-100
20	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	н	Cristales blancos	290.36	87	115-117
21	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Ме	н	Cristales blancos	304.38	70	62-63
22	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	Me	Cristales blancos	304.38	72	102-103
23	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	ОН	Cristales blancos	306.36	52	127-128
24	OMe	OMe	OMe	0	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	276.33	86	91-93
25	OMe	OMe	ОМе	1	0	Н	Н	Cristales blancos	292.33	83	137-139
26	OMe	OMe	OMe	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	305.37	73	117-118

27	OMe	OMe	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	н	Н	Cristales blancos	335.40	69	117-118
28	OMe	OMe	OMe	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	338.40	62	133-134
29	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	244.29	72	74-75
30	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH ₂	Ме	н	Cristales blancos	258.32	68	80-81
31	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	Ме	Cristales blancos	258.32	81	88-89
32	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	ОН	Cristales blancos	260.29	42	91-92
33	н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	Н	н	Cristales blancos	230.26	62	55-56
34	н	(OCH ₂ O)	-	1	0	Н	Н	Cristales blancos	246.26	78	118-119
35	н	(OCH ₂ O)	-	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	259.30	68	84-86
36	н	(OCH ₂ O)	-	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	Cristales blancos	289.33	68	129-130
37	н	(OCH ₂ O)	-	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	292.33	50	106-107
38	н	ОН	OMe	1	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	246.30	72	133-135
39	н	ОН	OMe	1	CH ₂	Н	ОН	Líquido crema	262.30	43	
40	н	ОН	OMe	0	CH ₂	Н	Н	Cristales blancos	232.28	71	118-119
41	н	ОН	OMe	1	0	Н	н	Cristales blancos	248.28	72	107-109
42	н	ОН	OMe	1	NMe	Н	Н	Cristales blancos	261.32	61	151-153
43	н	ОН	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	Cristales blancos	291.35	51	116-117
44	н	ОН	OMe	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	294.35	46	135-136
45	н	OMe	ОН	1	CH ₂	Н	Н	Cristales blancos	246.30	70	93-95
46	н	OMe	ОН	1	CH_2	н	ОН	Sólido crema	262.30	46	135-136

47	Н	OMe	ОН	0	CH ₂	Н	Н	Cristales blancos	232.28	71	93-95
48	Н	ОМе	ОН	1	0	Н	н	Cristales blancos	248.28	76	42-143
49	Н	OMe	ОН	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	261.32	63	167-169
50	н	OMe	ОН	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	Cristales blancos	291.35	42	103-104
51	Н	OMe	ОН	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	294.35	47	96-97
52	Н	OBz	Н	1	CH_2	Н	Н	Cristales blancos	306.40	87	88-89
53	н	OBz	Н	0	CH_2	Н	н	Cristales blancos	292.37	82	81-82
54	н	OBz	Н	1	0	Н	н	Cristales blancos	308.37	78	138-139
55	н	OBz	Н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	354.44	83	105-106
56	н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Н	н	Cristales blancos	243.35	43	77-78
57	н	N(Me) ₂	Н	1	CH ₂	Ме	н	Cristales blancos	257.37	41	98-99
58	н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Н	Ме	Cristales blancos	257.37	62	101-102
59	н	N(Me) ₂	н	1	CH ₂	Н	ОН	Cristales blancos	259.35	41	230-231
60	н	N(Me) ₂	Н	0	CH_2	Н	н	Líquido amarillo	229.32	46	
61	Н	N(Me) ₂	Н	1	0	Н	н	Cristales blancos	245.32	60	67-68
62	н	N(Me) ₂	н	1	NMe	Н	н	Cristales blancos	258.36	53	62-63
63	Н	N(Me) ₂	Н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	Cristales blancos	288.39	48	99-100
64	н	N(Me) ₂	н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	291.39	63	106-107
65	н	CI	н	1	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	234.72	68	76-77
66	н	CI	н	0	CH ₂	Н	н	Cristales blancos	220.70	61	153-154

67	н	CI	Н	1	0	Н	Н	Cristales blancos	236.70	61	65-66
68	Н	CI	Н	1	Ph	н	-	Cristales blancos	282.77	76	93-94
69	Н	Н	Н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	248.32	80	78-79
70	Н	ОН	Н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	264.32	67	129-130
71	1-Ph	-	н	1	Ph	Н	-	Cristales blancos	298.38	81	133-134

^a Rendimiento empleando KCN como fuente de cianuro

La caracterización estructural de los α -aminonitrilos obtenidos **1-71** se realizó empleando las técnicas analíticas de IR, como primera aproximación y prueba diagnóstica, seguida de análisis de CG-EM o ESI-EM, previo tratamiento de extracción y purificación. La confirmación estructural definitiva se obtuvo producto de los análisis de RMN-¹H y RMN-¹³C realizados.

Los espectros de infrarrojo de los compuestos se caracterizaron por presentar una banda débil entre 2190 y 2230 cm⁻¹ perteneciente a la tensión del enlace nitrílico - C=N y entre 1230 y 1280 cm⁻¹ una banda debida a la tensión del enlace -C-N. Como ejemplo representativo se presenta el espectro del compuesto **4** donde se indican las bandas características de los enlaces aromáticos y los observados para el grupo metilo y metoxilo (Figura 5).

Figura 5. Espectro infrarrojo del compuesto 4.



Seguidamente y como buscando continuar con la identificación de los productos obtenidos, se emplearon las técnicas cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM o la ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas ESI-EM según la disposición de los equipos.

Los perfiles cromatográficos obtenidos permitieron confirmar la pureza y la formación de los productos deseados al registrarse los picos para los respectivos iones moleculares cuya relación *m/z* correspondió a la masa nominal de sus fórmulas moleculares condensadas. Debido a la analogía estructural entre los sistemas generados, se observa un alto grado de similitud de los patrones de su fragmentación. Además de la presencia de sus iones moleculares con baja intensidad, se observaron el fragmento Φ_1 [M⁺·26], producto de la pérdida del fragmento nitrílico, y los iones complementarios Φ_2 y Φ_3 producto de la escisión del enlace C-N entre el fragmento amínico y el carbono α . Como ejemplo se presentan los fragmentogramas de las moléculas **37**, **40** y **45** donde se puede ver el patrón de fragmentación mencionado (Figura 6).



Figura 6. Espectros de masas y posibles fragmentaciones para 37, 40 y 45.

Al emplear la técnica de ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas ESI-MS se observaron las masas de los aductos (2M⁺⁺+Na), (M⁺⁺+Na) y nuevamente el aducto producto de la escisión del enlace que genera la perdida del fragmento nitrílico (M⁺⁺-CN), indicativo de su labilidad (Figura 7). Solo en algunos espectros se encontró la señal correspondiente al aducto (M⁺⁺+H). Este fenómeno fue atribuido a la ionización electroquímica de la molécula durante la exposición a la diferencia de potencial del capilar durante el proceso de nebulización en el electrospray dando origen preferiblemente al aducto (M⁺⁺-CN) encontrado para las moléculas evaluadas.

Figura 7. lones característicos ESI-EM para los compuestos 2, 10 y 31.



Finalmente, las estructuras de los productos obtenidos fueron confirmadas por análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones y de carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) y, en algunos casos, experimentos bidimensionales de correlación homonuclear como ¹H, ¹H-COSY.

Las diferentes señales observadas en los espectros de RMN-¹H de los compuestos **1-71** fueron asignados de acuerdo a su desplazamiento químico. Las señales registradas a campos bajos fueron asignados a los protones aromáticos presentes en las estructuras, mientras que las señales a campos altos se asignaron a los protones pertenecientes a las aminas precursoras.

Como característica general para todas las moléculas sintetizadas, entre 4.28 y 5.24 ppm (moléculas **42** y **12**, respectivamente), resonó en forma de singulete, el hidrógeno α al grupo nitrilo. Los grupos metoxilo de los benzaldehídos empleados se presentaron como singuletes entre 2.95 y 4.00 ppm mientras que solo en los

compuestos **1**, **44**, **38**, **48** y **51** se observó el grupo hidroxilo del arilo como un singulete ancho a 9.61, 5.80, 5.72, 5.90 y 5.75 ppm respectivamente (Figura 8).





Además, mientras los hidrógenos metilénicos del fragmento bencilo de los compuestos **52** a **55** resonaron a 5.08 ppm, los seis protones metílicos unidos al

nitrógeno en la posición C-4 del arilo resonaron como un singulete entre 2.95 y 2.99 ppm en las moléculas **56** a **64** (Figura 9).



Figura 9. Espectros de RMN ¹H de los compuestos **52** y **61**.

En los compuestos **65** a **68** la presencia del sustituyente cloro en la posición C-4 del arilo llevo a que los protones unidos a los carbonos en las posiciones C-3 y C-5

resonaran a campos más bajos, entre los 7.57 y 7.48 ppm, que ninguno de los demás hidrógenos unidos a este anillo aromático (Figura 10).



Figura 10. Espectro de RMN 1H del compuesto 68.

Con respecto a los protones presentes en las aminas heterocíclicas de las moléculas obtenidas, se observan señales como multipletes no resueltos lo que en la mayoría de los casos no permitió la asignación específica de cada uno de ellos. Para las moléculas obtenidas empleando 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, si bien los protones unidos a los carbonos identificados como C-3 y C-4 se observaron como multipletes, los protones gemínales del carbono 1 resonaron como un singulete entre 3.75 y 3.79 ppm para las moléculas **10**, **19**, **37**, **44**, **51**, **55** y **64**.

Un caso particular se observó para los compuestos 2-(3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)il)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)acetonitrilo **28** y 2-(4-clorofenil)-2-(3,4-dihidro isoquinolin-2(1H)-il)acetonitrilo **68** en los cuales los protones gemínales unidos al carbono C-1 se observaron como un multiplete y como dos dobletes respectivamente. En el compuesto **28** la señal de estos protones aparece solapada con la señal de los tres grupos metoxilo de la molécula, pero para la molécula **68**, sin grupos que resonarán en esta zona, los hidrógenos metilénicos del carbono C-1 se observaron como un par de dobletes con constantes de acoplamiento de 20.2 Hz, constante típica para protones gemínales (Figura 10). Esto puede deberse a la simetría que supone la presencia del cloro en la posición C-4 del arilo, lo que le permitiría al anillo tetrahidroisoquinolinico rotar generando dos mínimos de rotación brindando dos conformaciones diferenciables.

Debido a la presencia de un grupo metilo en el anillo piperidínico, para las moléculas **3**, **4**, **12**, **13**, **30** y **31** los protones gemínales de este anillo fueron distinguibles. Los protones axiales y ecuatoriales aparecieron como señales independientes entre 2.89 y 1.09 ppm, con constantes de acoplamientos de J_{ax-ax} y $J_{(ax-eq)}$ - $J_{(eq-eq)}$ típicas para protones vecinales (Figura 11).

Figura 11. Representación de los posibles acoplamientos para las 4-metilpiperidinas.



La evaluación de sus espectros bidimensionales ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HSQC permitió la identificación de los diferentes protones y la duplicación de las señales mostró la presencia de diasteroisómeros. Tomando como ejemplo a la molécula **4** se observó que los protones equatoriales unidos a los carbonos C-3 y C-5 aparecieron como doblete de dobletes con constantes de acoplamiento de 5.9 y 3.0 Hz mientras que sus protones axiales aparecieron como doble doblete de dobletes con constante de acoplamiento de 12.0 Hz deja en evidencia la interacción con dos protones axiales, en el caso de 5-H_{ax} con 6-H_{ax} y 4-H_{ax} y en el caso de 3-H_{ax} con 2-H_{ax} y 4-H_{ax}, en todos los casos con un $\theta \approx 180^{\circ}$ y su multiplicidad encontrada (Figura 12).


Figura 12. Representación de los posibles acoplamientos para las 4-metilpiperidinas.

Para el caso de grupos metilénicos identificados como C-2 y C-6 se observó un solapamiento de las señales para los protones 2-H_{eq} y 6H_{ax}, la aparición del protón 6-H_{eq} como un doblete de tripletes y una tripleta de dobletes para el 2-H_{ax}. La reducción en su multiplicidad, con respecto a lo encontrado para los grupos metilénicos 3 y 5, se observó debido a que en la posición C-1 del anillo el grupo metilénico ha sido sustituido por un nitrógeno. El estudio del espectro ¹H-¹³C HSQC permitió la asignación inequívoca de los diferentes carbonos con sus respectivos protones (Figura 13). Los protones unidos a los carbonos C-2 a C-6 de la piperidina presentaron carácter diasterotópico, debido a que se observaron que señales de protones bien diferenciadas interaccionaban con una misma señal en el espectro de RMN-¹³C.

Figura 13. Espectro ¹H-¹³C HSQC del compuesto **4**.



La asignación completa de las señales obtenidas en los espectros de RMN-¹³C se llevo a cabo mediante la directa comparación de los resultados de los experimentos de ¹³C y DEPT-135, en los que se logró diferenciar los carbonos metílicos de los metilénicos y cuaternarios (Figura 14). Además de estos resultados, las asignaciones propuestas fueron comparadas con los resultados de ¹H-¹H COSY y ¹H-¹³C HSQC para las moléculas con anillos de piperidina metil e hidroxi sustituidos y fragmentos tetrahidroisoquinolínicos.





El número de señales en los espectros de todas las moléculas obtenidas fue consistente con el número de carbonos esperados, teniendo en cuenta que, en algunos casos como en el mostrado en la figura, se observó solapamiento de señales para los carbonos del arilo provenientes del benzaldehído precursor.

Debido a que información cristalográfica por DRX de este tipo de compuestos ha sido poco explorada, el compuesto **25** se caracterizó por difracción de rayos X de polvo y el compuesto **64** por difracción de rayos X de monocristal. El patrón de DRX experimental del compuesto **25** se presenta en la figura 15 y los datos obtenidos en la tabla 3.

Figura 15. Patrón de difracción de rayos X en polvo de 25.



El 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo **25** cristalizó en un sistema monoclínico con grupo espacial P2₁/*a* (N° 14) estimado por el programa CHEKCELL, compatible con las ausencias sistemáticas. La densidad calculada para Z = 4 estuvo en concordancia con el valor medido, D_m = 1.29 g cm⁻³. El análisis de todo el patrón (111 máximos de difracción) con NBS*AIDS83 dio como resultado una celda unitaria con parámetros: *a* = 13.904 (2), *b* = 5.1696 (6), *c* = 21.628 (3) Å, β = 104.31 (1)° y *V* = 1506.3 (3) Å³. El conjunto de reflexiones observadas es consistente con el grupo espacial P2₁/*a* (N° 14). Las cifras de mérito de Wolf y Smith-Snyder fueron *M*₂₀ = 54.1 y *F*₃₀ = 151.4 (0.0051, 39), respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros obtenidos por DRX de polvo para el compuesto 25.

Compuesto	25
Sistema cristalino	Monocíclico
Grupo espacial	P2 ₁ /a (14)
a (Å)	13.904 (2)
b (Å)	5.1696 (6)
<i>c</i> (Å)	21.628 (3)
β (°)	104.31 (1)

V (Å ³)	1506.3 (3)
Z	4
M ₂₀	54.1
F ₃₀	151.4 (0.0051.39)
D _m	1.29 g cm ⁻³

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización del compuesto 2-(3,4dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-(4-(dimetilamino)fenil)acetonitrilo **64** mediante la difracción de rayos X de monocristal lo que permitió determinar que cristaliza en un sistema monoclínico con grupo espacial P_{21}/c (No. 14) (Figura 16). Los datos de cristal, los parámetros de recopilación de datos y los resultados del refinamiento de la estructura se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros y refinamiento para el α -aminonitrilo 64.

CCDC referencia	1499111
Formula Molecular	$C_{19}H_{21}N_3$
Mr	291.41
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i> (No. 14)
a / b / c [Å]	13.2197(9) / 6.4454(4) / 19.1092(13)
β [°]	95.051(8)
V [Å ³]	1621.90(19)
Z	4
<i>D</i> _c [g cm ⁻³]	1.193
μ(ΜοΚα) [mm ⁻¹]	0.071
F (000)	624
Tamaño del cristal [mm]	0.10 x 0.13 x 0.26
Color del cristal / habit	amarillos / prismas
Recopilación de datos	
Temperatura (K)	293
Radiación [Å]	ΜοΚα 0.71075
θ Min / Max [°]	2.1/27.6
Conjunto de datos	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 17; -6 ≤ <i>k</i> ≤ 8; -24 ≤ <i>l</i> ≤ 24
Tot., Uniq. Data, $R_{\rm int}$, R_{σ}	12233, 3681, 0.022, 0.0199
Datos observados [$I > 2.0 \sigma(I)$]	2639

Datos del cristal

Refinamiento

Nref / Npar	3681 / 202
R, wR2, S	0.0434, 0.1248, 1.02
Max. and Av. variación/error	0.00, 0.00
Min. and Max. Resd. Dens. [e ⁻ Å ⁻³]	-0.16, 0.15

La unidad asimétrica contiene una molécula de **64**. Se observó que el anillo que contiene el nitrógeno en el fragmento 3,4 dihidroisoquinolin adopta una conformación de media silla torcida, basado en el análisis de los parámetros de agrupamiento de anillo de Cremer y Pople realizado con PLATON (Figura 16).

Figura 16. Estructura molecular de 64 y su asignación obtenida (50% de probabilidad de elipsoides).



Los mejores planos a través de los anillos de arilo de la molécula presentan un ángulo de 86.67(7)° mientras que los contactos convencionales de enlace de hidrógeno no se observaron. Sin embargo, se determinó que una serie de interacciones intermoleculares desempeñan un papel importante en el empaquetamiento del cristal (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros geométricos para las interacciones intermoleculares de 64.

Contacto	D(H J) (Å)	–C–H […] J (°)	Simetría
C(5)–H(5) N(3)	2.70 D(H […] Cg) (Å)	121 –C–H […] Cg (°)	1- <i>x</i> , 2- <i>y</i> , 1- <i>z</i>
C(11)–H(11B) C _B	2.86	156	2- <i>x</i> ,1- <i>y</i> ,1- <i>z</i>
C(9)–H(9) C _C	2.87	137	1- <i>x</i> ,1- <i>y</i> ,1- <i>z</i>

Se produce un contacto C-H···N entre el nitrilo N3 y el C5-H5 de un anillo C con la operación de simetría 1-x, 2-y, 1-z (2.700 Å, 121°). Un análisis de contactos C-H···N similares en estructuras contenidas en el CSD indicó que las distancias varían entre 2.332 y 2.749 Å (media 2.619 Å) y los ángulos difieren entre 77.96° y 175.42° (media 131.61°). Las interacciones C-H···N observadas dan como resultado dímeros cíclicos entre moléculas antiparalelas que se puede representar, de manera similar a los enlaces de hidrógeno convencionales (Figura 17).

Figura 17. Interacciones C-H···N formando dímeros del compuesto 64.



Igualmente, se observaron dos interacciones C-H··· π , donde los pares de moléculas relacionadas por 2-x, 1-y, 1-z interactuaron de forma antiparalela a través de C (11) -H (11B) y el centroide del anillo B (CB) (Figura 18). Al mismo tiempo, las interacciones entre C(9)-H(9) con el centroide del anillo C (CC) relacionadas por 1 - x, 1 - y, 1 - z ocurrieron para producir cintas en zigzag que se extienden a lo largo del eje *a*.

Figura 18. Interacciones C-H··· π produciendo cintas en zig-zag del compuesto **64**.



Las distancias entre el átomo de H y el centroide (Cg) de cada anillo, H…CB y H…CC encontradas fueron de 2.86 y 2.87 Å y los ángulos C-H…Cg de 137° y 156° respectivamente (Tabla 5). Las cintas resultantes se apilaron a lo largo del eje c e interactuaron a través de contactos van der Waals (Figura 19).

Figura 19. Empaquetamiento del compuesto 64 a lo largo del eje b.



2.5. CONCLUSIONES

Se consiguió el diseño de nuevos α-aminonitrilos, análogos del alcaloide natural girgensohnina, incorporando fragmentos con reportada acción biológica. La realización del cribado *in silico*, utilizando como criterio seleccionador varios

descriptores moleculares relacionados con las propiedades ADMET, mostró que todas las moléculas diseñadas presentan perfiles farmacocinéticos aceptables, convirtiéndolas en blancos atractivos para su desarrollo experimental.

La evaluación de diferentes modificaciones sobre la versión clásica de Strecker permitió la selección un protocolo en el que se hace uso de (KCN)/ácido sulfúrico soportado en gel de sílice SSA como fuente de cianuro y catalizador respectivamente. Usando las condiciones de reacción y el sistema catalítico estudiado fue posible el acceso sintético a las 70 moléculas diseñadas, empleando una reacción "one-pot", cuya formación se realizó bajo las normas de la química sostenible.

La completa caracterización de los productos obtenidos empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas demostró la obtención inequívoca de los productos diseñados. El estudio de los espectros obtenidos para los compuestos con sustituyentes en su anillo de piperidina confirmó la presencia de diasteroisómeros y los resultados de empaquetamiento producto del análisis de difracción de rayos X mostraron que los productos se generaron como mezclas enantioméricas. Finalmente, cabe señalar que las condiciones de reacción verdes, la simplicidad y la eficacia del procedimiento sintético propuesto para la obtención de los α -aminonitrilos permitieron su preparación a gran escala, consideración de gran importancia al tener en cuenta el interés particular para su evaluación sobre diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.6. REFERENCIAS

[1] E. Pichersky, D.R. Gang, Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective., Trends Plant Sci. 5 (2000) 439–45.

[2] M. Wink, Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels, Stud.Nat. Prod. Chem. 21 (2000) 3–122.

119

[3] T. Aniszewski, Alkaloids – Secrets of life, (2007) First Edition, Elsevier.

[4] M. Wink, The role of quinolizidne alkaloids in plant-insect interactions, in: Insect-Plant Interact., 1992: pp. 131–166.

[5] P. Maximo, L.M. Ferreira, U.N. De Lisboa, Indolizidine and quinolizidine alkaloids structure and bioactivity, Stud. Nat. Prod. Chem. 27 (2002) 233–298.

[6] W. Meissner, C. Bernard, Alcaloides: aspectos generales (I), Panorama Actual Med. 25 (2001) 222–227.

[7] J.M. Miller, E.E. Conn, Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants., Plant Physiol. 65 (1980) 1199–202.

[8] B. Cherry, E. Fruits, E. Swain, C.P. Li, J.E. Poulton, Development of the Potential for Cyanogenesis in Maturing, (1992) 1423–1428.

[9] R.E. Miller, M.J. McConville, I.E. Woodrow, Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree Clerodendrum grayi (Lamiaceae)., Phytochemistry. 67 (2006) 43–51.

[10] W. Girald, A. Collin, M. Izquierdo, Toxicity and delivery methods for the linamarase/linamarin/glucose oxidase system, when used against human glioma tumors implanted in the brain of nude rats., Cancer Lett. 313 (2011) 99–107.

[11] Y. Akgul, D. Ferreira, E. a Abourashed, I. a Khan, Lotaustralin from Rhodiola rosea roots., Fitoterapia. 75 (2004) 612–4.

 [12] H. Johansen, L.H. Rasmussen, C.E. Olsen, H.C. Bruun Hansen, Rate of hydrolysis and degradation of the cyanogenic glycoside - dhurrin-in soil., Chemosphere. 67 (2007) 259–266.

[13] A.E. Burns, J.H. Bradbury, T.R. Cavagnaro, R.M. Gleadow, Total cyanide content of cassava food products in Australia, J. Food Compos. Anal. 25 (2012) 79–82.

[14] H. Wajant, S. Frsterb, H. Biittinger, F. Effenbergerb, K. Pfizenmaier, Acetone

cyanohydrin lyase from Manihot esculenta (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases, Plant Science 108 (1995) 1-11.

[15] A. Nahrstedt, M. Lechtenberg, A. Brinker, D. Seigler, R. Hegnauerb, 4 Hydroxymandelonitrile glucosides, dhurrin in Suckleya suckleyana and taxiphyllin in
 Girgensohnia oppositiflora (Chenopodiaceae), Phytochemistry. 33 (1993) 847–850.

[16] K.C. Probst, G. Jung, Solid-phase S-3CR generates N-substituted alphaaminonitriles for the synthesis of alpha-phenyl-alpha-(1-piperazinyl) substituted amino acids., Amino Acids. 30 (2006) 243–50.

[17] L.Y. Vargas, V. V Kouznetsov, First Girgensohnine Analogs Prepared
 Through InCl 3 -catalyzed Strecker Reaction and their Bioprospection, Curr. Org.
 Synth. 10 (2013) 969–973.

[18] C. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability., J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 44 (2001) 235–49.

[19] I. V Tetko, Computing chemistry on the web., Drug Discov. Today. 10 (2005) 1497–500. doi:10.1016/S1359-6446(05)03584-1.

[20] E.J. Park, S. Lee, S. Chang, Acetone cyanohydrin as a source of HCN in the Cu-catalyzed hydrocyanation of alpha-aryl diazoacetates., J. Org. Chem. 75 (2010) 2760–2.

[21] T.S. Heugebaert, B.I. Roman, A. De Blieck, C. Stevens, A safe production method for acetone cyanohydrin, Tetrahedron Lett. 51 (2010) 4189–4191.

[22] I. Mohammadpoor-Baltork, V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, M.A. Zolfigol, M. Abdollahi-Alibeik, A.R. Khosropour, H. Kargar, S.F. Hojati, Silica sulfuric acid: A versatile and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of oxazolines and imidazolines under various reaction conditions, Catal. Commun. 9 (2008) 894–901.

[23] A. Zolfigol, Silica sulfuric acid / NaNO 2 as a novel heterogeneous system for

production of thionitrites and disulfides under mild conditions, Tetrahedron. 57 (2001) 9509–9511.

[24] R. Da Silva, H.M.D. Navickiene, M.J. Kato, V.D.S. Bolzani, C.I. Méda, M.C.M. Young, M. Furlan, Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*., Phytochemistry. 59 (2002) 521–7.

[25] N. Terzioglu, R.M. van Rijn, R. Bakker, I. De Esch, R. Leurs, Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H(4) receptor antagonists., Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 5251–6.

[26] M.D. Arbo, M.L. Bastos, H.F. Carmo, Piperazine compounds as drugs of abuse., Drug Alcohol Depend. 122 (2012) 174–85.

[27] S.K. Prajapti, A. Nagarsenkar, B.N. Babu, An efficient synthesis of 5substituted 1H-tetrazoles via $B(C_6F_5)_3$ catalyzed [3+2] cycloaddition of nitriles and sodium azide, Tetrahedron Lett. 55 (2014) 3507–3510.

[28] D. Yildiz, Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects., Toxicon. 43 (2004) 619–32.

[29] X. Chen, M. Wei, H. Zhang, C. Luo, Y. Chen, Y. Chen, Effect of vanillin and ethyl vanillin on cytochrome P450 activity in vitro and in vivo., Food Chem. Toxicol.
50 (2012) 1897–901.

[30] A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays., Biochim. Biophys. Acta. 1810 (2011) 170–7.

[31] G. Tao, Y. Irie, D.-J. Li, W.M. Keung, Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity., Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 4777–88.

[32] S. Ducki, D. Rennison, M. Woo, A. Kendall, J.F.D. Chabert, A.T. McGown, N.J. Lawrence, Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule

polymerization. Part 1: synthesis and biological evaluation of antivascular activity., Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7698–710.

[33] Y.J. Gao, S. Stead, R.M.K.W. Lee, Papaverine induces apoptosis in vascular endothelial and smooth muscle cells., Life Sci. 70 (2002) 2675–85.

[34] C. Rauch, Toward a mechanical control of drug delivery. On the relationship between Lipinski's 2nd rule and cytosolic pH changes in doxorubicin resistance levels in cancer cells: a comparison to published data., Eur. Biophys. J. 38 (2009) 829–46.

[35] C. a Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings., Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (2001) 3–26.

[36] C. a Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings., Adv. Drug Deliv. Rev. 64 (2012) 4–17.

[37] A. Speck-planche, V. V Kleandrova, M.T. Scotti, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Fragment-based approach for the in silico discovery of multitarget insecticides, Chemom. Intell. Lab. Syst. 111 (2012) 39–45.

[38] M. Al-Sha'er, M.O. Taha, Discovery of novel CDK1 inhibitors by combining pharmacophore modeling, QSAR analysis and in silico screening followed by in vitro bioassay., Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 4316–30.

[39] R. Brenk, A. Schipani, D. James, A. Krasowski, I.H. Gilbert, J. Frearson, P.G.Wyatt, Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases, ChemMedChem. 3 (2008) 435–444.

[40] J.B. Baell, G.A. Holloway, New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays, J. Med. Chem. 53 (2010) 2719–2740.

123

[41] J. Baell, M.A. Walters, Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery, Nature. 513 (2014) 481–483.

[42] J.L. Dahlin, J.W.M. Nissink, J.M. Strasser, S. Francis, L. Higgins, H. Zhou, Z. Zhang, M.A. Walters, PAINS in the assay: Chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS, J. Med. Chem. 58 (2015) 2091–2113.

[43] M. Pouliot, S. Jeanmart, Pan Assay Interference Compounds (PAINS) and Other Promiscuous Compounds in Antifungal Research, J. Med. Chem. 59 (2016) 497–503.

[44] H. Gröger, Catalytic enantioselective Strecker reactions and analogous syntheses., Chem. Rev. 103 (2003) 2795–828.

[45] De Kanta, Vanadyl Triflate as an Efficient and Recyclable Catalyst for the Synthesis of α -Aminonitriles, Synth. Commun. 35 (2005) 1577–1582.

[46] J. Azizian, A. Mohammadi, N. Karimi, M.R. Mohammadizadeh, A.R. Karimi, Silica sulfuric acid a novel and heterogeneous catalyst for the synthesis of some new oxindole derivatives, Catal. Commun. 7 (2006) 752–755.

[47] E.S. Kim, H.S. Lee, S.H. Kim, J.N. Kim, An efficient InCl₃-catalyzed hydration of nitriles to amides: acetaldoxime as an effective water surrogate, Tetrahedron Lett. 51 (2010) 1589–1591.

[48] H. Veisi, Silica sulfuric acid (SSA) as a solid acid heterogeneous catalyst for one-pot synthesis of substituted pyrroles under solvent-free conditions at room temperature, Tetrahedron Lett. 51 (2010) 2109–2114.

[49] M. Baherad, A. Keivanloo, M. Siavashi, M. Omidian, Three-component synthesis of imidazo[1,2-c]pyrimidines using silica sulfuric acid (SSA), Chinese Chem. Lett. 25 (2014) 149–151.

[50] P. Gupta, S. Paul, Solid acids: Green alternatives for acid catalysis, Catal.

Today. 236 (2014) 153-170.

[51] L. Resnick, R.J. Galante, A practical synthesis of 3-ethyl-l-norvaline, Tetrahedron: Asymmetry. 17 (2006) 846–849.

 [52] S. Nakamura, N. Sato, M. Sugimoto, T. Toru, A new approach to enantioselective cyanation of imines with Et₂AICN, Tetrahedron Asymmetry. 15 (2004) 1513–1516.

[53] A. Heydari, A. Arefi, S. Khaksar, R.K. Shiroodi, Guanidine hydrochloride: An active and simple catalyst for Strecker type reaction, J. Mol. Catal. A Chem. 271 (2007) 142–144.

3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* Y DOCKING MOLECULAR DE ANÁLOGOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA COMO INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA ACHE.

Artículos publicados del capítulo:

Andrés G. Rueda, Aurora L. Carreño Otero, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov. Revista Brasileira de Entomolgia, 62 (2018) 112-118.

Aurora L. Carreño Otero, Leonor Y. Vargas Méndez, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov. European Journal of Medicinal Chemistry, 78 (2014) 392-400.

3.1. RESUMEN

La química orgánica como ciencia en constante evolución, ha estado desde siempre ligada a los diferentes y variados procesos que toman lugar en los organismos vivos. La generación de sistemas inspirados en los metabolitos encontrados en la naturaleza ha permitido el descubrimiento de nuevos compuestos capaces de actuar sobre blancos enzimáticos específicos. Dentro de estos sistemas naturales se destacan aquellos que poseen en su estructura heterociclos nitrogenados, a los cuales se les ha atribuido una gran variedad de propiedades biológicas incluidas aquellas para el control y tratamiento de patologías como el Parkinson, Alzheimer, cáncer, leishmaniasis tripanosomiasis, malaria, e incluso para el control de plagas. Reportes previos indicaron la capacidad del alcaloide natural girgensohnina para inhibir moderadamente la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), este hallazgo llevo ha proponer la síntesis y evaluación de nuevos análogos α -aminonitrílicos buscando potenciar esta acción biológica. El alcaloide natural girgensohnina **1** y 83

análogos, sintetizados empleando modificaciones de la reacción clásica de Strecker, fueron evaluados en ensayos *in vitro*, sobre la AChE comercial de *Electrophorus electricus* encontrando valores de inhibición IC_{50} más bajos que el obtenido para **1** previamente. Con el objetivo de explorar y comprender mejor las interacciones receptor-ligando, AChE-análogos y, se realizaron estudios de acoplamiento molecular basados en la estructura cristalina de la enzima AChE encontradas en el ProteinData Bank PDB. Se encontraron valores de energías de acoplamiento más bajas que las reportadas y validadas para los ligandos de referencia (-9.89 y -10.97 Kcal mol⁻¹ para el diazinón y la galantamina, respectivamente), a excepción de aquellas moléculas con morfolina como fragmento amínico.

3.2. INTRODUCCIÓN

El estudio a nivel molecular de los distintos tipos de sinapsis ha permitido conocer mejor la etiología y la patología de diferentes enfermedades y además ha contribuido con el desarrollo de nuevos sistemas y estrategias terapéuticas para prevenirlas, tratarlas e incluso curarlas.¹ El descubrimiento en los años 50 de las acciones antisicóticas de la reserpina, alcaloide indólico, y de la clorpromazina, una fenotiazina, permitieron determinar que es en la sinapsis en donde residen las dianas biológicas susceptibles a moléculas con utilidad clínica.^{2,3} De acuerdo a la distancia por la cual se encuentran separadas dos células, la sinapsis puede ser eléctrica o química.⁴ En la sinapsis eléctrica las células están separadas por un espacio sináptico de solo 20 Å lo que permite una transmisión rápida de la señal, mientras en la sinapsis química, con un espacio de más de 200 Å, el potencial de acción, necesita la liberación, desde la neurona presináptica, de sustancias específicas conocidas como neurotransmisores, que se difunden y se unen a sus receptores correspondientes en la membrana postsináptica.^{5,6}

El neurotransmisor monoaminérgico acetilcolina ACh se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso tanto central como periférico y su función, al igual que la de otros neurotransmisores, es mediar en la actividad sináptica del sistema.^{7–} ⁹ Este éster acético de la colina es sintetizado en el citoplasma neuronal a partir de la unión de la colina, producida en el hígado y transportada a las neuronas por vía hemática, y el ácido acético en presencia de la acetil CoA. Su participación en diversas funciones fisiológicas y su carácter de neurotransmisor en la unión neuromuscular y cerebral de vertebrados e invertebrados ha propiciado su investigación buscando nuevas formas de bloquear o incrementar su actividad colinérgica. Un punto para su control se encuentra en la acetilcolinesterasa AChE, proteína tetramérica del grupo de las hidrolasas [EC.3.1.1.7] (Figura 20).^{10–12}

Figura 20. Sitio activo de la AChE.



Esta enzima se encuentra localizada en el sistema nervioso y los músculos y es la principal responsable de la degradación, por hidrólisis, del neurotransmisor ACh a colina y ácido acético permitiendo la transmisión de la señal nerviosa en el sistema nervioso central y periférico (Esquema 32).¹³ Comparaciones entre las características estructurales de la enzima en diferentes organismos y los requerimientos del sitio activo para lograr interacciones efectivas, han permitido

establecer que la AChE se encuentra evolutivamente conservada entre las diferentes especies.¹⁴

Esquema 32. Mecanismo simplificado de la degradación de la acetilcolina en el sitio activo de la AChE.





Tyr124, Tyr133, Trp236, Trp286, Phe295, Phe297, Tyr337, Tyr341, Phe338, Trp439 y Tyr449. Estos 14 residuos se encuentran conservados entre diferentes especies y Trp86 es vital para la unión de ACh en el bolsillo de la AChE ya que su mutación resulta en una disminución en 3000 veces de su actividad.^{15,16} Se han encontrado moléculas que al unirse a cualquiera de estos sitios llevan a la inhibición de la actividad de la enzima y al consecuente aumento en la concentración del neurotransmisor ACh en el espacio sináptico. Estas moléculas conocidas como inhibidores de la AChE han tenido un amplio uso clínico, como la galantamina que se emplea como tratamiento paliativo en la enfermedad de Alzheimer al retrasar el deterioro cognitivo de los pacientes. Otro uso de gran importancia es en el campo agrícola, al ser esta enzima una de las dianas sobre la que actúan insecticidas como el diazinón y el propoxur.^{17,18}

Debido al conocimiento alcanzado al estudiar las diferentes interacciones de las moléculas con los residuos del sitio activo al PAS y a la suposición de que la AChE promueve la formación de fibrillas amiloides mediante la interacción a través de los residuos del PAS, la búsqueda se ha orientado generación de inhibidores duales. Un excelente ejemplo es el donepecilo, inhibidor reversible de la AChE que se emplea como tratamiento en pacientes con enfermedad de Alzheimer, el cual es reconocido por el sitio A y el PAS conjuntamente.^{16,19} Estudios cristalinos reportados en la PDB han mostrado interacciones del fragmento bencilo del donepecilo con el sitio A, del nitrógeno del fragmento piperidínico con la garganta hidrófoba y del fragmento dimetoxinodanona con el PAS de la enzima (Figura 21).

Figura 21. Disposición del donepecilo en el sitio activo de la AChE.



Debido la necesidad de nuevos y eficientes inhibidores de la AChE, la búsqueda continua apoyándose en las moléculas sintetizadas por las plantas, donde los metabolitos naturales continúan siendo ejes centrales debido a sus potentes acciones sobre otros sistemas vivos, incluidos mamíferos e insectos.²⁰ Esta investigación involucró al alcaloide natural girgensohnina, compuesto cianogénico con un anillo de piperidina y un fragmento nitrílico que, contrario a los demás alcaloides clasificados en este grupo, no presenta un fragmento glucosídico en su estructura.²¹ Apoyados en reportes que indicaron su capacidad de inhibir a la actividad de la AChE de forma moderada y teniendo en cuenta la serie de análogos α -aminonitrilos generados empleando una metodología verde de Strecker, se propuso la evaluación in vitro de la actividad de estas moléculas sobre la AChE comercial de *Electrophorus electricus*.^{22,23} Finalmente, y gracias a diferentes herramientas computacionales que han permitido explorar las interacciones que estabilizan los sistemas AChE-ACh y AChE-inhibidor, se realizaron simulaciones de análogos.²⁴ molecular AChE- α -aminonitrilos acoplamiento Los hallazgos encontrados proporcionaron información acerca de los requerimientos del sitio

131

catalítico y la disposición de los análogos en el sitio activo, la cual puede ser usada para el diseño de nuevas moléculas activas.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. Procedimiento general para la síntesis de derivados αaminonitrílicos. La girgensohnina 1 y sus análogos 2-71 se sintetizaron usando una reacción de Strecker modificada, como se reporta en el capítulo dos del presente texto (Esquema 33). La caracterización estructural de los productos se realizó empleando las técnicas analíticas de IR, CG-EM o ESI-EM y la confirmación estructural definitiva se obtuvo producto de los análisis de RMN-¹H y RMN-¹³C.

Esquema 33. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.



Teniendo en cuenta los principios de la química verde, los análogos **72** a **78** fueron sintetizados empleando una metodología de la reacción de Strecker sin catalizador y con agua como disolvente. Se empleó una mezcla de benzaldehído (2 mmol) y amina cíclica (1,2 mmol) agitando durante 30 minutos. Se añadieron entonces KCN (1,2 mmol) como fuente de cianuro empleando agua como disolvente (15-20 mL) a temperatura ambiente (6-14 h). Los productos se obtuvieron como sólidos blancos insolubles en el medio de reacción, por lo que se filtraron, lavaron y se secaron a 40 °C (Esquema 34).

R ₃ R ₂ R ₁	[≷] 0 ₊ HN Į	NH –	KCN H ₂ O, t.a. 6-14h	R_1 R_2 R_3	CN N N N N	R ₃ R ₂ R ₁ CN
	Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	n	
	72	Н	OMe	Н	1	-
	73	Н	OMe	OMe	1	
	74	OMe	OMe	OMe	1	
	75	Н	(OCH ₂ O)	-	1	
	76	Н	OH	OMe	1	
	77	Н	OMe	OH	1	
	78	Н	N(Me) ₂	-	1	

Esquema 34. Obtención de los compuestos 72 - 78 bajo condiciones verdes.

Los compuestos **79** a **84** fueron sintetizados empleando NaBH₄ y SSA en metanol obteniendo las aminas secundarias de interés. Los productos se obtuvieron como líquidos amarillos y transparentes después de su purificación por columna cromatográfica. La caracterización estructural de los productos **72** a **84** se realizó empleando diferentes técnicas analíticas y los resultados encontrados fueron consistentes con las reportados en la literatura (Esquema 35).^{25,26}

Esquema 35. Obtención de los compuestos 79 - 84 vía aminación reductiva.

R ₁	R ₃) +	HN The NaBH	I₄, SSA → ⊖OH 4-6 h	R ₁ R ₂ F	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	X
	Comp.	R ₁	R ₂	R₃	n	х	
	79	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	
	80	н	OMe	OMe	0	CH_2	
	81	н	OMe	1e OMe		0	
	82	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	
	83	н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	
	84	Н	(OCH ₂ O)	-	1	0	

3.3.2. Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. La actividad inhibidora de los compuestos sintetizados **1-84** sobre la AChE se realizó empleando la metodología descrita por Ellman empleando AChE de Electrophorus electricus, ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico) (DTNB) y voduro de acetiltiocolina.²⁷ En una placa de 96 pocillos, se disolvieron 50 µL de la muestra en tampón fosfato (K₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄, 2.3 M, NaCl 150 M y Tween 20 al 0.05% a pH 7,6) así como 50 µL de la solución AChE (0,25 unidades/mL). Las soluciones de ensayo, excepto el sustrato, se pre incubaron con la enzima durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la pre incubación, se añadió el sustrato (0.1 mM de Na₂HPO₄, 0.6 mM de yoduro acetiltiocolina y 0.5 mmol/L de DTNB en agua Millipore, pH 7.5). La absorbancia del producto de color amarillo, generado por la hidrólisis espontánea del sustrato por acción de la AChE, se midió a 410 nm durante 5 minutos en un lector de placas. El alcaloide galantamina y el insecticida diazinón se emplearon como referencia. En cada ensayo se evaluaron cinco concentraciones diferentes de cada uno de los análogos obtenidos y cada ensayo general se realizó por triplicado en tres días diferentes para finalmente determinar los valores de IC_{50} por análisis de regresión.

Software y métodos computacionales. *Para el acoplamiento molecular*, diseño, manipulación y análisis de estructuras, minimización de energía y generación de confórmeros se utilizaron diferentes herramientas disponibles en el paquete OpenEye Scientific Software (OSS) bajo licencia académica, incluyendo un conjunto de aplicaciones para modelado molecular y quimioinformático.²⁸ Se generó un máximo de 1000 confórmeros con el software OMEGA 2.5.1.4 para describir el espacio conformacional para cada ligando.²⁹ Todos los confórmeros se generaron dentro de una ventana de energía de 10,0 Kcal/mol y se utilizó un límite de RMSD de 0,01 Å para eliminar las estructuras redundantes. El software SZYBKI 1.8.0.2 se utilizó para la optimización de la geometría y el cálculo de las energías de tensión en diferentes etapas del estudio.³⁰ Un acoplamiento molecular rígido entre múltiples conformaciones de cada uno de los ligandos y el receptor AChE se llevó a cabo con

134

software OEDocking 3.0.1. empleando este mismo programa para optimizar la conformación en el sitio de unión del receptor.³¹

3.3.3. Acoplamiento molecular. Para realizar las simulaciones, se llevó a cabo una búsqueda en modo de texto completo en el sitio web de Protein Data Bank (PDB) de cristales de la AChE de diferentes especies. El programa Clustal X y el algoritmo MUSCLE se utilizaron para el alineamiento de secuencia múltiple identificando las regiones conservadas y el porcentaje de identidad entre todas las secuencias evaluadas.^{32,33}

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ventaja que supone descubrir una actividad biológica específica de un metabolito secundario contribuye con el desarrollo de nuevos sistemas análogos que potencien esta actividad. Esta molécula se convierte entonces en el compuesto cabeza de serie que dirige el diseño y respalda la búsqueda de estrategias sintéticas que permitan la obtención de este producto natural y de sus análogos estructurales. Hallazgos de este tipo han fomentado el trabajo y el desarrollo mancomunado de áreas de la ciencia que van desde la química orgánica hasta la medicinal y la agroquímica.

Para la realización de pruebas en las que se evalúa la bioactividad de este tipo de moléculas es necesaria la obtención de cantidades considerables de productos con alta pureza. Los métodos tradicionales de extracción se encuentran limitados debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios obtenidos junto con el material de interés, además de presentarse en la mayoría de las ocasiones con rendimientos bajos, sin siguiera representar el 1% del material vegetal estudiado.

Empleando la reacción modificada de Strecker, empleando KCN y SSA como catalizador, se generó una serie de α -aminonitrilos análogos a la girgensohnina **1**.^{22,23} Reportes de la acción inhibitoria moderada sobre la AChE determinados para

135

la girgensohnina respaldaron la evaluación de los análogos obtenidos sobre esta enzima.²¹ La evaluación de su estructura al ser comparada con la del donepecilo mostró consistencias estructurales que previamente han sido exploradas en diferentes investigaciones (Figura 22).^{26,34}

Figura 22. Identificación de motivos estructurales en los sistemas evaluados.



Buscando comprender la importancia del fragmento nitrílico presente en **1** y sus análogos se empleó una versión verde de la reacción de Strecker obteniéndose así una serie de 7 moléculas con dos fragmentos nitrílicos en su estructura. Los productos **72** a **78** se obtuvieron como sólidos blancos poco solubles en agua, lo que permitió su purificación por filtración. Igualmente, empleando una reacción de aminación reductiva, una serie de 6 moléculas sin este fragmento fue obtenida e identificada como los compuestos **79** a **84** (Tabla 6).

Estructura	Comp	P.	Ρ.	P.	n	Y	Formula	РМ	Rto
LStructura	comp.	IN1	112	13		~		g/mol	%
	72	Н	OMe	Н	1	Ν	$C_{22}H_{24}N_4O_2$	376.45	61
R ₁ CN	73	н	OMe	OMe	1	Ν	$C_{24}H_{28}N_4O_4\\$	436.50	61
R ₂ CN	74	OMe	OMe	OMe	1	Ν	$C_{26}H_{32}N_4O_6$	496.56	62
$R_3 \qquad N \qquad R_3$	75	-	(OCH ₂ O)	-	1	Ν	$C_{22}H_{20}N_4O_4$	404.42	59
	76	н	ОН	OMe	1	Ν	$C_{22}H_{24}N_4O_4$	408.45	58
72 - 78 R ₁	77	н	OMe	OH	1	Ν	$C_{22}H_{24}N_4O_4$	g/mol 376.45 436.50 496.56 404.42 408.45 408.45 402.54 235.32 221.30 237.29 219.28	58
	78	-	N(Me) ₂	-	1	Ν	$C_{24}H_{30}N_6$	402.54	56
	79	Н	OMe	OMe	1	CH_2	$C_{14}H_{21}NO_2$	235.32	90
	80	н	OMe	OMe	0	CH_2	$C_{13}H_{19}NO_2$	221.30	88
н ₂ т R ₃	81	Н	OMe	OMe	1	0	$C_{13}H_{19}NO_3$	237.29	92
79 - 84	82	н	(OCH_2O)	-	1	CH_2	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂	219.28	90

Tabla 6. Características de los compuestos 72 - 84.

83	Н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	$C_{12}H_{15}NO_2$	205.25	89
84	Н	(OCH ₂ O)	-	1	0	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.25	87

La búsqueda de nuevos modelos moleculares que presenten actividad inhibitoria frente a la AChE, importante línea de estudios del LQOBio, llevó a la evaluación de las 84 moléculas obtenidas sobre la enzima AChE. El método más ampliamente utilizado para la determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa, elaborado por Ellman en 1961, se basa en un ensayo colorimétrico, donde en lugar de utilizar acetilcolina, compuesto que no presenta propiedades espectroscópicas características, se utiliza la acetilticolina como sustrato alternativo (Esquema 36).^{35,27,36}

Esquema 36. Generación del anión TNB.



Para permitir su detección por medio de la absorción de la luz se acopla una reacción a la conversión. La acetiltiocolina se hidroliza por medio de la AChE produciendo sus respectivos compuestos tiol. Éste es interceptado por el ácido 5,5 ditiobis [2-nitrobenzóico] (DTNB) formando un enlace bisulfuro y liberando el anión TNB de color amarillo. La formación de este compuesto se monitoreó midiendo la absorción de la mezcla reaccionante a una longitud de onda de 410 nm.

De las 84 moléculas evaluadas 45 mostraron valores de inhibición media IC₅₀ inferiores al reportado previamente para el alcaloide natural **1**. Se encontró que mientras solo dos análogos con sustituyente metoxilo en la posición C-4 del arilo, compuestos **5** y **9**, hacían parte de este grupo, la inclusión de dos grupos electrodonadores en las posiciones 3 y 4 del arilo, llevó a que seis de estos análogos, compuestos **11**, **14** - **16**, **18** y **19**, presentaron valores de inhibición más bajos que para **1** (IC₅₀ = 92.9 μ M). Igualmente, y debido a su equivalencia biológica, la presencia del fragmento dioximetilenico en los análogos sustituidos con grupos metoxilo e hidroxilo en las posiciones C-3 y C-4 del arilo, solo los compuestos **39**, con un sustituyente hidroxilo en la posición 3 de la piperidina, **43** y **50**, con piperacina N- sustituida, y **44** y **51**, con el fragmento de la tetrahidroisoquinolina, presentaron valores de IC₅₀ inferiores que el encontrado para el alcaloide **1** (Tabla 7).

Comp	D D		D.	P. n. Y		D.	P.	Formula	PM	PM IC ₅₀	
comp.	Π1	N 2	N3		~	Γ.4	N5	Fornula	g/mol	mg/L	μM
1	Н	OH	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216.28	20.1	92.9
2	Н	OMe	Н	1	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O$	230.32	50.1	217.3
3	Н	OMe	Н	1	CH_2	Me	Н	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.33	53.8	220.4
4	Н	OMe	Н	1	CH_2	Н	Me	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.34	36.3	148.6
5	Н	OMe	Н	1	CH_2	Н	ОН	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	16.5	67.1
6	Н	OMe	Н	0	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216.28	51.6	238.8
7	Н	OMe	Н	1	0	н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2\\$	232.28	60.3	259.4
8	Н	OMe	Н	1	NMe	н	Н	$C_{14}H_{19}N_3O$	245.32	23.4	95.5
9	Н	OMe	Н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275.35	20.2	73.3
10	Н	OMe	Н	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O$	278.35	33.0	118.6
11	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	260.33	11.6	44.6
12	Н	OMe	OMe	1	CH_2	Me	н	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.36	40.0	145.8
13	Н	OMe	OMe	1	CH_2	Н	Me	$C_{16}H_{22}N_{2}O_{2} \\$	274.36	43.8	159.6
14	Н	OMe	OMe	1	CH_2	н	OH	$C_{15}H_{20}N_2O_3\\$	276.33	11.2	40.4
15	Н	OMe	OMe	0	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_2\\$	246.30	10.3	41.8
16	н	OMe	OMe	1	0	Н	н	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	262.30	14.1	53.8
17	Н	OMe	OMe	1	NMe	н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275.35	104.4	379.2

Tabla 7. Valores IC₅₀ encontrados para los compuestos 1 - 84.

18	Н	OMe	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{16}H_{23}N_3O_3$	305.37	16.1	52.6
19	Н	OMe	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.37	22.2	72.0
20	OMe	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	Н	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	290.36	110.1	379.2
21	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Me	Н	$C_{17}H_{24}N_2O_3$	304.38	47.6	156.4
22	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	Me	$C_{17}H_{24}N_2O_3$	304.38	13.6	44.8
23	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	Н	ОН	$C_{16}H_{22}N_2O_4$	306.36	18.7	61.2
24	OMe	OMe	OMe	0	CH_2	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_3$	276.33	88.7	321.0
25	OMe	OMe	OMe	1	0	Н	Н	$C_{15}H_{20}N_2O_4$	292.33	113.7	388.9
26	OMe	OMe	OMe	1	NMe	Н	Н	$C_{16}H_{23}N_3O_3$	305.37	124.0	406.1
27	OMe	OMe	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{17}H_{25}N_3O_4$	335.40	15.1	45.0
28	OMe	OMe	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{20}H_{22}N_2O_3\\$	338.40	33.9	100.3
29	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	244.29	15.0	61.4
30	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Me	Н	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32	43.0	166.3
31	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	Me	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32	42.1	163.0
32	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	ОН	$C_{14}H_{16}N_2O_3\\$	260.29	20.5	78.8
33	Н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	Н	н	$C_{13}H_{14}N_2O_2$	230.26	11.6	50.4
34	Н	(OCH ₂ O)	-	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	246.26	14.2	58.6
35	Н	(OCH ₂ O)	-	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{17}N_3O_2$	259.30	123.2	475.1
36	Н	(OCH ₂ O)	-	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	н	$C_{15}H_{19}N_3O_3$	289.33	19.3	66.5
37	Н	(OCH ₂ O)	-	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{16}N_{2}O_{2}$	292.33	20.0	68.5
38	Н	OH	OMe	1	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	110.3	447.8
39	Н	ОН	OMe	1	CH_2	Н	ОН	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	262.30	20.8	79.1
40	Н	OH	OMe	0	CH_2	Н	н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28	83.2	358.2
41	Н	OH	OMe	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248.28	101.6	409.2
42	Н	OH	OMe	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_{3}O_{2} \\$	261.32	88.9	340.2
43	Н	OH	OMe	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_3$	291.35	23.1	79.2
44	Н	OH	OMe	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O_2$	294.35	17.3	58.9
45	Н	OMe	OH	1	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30	117.7	477.9
46	Н	OMe	OH	1	CH ₂	Н	ОН	$C_{14}H_{18}N_2O_3\\$	262.30	49.2	187.8
47	Н	OMe	OH	0	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28	91.5	393.9
48	Н	OMe	OH	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	248.28	90.1	362.9
49	Н	OMe	OH	1	NMe	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_3O_2$	261.32	91.5	350.1
50	Н	OMe	OH	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3O_3$	291.35	16.2	55.6
51	Н	OMe	OH	1	Ph	Н	-	$C_{18}H_{18}N_2O_2$	294.35	20.4	69.4
52	Н	OBz	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{20}H_{22}N_2O$	306.40	25.6	83.6
53	Н	OBz	Н	0	CH ₂	Н	Н	$C_{19}H_{20}N_2O$	292.37	7.8	26.6
54	Н	OBz	Н	1	0	Н	Н	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308.37	23.0	74.6
55	Н	OBz	Н	1	Ph	Н	-	$C_{24}H_{22}N_2O$	354.44	37.1	104.6
56	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{15}H_{21}N_3$	243.35	13.9	56.9

57	Н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Me	Н	$C_{16}H_{23}N_3$	257.37	8.8	34.1
58	н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Н	Me	$C_{16}H_{23}N_3$	257.37	10.7	41.4
59	н	N(Me) ₂	Н	1	CH_2	Н	ОН	$C_{15}H_{21}N_{3}O$	259.35	36.3	139.8
60	н	N(Me) ₂	Н	0	CH_2	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_3$	229.32	0.4	1.9
61	н	N(Me) ₂	Н	1	0	Н	Н	$C_{14}H_{19}N_3O$	245.32	41.9	171.0
62	Н	N(Me) ₂	Н	1	NMe	Н	н	$C_{15}H_{22}N_4$	258.36	18.8	72.6
63	н	N(Me) ₂	Н	1	N(CH ₂) ₂ OH	Н	Н	$C_{16}H_{24}N_4O$	288.39	16.2	56.2
64	Н	N(Me) ₂	Н	1	Ph	Н	-	$C_{19}H_{21}N_3$	291.39	7.7	26.4
65	Н	Cl	Н	1	CH ₂	Н	Н	$C_{13}H_{15}CIN_2$	234.72	26.4	112.5
66	н	CI	Н	0	CH_2	Н	н	$C_{12}H_{13}CIN_2$	220.70	29.5	133.5
67	н	CI	Н	1	0	Н	н	$C_{12}H_{13}CIN_2O$	236.70	26.3	111.1
68	Н	CI	Н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{15}CIN_2$	282.77	41.3	146.1
69	Н	Н	Н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{16}N_2$	248.32	11.8	47.6
70	Н	OH	Н	1	Ph	Н	-	$C_{17}H_{16}N_2O$	264.32	15.5	58.7
71	1-Ph	-	Н	1	Ph	Н	-	$C_{21}H_{18}N_2$	298.38	38.8	129.9
72	Н	OMe	Н	1	Ν	Н	Н	$C_{22}H_{24}N_4O_2$	376.45	9.5	25.2
73	Н	OMe	OMe	1	Ν	Н	Н	$C_{24}H_{28}N_4O_4$	436.50	14.1	32.4
74	OMe	OMe	OMe	1	Ν	Н	н	$C_{26}H_{32}N_4O_6$	496.56	26.8	53.9
75	н	(OCH ₂ O)	Н	1	Ν	Н	н	$C_{22}H_{20}N_4O_4$	404.42	23.6	58.3
76	н	ОН	OMe	1	Ν	Н	Н	$C_{22}H_{24}N_4O_4$	408.45	27.2	66.5
77	н	OMe	OH	1	Ν	Н	Н	$C_{22}H_{24}N_4O_4$	408.45	52.1	127.7
78	Н	N(Me) ₂	Н	1	Ν	Н	Н	$C_{24}H_{30}N_6$	402.54	10.4	25.8
79	Н	OMe	OMe	1	CH ₂	Н	Н	$C_{14}H_{21}NO_2$	235.32	18.8	79.9
80	н	OMe	OMe	0	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{19}NO_2$	221.30	19.8	89.2
81	Н	OMe	OMe	1	0	Н	Н	$C_{13}H_{19}NO_3$	237.29	21.6	90.9
82	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	Н	$C_{13}H_{17}NO_2$	219.28	12.2	55.6
83	Н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	Н	Н	$C_{12}H_{15}NO_2$	205.25	13.3	64.9
84	Н	(OCH_2O)	-	1	0	Н	Н	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.25	27.8	125.6
								Propoxur	209.25	0.02	0.071
								Diazinón	304.35	0.6	1.9
								Galantamina	287.35	0.3	1.0

Las líneas horizontales en la tabla agrupan las diferentes familias de compuestos sintetizados de acuerdo a su aldehído precursor (1 -71), al empleo de piperacina como motivo estructural amínico (72 -78), a los compuestos obtenidos vía aminación reductiva (79 -84) y finalmente se presentan los sistemas de referencia empleados.

Entre los análogos **56** a **64** cuyo precursor fue el 4-(dimetilamino)benzaldehído, los compuestos **59** y **61**, con un sustituyente hidroxilo en la posición C-3 de la piperidina y con un anillo de morfolina respectivamente, brindaron valores de IC₅₀ superiores a 139 μ M. Aunque entre los compuestos **72** y **78**, con 2 equivalentes de benzaldehído, solo el compuesto **77** mostró un IC₅₀ de 127.7 μ M, menos activo que **1**, se deben mencionar los inconvenientes debido a su baja solubilidad en agua y en la buffer de evaluación empleada en el ensayo. Estos compuestos se evaluaron a las concentraciones más bajas en las que se aseguraba la generación de soluciones homogéneas y fue necesario el empleo de Triton en lugar de Tween para facilitar su solubilidad.

Como tendencias generales entre los compuestos de la serie evaluada se encontró que mientras que mientras para los análogos 2 y 4-metilpiperidin sustituidos solo los compuestos **22**, **57** y **58** registraron valores de inhibición IC₅₀ inferiores a 50 μ M, ninguno de los análogos obtenidos empleando 4-clorobenzaldehído como precursor arílico, mostró valores de IC₅₀ inferiores a 100 μ M. Finalmente, entre la serie evaluada se encontró que el compuesto **60** con un valor IC₅₀ de 1.9 μ M, fue el mejor inhibidor diseñado, sintetizado y evaluado. Este valor encontrado es comparable con el hallado para el diazinón, compuesto organofosforado empleado como insecticida sobre cosechas de frutas y vegetales y también empleado para la eliminación de moscas, pulgas y cucarachas, y que actúa inhibiendo a la AChE en los insectos (Figura 23).^{37,38}

Figura 23. Análogo con el mayor valor de inhibición encontrado.



Obtenidos estos resultados se siguió con los estudios teóricos donde, para realizar las simulaciones, se llevó a cabo una búsqueda en modo de texto completo en el sitio web de Protein Data Bank (PDB) para acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* debido a que los ensayos *in vitro* se realizaron sobre la AChE de esta especie. Se encontraron tres resultados, y se seleccionó aquel con la mejor resolución (AP ID: 1C2O).³⁹ Sin embargo, una resolución de 4,2 Å es baja para los estudios de acoplamiento, se empleó esta secuencia como referencia para realizar una búsqueda de similitud con la herramienta BLAST en el sitio web de Uniprot.

Se seleccionaron un total de 5 secuencias de AChE correspondientes a diferentes organismos y con una estructura 3D informada con una resolución inferior a 3 Å. Clustal X y el algoritmo MUSCLE se utilizaron para un alineamiento de secuencia múltiple para identificar las regiones conservadas y el porcentaje de identidad entre todas las secuencias.^{33,32} Las secuencias seleccionadas y empleadas para el alineamiento fueron AChE de *Electrophorus electricus EeAChE* (AP ID: 1C2O), *Homo sapiens* (AP ID: 1B41), *Mus musculus* (AP ID: 1KU6), *Bungarus fasciatus* (AP ID: 4QWW); *Tetronarce californica* (AP ID: 1EA5) y *Anopheles gambiae* (AP ID: 5X61) (Figura 24).

Figura 24. Superposición de estructuras de la cadena A y sitio activo de la AChE: *Electrophorus electricus EeAChE* (1C2O naranja), *Homo sapiens* (1B41 púrpura), *Mus musculus* (1KU6 verde), *Bungarus fasciatus* (4QWW rojo); *Tetronarce californica* (1EA5 azul) y *Anopheles gambiae* (5X61 cian).



Entre las 5 secuencias, los sitios de unión tenían regiones altamente conservadas con una RMSD menor de 0,5 Å, en la que de los 19 residuos informados como relevantes en la tríada catalítica, el sitio aniónico periférico y la garganta hidrofóbica, solo 4 mostraron un valor ligeramente mayor de RMSD. La secuencia con mayores desviaciones fue observada para de *Anopheles gambiae*. La alineación de secuencias mostró una identidad del 88,5% entre AChE de *Electrophorus electricus* y *Homo sapiens* y como resultado se seleccionó esta AChE (PDB ID 1B41) para las simulaciones de acoplamiento.⁴⁰

La alineación muestra que hay una alta homología entre todas las estructuras 3D, el RMSD entre los residuos conservados estaba por debajo de 0.76 Å y casi un 85% de los átomos de la cadena principal tenían una RMSD de 2.5 Å o incluso mejor. Aunque se encontraron mayores discrepancias en los bucles, la región del sitio de unión estaba altamente conservada tanto en términos de forma como de naturaleza de sus aminoácidos. Las estructuras moleculares de girgensohnina y sus análogos, como estereoisómeros y diasteroisómeros, se generaron con VIDA 4.3.0.4 y se optimizaron con SZYBKI. Se generaron múltiples conformaciones para cada ligando con OMEGA y se guardaron en formato de archivo .oeb (Figura 25). El acoplamiento rígido y multiconformacional de la proteína con cada ligando se realizó utilizando diferentes herramientas en el paquete OEDOCKING. Para cada ligando se generó una caja lo suficientemente grande como para acomodar la cavidad centrada en el sitio de unión y se procesaron hasta 1000 conformaciones, pero solo se seleccionaron las mejores 5 mejores posturas para una reoptimización y análisis

Figura 25. Procesamiento estructural del análogo 11.



Posibles conformaciones

La preparación de los ligandos desempeñó un papel clave en la estimación y simulación de la interacción de la girgensohnina **1** y sus 83 análogos sintéticos sobre la AChE. El conjunto de 84 estructuras se acopló en el sitio de unión de AChE y los resultados encontrados indicaron una fuerte influencia de los fragmentos amínicos y arílicos entre los compuestos analizados (Tabla 8).

La mayoría de los compuestos, sin tener en cuenta su estructura, se unieron al grupo hidroxilo de la Tyr124 a través de su amina terciaria. El nitrógeno del nitrilo

presentó, en muchos casos, interacciones aceptoras-donoras con el grupo hidroxilo de la Tyr337. Igualmente, se observaron interacciones π - π , π -catión y/o π -H con uno o más de los residuos Trp86, Phe295, Tyr337 y Tyr341 pertenecientes al sitio de unión aniónico periférico PAS. Además, se observaron interacciones puente de hidrógeno con Gly121, Tyr124, Ser203, e His447, residuos esenciales del sitio activo, e interacciones con los residuos Tyr72, Trp86, Tyr124, Tyr133, Trp286, Phe295, Phe297 Tyr337 y Tyr341 que recubren la estrecha garganta hidrofóbica que conecta al PAS con el sitio activo.

Comp.	IC ₅₀	$\Delta \mathbf{G}$	Comp.	IC ₅₀	$\Delta \mathbf{G}$
	μM	Kcal mol ⁻¹		μM	Kcal mol ⁻¹
1	92.9	-10.95	44	58.9	-12.91
2	217.3	-11.43	45	477.9	-11.69
3	220.4	-11.98	46	187.8	-12.45
4	148.6	-12.80	47	393.9	-10.98
5	67.1	11.70	48	362.9	-10.56
6	238.8	-11.21	49	350.1	-11.15
7	259.4	-10.36	50	55.6	-12.10
8	95.5	-11.40	51	69.4	-12.76
9	73.3	-11.75	52	83.6	-14.92
10	118.6	-11.89	53	26.6	-13.70
11	44.6	-11.46	54	74.6	-14.09
12	145.8	-11.19	55	104.6	-14.77
13	159.6	-11.57	56	56.9	-11.87
14	40.4	-11.36	57	34.1	-11.70
15	41.8	-11.09	58	41.4	-12.06
16	53.8	-10.99	59	139.8	-11.76
17	379.2	-11.54	60	1.9	-11.23
18	52.6	-11.72	61	171.0	-11.14
19	72.0	-12.45	62	72.6	-10.77
20	379.2	-12.72	63	56.2	-12.25
21	156.4	-11.79	64	26.4	-12.97
22	44.8	-13.08	65	112.5	-11.06
23	61.2	-12.84	66	133.5	-10.91
24	321.0	-12.56	67	111.1	-10.32

Tabla 8. Energías de acoplamiento encontrados para los análogos evaluados.

25	388.9	-12.26	68	146.1	-11.94
26	406.1	-12.36	69	47.6	-12.42
27	45.0	-12.48	70	58.7	-12.66
28	100.3	-13.34	71	129.9	-12.92
29	61.4	-11.24	72	25.2	-14.30
30	166.3	-11.91	73	32.4	-12.69
31	163.0	-12.27	74	53.9	-11.62
32	78.8	-11.96	75	58.3	-14.54
33	50.4	-11.42	76	66.5	-13.77
34	58.6	-10.77	77	127.7	-13.65
35	475.1	-11.30	78	25.8	-13.82
36	66.5	-13.23	79	79.9	-12.21
37	68.5	-13.17	80	89.2	-11.94
38	447.8	-11.68	81	90.9	-11.70
39	79.1	-12.16	82	55.6	-11.69
40	358.2	-11.00	83	64.9	-11.55
41	409.2	-10.91	84	125.6	-11.10
42	340.2	-11.32	Diazinón	1.9	-9.89
43	79.2	-11.97	Galantamina	1.0	-10.97

La evaluación de las conformaciones adoptadas por los análogos en el sitio activo permitió determinar dos modos de unión principales, con orientaciones como las encontradas para el donepecilo y la galantamina (Figura 26). Estos resultados, acordes con los previamente reportados donde se evaluaron estos fármacos, se emplearon no solo para validar el tratamiento realizado sobre el receptor, sino también fueron tenidos en cuenta para determinar las interacciones más fuertes presentadas por los diferentes fragmentos que constituyeron los análogos evaluados. Mientras aquellos análogos que adquirían una disposición similar a la encontrada para el donepecilo presentaban interacciones con los residuos del PAS y de la garganta hidrófoba, los compuestos con un modo de unión como el observado para la galantamina presentaron interacciones con los residuos que constituían la parte más profunda del sitio activo.


Figura 26. Modos de unión del donepecilo y la galantamina en la AChE.

Como generalidades observadas se encontró que los valores de energía de acoplamiento para los análogos dispuestos en la zona profunda de la garganta, por ejemplo, para **34** y **41**, similares a la galantamina, fueron mayores que para aquellos

interaccionando de modo similar al donepecilo, incluso con residuos del PAS (Figura 27).

Figura 27. Comparación de residuos que participan en las interacciones con modos de unión similares a **A.** donepecilo y **B.** galantamina.



Entre los diferentes motivos estructurales presentes en los análogos sintetizados se encontró al fragmento morfolínico en 8 de las 20 moléculas con los valores de energía más altos, solo el compuesto **54**, con un sustituyente benciloxi en la posición 4 del arilo, presentó el 5 mejor valor de energía de toda la serie.

Tanto el 4-(benciloxi)benzaldehído como la 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina fueron los motivos estructurales con mayor recurrencia entre los compuestos con los valores de energía más bajos, es decir, con un mayor número de interacciones efectivas con los residuos del sitio activo de la AChE. Esto pudo observarse en los valores de energía determinados para los análogos **52** a **55** donde se encontró una interacción adicional a menos de 1.8 Å entre el fragmento nitrílico de los análogos y el residuo Phe295 (Figura 28). Dentro de los compuestos encontrados en estas familias se encontraron valores de IC₅₀ comparables con el encontrado para el alcaloide **1**,

donde por ejemplo los compuestos **19**, **37**, **44**, **51-54** y **64** mostraron ser de los más activos.

Figura 28. Interacciones del compuesto 55 en el sitio activo.



El anillo aromático de tetrahidroisoquinolina se encontró, en la mayoría de las estructuras, orientado hacia la zona más hidrófoba de la garganta, salvo para el análogo **28** donde adquirió una disposición en la que los grupos metoxilo de su fragmento arílico se orientaron hacia la parte más profunda de la garganta (Figura 29).

Figura 29. Interacciones en el sitio activo de análogos con su fragmento tetrahidroquinolínico orientado hacia **A.** la profundidad de la cavidad y **B.** hacia el PAS del sitio activo (observado solo para los enantiómeros del compuesto **28**).



Análogos con arilos 3,4-disustituidos y 3,4,5-trisustituidos con grupos metoxi, hidroxi y dioximetilen se dispusieron preferiblemente de forma semejante a la observada para el fragmento dimetoxiindanona del donepecilo. Los residuos implicados en esta interacción fueron la Phe295 y el Trp296, a través de su cadena principal que forma enlaces H con los átomos de oxígeno del ligando, y a través de enlaces de H con el grupo hidroxilo de la Asp74.

Debido a la evaluación de los diferentes enantiómeros y diasteroisómeros de los análogos sintetizados fue posible determinar que los enantiómeros R mostraron mayor afinidad que sus respectivos homólogos S (Figura 30). En estas situaciones, la diferencia entre los valores de energía encontrado entre los enantiómeros fue de alrededor de un 19,73% de variabilidad, mientras que en los casos donde los enantiómeros S presentaron una mayor energía de acoplamiento esta diferencia fue de solo un 8,37%.



Figura 30. Energías de acoplamiento e interacciones encontradas para los enantiómeros del compuesto **27**.

Esto significó que para los compuestos analizados con un solo centro quiral, los enantiómeros R tienden a producir afinidades mayores, es decir menores energías de acoplamiento, sin embargo, para los compuestos con múltiples centros quirales, esta tendencia no se observó. Para los diasteroisómeros se observaron diferencias marcadas con respecto a la disposición más estable adoptada en el sitio activo de la AChE. Los diasteroisómeros, análogos 2-metil y 3-hidroxi piperidin sustituidos, presentaron interacciones con diferentes residuos tanto del PAS, garganta hidrófoba y aquellos residuos más cercanos al sitio A. Resultados reportados y encontrados en el PDB para el complejo cristalino de la AChE de *Torpedo californica* (AP ID: 2C4H, con una resolución de 2.15 Å) después de ser tratada con una concentración de 500 mM de acetiliticolina, permiten observar que la cavidad donde se encuentra el sitio activo de la enzima puede enlazar más de una molécula del ligando. En este caso la primera molécula ingresa a lo profundo de la cavidad interaccionando con los residuos cercanos al sitio A y la segunda, en cambio, presenta interacciones con los residuos hidrófobos del PAS.

Como ejemplo y tomando en consideración los resultados encontrados para los diasteroisómeros, como en el caso del compuesto **46**, se observó que, aunque por sus características estructurales no puede actuar como un inhibidor dual, existe la posibilidad de que dos moléculas interaccionen con la cavidad de la AChE (Figura 31). Como en el caso de la figura 31, el compuesto **46** podría interaccionar con diasteroisómero RRS cercano al sitio A y el diasteroisómero RRR con el PAS a la entrada de la garganta de la AChE.





Al comparar los resultados de inhibición experimental encontrados para los análogos sintetizados con los determinados de forma teórica se pudo observar que aquellos compuestos con fragmento piperidin sustituidos y aquellos con pirrolidina en su estructura guardaron correlación al encontrarse entre los compuestos con los mejores resultados teóricos y experimentales. Aquellos compuestos obtenidos empleando morfolina como precursor amínico fueron, entre las series evaluadas, los que presentaron una inhibición mas baja en ambas evaluaciones, lo que mostró una correlación entre los resultados teóricos y practicos evaluados.

Al estudiar las diferentes orientaciones de estos análogos en el sitio activo de la enzima se evidenció que la presencia del oxígeno en el anillo de morfolina orientó a su grupo nitrílico de forma tal que generaba una interacción a 2.1 Å con la Ser125, mientras que en los análogos con piperidina el nitrógeno de este mismo fragmento podía interaccionar a distancias menores con diferentes residuos como la Ser203 y la Ala204 (Figura 32).



Figura 32. Distancias de interacción de los compuestos 2 (Ala204 a 1.80 Å) y 7 (Ser125 a 2.05 Å).

Los análogos **72** a **78** obtenidos a partir de piperacina y con dos fragmentos nitrílicos en su estructura mostraron altas afinidades de unión, atribuidas a una interacción adicional entre el segundo fragmento nitrílico con el residuo Phe295 del PAS a menos de 2.0 Å (Figura 33). Las dificultades en solubilidad observadas en los ensayos *in vitro* e incluso en disolventes orgánicos como el acetato de etilo y el cloroformo se presentaron como una gran desventaja para nuevas evaluaciones sobre otros sistemas enzimáticos. Figura 33. Interacciones del compuesto 73 en el sitio activo de la AChE.



La comparación entre las interacciones observadas para esta serie y para los análogos con y sin el fragmento nitrílico mostró que este grupo orienta a la estructura dentro del sitio activo de forma tal que se generan interacciones efectivas que contribuyen con su estabilidad (Figura 34).



Figura 34. Interacción del compuesto A. 11 con Ser125 no observada en B. 79.

Finalmente, para el compuesto **60**, con el menor valor de inhibición en el ensayo *in vitro* sobre la AChE, se encontró un valor de energía de acoplamiento más alto del

valor promedio de todos los resultados encontrados. Sus enantiómeros R y S se orientaron de diferente forma a lo largo de la cavidad del sitio activo de la enzima presentando interacciones con los residuos Ala 204, Ser125 y Phe295 (Figura 35).



Figura 35. Interacciones de los enantiómeros del compuesto 60: A. isómero R y B. isómero S.

3.5. CONCLUSIONES

Ochenta y cuatro moléculas, incluido el alcaloide natural girgensohnina empleado como estructura cabeza de serie, se analizaron para determinar su capacidad para inhibir la actividad de la AChE en ensayos *in vitro*, empleando enzima comercial de la especie *Electrophorus electricus*. Cuarenta y cinco de las moléculas obtenidas mostraron concentraciones de inhibición media menores que la encontrada para la girgensohnina (IC₅₀ = 92.9 μ M) bajo las mismas condiciones de evaluación. Se destacaron doce de los análogos con IC₅₀ entre 25,2 y 45,0 μ M y el análogo **60** con un valor IC₅₀ = 1.93 μ M comparable con el encontrado para el diazinón (IC₅₀ = 1.87 μ M), insecticida comercial organofosforado empleado como control en el ensayo.

El empleo de herramientas de docking molecular permitieron determinar los valores de la energía de acoplamiento de las moléculas en el sitio activo de la cadena A de la AChE de *Homo sapiens* (AP 1D: 1B41). Como interacciones características en

las series evaluadas se encontró que mientras su amina terciaria interaccionó con el grupo hidroxilo de la Tyr124, el nitrógeno del fragmento nitrílico lo hizo el residuo Tyr337. También se observaron interacciones π - π , π -catión y/o π -H con uno o más de los residuos pertenecientes al sitio de unión aniónico periférico PAS e interacciones tipo puente de hidrógeno con residuos del sitio activo y con los residuos encontrados entre el PAS y el sitio activo.

Los análogos preferiblemente adoptaron dos modos de unión principales semejantes a aquellos encontrados para el donepecilo y la galantamina, donde los que adoptaron este último modo de unión presentaron valores de energía más altos. La evaluación de los diferentes enantiómeros de los análogos evaluados permitió determinar como tendencia que los enantiómeros *R* presentaron una mayor afinidad por el sitio activo que los enantiómeros *S*. Finalmente se determinó que el fragmento nitrílico interactuó preferiblemente con los residuos Ser125, Ser203 y Ala 204 vía puentes de hidrógeno a distancias menores a los 2,5 Å. El alcance de las evaluaciones teóricas pudo constatarse después de analizar los resultados encontrados para los compuestos **72** a **78**, los cuales brindaron excelentes valores de energías de acoplamiento pero que presentaron inconvenientes de alta relevancia en los ensayos *in vitro* al presentarse problemas de solubilidad en las soluciones acuosas a pH morfológico usados en el ensayo.

3.6. REFERENCIAS

[1] A. García, L. Gandía, Fronteras en la enfermedad de Alzheimer, 2002, Farmaindustria, Madrid.

[2] M. Wink, Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels, Stud. Nat. Prod. Chem. 21 (2000) 3–122.

[3] T. Aniszewski, Alkaloids – Secrets of life, 2007.

[4] Z. Nusser, Creating diverse synapses from the same molecules, Curr. Opin.

Neurobiol. 51 (2018) 8–15.

[5] J.I. Nagy, A.E. Pereda, J.E. Rash, On the occurrence and enigmatic functions of mixed (chemical plus electrical) synapses in the mammalian CNS, Neurosci. Lett. (2017) 0–1.

[6] J. O'Brien, Design principles of electrical synaptic plasticity, Neurosci. Lett. (2017) 1–8.

[7] K. Matsuda, S.D. Buckingham, D. Kleier, J.J. Rauh, M. Grauso, D.B. Sattelle, Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors., Trends Pharmacol. Sci. 22 (2001) 573–80.

[8] M.A. Riaz, A. Chandor-Proust, C. Dauphin-Villemant, R. Poupardin, C.M. Jones,
 C. Strode, M. Régent-Kloeckner, J.-P. David, S. Reynaud, Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector Aedes aegypti., Aquat. Toxicol. 126 (2013) 326–37.

[9] M. Tomizawa, J.E. Casida, Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45 (2005) 247–68.

[10] J. Kao, Cholinesterase Inhibitors, Top Med Chem. 2 (2008) 25–51.

[11] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman, Acetycholinesterase: From 3D Structure to Function, Chem. Biol. Interact. 187 (2010) 10–22.

[12] P.J. Houghton, Y. Ren, M.-J. Howes, Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi., Nat. Prod. Rep. 23 (2006) 181–99.

[13] I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: How is structure related to function?, Chem. Biol. Interact. 175 (2008) 3–10.

[14] Y.H. Kim, S.H. Lee, Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and non-classical functions, J. Asia. Pac. Entomol. 21 (2018) 186–195.

[15] J. Wang, Z. Wang, X. Li, F. Li, J. Wu, L. Kong, X. Wang, Synthesis and evaluation

of multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and melatonin, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 4324–4338.

[16] A. Yan, K. Wang, Quantitative structure and bioactivity relationship study on human acetylcholinesterase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 22 (2012) 3336–3342.

[17] P. Meena, V. Nemaysh, M. Khatri, A. Manral, P.M. Luthra, M. Tiwari, Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of novel piperidine and piperazine derivatives as multi-targeted agents to treat Alzheimer's disease, Bioorganic Med. Chem. 23 (2015) 1135–1148.

[18] E.U. Mughal, A. Sadiq, S. Murtaza, H. Rafique, M.N. Zafar, T. Riaz, B.A. Khan, A. Hameed, K.M. Khan, Synthesis, structure-activity relationship and molecular docking of 3-oxoaurones and 3-thioaurones as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors, Bioorganic Med. Chem. 25 (2017) 100–106.

[19] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, Structure.
 7 (1999) 297–307.

[20] R.S. Rattan, Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin, Crop Prot. 29 (2010) 913–920.

[21] L.Y. Vargas, V. V Kouznetsov, First Girgensohnine Analogs Prepared Through InCl3 -catalyzed Strecker Reaction and their Bioprospection, Curr. Org. Synth. 10 (2013) 969–973.

[22] A.G. Rueda, A.L. Carreño Otero, J.E. Duque, V.V. Kouznetsov, Synthesis of new α-amino nitriles with insecticidal action on Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), Rev. Bras. Entomol. (2018).

[23] A.L. Carreño Otero, L.Y. Vargas Méndez, J.E. Duque L, V. V Kouznetsov, Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girgensohnine analogs on Aedes aegypti, vector of dengue fever., Eur. J. Med. Chem. 78 (2014) 392–400.

[24] H. Zeng, X. Wu, Alzheimer's disease drug development based on Computer-Aided Drug Design, Eur. J. Med. Chem. 121 (2016) 851–863.

[25] P. Galletti, M. Pori, D. Giacomini, Catalyst-Free Strecker Reaction in Water: A Simple and Efficient Protocol Using Acetone Cyanohydrin as Cyanide Source, Eur. J. Org. Chem. 2011 (2011) 3896–3903.

[26] M.E. Welsch, S. a Snyder, B.R. Stockwell, Privileged scaffolds for library design and drug discovery., Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 347–61.

[27] G.L. Ellman, K.D. Courtney, S. Francisco, A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharm. 7 (1961) 88–95.

[28] T.A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries, J. Comput. Chem. 20 (1999) 730–748.

[29] P. Hawkins, A.G. Skillman, G.L. Warren, B.A. Ellingson, M.T. Stahl, Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database, J. Chem. Inf. Model. 50 (2010) 572–584.

[30] S. Wlodek, A.G. Skillman, A. Nicholls, Ligand entropy in gas-phase, upon solvation and protein complexation. Fast estimation with quasi-Newton Hessian, J. Chem. Theory Comput. 6 (2010) 2140–2152.

[31] M. McGann, FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets,J. Comput. Aided. Mol. Des. 26 (2012) 897–906.

[32] R.C. Edgar, MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Res. 32 (2004) 1792–1797.

[33] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 4876–4882.

[34] D.A. Smith, Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional Groups: Impact of the Building Blocks of Medicinal Chemistry in ADMET, 2010.

[35] P. Järvinen, P. Vuorela, A. Hatakka, A. Fallarero, Potency determinations of acetylcholinesterase inhibitors using Ellman's reaction-based assay in screening: Effect of assay variants., Anal. Biochem. 408 (2011) 166–8.

[36] S. Di Giovanni, A. Borloz, A. Urbain, A. Marston, K. Hostettmann, P.-A. Carrupt,
M. Reist, *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods., Eur. J. Pharm. Sci. 33 (2008) 109–19.

[37] M. Colović, D. Krstić, S. Petrović, A. Leskovac, G. Joksić, J. Savić, M. Franko, P.
 Trebse, V. Vasić, Toxic effects of diazinon and its photodegradation products., Toxicol.
 Lett. 193 (2010) 9–18.

[38] J. Keizer, G. D'Agostino, L. Vittozzi, The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (Poecilia reticulata) and zebra fish (Brachydanio rerio), Aquat. Toxicol. 21 (1991) 239–254.

[39] Y. Bourne, J. Grassi, P.E. Bougis, P. Marchot, Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography, J. Biol. Chem. 274 (1999) 30370–30376.

[40] G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J.L. Sussman, Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II, Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 56 (2000) 1385–1394.

4. EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD *IN VIVO* E *IN VITRO* DE ANÁLOGOS DE LA GIRGENSOHNINA FRENTE A DIFERENTES MODELOS ANIMALES.

Artículos publicados del capítulo:

Andrés G. Rueda, Aurora L. Carreño Otero, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov. Revista Brasileira de Entomologia, 62 (2018) 112–118.

Mayra A. Borrero Landazabal, Aurora L. Carreño Otero, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque Luna, Stelia C. Mendez-Sanchez. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 144, p. 64-70.

Aurora L. Carreño Otero, Angela Maria Palacio-Cortés, Mario Antonio Navarro-Silva, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque L. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2018, 204, p. 14-25.

Juliana Cuadros, Aurora L. Carreño, Vladimir V. Kouznetsov, Jonny E. Duque. Biomedica, 2017, 37, Supl: 2, p. 50-58.

Aurora L. Carreño Otero, Leonor Y. Vargas Méndez, Jonny E. Duque L., Vladimir V. Kouznetsov. European Journal of Medicinal Chemistry, 78 (2014) 392-400.

4.1. RESUMEN

Hoy en día, para luchar contra plagas e insectos oportunistas se cuenta con una amplia gama de insecticidas que van desde los agentes agroquímicos clásicos, como los compuestos organofosforados, carbamatos y piretroides, hasta los insecticidas de tipo nicotínoides y neonicotínoides. Todos estos agentes

insecticidas, ya sean clásicos o modernos, afectan el funcionamiento del sistema colinérgico de los insectos causando daños severos en los receptores nicotínicos y/o en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa AChE. El descubrimiento de nuevas moléculas capaces de inhibir la AChE ha permitido perfilar nuevos insecticidas, con los cuales se busca solventar los inconvenientes de resistencia que ya presentan las colonias de insectos frente a productos comercialmente disponibles. Mediante la modificación de la reacción de Strecker, se obtuvo el alcaloide girgensohnina 1 y una serie de 83 análogos estructurales, de entre los cuales, y teniendo en cuenta su capacidad de inhibir a la AChE y sus energías de acoplamiento, 22 análogos fueron seleccionados y evaluados sobre larvas de Aedes aegypti, triatominos de Rhodnius prolixus y embriones de pez cebra Danio rerio buscando determinar su capacidad insecticida y su toxicidad. Finalmente, ensayos sobre las enzimas detoxificantes y la bioenergética mitocondrial de análogos seleccionados se emplearon para evaluar su mecanismo de acción sobre larvas de Aedes aegypti. Se encontró que análogos de la girgensohnina afectan el desarrollo biológico de la larvas de Aedes aegypti y ninfas de Rhodnius prolixus en condiciones de laboratorio. Mientras que la evaluación de análogos sobre la bioenergética mitocondrial mostró alteraciones en la cadena de transporte de electrones generando estrés oxidativo, la evaluación sobre las enzimas detoxificantes mostró perfiles conservados. Finalmente, la determinación de las CL₅₀ sobre embriones de pez cebra demostró que los análogos diseñados y evaluados son menos tóxicos que el alcaloide natural girgensohnina.

4.2. INTRODUCCIÓN

Enfermedades transmitidas a los humanos por la picadura de vectores artrópodos constituyen una porción significativa de la carga mundial de enfermedades infecciosas. Vectores, como los mosquitos, triatominos y garrapatas, entre otros, son agentes capaces de transportar y transmitir patógenos infecciosos como parásitos, virus y bacterias a otros organismos vivos.¹ Según la Organización

Mundial de la Saludo (OMS) cada año se registran más de 700 mil muertes como una consecuencia directa de enfermedades transmitidas por vectores y su distribución y proliferación es debida a complejos factores demográficos, medioambientales y sociales.

La fiebre del dengue y del chikungunya, el virus del Zika y el mal de Chagas son consideradas hoy en día enfermedades importantes a nivel mundial al afectar principalmente zonas tropicales y subtropicales, pero con reportes recientes en el norte de América y Europa.¹ El creciente número de casos probables, la alta incidencia de estas enfermedades en nuestro país y las estimaciones de personas infectadas o en riesgo de infección han llevado al estudio de los vectores transmisores de estas enfermedades.

4.2.1. Aedes aegypti: vector transmisor del dengue, Zika y chikungunya. El dengue es considerada una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes que afectan a las sociedades en términos de morbilidad y mortalidad, convirtiéndole en un problema de salud publica a nivel mundial.^{2,3} El primer estudio sobre la carga económica del dengue para las Américas, realizado entre 2000 y el 2007 por la Organización Panamericana de la Salud, indicó solo para esta enfermedad un costo promedio anual de US \$ 2.100 millones. Para el año 2010 se registraron más de un millón y medio de casos de dengue y se registraron 1194 muertes en todo el continente americano.⁴

El virus del dengue pertenece al grupo de los arbovirus del género *Flavivirus* (Fam. Flaviviridae) al ser transmitido por artrópodos hematófagos. La alta incidencia de esta enfermedad se debe a la circulación en conjunto de los cuatro serotipos de este virus, los cuales, debido a su sintomatología, que va desde una enfermedad similar a la gripe hasta síntomas hemorrágicos severos y shock hemodinámico, son indistinguibles. Se ha sugerido que una infección primaria confiere inmunidad contra el serotipo que se ha contraído y una protección por hasta 3 meses frente a un

serotipo diferente, tiempo después del cual una nueva infección con un serotipo diferente es mucho más agresiva.^{5,6}

En los últimos años enfermedades descubiertas en África y Asia han generado brotes epidémicos en países de América Latina. Este es el caso del chikungunya y el Zika, enfermedades que ingresaron por Brasil y que, debido a factores ambientales y de migración, rápidamente se extendieron por todo el continente. El agente transmisor de estas enfermedades son las hembras de *Aedes aegypti* las cuales, mediante picaduras, ingieren la sangre necesaria para su proceso de ovoposición y en el proceso infectan a los seres humanos. Después de su alimentación parental las hembras depositan sus huevos en agua limpia estancada en reservorios naturales, por ejemplo, después de la lluvia, o almacenadas por comunidades para su consumo. Debido a que estrategias para la eliminación de los mosquitos, como aquellas que buscan disminuir los criaderos o educar a los habitantes en zonas de riesgo, y a la ausencia de vacunas para prevenir o fármacos para tratar estas enfermedades no han brindado los resultados esperados, la estrategia más efectiva se ha centrado por años en el empleo de insecticidas sintéticos.

4.2.2. Rhodnius prolixus: vector transmisor del mal de Chagas. Actualmente la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, descubierta en 1909 por el médico brasilero Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, representa un grave problema de salud pública en Latinoamérica. De acuerdo a la OMS, la enfermedad de Chagas, cuyo agente causal es el parásito Trypanosoma cruzi, afecta la población de 21 países en América Latina.

Aunque existen diferentes formas de transmisión del párasito como por transfusión de sangre contaminada, por vías orales, transplacentarías o por el canal de parto, accidentes de laboratorio y trasplante de órganos, el principal modo de transmisión es a través del contacto con heces de triatominos infectados cuando la persona

instintivamente se frota la herida llevando las heces con parásitos a los ojos, la boca o alguna lesión en la piel. Aunque su interacción con los humanos es accidental, la prevalencia estimada de tripanosomiasis en Colombia varía entre 700,000 y 1,200,000 habitantes infectados y 8 millones en riesgo de contraer la infección.

En nuestro país diferentes especies de triatominos prevalecen de acuerdo a las condiciones de las regiones, *R. prolixus* prolifera en las regiones de los Andes, el Caribe, el Orinoco y la Amazonía; *T. dimidiata* en las regiones de los Andes, el Caribe y el Orinoco; *T. venosa* en las regiones de los Andes y la Orinoquia; *T. maculata* en las regiones de los Andes, el Caribe y el Orinoco, y *Pastrongylus geniculatus* en las regiones de los Andes, el Caribe, el Orinoco y la Amazonía. El departamento de Santander es una de las principales zonas endémicas de Colombia con la especie *R. prolixus* como principal agente causal.

Medicamentos como el Nirfutimox y Benznidazol, eficientes en una etapa temprana de la patología, no han impactado de forma considerable en la reducción de casos debido a que en la mayoría de los pacientes la enfermedad se expresa de forma asintomática, por lo cual no son tratados en su etapa controlable.^{7,8} Es así que el método más efectivo para prevenir esta enfermedad en América Latina ha sido, igualmente, el control del vector a través de insecticidas sintéticos.

4.2.3. Estrategias para el control de vectores. Debido a la falta de tratamientos específicos, vacunas efectivas o medicamentos preventivos para estas enfermedades infecciosas, se ha evidenciado que estas infecciones se previenen mejor empleando métodos de control de vectores.^{9–11} Estrategias como la gestión integrada de vectores promovida por la OMS desde el 2012 incluyen la interrupción del contacto humano-vector, la gestión ambiental, los controles biológicos y químicos y la iniciativa propia para la protección individual y doméstica.

El uso de repelentes, mosquiteros tratados con insecticida, insecticidas en aerosol, e incluso ropa para minimizar la exposición de la piel y el aire acondicionado para

reducir la picadura de mosquito son algunas de las estrategias caseras más populares.^{12–14} No obstante, ante brotes epidémicos la alternativa de control de vectores más común en etapas de larvas, ninfas y adultos es el uso de insecticidas sintéticos. Insecticidas convencionales del tipo organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, en muchos casos tóxicos para los mamíferos y perjudiciales para el medio ambiente, han sido empleados por décadas para el control de diferentes vectores (Figura 36).

Mientras los piretroides actúan produciendo interferencia en el mecanismo de transporte iónico dificultando su función neuronal, muchos otros perturban el funcionamiento del sistema colinérgico de los insectos causando daños severos en los receptores nicotínicos y/o en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa AChE.¹⁵ Este es el caso de los carbamatos y compuestos organofosforados que al inhibir esta enzima producen la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en el tejido neuromuscular de los insectos observándose su continua estimulación, parálisis y posterior muerte.^{16–18}

Sin embargo, la resistencia a los insecticidas, documentada para más de 500 especies de artrópodos es uno de los principales problemas en el control vectorial.^{19–21} El aumento en las dosis, la falta de rotación entre los insecticidas empleados y frecuencias de aplicación han generado modificaciones en las conformaciones de los receptores y un aumento en la actividad de enzimas detoxificantes disminuyendo la efectividad de los insecticidas comerciales. Debido a la necesidad de dosis mayores de un mismo producto han llegado a afectar a insectos beneficiosos como a los polinizadores e incluso a seres humanos.

Figura 36. Agentes agroquímicos empleados contra insectos vectores.



De acuerdo con estos hechos y debido a que la resistencia de las poblaciones de insectos a productos sintéticos está aumentando a un ritmo dramático, lo que pone en peligro la eficacia de cualquier método de control, la búsqueda de nuevos insecticidas ha sido priorizada. La necesidad contínua de explorar nuevas moléculas activas con diferentes mecanismos de acción y el descubrimiento de productos naturales capaces de inhibir AChE y presentar actividad insecticida ha llevado al estudio y evaluación de nuevas entidades químicas inspiradas en las estructuras de estos metabolitos.

Orientados en la búsqueda de nuevos sistemas activos es particularmente significativo determinar cuáles son los modos de acción de los nuevos sistemas propuestos y aquellos cambios que resultan en la resistencia a producto aplicados.²²

El descubrimiento de cómo nuevas moléculas pueden modificar diferentes sitios diana en insectos, por ejemplo, afectando la actividad normal de AChE, juega un papel clave en la generación de nuevos insecticidas. Además de AChE, las esterasas no específicas (α - y β -), las oxidasas de función mixta (MFO) y la glutationa S-transferasas (GST) también son enzimas que ayudan a los organismos a transformar y/o eliminar compuestos endógenos y exógenos.^{23,24} Estas enzimas de fase I pueden reconocer los xenobióticos ambientales y transformarlos por oxidación, reducción o hidrólisis. Ocasionalmente, los productos de fase I se convierten en sustratos para las enzimas de fase II. Estas enzimas catalizan la conjugación de xenobióticos a un compuesto hidrófilo, convirtiéndolo en un metabolito menos tóxico que puede eliminarse más fácilmente que la molécula precursora.^{25,26}

Reconocer los modos de acción de una nueva molécula activa adquiere gran relevancia cuando se propone su uso como insecticida debido a la exposición de diferentes plantas y animales a su acción después de aplicación. Debido a esto, los complejos de transporte de electrones en la mitocondria, al igual que las enzimas detoxificantes, se han estudiado intensamente como objetivo bioquímicos de insecticidas y acaricidas.^{27,28} Teniendo en cuenta el papel de las mitocondrias en la producción de especies reactivas de oxígeno, la regulación de los niveles de calcio, síntesis de ATP, procesos de señalización y muerte celular, las evaluaciones mitocondriales han mostrado ser útiles para comprender el efecto de un insecticida sobre la respiración celular.^{29–32}

Recientemente, la inclusión exitosa del vertebrado *Danio rerio,* conocido como pez cebra, como un modelo animal en las ciencias biomédicas ha presentado grandes ventajas con respecto a otros modelos animales empleados como las ratas o ratones.^{33–35} Este modelo ha tenido gran aceptación debido a las facilidades en el mantenimiento, a la economía de cría y a su alta tasa de reproducción además de contar con la secuencia de su genoma el cual presenta gran homología con los mamíferos. Todo esto ha permitido su empleo en estudios de toxicidad,

conductuales y genéticos además de facilitar el mecanismo de enfermedades humanas y permitir la evaluación de nuevos agentes terapéuticos.^{36,37}

El alcaloide girgensohnina y análogos obtenidos vía la reacción de Strecker mostraron inhibir a la AChE. Este hallazgo y sus características estructurales llevaron a proponer su evaluación *in vivo* sobre larvas de *A. aegypti* y sobre ninfas de *R. prolixus* e *in vitro* sobre las principales enzimas detoxificantes y sobre la bioenergética mitocondrial buscando determinar su modo de acción. Finalmente, estudios en los que se emplearon embriones de pez cebra tratados con análogos del alcaloide natural se llevaron a cabo buscando determinar su toxicidad y determinar sus concentraciones letales medias.

4.3. EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de los bioensayos presentados en este apartado, se seleccionaron 23 análogos de acuerdo con sus semejanzas estructurales y los resultados de inhibición previamente obtenidos, buscando establecer también relaciones entre sus estructuras y sus actividades.

4.3.1. Consideraciones generales: especie Aedes aegypti. Se utilizaron huevos de *A. aegypti* de la colonia Rockefeller UIS-CINTROP establecida en un insectario. Las larvas se criaron en bandejas de plástico ($35,5 \text{ cm} \times 21,5 \text{ cm} \times 6,5 \text{ cm}$) con aprox. 3.000 mL de agua sin cloro por debajo de 25 ± 5 °C; 75-80% de humedad y un fotoperiodo 12:12. Los mosquitos adultos de Rockefeller se mantuvieron en jaulas de cría en las mismas condiciones insectarias.

Una colonia silvestre de *A. aegypti* establecida a partir de un muestreo realizado con un total de 120 Ovitraps OV instalados en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga-Colombia en febrero de 2016, fue criada en el insectario del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la misma Universidad. Los huevos obtenidos se dejaron incubar y las larvas obtenidas se

usaron para establecer la colonia silvestre Santander en las mismas condiciones de la colonia Rockefeller. El ensayo biológico se realizó empleando a larvas de *A. aegypti* en el tercer estadio (7 \pm 1 día de edad). Larvas de referencia Rockefeller, utilizadas en los bioensayos, se mantuvieron apartadas en bandejas de plástico (35,5 cm) 21,5 cm) 6,5 cm) con aprox. 3000 mL de agua sin cloro, a temperatura ambiente (25 °C \pm 5), humedad (80 \pm 5%) y fotoperiodo (12:12).

4.3.2. Consideraciones generales: especie *Rhodnius prolixus*. Se utilizó una cepa de *R. prolixus* mantenida por más de diez años en el insectario de cría del CINTROP-UIS, el cual no ha tenido aporte de material externo y se ha mantenido libre de contacto con insecticidas. Esta colonia se mantuvo bajo condiciones controladas de 25±4 °C de temperatura, humedad relativa de 75±4% y un fotoperiodo de 12:12. Los adultos de *R. prolixus* se alimentaron cada ocho días con sangre de gallina Gallus gallus. En los bioensayos se utilizaron ninfas de I estadio de 24 a 36 horas de edad, con ayuno desde la eclosión y ninfas de V estadio con 8 días de ayuno y peso entre 20±30 mg.

4.3.3. Análogos del alcaloide girgensohnina empleados en los ensayos. Los compuestos ensayados se sintetizaron usando una reacción de Strecker modificada, como se reporta en el capítulo dos del presente texto (Esquema 37). La caracterización estructural de los productos se realizó empleando las técnicas analíticas de IR, CG-EM o ESI-EM y la confirmación estructural definitiva se obtuvo producto de los análisis de RMN-¹H y RMN-¹³C.

Esquema 37. Preparación de la girgensohnina y sus análogos.



Todos los compuestos se obtuvieron en forma de cristales blancos solubles en los disolventes y buffers de evaluación. Los análogos seleccionados se presentan en la tabla 9 donde también, para facilitar su identificación, se presenta la numeración empleada en los capítulos anteriores.

Comp	Num.	R	Ra	Ra	n	x	R.	Formula	PM
comp.	Cap. 2	IX1	112	13		Х	14		g/mol
1	1	Н	OH	Н	1	CH_2	Н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216.28
2	2	н	OMe	Н	1	CH_2	н	$C_{14}H_{18}N_2O$	230.32
3	3	н	OMe	Н	1	CH_2	Me	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.33
4	4	Н	OMe	Н	1	CH ₂ Me	н	$C_{15}H_{20}N_2O$	244.34
5	6	Н	OMe	Н	0	CH_2	н	$C_{13}H_{16}N_2O$	216,28
6	7	н	OMe	Н	1	0	Н	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	232.28
7	11	Н	OMe	OMe	1	CH_2	н	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	260.33
8	12	н	OMe	OMe	1	CH_2	Ме	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.36
9	13	Н	OMe	OMe	1	CH_2Me	Н	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.36
10	15	Н	OMe	OMe	0	CH_2	н	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	246.30
11	16	н	OMe	OMe	1	0	Н	$C_{14}H_{18}N_2O_3$	262.30
12	17	Н	OMe	OMe	1	NMe	н	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275.35
13	29	н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Н	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	244.29
14	30	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH_2	Me	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32
15	31	Н	(OCH ₂ O)	-	1	CH ₂ Me	н	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	258.32
16	33	Н	(OCH ₂ O)	-	0	CH_2	н	$C_{13}H_{14}N_2O_2$	230.26
17	34	Н	(OCH ₂ O)	-	1	0	н	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	246.26
18	35	н	(OCH_2O)	-	1	NMe	н	$C_{14}H_{17}N_3O_2$	259.30
19	20	OMe	OMe	OMe	1	CH_2	н	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	290.36
20	24	OMe	OMe	OMe	0	CH_2	н	$C_{15}H_{20}N_2O_3$	276.33
21	25	OMe	OMe	OMe	1	0	н	$C_{15}H_{20}N_2O_4$	292.33
22	26	OMe	OMe	OMe	1	NMe	Н	$C_{16}H_{23}N_3O_3$	305.37
23	60	Н	N(Me) ₂	Н	0	CH_2	н	$C_{14}H_{19}N_3$	229.32

Tabla 9. Análogos seleccionados para las evaluaciones biológicas.

4.3.4. Evaluación insecticida in vivo sobre larvas de *A. aegypti.* Después de alcanzar la etapa larval entre el tercer y cuarto instar, larvas de *A. aegypti* se contaron y se separaron con pipetas Pasteur y se llevaron a vasos de plástico con una capacidad de 100 mL que contenían 20 mL de agua declorada y un total de 10 larvas por evaluación. Se realizó una prueba de diagnóstico en la que las larvas estuvieron expuestas a diferentes concentraciones de los análogos (1000, 300, 270, 180, 140, 70, 60, 45 y 25 mg L⁻¹). Se colocaron cinco larvas por vaso, cuatro repeticiones por concentración y un control usando solo DMSO al 1%. Finalmente, se realizó un segundo bioensayo con las moléculas con mayores tasas de mortalidad en la prueba previa. La mortalidad de las larvas expuestas al tratamiento se determinó después de 24 y 48 h. Las larvas que no alcanzaron la superficie del agua cuando se estimularon se consideraron muertas. Las concentraciones letales (LC₅₀ y LC₉₉) y sus respectivos intervalos de confianza se calcularon a través de análisis Probit, utilizando el Sistema de Análisis Estadísticos (SAEG, versión 9.1 e 2007).

4.3.5. Actividad de las enzimas detoxificantes extraídas de larvas tratadas

Tratamiento de las larvas.

Para esta evaluación se seleccionó al compuesto **7** y se empleó al aceite esencial *Cymbopogon flexuosus* CFEO como control (Tabla 10). Las dosis experimentales para el compuesto **7** y la mezcla CFEO se determinaron a partir de sus valores de CL₅₀ encontrados en la evaluación larvicida previa.^{38,39}

	Nombres	Componentes mayoritarios			
Especie	comunes	Compuestos	% cantidad relativa		
	Citronola Iomon	Neral	28.2		
Cumbonogon		Geranial	28.2		
Cymbopogon	grass,	Geranyl acetate	10.0		
nexuosus	cochin grass or	Geraniol	9.0		
	malabar grass	trans-β-Caryophyllene	2.0		

Tabla 10. Componentes mayoritarios de *Cymbopogon flexuosus* CFEO.

^a Aceite esencial obtenido por hidordestilación con un 0.3 % de rendimiento.

Se usó DMSO como disolvente para la preparación de soluciones matriz, alcanzando las concentraciones finales en los recipientes de plástico con agua declorada y manteniendo la cantidad de DMSO por debajo del 1% del volumen final de evaluación (50 mL). Se colocaron 20 larvas en vasos de plástico que contenían 50 mL de agua sin cloro y se evaluó el efecto después de 24 h de exposición a 20,10, 35,18 y 70,35 mg L⁻¹ para el compuesto **7** y 18,45, 30,75 y 61,50 mg L⁻¹ para CFEO. Se establecieron cuatro repeticiones por concentración y un grupo de control que usa DMSO al 0,1%. Después del tiempo de exposición, se colocaron grupos de cinco larvas vivas dentro de tubos Eppendorf que se congelaron inmediatamente a -70 °C. Se realizaron tres réplicas biológicas del ensayo en tres días diferentes.

Ensayos bioquímicos.

Se utilizó una metodología modificada del Ministerio de Salud de Brasil.⁴⁰ Los tubos mantenidos a -70 °C se retiraron del congelador inmediatamente antes de su uso y cada uno se homogeneizó y se completó hasta 400 µL con tampón de fosfato de potasio (pH 7,2). Antes de la centrifugación, tres alícuotas de 25 µL cada una para cuantificar AChE y tres alícuotas adicionales, 20 µL cada una, para cuantificar MFO se retiraron del homogeneizado y se transfirieron a microplacas de 96 pocillos. El homogenizado restante se centrifugó a 12,000 g durante 60 s. Para reducir la proteólisis, los tubos se mantuvieron en hielo mientras se distribuía el homogenizado. Después de su centrifugación se transfirieron aproximadamente

200-220 μL del sobrenadante de cada tubo a una nueva microplaca de 96 pocillos. Seis enzimas desintoxicantes diferentes se cuantificaron para cada homogenizado: α -, β -esterasas, MFO, p-NPA esterasas, GST y acetilcolinesterasa (iAChE). Los niveles de absorbancia se midieron con un lector de microplacas Versamax® (Brand, Inc.) a una longitud de onda apropiada para cada enzima y la absorbancia media se calculó en base a las tres repeticiones. Las réplicas, que tenían un coeficiente de variación> 0.2, se descartaron para eliminar las diferencias debidas a errores manuales. El porcentaje de actividad enzimática superior a los 99 percentiles de las cepas se clasificó como "inalterado" cuando fue <15%, "alterado" cuando estuvo entre 15% y 50% y "altamente alterado" cuando fue > 50%.

Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa AChE

Para el ensayo AChE, que determina si el sitio de unión de la acetilcolina presente en *A. aegypti* se encuentra alterado, se distribuyeron 25 µL de los homogenados antes de la centrifugación, por triplicado, en dos microplacas denominadas AChE y AChI, respectivamente. En la placa AChE se cuantificó la actividad total de la acetilcolinesterasa y en la placa AChI se mide la actividad restante de esta enzima, en presencia de un inhibidor. Se empleó Propoxur, carbamato indicado por WHO/SIT/18.R4, como inhibidor. Se añadieron 145 µL de Triton 1% /fosfato de Na y 10 µL de DTNB (12 mg de ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB)/ 3 mL de tampón de KPO₄) a cada pocillo en ambas placas. Se añadieron 25 µL de la solución ATCh (17,4 mg de yoduro de acetiltiocolina/6 mL de agua Milli-Q) a cada pocillo de la placa AChE. Se añadieron 25 µL de la solución ATChI (17,4 mg de yoduro de acetiltiocolina / 6 mL de agua Milli-Q/6 µL de propoxur 0,1 M) a cada pocillo de la placa AChI. Las preparaciones se leyeron a 405 nm y los resultados de AChE se expresaron como el porcentaje de la actividad restante después de la adición del inhibidor.

Evaluación de las oxigenasas de función mixtas MFO

Se preparó una solución tampón de acetato de sodio (NaOAC) adicionando 41,6 mL de acetato de sodio 3 M (NaOAc) a 450 mL de H2O y luego se ajustó su pH a 5. A cada pocillo de la placa se adicionaron 200 μ L de dihidrocloruro de tetrametilbencidina (TMBZ-10 mg de dihidrocloruro de 3,3,5,5-tetrametil-bencidina/5 mL de metanol/15 mL de tampón NaOAc 0,25 M, pH 5,0). Finalmente, 25 μ L de peróxido de hidrógeno al 3% fueron adicionados a cada pozo. La placa se incubó luego durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se leyó a 620 nm.

Evaluación de glutationa S-transferasa (GST)

A cada 15 μ L homogenizado se añadieron 195 μ L de glutationa reducida (46,1 mg de glutationa reducida / 3,2 mg de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno cDNB/10 mL de metanol/15 mL de tampón KPO₄). Las lecturas de absorbancia se tomaron inmediatamente (T0) y en intervalos de un minuto durante 20 minutos a una longitud de onda de 340 nm. Los valores de absorbancia obtenidos en T0 se restaron de los valores obtenidos en T10 y los resultados se usaron en los análisis estadísticos.

Evaluación de la p-NPA esterasa

A 15 µL homogenizado se añadieron 200 µL de la solución de trabajo: p-NPA /fosfato de Na (3,6 mg de para-nitrofenil acetato/200 µL de acetonitrilo/19,8 mL de tampón de fosfato de sodio 50 mM). La absorbancia se leyó a 405 nm, a intervalos de 15 s durante 2 min. La lectura de 30 s se restó de la lectura de los 90 s y se usó en los análisis estadísticos. En este ensayo, el resultado se expresó como Δ Abs min-1 mg-1 de proteína, lo que significa que se calculó la variación de la absorbancia en 1 minuto, siendo corregida por el contenido de proteína total en cada adulto.

Evaluación de las α - y β -esterasas

Se añadieron 200 μ L de α -naftil acetato y β -naftil acetato (tampón 0,3 mM de KPO₄) a cada pozo previamente cargado con 10 μ L de homogenizado después de

la centrifugación. La preparación se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de lo cual se añadieron 50 μ L de Fast Blue (30 mg/3 mL de agua Milli-Q/7 mL de SDS al 3%) a cada pozo. Después de un período adicional de incubación de 5 minutos, la producción de α -naftol y β -naftol se midió a 570 nm y se expresó como μ moles de α -naftol por mg de proteína por minuto ± SE y β -naftol por mg de proteína por minuto ± SE y β -naftol por mg de proteína por minuto ± SE respectivamente.

Determinación de proteínas totales

Las concentraciones de proteína se determinaron para cada grupo de larvas. A alícuotas de 10 μ L de homogeneizado se añadieron 300 μ L del reactivo BioeRad a 1:5. El volumen final en cada pozo fue de 310 μ L. La absorbancia se leyó inmediatamente a 620 nm.

Controles

El mismo volumen de homogenizado usado en los ensayos respectivos se usó en los controles. Para los ensayos de esterasas, se incluyeron controles tanto positivos (α -naftol, β -naftol) como negativos (Milli-Q). Para el ensayo de MFO se usó una solución de citocromo C a 0,01 mg/mL como control positivo. Para el control positivo en el ensayo de proteína total, se añadieron 10 µL de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL y tampón de KPO₄ como controles positivo y negativo, respectivamente. Los sustratos estándar para los ensayos de esterasa p-NPA, glutatión-S-transferasa y acetilcolinesterasa no están disponibles, los controles negativos (tampón KPO₄) se incluyeron en estos ensayos. Todos los controles se trataron de la misma manera que los homogenizados evaluados.

Actividad de AChE en homogenizado larvas y adultos

Grupos de cinco larvas entre el tercer y cuarto instar y mosquitos adultos se colocaron por separado en tubos Eppendorf y se congelaron inmediatamente a -70 ° C. Los tubos se retiraron del congelador antes de su uso y cada uno se

homogeneizó en 30 μ L de agua Milli-Q y se completó a 400 μ L. Las larvas y los adultos se evaluaron por separado: 25 μ L de los homogenizados se distribuyeron por triplicado en dos microplacas siguiendo el protocolo previo de evaluación de la AChE. Concentraciones de 20.10, 40.0 y 80.0 mg L⁻¹ del α -aminonitrilo **7** y 20.6, 41.2 y 82.5 mg L⁻¹ de CFEO fueron evaluados reemplazando el inhibidor propoxur en la solución ATChI. Los controles negativos y positivos (tampón KPO₄ y propoxur) se incluyeron en estos ensayos. Finalmente, las microplacas se leyeron a 405 nm.

Análisis estadístico

Los resultados de la actividad enzimática se realizaron comparando el valor de la mediana de la cepa Rock y WSant, con y sin tratamiento, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (p <0,05) para cada enzima. Los valores de absorbancia se obtuvieron para las réplicas de larvas y se corrigieron en relación con el volumen final de los homogenizados de larvas, la unidad de actividad enzimática y el contenido de proteína total de cada conjunto de larvas. El percentil 99 se calculó para cada enzima y se calculó el porcentaje de muestras con actividad enzimática por encima de las cepas Rock o WSant del percentil 99. Las comparaciones en actividades enzimáticas entre las cepas y la actividad de AChE en larvas tratadas y homogenizados adultos se analizaron estadísticamente mediante la prueba no paramétrica (para datos sin distribución normal) de Kruskal-Wallis y se graficaron usando el programa GraphPad Prism 7.0a.

4.3.6. Evaluación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Para estas evaluaciones se emplearon los compuestos 7, 10, 13 y 16 con los cuales se buscó determinar si existe alguna relación entre sus características estructurales y su acción sobre los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Aislamiento de mitocondrias de A. larvas aegypti

Se usaron aproximadamente 10 g de larvas (N = 600-800) entre la tercer y cuarto instar, las se filtraron usando gasa quirúrgica y un medio de aislamiento compuesto de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2, EGTA 1 mM y 0.1% de BSA. Todas las larvas se procesaron en un homogeneizador Van Potter con el fin de romper sus membranas y obtener una suspensión homogénea para su posterior centrifugación. La suspensión obtenida se filtró usando fibra de vidrio, y la solución resultante se sometió a cuatro centrifugaciones adicionales, la primera a 300 x g a 4 °C durante 5 minutos, y luego se descartó el sedimento y el sobrenadante se sometió a la segunda centrifugación a 10000 × g a 4 °C durante 10 min. Para la tercera centrifugación, el precipitado se suspendió en medio de extracción y se centrifugó a 300 x g a 4 °C durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado resultante consistió en mitocondrias aisladas (parcialmente fragmentadas), que se mantuvieron en medio de extracción sin BSA a -70 °C hasta su uso.

Fragmentación mitocondrial

Las mitocondrias aisladas y almacenadas en tubos Eppendorf de 2 mL a -70 °C se fragmentaron usando ultrasonido durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, la suspensión obtenida se usó como fuente de enzima y se mantuvo a 4 °C.

Actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial

La NADH oxidasa y la succinato oxidasa se evaluaron polarográficamente usando un oxígrafo Hansatech (Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra) dotada con un electrodo de tipo Clark. La NADH deshidrogenasa (NADH: ubiquinona oxidorreductasa) y la succinato deshidrogenasa se determinaron mediante espectrofotometría y la actividad de la succinato de citocromo c reductasa (succinato: citocromo c oxidoreductasa) se midió mediante la reducción del citocromo c a 550 nm. Mientras que la actividad citocromo c oxidasa se determinó

a 550 nm, la actividad de la enzima NADH-citocromo c reductasa no se determinó debido a que se encontró una inhibición del complejo I.

Actividad de enzimas antioxidantes

La suspensión de mitocondrias fragmentadas se utilizó como fuente de enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y los resultados se expresaron como porcentaje de actividad específica. La SOD también se evaluó en proteínas totales, obtenidas en el sobrenadante de la primera centrifugación durante el aislamiento de las mitocondrias. La generación de radicales superóxido y la actividad de SOD se evaluaron mediante el método descrito por Nishimiki. Se empleó una mezcla de fenazina metosulfato PMS-NADH a pH 8,0 la cual genera un radical superóxido (O2% -) que puede medirse por su capacidad para reducir el NBT. Se realizaron tres experimentos usando este sistema de reacción. Experimento 1: Se indujo la generación de radicales superóxido, como fue descrito previamente y se analizó la capacidad de los compuestos para generar o eliminar el radical superóxido, este ensayo se realizó en ausencia de SOD. Experimento 2: La actividad de superóxido dismutasa se determinó por la presencia de NBT, PMS y NADH, según lo descrito por Nishimiki. En este ensayo, se usó una concentración de proteína (mitocondrial y total) capaz de reducir el 50% del radical superóxido generado en el control. Experimento 3: Para confirmar que los compuestos promueven la formación de ROS mediante "fuga de electrones", se incubaron los compuestos y mitocondrias fragmentadas (activadas con NADH) fueron incubadas (sin emplear SOD y PMS). En esta prueba, si se produce una fuga de electrones, las mitocondrias inducirán la formación de O₂^{•-}, que se puede medir mediante la reducción de NBT. Para garantizar que la generación de radicales superóxido se generó únicamente debido a los efectos en la cadena respiratoria mitocondrial, las mitocondrias fragmentadas se centrifugaron, eliminando las proteínas solubles de la matriz y el espacio intermembrana presente en el sobrenadante. La actividad de la catalasa se determinó controlando la descomposición de H₂O₂ en O₂ y H₂O, como en el método descrito por Marklud. La

actividad de la glutationa peroxidasa (Gpx) se evaluó de acuerdo con la técnica propuesta por Flohe y Gunzler. La actividad de glutatión reductasa (Gred) se evaluó de acuerdo con lo descrito por Sies, ambas reacciones se leyeron a 340 nm. Las actividades se informaron como nmol de NADP+ mg⁻¹ de proteína.

Determinación de la concentración de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el ensayo de proteínas Bradford. Se preparó una curva de calibración usando patrones de BSA (fracción V) disueltos en agua Milli-Q. Los valores de absorbancia estándar y de muestra se midieron usando un espectrómetro de microplacas Multiscan GO (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.) Y los datos se procesaron en el software Skanlt de cuarta generación (Thermo Scientific).

Análisis estadístico

Se analizaron cuatro concentraciones para cada compuesto, y las diferentes concentraciones se evaluaron por triplicado, en al menos dos experimentos realizados en días diferentes sobre proteínas mitocondriales y enzimas antioxidantes. La normalidad se probó usando las estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), de acuerdo con los datos de normalidad. Solo se consideraron significativos los valores de P <0,05, y se realizaron pruebas de comparación múltiples de Tukey para determinar las diferencias entre el tratamiento y las concentraciones empleando el software estadístico Statistic V11.

4.3.7. Evaluación insecticida in vivo sobre ninfas de *R. prolixus*

Aplicación tópica.

Se utilizó el protocolo OMS, 2005 modificado. Las ninfas de l y V estadio de *R. prolixus* se trataron con aplicación tópica de las diferentes moléculas seleccionadas y 2 insecticidas comerciales empleados como referencia, diluidos en acetona y aplicados con micro jeringa Hamilton de 5 y 25 µl provista de descargador repetitivo. En la región de los terguitos y esternitos de cada ninfa de estadio l y V se aplicaron 0,1 y 0,5 µl de las soluciones, respectivamente. Las dosis utilizadas fueron 500, 125 y 25 mg L⁻¹ más el tratamiento control con el mismo volumen de acetona. Se realizaron 4 réplicas por dosis cada réplica con 3 ninfas para un total de 12 ninfas por dosis y 48 ninfas por bioensayo incluyendo el control. Cada bioensayo se realizó tres veces en días diferentes. Después del tratamiento, las ninfas se colocaron en vasos plásticos de media onza, con papel plegado en su interior y cubiertos con tapas perforadas. El registro de mortalidad se realizó las 2, 12, 24, 48 y 72 horas postratamiento.

Exposición a superficies tratadas.

Se utilizó el protocolo OMS, 2005 modificado. Se usaron placas Petri de vidrio de 6 cm de diámetro, se colocaron dentro de ellas discos de papel filtro, sus superficies se impregnaron de manera homogénea mediante una micropipeta siguiendo un patrón en forma espiralada del centro hacia fuera, para ello se utilizó un volumen de 437µl de la solución el cual fue calculado según el protocolo OMS, 2005. Se dejaron secar las superficies impregnadas durante 5 minutos y luego se expusieron 12 ninfas por dosis para un total de 48 ninfas por bioensayo, después se cubrieron las placas Petri con vinipel perforado. La mortalidad se registró desde 30 min, 1, 2, 12, 24, 48, hasta las 72 horas postratamiento.

Bioensayos para la determinación de Dosis Letales (DL).

Para estos bioensayos se utilizaron dosis exploratorias de 25, 125, 500 mg L⁻¹ para cada uno de los análogos evaluados escogiéndose la molécula con mejor actividad insecticida. Se realizó una nueva batería de dosis múltiples asimétricas cuyos resultados dosis- respuesta se utilizaron para determinar la DL₅₀ y DL₉₅ mediante el análisis de Probit.

4.3.8. Determinación de las CL_{50} de análogos de girgensohnina sobre embriones de pez cebra. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones biológicas, los compuestos **1**, **2**, **7**, **11** y **23** fueron seleccionados para determinar sus LC_{50} frente a embriones de pez cebra Danio rerio. Embriones fertilizados y sincronizados de 4 hpf fueron separados, almacenados en reservorios con agua de su medio de cría y revisados cada 30 minutos hasta que alcanzaron las 6hpf, de esta forma se evita la selección equivocada de huevos no fertilizados u otros defectos que lleven a que su muerte no sea una respuesta directa de la acción de los compuestos evaluados. Alcanzadas las 6hpf, embriones fertilizados fueron separados en grupos de 20 individuos y colocados en micro placas de seis pozos.

Debido a que los rangos de concentraciones que causan letalidad o toxicidad varían según cada compuesto, inicialmente se realizó un ensayo de dosis exploratorias donde se evaluaron 5 concentraciones (1000, 500, 100, 50, 10 μ M) por cada molécula a ensayar empleando Propoxur como control positivo. La concentración de DMSO en pozo se mantuvo entre 0,01 y 0,02%. Se realizaron conteos cada 12 horas, retirando los embriones no viables y haciendo recambio (50%) del medio, hasta que alcanzaron las 120 hpf y a partir de los resultados obtenidos se estableció una nueva batería de concentraciones para determinar sus concentraciones letales medias LC₅₀.

Para la determinación de las concentraciones letales medias LC₅₀ embriones seleccionados de 6hpf fueron colocados en placas de 96 pozos. Se evaluaron 12 embriones por cada una de las ocho concentraciones establecidas a partir de los resultados hallados en la evaluación de dosis exploratorias. Se realizaron conteos cada 12 horas y los embriones no viables fueron retirados. Cada 24 horas 60% del volumen de la solución de cada pozo de evaluación fue retirada y reemplazada.
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Actividad de los análogos sobre larvas y LC₅₀. Aunque en la literatura actual se cuentan con algunos estudios que evalúan nuevos sistemas contra cualquiera de los diferentes estados, larva, pupa y adulto, de mosquitos del género *A. aegypti* la mayoría son extractos naturales o aceites esenciales usados desde la antigüedad. En esta investigación larvas de *A. aegypti*. fueron expuestas a diferentes concentraciones (300, 270, 180, 140, 70, 60, 45 y 25 mg L⁻¹) de las moléculas obtenidas **1-23** como primera prueba diagnóstica buscando las mayores tasas de mortalidad.

Los resultados del bioensayo de pruebas diagnósticas revelaron que todas las moléculas evaluadas afectaron el desarrollo de las larvas causando su muerte a concentraciones por enzima de los 150 mg L⁻¹. Diferentes revisiones han sugerido que un nuevo sistema se puede considerar como un larvicida efectivo si presenta un valor LC₅₀ inferior a 100 mg L⁻¹, este criterio permitió la selección de los análogos **1**, **2**, **4**, **7** y **23** para los cuales fueron determinadas sus concentraciones letales medias LC₅₀ en mg L⁻¹ empleando análisis Probit.

Tabla 11. Valores de LC₅₀ de los análogos evaluados.



Comp.		Concentraciones letales LC_{50} [mg L^{-1}] IC_{50}									
	24 h	CI	X^2	48 h	CI	X ²	mg L ⁻¹				
1	46.61	(45.09 – 48.43)	3.39	42.2	(40.87 – 43.59)	0.92	20.1				
2	50.55	(48.13 – 52.98)	3.77	48.53	(46.18 – 50.94)	2.63	50.1				
4	69.59	(66.01 – 73.32)	4.50	64.51	(61.32–67.79)	3.78	53.8				
7	88.12	(83.43 - 94.74)	0.58	87.47	(82.38 - 94.82)	7.14	44.6				
23	48.96	(46.67 – 52.07)	1.78	38.65	(37.67 – 39.73)	4.2	0.44				

CI: Índice de confianza; X²: Shi cuadrado; IC₅₀: Concentración inhibitoria media frente a la AChE.

Los resultados de bioensayos de actividad insecticida y en condiciones de laboratorio mostraron que, en la etapa larval, A. aegypti es susceptible al uso de las moléculas 1, 2, 4, 7 y 23 (Tabla 11). La mortalidad de las larvas debida a la acción de las moléculas se observó después de 2-4 h de aplicación en los vasos de prueba, tiempo durante el cual se observaron cambios morfológicos como oscurecimiento y reducción de tamaño en comparación con los individuos de los controles, lo que ocasionó la muerte de las larvas. Las larvas que no se vieron afectadas durante los experimentos emergieron como adultos normales dentro de los parámetros observables en cuatro días. La evaluación de sus características estructurales mostró que las moléculas más activas presentaban grupos electrodonadores en la posición para de su arilo. La introducción de otro grupo electrodonador en la posición meta aumentó su actividad solamente cuando se empleó piperidina como amina cíclica. La sustitución de los sustituyentes metoxi e hidroxi en la posición para del arilo por el grupo dimetilamino aumentó considerablemente su actividad insecticida. Al comparar estos resultados con los valores de inhibición in vitro sobre la enzima AChE se pudo determinar que el compuesto 23, el cual presenta el valor más bajo de IC₅₀ causa la muerte de larvas a las concentraciones más bajas incluso después de 48 h de tratamiento.

Aunque sus valores LC_{50} son más altos que los reportados para insecticidas comerciales (Temefos, $LC_{50} = 0,0059$ mg L⁻¹), los α -aminonitrilos mostraron en análisis *in silico* previos buenas propiedades farmacocinéticas y baja toxicidad en

comparación con insecticidas comerciales como Temefos. Productos extraídos de plantas para los cuales se han determinado sus LC_{50} han mostrado valores comparables con los encontrados para los análogos α -aminonitrílicos (aceites esenciales de *Croton zehntneri* ($LC_{50} = 26,2 \text{ mg L}^{-1}$) y *Croton nepetaefolius* ($LC_{50} = 66,4 \text{ mg L}^{-1}$). Seo y colaboradores evaluaron los componentes del aceite esencial de Apiaceae contra *Aedes albopictus*, revelando para carvacrol una actividad larvicida del 80% a una concentración de 50 mg L⁻¹ y una LC_{50} de 57 mg L⁻¹, mostrando una correlación entre la mortalidad de larvas y la inhibición de la AChE. Aunque los valores de LC_{50} de los compuestos **1**, **2**, **4**, **7** y **23** encontrados mostraron actividad larvicida en un rango de concentración comparable a los reportados previamente para aceites esenciales, se debe notar que estos compuestos sintéticos pueden ser producidos en cantidades considerables con alta pureza.

4.4.2. Actividad de las enzimas detoxificantes extraídas de larvas tratadas

Resultados

El número de mosquitos evaluados en cada ensayo, los valores de mediana y el porcentaje de muestra de mosquito con actividad superior al percentil 99 después de los tratamientos se compararon con Rock y WSant y se muestran en las tablas 12 a 15 junto con los criterios de clasificación (inalterados, alterados y muy alterados). Los niveles de actividad de las enzimas en cada cepa se muestran gráficamente en diagramas de dispersión (Figuras 37-42) y en cada figura, los resultados encontrados para las cepas Rock y WSant se incluyeron facilitando la comparación directa con la actividad de cada grupo.

Book	AChE MFO				GST					
ROCK		(% de inhibi	ción)		(nmol cit mg ⁻¹ ptn)			(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn)		
	Na	Medianaa ^b	p99°	Ν	Mediana	p99	Ν	Mediana	p99	
NT	165	79.32	94.8	150	25.37	30.9	150	0.22	0.2	
7										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99 ^d	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
20.10	150	81.61	6.5 ¹	150	29.21	1.9 ¹	150	0.22	6.9 ¹	
35.18	150	79.81	9.5 ¹	150	29.34	6.6 ¹	150	0.18	10.2 ¹	
70.35	150	79.79	12.7 ¹	150	29.83	7.6 ¹	150	0.21	10.0 ¹	
CFEO										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
18.45	150	81.45	5.4 ¹	150	30.36	1.3 ¹	150	0.20	17.8 ²	
30.75	150	80.37	7.9 ¹	150	30.52	6.1 ¹	150	0.34	100 ³	
61.50	150	80.03	10.4 ¹	150	29.08	6.5 ¹	150	0.33	100 ³	

Tabla 12. Cuantificación de la actividad enzimática de AChE, MFO y GST en la cepa Rock.

Tabla 13. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas en la cepa Rock.

Deak	<i>p</i> -NPA esterasas				α-Esterasas			β-Esterasas		
ROCK	(4	∆Abs min⁻¹ m	ıg⁻¹ ptn)	(1	(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn)			(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn)		
	N ^a	Mediana ^b	p99°	Ν	Mediana	p99	Ν	Mediana	p99	
NT	150	1.28	1.4	150	40.98	46.2	150	56.50	73.9	
7										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99 ^d	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
20.10	150	1.09	0.6 ¹	150	35.77	0.5 ¹	150	62.19	3.6 ¹	
35.18	150	1.26	7.6 ¹	150	39.23	0.3 ¹	150	50.41	7.7 ¹	
70.35	150	1.29	2.7 ¹	150	41.18	1.0 ¹	150	50.73	9.0 ¹	
CFEO										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
18.45	150	1.30	2.9 ¹	150	34.90	2.1 ¹	150	53.87	1.9 ¹	
30.75	150	2.71	100 ³	150	38.06	2.8 ¹	150	49.55	15.7 ²	
61.50	150	4.23	100 ³	150	37.75	22.9 ²	150	43.06	19.3 ²	

WSont	AChE				MFO			GST		
woant		(% inhibiti	on)		(nmol cit mg ⁻¹ ptn)			(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn)		
	Na	Mediana ^b	p99°	Ν	Mediana	p99	Ν	Mediana	p99	
NT	180	83.63	88.5	120	35.91	70.9	120	1.51	2.0	
7										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99 ^d	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
20.10	120	83.18	2.2 ¹	150	59.82	2.1 ¹	150	1.20	7.1 ¹	
35.18	120	85.27	0.5 ¹	150	57.00	5.1 ¹	150	1.28	8.1 ¹	
70.35	120	87.55	1.1 ¹	150	51.23	8.9 ¹	150	1.27	13.6 ¹	
CFEO										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
18.45	120	84.43	1.9 ¹	120	56.86	19.7 ²	120	0.98	7.1 ¹	
30.75	120	85.86	1.5 ¹	120	75.08	21.3 ²	120	1.41	19.3 ²	
61.50	120	84.35	0.5 ¹	120	70.68	35.9 ²	120	1.68	26.0 ²	

Tabla 14. Cuantificación de la actividad enzimática de AChE, MFO y GST en la cepa WSant.

Tabla 15. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas en la cepa WSant.

WCont	<i>p</i> -NPA esterasas			α-Esteras	as	β-Esterasas				
wSant	(4	∆Abs min ⁻¹ m	g⁻¹ ptn)	1)	nmol min ⁻¹ m	g⁻¹ ptn)	(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn)			
	N ^a	Mediana ^b	p99°	Ν	Mediana	p99	Ν	Mediana	p99	
NT	120	1.99	2.4	120	47.51	56.2	120	22.61	26.8	
7										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99 ^d	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
20.10	150	2.14	0.6 ¹	150	46.98	2.8 ¹	150	21.38	2.2 ¹	
35.18	150	1.75	1.4 ¹	150	52.32	7.5 ¹	150	22.20	6.4 ¹	
70.35	150	1.82	9.5 ¹	150	52.76	11.6 ¹	150	19.54	12.4 ¹	
CFEO										
mg L ⁻¹	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	Ν	Mediana	% >p99	
18.45	120	2.19	0.2 ¹	120	48.50	1.3 ¹	120	20.80	7.7 ¹	
30.75	120	1.93	3.2 ¹	120	48.66	2.3 ¹	120	21.00	12.8 ¹	
61.50	120	2.45	8.7 ¹	120	43.78	1.4 ¹	120	20.88	18.3 ²	

^a Número de larvas probadas. ^b Valor de la mediana para cada actividad enzimática. ^c percentil 99 para las variedades Rock y WSant respectivamente. ^d Porcentaje con actividad superior al percentil 99 para cada cepa. NT = No tratado. Criterios de clasificación%> p99: 1 inalterado, 2 alterado y 3 altamente alterado.





Figura 38 Perfil de actividad de MFO de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.







Figura 40. Perfil de actividad de p-NPA esterasas de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.







Figura 42. Perfil de actividad de β -esterasas de larvas Rock (A) y WSant (B) tratadas.



La actividad de AChE de las larvas tratadas en la presencia de propoxur no fue significativamente diferente de la observada para las cepas Rock y WSant (p > 0.05). Se encontró un perfil inalterado de AChE para todas las evaluaciones (Tablas 12 y 14).

La actividad de la MFO se cuantificó midiendo el contenido del grupo hemo que, en mosquitos no alimentados con sangre, se asocia principalmente con el citocromo P450. Cuando se evaluó CFEO, los niveles de actividad mediana fueron significativamente diferentes de los de la cepa Rock (p < 0,05). Ambas poblaciones tenían un perfil inalterado excepto cuando el CFEO se evaluó en WSant, se observó un perfil incipientemente alterado para CFEO en esos casos (Tabla 12). Los niveles de actividad cuando se evaluó **7** no fueron significativamente diferentes de los observados para Rock y WSant (p > 0,05). Se encontró un perfil inalterado de MFO para todas las concentraciones de **7** evaluadas (Figura 38).

La actividad de GST no fue significativamente diferente de la observada en las cepas evaluadas, excepto cuando se evaluaron las dos concentraciones más altas de CFEO en sobre la cepa Rock (p < 0.05) (Figura 39). GST mostró un perfil altamente alterado cuando CFEO se evaluó sobre larvas de Rock mientras que se observó un perfil incipientemente alterado para WSant (Tabla 12 y 14). Se encontró un perfil inalterado de GST cuando se evaluó **7** en ambas poblaciones.

La actividad p-NPA esterasa no fue significativamente diferente de la observada en las cepas evaluadas excepto cuando las dos concentraciones más altas de CFEO se evaluaron en la cepa Rock (p < 0.05) (Figura 40A). Se encontró un perfil inalterado de p-NPA esterasa en todos los casos excepto cuando se evaluaron las concentraciones más altas de CFEO en la colonia de Rock, para lo cual se observó un perfil altamente alterado (Tabla 13).

No hubo diferencias entre las actividades de las α -esterasas de Rock y WSant tratadas (p > 0.05) (Figura 41). Para todos los casos, se observó un perfil inalterado

(Tabla 13 y 15). No hubo diferencias significativas entre las actividades de β esterasas de Rock y WSant tratados (p> 0.05) (Figura 42). Se encontraron perfiles incipientemente alterados al evaluar la concentración más alta de CFEO en ambas cepas (Tabla 13 y 15).

La actividad inhibidora de AChE de larvas de *A. aegypti* y homogenizados de adultos, tratados por separado con concentraciones subletales de **7** y CFEO, mostraron porcentajes de inhibición entre 12 a 20% en larvas y 14 a 27% en adultos inducida por **7**, mientras que CFEO inhibió la actividad enzimática entre 18 a 26% en larvas y 26 a 34% en adultos (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentajes de inhibición de la AChE en homogenizado de larvas y adultos.

Book	AC	AChE					
NUCK	(% de i	nhibición)					
	Larvas	Mosquitos					
Propoxur	83.51±2.5	85.24±1.90					
7							
mg L ⁻¹	Media	Media					
20.1	12.84±2.0*	14.72±2.5*					
40.0	18.87±3.5*	25.85±2.8*					
80.0	20.56±4.7*	27.00±3.2*					
CFEO							
	Media	Media					
20.6	18.95±2.3*	26.86±2.1*					
41.2	25.17±1.4*	31.32±3.0*					
82.5	26.07±2.9*	34.31±4.4*					

Discusión

La necesidad de desarrollar nuevos insecticidas fomenta la búsqueda de moléculas que proporcionen nuevas herramientas para el control y la gestión de diferentes vectores.^{41,42} Aunque en la literatura existe una amplia variedad de estudios que evalúan insecticidas comerciales, muy pocos trabajos se enfocan en

la investigación y evaluación de nuevas moléculas que afecten cualquiera de las etapas de los mosquitos (huevos, larvas, pupas o adultos).^{43–46}

Extractos de plantas, aceites esenciales y alcaloides en general han sido reconocidos como importantes recursos naturales de insecticidas. Dentro de los aceites esenciales evaluados previamente por el CINTROP-UIS, el CFEO exhibió la mayor actividad larvicida y adulticida contra *A. aegypti*.^{38,39} La IC₅₀ determinada para el CFEO sobre AChE comercial fue de 65,6 mg L^{-1.47} En cuanto a los alcaloides, para 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo, análogo **7** de la girgensohnina, obtenido mediante la reacción de Strecker, se ha confirmado su efecto sobre el desarrollo en larvas de *A. aegypti* en condiciones *in vivo*. Este resultado podría asociarse con su capacidad para inhibir a la AChE comercial incluso ya que su inhibición es aun mejor que el alcaloide natural. Además de la actividad AChE, los insectos cuentan con diversos mecanismos de defensa como su sistema enzimático de detoxificación que involucra el metabolismo xenobiótico (incluyendo insecticidas) a través de las actividades de esterasa α y β , MFO, GST y p-NPA.⁴⁸⁻⁵⁰

Los resultados de evaluación de la población de WSant sin tratamiento presentaron perfiles enzimáticos altamente alterados cuando se comparó con la colonia de referencia Rock, encontrando que los niveles de actividad de todas las enzimas evaluadas, excepto AChE y α -esterasas, fueron significativamente diferentes de los encontrados para la cepa de referencia Rock (Figura 37 - 42). La actividad MFO de la cepa WSant duplicó los valores de la Rock mostrando que, incluso después de tratar la cepa de referencia Rock con los metabolitos de investigación, sus resultados fueron significativamente más bajos que los observados para la población de WSant (Figura 38). Se observó un aumento incluso mayor en la actividad de GST cuando se evaluó la cepa WSant y se comparó con Rock y, como en los resultados de la MFO, sus valores fueron significativamente diferentes, incluso de aquellos obtenidos cuando Rock se trató con la mayor concentración de CFEO (Figura 39). Entre las esterasas evaluadas, hubo un aumento en la actividad

de p-NPA esterasas de la cepa WSant respecto de las determinadas para la Rock pero, al contrario de lo que se observó en las actividades enzimáticas previas, los valores encontrados para las larvas de Rock tratadas con las concentraciones más altas de CFEO fueron más altos que los determinados para la cepa WSant (Figura 40). Se observó una disminución en la actividad enzimática de WSant con respecto a la de referencia Rock solo para las β -esterasas, en este caso los valores de la cepa de referencia duplicaron los valores encontrados para WSant incluso después del tratamiento (Figura 42). La diferencia entre la actividad enzimática observada para Rock y WSant podría haber surgido debido a la capacidad de los insectos para regular su respuesta cuando se exponen a xenobióticos. Esta exposición podría inducir una respuesta transcripcional que reguló las expresiones enzimáticas solo en la población de WSant y podría explicar por qué no muestran alteración de la actividad enzimática después de la exposición ni a la CFEO ni a **7** en todas las concentraciones evaluadas.^{51–54}

Larvas de *A. aegypti* de ambas colonias tratadas con diferentes concentraciones de **7** y CFEO mostraron diferentes perfiles de actividad enzimática. No se observaron alteraciones en las actividades de las enzimas evaluadas para las larvas tratadas con diferentes concentraciones de **7** (Tablas 12 - 15). La actividad de AChE para larvas tratadas en presencia de propoxur no fue significativamente diferente de la observada en larvas no tratadas (Rock y WSant, p > 0.05) en este experimento y en los reportados previamente. Se encontró un perfil inalterado de AChE cuando la concentración de la molécula evaluada se incrementó a 70,35 mg L⁻¹, valor máximo de concentración en el que no se observó la muerte de las larvas en las pruebas *in vivo* (Tablas 12 y 14). Los niveles de actividad de todas las esterasas, las enzimas MFO y GST no fueron significativamente diferentes de aquellas encontradas para las larvas Rock y WSant no tratadas (p> 0.05) que muestran un perfil inalterado de la actividad de las enzimas analizadas cuando se evaluó **7**. La comparación de los datos encontrados para Rock y WSant con y sin tratamiento permitió determinar que **7** no es reconocido por las enzimas desintoxicantes y no lleva a aumentar sus actividades como ha sido descrito previamente por otros.^{45,55,56}

Cuando larvas Rock y WSant se trataron con diferentes concentraciones de CFEO, la actividad AChE restante en presencia de propoxur no se modificó (<15%) en ninguno de los casos. Estos resultados son contrarios a los encontrados cuando se evaluaron organofosforados y carbamatos ya que la exposición a este tipo de insecticidas causó alteraciones estructurales del sitio AChE activo y mostró perfiles alterados (Tablas 12 y 14).^{26,53,57,58} Para la cepa WSant, se observaron perfiles de MFO y β-esterasas incipientemente alterados dependientes de la dosis empleada para tratar las larvas con CFEO. Se observó un perfil de β-esterasa ligeramente alterado cuando se trató la cepa Rock con la mayor concentración de CFEO. Se ha informado que las MFO y las esterasas son importantes en el metabolismo de los insecticidas debido a su flexibilidad biológica y su capacidad para reducir la actividad biológica de una amplia gama de sustratos.⁵⁹ Los perfiles con las alteraciones más altas se observaron cuando se determinaron las actividades de p-NPA y GST para las dos concentraciones más altas de CFEO en larvas de Rock (Tablas 12 y 13) mientras que, para WSant, se observó un perfil de GST incipientemente alterado dependiente de la dosis empleada para tratar las larvas (Tablas 14 y 15).

Se detectaron niveles mayores de actividad de GST, α -, β - y p-NPA esterasas cuando se evaluó el CFEO en larvas de la cepa Rock, lo que indica que los miembros de estas clases de enzimas, que desempeñan un papel importante en la desintoxicación, pueden identificar diferentes compuestos que constituyen los aceites esenciales como aquellos encontrados en CFEO (Tablas 12 y 13). Debido a que WSant sin tratamiento presentó un perfil alterado, con respecto a la colonia de referencia, solo las actividades de MFO y GST mostraron estar incipientemente alteradas (Tablas 14 y 15).

La actividad insecticida de un aceite esencial se puede atribuir a la combinación de componentes principales y secundarios como en los formulados para

insecticidas.^{60,61} Sin embargo, esta característica ha respaldado la evaluación de la acción sinérgica cuando los insecticidas comerciales se combinan con CFEO. En algunos casos, la combinación de aceites esenciales con insecticidas para los que una población de insectos ya tenía resistencia ha demostrado disminuir sus concentraciones letales promedio.^{62–64} La actividad de AChE evaluada utilizando diferentes concentraciones de **7** y CFEO en larvas y homogenizado de adultos mostró una inhibición menor en comparación con los valores encontrados cuando larvas de Rock y homogenizados de adultos fueron tratados con propoxur. La evaluación directa en homogeneizados mostró que es posible que la inhibición de AChE no sea la única interacción responsable de la muerte de larvas en los ensayos *in vivo* y que tanto el compuesto **7** como el CFEO pueden interactuar o alterar otros objetivos o receptores que conducen a la muerte del insecto.

Esta información es útil para el diseño de nuevos insecticidas porque ayuda a comprender cómo se produce la mortalidad en el insecto cuando se expone a una molécula o compendios de moléculas como los aceites esenciales. En este sentido, en una formulación con combinación de diferentes plantas y sus metabolitos se potenciará el efecto insecticida debido al objetivo celular múltiple que podría alcanzar.⁶⁵

4.4.3. Evaluación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Resultados

Cuando se evaluó el efecto de los compuestos 7, 10, 13 y 16 sobre los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se observó que el compuesto 7 exhibió un efecto inhibidor no estadísticamente significativo sobre la NADH deshidrogenasa en comparación con el tratamiento de control (F = 1.265; P = 0.33). Sin embargo, NADH oxidasa se inhibió significativamente entre un 12 y 33% (F = 24.329, P = 0.000002) en todas las

concentraciones (8 nM, 2 μ M, 8 μ M y 40 μ M). Asimismo, se observó una disminución en la actividad succinato oxidasa con una inhibición entre 19 y 24% (P <0.05 F = 6.458). A diferencia de las tres enzimas succinato deshidrogenasa anteriores, la succinato citocromo c reductasa y la citocromo c oxidasa mostraron una mayor actividad (79-182%, 10-88% y 28-55%, respectivamente). Se encontró que el efecto activador fue mayor para la enzima succinato deshidrogenasa que para las otras dos enzimas (Tabla 17).

También se observó un efecto inhibidor significativo para el compuesto **13** (F = 38.771; P <0.05) en el complejo I de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa y oxidasa), con porcentajes de inhibición de entre el 21 y 31%. La enzima succinato oxidasa no se inhibió significativamente (F = 1.543, P = 0.24). Las actividades enzimáticas de succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa aumentaron significativamente con todos los tratamientos (F = 11.28, P = 0.000023, F = 12.743, P = 0.000140). De forma similar, la reductasa de citocromo c de succinato mostró una actividad aumentada, con diferencias significativas solo en la concentración de 2 µM (F = 4,3202, P = 0.021515).

El compuesto **10** causó la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria: en el caso de esta molécula, la actividad de las enzimas NADH deshidrogenasa (F = 9.264, P = 0.000451) y NADH oxidasa (F = 54.210; p < 0.05) disminuyó significativamente en todas las concentraciones evaluadas, con porcentajes de inhibición de entre 20 y 44%. La actividad succinato oxidasa también se redujo significativamente entre un 30 y un 42% (F = 38.821; p <0.05). Al igual que con los compuestos **7** y **13**, el compuesto **10** también produjo un aumento en la actividad de la succinato deshidrogenasa (F = 5.1868, p = 0.0033), citocromo c oxidasa (F = 20.842, p = 0.00009) y succinato citocromo c reductasa (F = 2.2589, p = 0.12).

Con respecto al compuesto **16**, se observó una actividad disminuida del complejo I, con porcentajes de inhibición de 22 a 24% para NADH deshidrogenasa (F = 7.575, P = 0.001511), y nuevamente de 27 a 41% para NADH oxidasa (F = 47.688, P

<0.05). La actividad succinato oxidasa también disminuyó (22%) como resultado del tratamiento, aunque solo a la concentración más alta evaluada (F = 5.639, P = 0.005642). La actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa aumentó del 106 al 116% con todos los tratamientos (F = 8.1440, P = 0.000239), así como la actividad oxidasa del citocromo c, que aumentó del 52 al 88% (F = 14.185; P = 0.000055). La actividad succinato citocromo c reductasa no fue significativamente diferente del control (F = 3.4079, P = 0.040902).

Tabla 17. Efecto de los compuestos 7, 10, 13 y 16 sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial.



Comp.	[]	NADH deshidrog.	NADH oxidasa	Succinato deshidrog.	Succinato oxidasa	Succinato citocromo c reductasa	Citocromo c oxidasa
	μΜ	%	%	%	%	%	%
	0	100	100	100	100	100	100
	8x10 ⁻³	87±6	88±6ª	179±18	78±6ª	110±8	128±2
7	2	92±7	78±4 ^a	194±16 ^a	79±4 ^a	147±5	136±24
	8	84±19	74±2 ^a	236±36ª	81±4ª	188±58ª	155±5ª
	40	85±3	67±4 ^a	282±61ª	76±6ª	188±68ª	133±21ª
	0	100	100	100	100	100	100
	8x10 ⁻³	77±2 ^a	74±1 ^a	223±27ª	58±4ª	135±23	155±11ª
10	2	79±5ª	69±1ª	249±34ª	71±8ª	137±10	160±10 ^a
	8	80±6ª	59±6 ^a	166±36ª	83±5	131±6	206±33ª
	40	77±2ª	56±6ª	205±43ª	70±5ª	111±7	189±24ª
	0	100	100	100	100	100	100
	8x10 ⁻³	79±2ª	79±2 ^a	231±29ª	83±13	180±56	153±26
13	2	84±8	72±2ª	224±22 ^a	94±5	201±33ª	168±18ª
	8	76±5ª	72±2ª	226±8ª	86±18	143±22	171±16 ^a
	40	74±8 ^a	69±2 ^a	272±54ª	92±6	140±38	182±25ª
	0	100	100	100	100	100	100
16	8x10 ⁻³	77±2ª	73±2ª	214±41ª	86±9	106±5	188±23ª
	2	78±5ª	68±1ª	206±37 ^a	83±8	136±20	152±27ª

8	81±2	62±3ª	215±23 ^a	86±5	150±23	155±11ª
40	76±3ª	59±5ª	216±14ª	78±6ª	118±12	130±10

El valor del 100% corresponde a: NADH deshidrogenasa: 0,850 ± 0,214 nmol min-1 de ferricianuro reducido mg-1 proteína; NADH oxidasa: 20.917 ± 6.498 nmol O / min mg de proteína; Succinato deshidrogenasa: 0.589 ± 0.039 pmol de DCPIP reducido min-1 mg-1 de proteína; Succinato oxidasa: 20.749 ± 6.444 nmol de oxigeno consumido min-1 mg-1 proteína; Succinato citocromo c reductasa: 3.621 ± 1.479 pmol de citocromo c reducido por min-1 mg-1 proteína; citocromo c oxidasa: 2.716 ± 0.286 pmol citocromo c oxidado min-1 mg-1 de proteína. Para cada enzima n = 6.

Cuando se evaluó la actividad de la superóxido dismutasa y en la figura 43A se muestra el efecto aislado (es decir, sin proteína) de los compuestos sobre la formación de O_2^{\bullet} . No se encontraron diferencias significativas entre los compuestos y el control, lo que significa que no son capaces de generar O_2^{\bullet} en ausencia de proteína.



Figura 43. Efecto de los análogos evaluados en la formación del radical superóxido.

a) En ausencia de SOD, el 100% corresponde a 6.873 ± 3.195 abs / min, n = 6; b) con proteína total de larvas, el 100% corresponde a 5.993 ± 0.817 abs / min, n = 9 yc) con mitocondrias fragmentadas, n = 6. * Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0.05), el 100% corresponde a 5.591 ± 1.442 abs / min. ** Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0.01). *** Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0.01).

Cuando se utilizó la proteína total como fuente enzimática (Figura 43B), los compuestos no lograron aumentar la producción de O_2^{\bullet} , lo que significó que los compuestos no actúan como inhibidores de la superóxido dismutasa. La figura 43C muestra la producción de O_2^{\bullet} cuando las mitocondrias se utilizaron como fuente enzimática. Los valores de actividad para los compuestos **7** y **13** no presentaron diferencias significativas cuando se compararon con el control, mientras que los compuestos **10** y **16** exhibieron un aumento de aproximadamente 50% en la formación de O_2^{\bullet} a las concentraciones de 2, 8 y 40 µM para el compuesto **10** y 40 µM para compuesto **16**.

Todos los compuestos inhibieron la actividad de catalasa (F = 101.2; P < 0.0001). La disminución de esta actividad enzimática sugirió un efecto inhibidor dependiente de la dosis para los compuestos **7**, **10** y **16**. En todos los casos, la inhibición fue de alrededor del 95% cuando se evaluó la concentración más alta (Figura 44).

Figura 44. Actividad de la enzima catalasa.



El control (100%) corresponde a 7.701 ± 3.279 pmol de H_2O_2 / mg de proteína · min, n = 6. * Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0,0001).

Los compuestos **10** y **16** mostraron un aumento en la actividad de Gpx (30 y 25%, respectivamente) solo en la concentración más alta probada (F = 3.115; P = 0,0003). Para los compuestos **7** y **13**, así como las concentraciones bajas de los compuestos **10** y **16**, no se observaron alteraciones en la actividad de esta enzima (Figura 45).

Figura 45. Actividad de la enzima glutationa peroxidasa.



El control (100%) corresponde a 13.07 \pm 1.73 nmol of NADPH/mg protein·min, n= 9. * Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0,0001).

Los compuestos **7** y **13** inhibieron la actividad de Gred. El compuesto **7** evaluado a una concentración de 8 μ M mostró un 17% de inhibición, y en la concentración más alta probado (40 μ M) una inhibición cercana al 40%. El compuesto **13** mostró diferencias estadísticamente significativas (F = 7.052; P = 0.0001) con relación al control en todas las concentraciones probadas, mostrando un 27% de inhibición a concentraciones de 2 nM, 2 μ M y 8 μ M, alcanzando hasta 38% de inhibición con la concentración más alta probada. Compuestos **10** y **16** no indujeron alteraciones en Gred (Figura 46).

Figura 46. Actividad de la glutationa reductasa.



El control (100%) corresponde a 9.743 ± 1.73 nmol of NADPH/mg protein min, n= 9.. * Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control (P <0,0001)

Discusión

Los compuestos generados por las plantas han sido considerados como una estrategia de control alternativa para eliminar mosquitos de *A. aegypti*. Ciertas plantas usan estos metabolitos secundarios como un sistema de defensa química contra los depredadores o como agentes que les producen daño.^{24,66} Se ha publicado una gran cantidad de estudios centrados en la actividad biológica (insecticida, fungicida, pesticida, anticancerígeno, etc.) de extractos, aceites esenciales y metabolitos secundarios de muchas plantas. En el presente estudio, los análogos estructurales del alcaloide girgensohnina se analizaron como una contribución al conocimiento de los mecanismos de acción mediante la determinación de sus efectos sobre la cadena respiratoria mitocondrial y las enzimas antioxidantes de homogenizados de larvas de *A. aegypti*.

Con respecto a los cambios estructurales de los α -aminonitrilos probados en este estudio, se observó que los compuestos **10** y **16** causaron los efectos más significativos sobre las actividades enzimáticas mitocondriales. De estos resultados se pudo inferir que el mayor efecto inhibidor de estos dos compuestos sobre el complejo I se debe a la presencia del fragmento de pirrolidina en su estructura, ya que los compuestos **7** y **13** contienen un fragmento piperidínico en su lugar y su

efecto fue menor. Sin embargo, la diferencia entre los efectos sobre la enzima y las diferencias entre sus estructuras es mínima, por lo tanto, se espero que sus efectos en la cadena respiratoria fueran similares entre sí.

Los compuestos probados produjeron alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial de larvas de A. aegypti, principalmente en el complejo I. Por ejemplo, el complejo I se inhibió significativamente en la concentración más baja probada (8 µM) con todos los compuestos. La inhibición de este complejo se ha asociado con procesos de daño celular, formación de especies reactivas de oxígeno e inducción de apoptosis.⁶⁷⁻⁶⁹ Por lo tanto, es posible inferir que la actividad insecticida informada por estudios previos sobre estos análogos no solo puede estar asociada con un efecto inhibidor sobre la enzima AChE, sino también con un efecto sobre la cadena respiratoria mitocondrial en la célula. Además, los α-aminonitrilos aumentaron la actividad enzimática de los complejos II, III y IV de forma independiente. De acuerdo con Martín y colaboradores, algunos medicamentos pueden inducir un efecto estimulante sobre los complejos enzimáticos, pero no hay certeza razonable sobre la causa de tal efecto.^{70,74} Ciertos antidepresivos de uso común, como venlafaxina, paroxetina y nortriptilina, inducen un efecto estimulante en los complejos II y IV en la corteza prefrontal de la rata, el hipocampo, el estriado y la mitocondria de la corteza cerebral; este proceso es similar al efecto descrito en el presente documento, aunque para los sistemas en larvas de A. aegypti.⁷¹

Dado que nuestros compuestos aumentaron la actividad de los complejos II, III y IV, la disminución de la actividad succinato oxidasa fue inesperada. Esta observación llevó a la hipótesis de que el efecto de los compuestos está relacionado con la pérdida (liberación) de electrones entre los complejos proteicos de la cadena. La liberación de electrones o "fuga de electrones", la inhibición de los complejos I y III en la cadena respiratoria, así como la producción de ROS, han sido reportados por diferentes autores. Lambert y Brand informaron que el efecto inhibidor de la rotenona, la piericidina, la antimicina A y el mixotiazol en los complejos I y III está relacionado con la producción de superóxido; sin embargo, se ha observado que

todos los inhibidores del complejo I generan niveles muy bajos de superóxido, aunque en presencia de inhibidores en el sitio de unión a ubiquinona, los niveles aumentaron de 10 a 30 veces.⁷² Además, Liu y colaboradores evaluaron la producción de superóxido en presencia de diferentes inhibidores de la cadena respiratoria y demostraron que, contrariamente a lo que se pensaba anteriormente, los inhibidores del complejo III no son los principales responsables de la liberación de electrones y la formación de superóxido.⁷⁰ En este sentido, los inhibidores del complejo I tienen un papel informado en la producción de ROS. También se demostró que cuando el succinato es utilizado como sustrato en ausencia de ADP, se produce una transferencia inversa de electrones en el complejo I donde NAD + se reduce a NADH. Cuando se usó rotenona como inhibidor del complejo I, se interrumpió dicha transferencia inversa, y el grupo FMN aparentemente participó en el desvío de estos electrones al oxígeno para facilitar la producción de especies reactivas de oxígeno.

En comparación con otros fármacos, el mecanismo de acción de la mayoría de los inhibidores I no está claro. Sin embargo, en un estudio previo de Fato y colaboradores agruparon a los inhibidores del complejo I en dos clases: los inhibidores de "clase A" son aquellos que aumentan la producción de ROS (rotenona, piericidina A y rolliniastatina 1 y 2), mientras que los inhibidores de "clase B" son los que previenen la producción de ROS (estigmatela, mucidina, capsaicina y coenzima Q2). Según el tipo de inhibición y la producción de ROS mostrada por los análogos de alcaloides evaluados en este estudio, los compuestos 7, 10, 13 y 16 pertenecen a los inhibidores de clase A. Teniendo en cuenta las mediciones de SOD, se podría concluir que los compuestos probados no generan radicales superóxido en ausencia de proteína, y no pueden inhibir la enzima SOD. Finalmente, los compuestos 13 y 16 aumentaron la producción de O_2 % a través de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que confirma la hipótesis sobre fuga de electrones en el paso del complejo I al complejo III causado por la inhibición del complejo I, aunque los compuestos 7 y 10 no aumentaron O_2 %.^{68,73}

Sin embargo, como se discutió anteriormente, los compuestos **13** y **16** exhibieron los efectos más significativos en las actividades enzimáticas mitocondriales, y podría ser posible encontrar otros ROS, como el H₂O₂. Según lo indicado por los resultados de la actividad de catalasa, los compuestos causaron la inhibición casi completa de la enzima en la concentración más alta; también, los compuestos **7** y **10** inhibieron la actividad de Gred. Estos resultados indicaron que todos los compuestos podrían promover la acumulación de ROS (peróxido de hidrógeno) y adicionalmente los compuestos con fragmento de piperidina disminuirían la capacidad de reducir el glutatión; un péptido esencial para regular el estado redox de las células.^{30,74}

La confirmación de la inhibición del complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial mostró un posible mecanismo de acción por el cual se puede entender su actividad insecticida. Esta actividad puede estar vinculada al efecto de la pérdida de electrones a través del complejo I, así como a la inhibición de las enzimas catalasa y Gred, favoreciendo la acumulación de ROS, que están estrechamente relacionadas con el daño celular y la muerte.^{75,76} Los resultados sugieren la inducción de estrés oxidativo por inhibición de enzimas antioxidantes y por liberación de electrones en la cadena respiratoria en el complejo I. Además del efecto inhibidor sobre el complejo I, los compuestos causaron un efecto estimulante sobre los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Los compuestos **13** y **16** mostraron una mayor actividad inhibidora sobre el complejo I y aumentaron los niveles de O_2^{\bullet} % en la cadena respiratoria mitocondrial.

4.4.4. Evaluación insecticida in vivo sobre ninfas de *R. prolixus*

Resultados

Se encontró que 11 análogos mostraron actividad insecticida cuando se realizó aplicación tópica en terguitos, en los 12 análogos cuando se aplicó sobre los

esternitos y seis análogos en superficies tratadas, con la molécula 3 que muestra la mayor tasa de mortalidad (Figura 47).



Figura 47. Evaluación tópica sobre terguitos.

Entre los análogos evaluados la mortalidad en terguitos fue significativamente diferente (Kruskal-Wallis: H (14 N = 45) = 36.51205 p = 0.0009). La aplicación tópica en esternitos resultó en una mortalidad significativamente baja (Kruskal-Wallis: H (14 N = 45) = 33.98065 p = 0.0021) en comparación con terguitos (Tabla 18). El mismo efecto se observó en las superficies tratadas (Kruskal-Wallis: H (14 N = 45) = 41.89138 p = 0.0001) (Figura 48B). Como era de esperar, los controles positivos (deltametrina Del y fenitriotion Fen) y negativos (acetona Ste1) mostraron tasas de mortalidad del 100% y del 0%, respectivamente. Al comparar las tasas de mortalidad en los dos tipos de tratamiento, terguitos y esternitos, se observaron diferencias significativas (Mann-Whitney, MW, p < 0.05) para los análogos sintéticos **11**, **13** y **22**.

Figura 48. A. Evaluación tópica sobre esternitos. B. Evaluación sobre superficies tratadas.



Al comparar los tres tipos de tratamiento, (Mann-Whitney, MW, p <0,05) se observaron diferencias para seis de los 12 análogos evaluados, compuestos **10**, **11**, **13**, **16**, **21** y **22**) donde compuesto **11** mostró la tasa de mortalidad más alta en cada uno de los tratamientos, con LD₅₀ 225.60 mg L⁻¹ y LD₉₅ 955,90 mg L⁻¹ en aplicación tópica sobre terguitos a las 72 h y 500 mg L⁻¹ (Tablas 18 y 19).

	Mortalidad	Mortalidad	Test de probabilidad	Mortalidad	Test de probabilidad
Comp.	terguitos	esternitos	Mann-Whitney	exposición a	Kruskal-Wallis
	(%±DE)	(%±DE)	(p<0.05)	superficies (%±DE)	(p<0.05)
10	0	19.4±4.8	1.000000	0	0.0457*
11	83.3±16.7	38.9±4.8	0.046302*	16.7±0	0.0234*
7	2.8±4.8	11.1±9.6	0.238594	0	0.195
12	11.1±4.8	13.9±4.8	0.238594	8.3±0	0.195
13	25±22	13.9±4.8	0.046302*	0	0.0234*
16	2.8±4.8	19.4±4.8	1.000000	5.6±4.8	0.0498*
17	22.2±12.7	30.6±26.7	0.512691	11.1±4.8	0.5501
18	22.2±4.8	22.2±4.8	0.796254	11.1±4.8	0.067
19	13.9±4.8	8.3±8.3	0.653095	13.9±4.8	0.8599
20	19.4±4.8	25±0	0.113847	0	0.0289*
21	16.7±8.3	11.1±4.8	0.345779	0	0.0446*
22	27.8±4.8	16.7±0	0.043115*	0	0.0226*

Tabla 18. Mortalidad causada por las moléculas evaluadas en ninfas NI.

C. flexuosus	0	11.1±4.8	 11.1±4.8	0.0457*
C. sinensis	5.6±4.8	8.3±0	 0	0.0608
E. citriodora	0	0	 0	
Acetona Ste1	0	0	 0	

Análogos sintéticos y tres aceites esenciales aplicados con tres tipos de tratamiento contra ninfas *Rhodnius prolixus* en ninfas etapa I a las 72 h y 500 mg L⁻¹. * Valores estadísticamente significativos

Aplicación tópica	LD_{50}	LD ₉₅	X ²	
11	225.60	955.9	4 00	
Terguitos	(194.38-257.97)	(729.31-1443.64)	1.00	
Delterretrine	0.001	0.01		
Deitametrina	(4x10 ⁻⁴ - 5x10 ⁻³)	(2x10 ⁻² - 4x10 ⁻²)		
Fonitotrion	24	110		
Fermourion	(20 - 36)	(100 - 260)		

Tabla 19. LD₅₀ para el compuesto **11** y los controles empleados en el ensayo.

Intervalos de confianza del 95% (entre paréntesis). LD₅₀: dosis letal que causa mortalidad al 50% de las ninfas expuestas al tratamiento; LD₉₅: dosis letal que causa mortalidad al 95% de las ninfas expuestas al tratamiento; * X²: Chi cuadrado; LD₅₀ y LD₉₅ de deltametrina y fenitrotion utilizados en el estudio realizado por Vivas, *et al*.

La mortalidad en ninfas de quinto estadio NV de *R. prolixus* a las 72 h y 1500 mg L⁻¹ fue baja y solo se evidenció acción sobre esternitos para el análogo **16** con 11.1 \pm 9.6% y 5.5 \pm 4.7% para los análogos **1** y **11**, registrando una acción significativamente diferente (Kruskal-Wallis: H (14 N = 45) = 36.64743 p = 0.0008). No hubo mortalidad con la aplicación tópica sobre terguitos y superficies tratadas con los 12 análogos sintéticos.

Los ensayos empleando aceites esenciales, usados a modo comparativo sobre ninfas NI y NV, mostraron al aceite esencial *C. flexuosus* como el más activo sobre esternitos (11.1 ± 4.8%) y cuando fueron expuestas a superficies tratadas a las 72 h y 1.000 mg L⁻¹. Sin embargo, la evaluación de *C. sinensis* a la misma dosis evidenció una baja mortalidad en tergitos (5,6 ± 4,8%) y esternitos (8,3 ± 0%). Para las ninfas de la etapa V, la mortalidad fue baja (8,3 ± 0%) y solo se observó con C.

sinensis en tergitos. Por otro lado, no se registró mortalidad con la aplicación tópica de *C. sinensis* y *E. citriodora* en esternitos ni cuando se evaluaron las superficies tratadas (Tabla 18).

Discusión

Los análogos evaluados son moléculas hidrofóbicas que, cuando se aplican por vía tópica, pueden atravesar fácilmente el exoesqueleto de ninfas de la etapa I NI, una propiedad que puede ser responsable de la actividad insecticida observada tanto en terguitos como en esternitos. Las sustancias hidrofóbicas penetran la cutícula del insecto más fácilmente que las sustancias hidrofílicas porque están hechas principalmente de lípidos y ceras, que están más relacionadas con las sustancias evaluadas en nuestro estudio.^{77,78}

Sin embargo, otros factores intrínsecos y extrínsecos (tamaño, edad, estado nutricional, humedad y temperatura) pueden cambiar la evaluación de las moléculas. Otro hecho a tener en cuenta es la esclerotización de la cutícula, ya que las ninfas de 24 a 36 horas de edad tienen una cutícula semiesclerocida y, por lo tanto, una mayor susceptibilidad. Como otros autores han mencionado, las diferencias en el grosor de la cutícula en las ninfas de las etapas l y V pueden afectar la susceptibilidad a los estímulos externos; por ejemplo, Reyes, *et al.*, observaron que los insecticidas piretroides (beta-cipermetrina y fenitrotion) fueron más efectivos en las ninfas de la etapa I de *T. dimidata* y *T. maculata* que en las etapas de la etapa V. Cáceres, *et al.*, encontraron que las ninfas de *R. pallescens* en la etapa I eran sensibles a deltametrina y lambda-cihalotrina en diferentes zonas geográficas. En otro estudio, Germano encontró resultados similares en bioensayos de toxicidad con deltametrina en diferentes etapas de desarrollo en *T. infestans*.^{79–81}

Los insecticidas penetran en los insectos hasta que alcanzan su objetivo de tres maneras: a través de la cutícula, por ingestión y por inhalación. La penetración ocurre a través de la cutícula y de membranas articulares e intersegmentos, y a través de espiráculos. Encontramos la actividad insecticida más alta para el análogo

11 cuando se evaluó en terguitos de ninfas de la etapa I, sugiriendo que la penetración ocurre a través de la cutícula más delgada en esta etapa en las posiciones dorsal, ventral y lateral. En ninfas de la etapa V, la penetración de moléculas solo se observó en esternitas, con una menor actividad de insecticida teniendo en cuenta las características de la cutícula en esta etapa ninfal.

Debido a que los análogos sintéticos son compuestos no volátiles que, cuando se disuelven en un disolvente volátil como la acetona, permiten la formación de cristales, dejando residuos en sustratos porosos, como papel de filtro. En algunos estudios de campo, los autores han explicado la falta de persistencia de sustancias en algunas superficies porosas por el hecho de que estas superficies retienen partículas, lo que reduce su disponibilidad y la interacción de insectos y sustancias.^{82,83} Esto puede haber ocurrido en el experimento con las placas de Petri evaluado ya que la actividad insecticida de los análogos sintéticos en las superficies expuestas dio como resultado menores tasas de mortalidad. En este sentido, Stampini, *et al.*, han sugerido aumentar la dosis del ingrediente activo cuando se usa en superficies porosas. Otro factor que influyó en la bioactividad de los análogos sintéticos fue el comportamiento observado en las ninfas de la etapa I: se movieron hacia los extremos del papel, donde permanecieron durante todo el bioensayo, lo que pudo haber disminuido su interacción con las moléculas.

Finalmente, La baja actividad insecticida de los aceites esenciales en terguitos y esternitos probablemente se debió a la volatilidad de algunos de sus componentes, que, por lo tanto, fueron arrastrados fácilmente por la acetona en su proceso de evaporación después de la aplicación tópica, disminuyendo así su bioactividad. Este fue también el caso en el ensayo con superficies tratadas, en el que disminuyó la concentración de los compuestos activos en la placa de Petri.

4.4.5. Determinación de las CL₅₀ de análogos de girgensohnina sobre embriones de pez cebra. El pez cebra o Danio rerio es un modelo animal ideal para estudiar la genética y el desarrollo en organismos vertebrados.^{84,85} Debido a que su embriogénesis ocurre externamente y a que los embriones se encuentran recubiertos por una membrana transparente denominada corión, la observación de los diferentes estadios de su desarrollo, con ayuda de un microscopio, es una herramienta muy útil. Este modelo animal presenta grandes ventajas sobre otros extensamente empleados debido a sus facilidades de mantenimiento, costos y capacidad reproductiva, ya que parejas de individuos mantenidos en optimas condiciones pueden generar hasta 200 huevos por semana listos para empleo en diferentes bioensayos. Otra gran ventaja se encuentra en la rapidez de su desarrollo y la formación de las diferentes estructuras, segmentación del cerebro, formación de tubo neural, somitas, ojos, corazón, hígado, entre otras, después de tan solo 5 días de desarrollo.^{86,87}

Con la orientación y colaboración de la profesora Verónica Akle y su Laboratorio de Neurociencias y Ritmos Circadianos de la Universidad de los Andes, este modelo animal se empleó para realizar pruebas de toxicidad y las LC₅₀ de 5 moléculas análogas del alcaloide girgensohnina, compuestos **1**, **2**, **7**, **11** y **23** fueron determinadas (Tabla 20).

Comp	PM	LC ₅₀)
oomp.	g mol ⁻¹	μmol L ⁻¹	± DE
1	216.28	409.28	7.40
2	230.31	952.19	0.08
7	260.43	534.50	0.37
11	262.30	597.41	0.65
23	229.32	608.32	1.40

Tabla 20. LC₅₀ mg/L de los análogos evaluados sobre embriones de pez cebra.



Además de la determinación de las LC₅₀ de los 5 análogos evaluados, los ensayos permitieron determinar que los compuestos **1**, **7** y **11** produjeron un retraso en la eclosión de los embriones de hasta 6 horas, que se mantuvo hasta las 120 hpf (Tabla 21). Entre los cambios morfológicos presentados por los embriones cuando se empleó propoxur (100 mg L⁻¹), insecticida inhibidor de la AChE, como control, se observaron curvaturas en los cuerpos de los embriones y retrasos en el desarrollo, características no observadas en los embriones tratados con los análogos **1**, **2**, **7**, **11** y **23**. Los inhibidores de rutas implicadas en el desarrollo del sistema nervioso y del corazón provocan la curvatura del tronco de los peces.

A partir de estos resultados se observó que el compuesto **1**, el alcaloide girgensohnina, presentó una toxicidad mayor que sus análogos evaluados. Esto indicó que la sustitución del grupo hidroxilo en el arilo, por grupos electrodonadores, llevó a la generación de análogos con una toxicidad menor, destacándose el compuesto **23**, el cual fue el compuesto con menor toxicidad de la serie evaluada. La inclusión de otro grupo metoxilo en el arilo de los análogos **7** y **11**, si bien mostró una toxicidad menor que aquella encontrada para el compuesto **1**, presentó valores de LC₅₀ mayores que los compuestos con solo un sustituyente en para-. Ninguna tendencia pudo ser observada con respecto a la incidencia del tamaño y tipo sustituyente amínico de las estructuras.

Tabla 21. Cambios observables en los embriones a 96 hpf.



4.5. CONCLUSIONES

Utilizando los ensayos biológicos realizados en laboratorio sobre larvas de *A. aegypti* de tercer estadio y ninfas de *R. prolixus*, se encontró que análogos de la girgensohnina afectan el desarrollo biológico de estas especies. Mientras que todos los análogos evaluados mostraron afectar a las larvas a concentraciones menores a 140 mg L⁻¹, donde se destacaron los compuestos **1**, **2**, **4**, **7** y **23**, en la evaluación sobre ninfas de primer estadio, solo el compuesto **11** se destacó en todas las evaluaciones realizadas donde se emplearon ninfas de *R. prolixus*. El compuesto **23**, con una CL₅₀ de 48,96 mg L⁻¹ a las 24 h y una CL₅₀ menor de 38,65 mg L⁻¹, a

las 48 h, se identificó como el compuesto con la mejor actividad insecticida sobre larvas de *A. aegypti*, entre los análogos evaluados.

Cuando el análogo **7** se evaluó sobre las enzimas detoxificantes se observaron perfiles conservados en la actividad de estas enzimas, lo que sugiere que el análogo de girgensohnina evaluado no es reconocido por las enzimas desintoxicantes en las larvas. Caso contrario ocurrió con el aceite esencial evaluado ya que se encontró que el CFEO alteró notoriamente la actividad de las enzimas GST y p-NPA esterasa en la colonia de Rock, en comparación con el ligero aumento observado para la cepa WSant. La evaluación de la AChE sugiere que la mortalidad observada en los ensayos *in vivo* no puede atribuirse completamente a la inhibición de la actividad de esta enzima y es posible que tanto **7** como CFEO interactúen con otros sistemas en las larvas que conducen a su muerte.

Esto se corroboró con los resultados sobre la bioenergética mitocondrial donde se encontró que los α -aminonitrilos alteran la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias y genera estrés oxidativo en las células de larvas de *A. aegypti*. Se encontró que los compuestos **7**, **10**, **13** y **16** inhibieron notablemente la actividad de del complejo I y de la catalasa, incluso a las concentraciones más bajas. Los compuestos **10** y **16** mostraron una mayor actividad inhibidora sobre el complejo I y aumentaron los niveles de O₂•• % en la cadena respiratoria mitocondrial. Finalmente, empleando el modelo de pez cebra, se determinaron los CL₅₀ para los compuestos**1**, **2**, **7**, **11** y **23** encontrando que modificaciones sobre los sustituyentes del arilo de los compuestos ensayados llevaron a una reducción en la toxicidad de los compuestos. Estos resultados validaron la selección de los precursores empleados, lo que permitió la obtención de sistemas menos tóxicos que el alcaloide girgensohnina utilizado como alcaloide modelo cabeza de serie.

4.6. REFERENCIAS

[1] I.N. Kantor, [Dengue, Zika and Chikungunya]., Medicina (B. Aires). 76 (2016)

1–5.

J.P. Messina, O.J. Brady, T.W. Scott, C. Zou, D.M. Pigott, K.A. Duda, S.
 Bhatt, L. Katzelnick, R.E. Howes, K.E. Battle, C.P. Simmons, S.I. Hay, Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history, Trends Microbiol. 22 (2014) 138–146.

[3] M.L. Cafferata, A. Bardach, L. Rey-Ares, A. Alcaraz, G. Cormick, L. Gibbons,
 M. Romano, S. Cesaroni, S. Ruvinsky, Dengue Epidemiology and Burden of Disease
 in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and
 Meta-Analysis, Value Heal. Reg. Issues. 2 (2013) 347–356.

[4] R. Tapia-Conyer, M. Betancourt-Cravioto, J. Méndez-Galván, Dengue: an escalating public health problem in Latin America, Paediatr. Int. Child Health. 32 (2012) 14–17.

[5] S. Yacoub, B. Wills, Predicting outcome from dengue, BMC Med. 12 (2014) 147–156.

[6] C.C. Jansen, N.W. Beebe, The dengue vector Aedes aegypti: what comes next., Microbes Infect. 12 (2010) 272–9.

[7] G. Rojo, C. Castillo, J. Duaso, A. Liempi, D. Droguett, N. Galanti, J.D. Maya,
 R. López-Muñoz, U. Kemmerling, Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and
 Benznidazol on Trypanosoma cruzi ex vivo infection of human placental chorionic
 villi explants, Acta Trop. 132 (2014) 112–118.

[8] M. Boiani, L. Piacenza, P. Hernández, L. Boiani, H. Cerecetto, M. González,
 A. Denicola, Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles
 against Trypanosoma cruzi: Is oxidative stress involved?, Biochem. Pharmacol. 79
 (2010) 1736–1745.

[9] L.J. Scott, Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease, Drugs. 76 (2016) 1301–1312.

[10] L.M. Schwartz, M.E. Halloran, A.P. Durbin, I.M. Longini, The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control, Vaccine. 33 (2015) 3293–3298.

[11] L. Villar, G.H. Dayan, J.L. Arredondo-García, D.M. Rivera, R. Cunha, C.
Deseda, H. Reynales, M.S. Costa, J.O. Morales-Ramírez, G. Carrasquilla, L.C. Rey,
R. Dietze, K. Luz, E. Rivas, M.C.M. Montoya, M.C. Supelano, B. Zambrano, E.
Langevin, M. Boaz, N. Tornieporth, M. Saville, F. Noriega, Efficacy of a Tetravalent
Dengue Vaccine in Children in Latin America, N. Engl. J. Med. 372 (2014) 313–323.

[12] D. Sritabutra, M. Soonwera, Repellent activity of herbal essential oils against
Aedes aegypti (Linn.) and Culex quinquefasciatus (Say.), Asian Pacific J. Trop. Dis.
3 (2013) 271–276.

[13] J.C. Dickens, J.D. Bohbot, Mini review: Mode of action of mosquito repellents, Pestic. Biochem. Physiol. 106 (2013) 149–155.

 [14] M. Govindarajan, R. Sivakumar, Mosquito adulticidal and repellent activities of botanical extracts against malarial vector, Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae)., Asian Pac. J. Trop. Med. 4 (2011) 941–7.

[15] R.A. Alzogaray, Caracterización de la tocixidad de insecticidas piretroides en Triatoma infestans (Klug)., Centro de investigaciones de Plagas e Insecticidas.Buenos Aires, 1996.

[16] M. Jung, M. Park, Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa., Molecules. 12 (2007) 2130–9.

[17] E. Sancho, M.D. Ferrando, E. Andreu, In vivo inhibition of AChE activity in the European eel Anguilla anguilla exposed to technical grade fenitrothion., Comp.Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 120 (1998) 389–95.

[18] D. Nordmeyer, D.W. Dickson, Biological activity and acetylcholinesterase inhibition by nonfumigant nematicides and their degradation products on Meloidogyne incognita (1), Rev. Nématol. 13 (1990) 229–232. [19] J. Hemingway, The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance., Insect Biochem. Mol. Biol. 30 (2000) 1009–15.

[20] J. Hemingway, N.J. Hawkes, L. McCarroll, H. Ranson, The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes., Insect Biochem. Mol. Biol. 34 (2004) 653–65.

[21] C. Bass, I. Denholm, M.S. Williamson, R. Nauen, The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides, Pestic. Biochem. Physiol. 121 (2015) 78–87.

[22] E.P. Lima, M.H.S. Paiva, A.P. de Araújo, E.V.G. da Silva, U.M. da Silva, L.N. de Oliveira, A.E.G. Santana, C.N. Barbosa, C.C. de Paiva Neto, M.O.F. Goulart, C.S. Wilding, C.F.J. Ayres, M.A. V de Melo Santos, Insecticide resistance in Aedes aegypti populations from Ceará, Brazil., Parasit. Vectors. 4 (2011) 5.

[23] K. a Polson, W.G. Brogdon, S.C. Rawlins, D.D. Chadee, Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of Aedes aegypti mosquitoes., Acta Trop. 117 (2011) 31–38.

[24] P.K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P.J. Houghton, Acetylcholinesterase inhibitors from plants., Phytomedicine. 14 (2007) 289–300.

[25] J. Hemingway, H. Ranson, Insecticide resistance in insect vectors of human disease, Annu. Rev. Entomol. (2000) 371–391.

[26] A.A. Enayati, H. Ranson, J. Hemingway, Insect glutathione transferases and insecticide resistance, Insect Mol. Biol. 14 (2005) 3–8.

[27] C. Song, M.E. Scharf, Mitochondrial impacts of insecticidal formate esters in insecticide-resistant and insecticide-susceptible Drosophila melanogaster., Pest Manag. Sci. 65 (2009) 697–703.

[28] G. Vyatkina, V. Bhatia, A. Gerstner, J. Papaconstantinou, N. Garg, Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development., Biochim. Biophys. Acta. 1689 (2004) 162–73.

[29] J.E. Casida, Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action.,
Chem. Res. Toxicol. 22 (2009) 609–19.

[30] V. Kaminskyy, O. Kulachkovskyy, R. Stoika, A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids., Toxicol. Lett. 177 (2008) 168–81.

[31] A. Szewczyk, L. Wojtczak, Mitochondria as a pharmacological target., Pharmacol. Rev. 54 (2002) 101–27.

[32] M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Mitochondria, oxidative stress and cell death., Apoptosis. 12 (2007) 913–22.

[33] S.K. Bopp, M. Minuzzo, T. Lettieri, The Zebrafish (Danio rerio): an Emerging Model Organism in the Environmental Field, Inst. Environ. Sustain. Eur. Comm. Eur 22598 (2006) 1–19.

[34] M.D.A. Figueiredo, C. Frederico, C. Lanes, D.V. Almeida, L.F. Marins, Improving the production of transgenic fish germlines : In vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (Danio rerio) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy, 36 (2007) 31–36.

[35] Y. Huang, J. Zhang, X. Han, T. Huang, The use of zebrafish (Danio rerio) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin, Int. J. Environ. Res. Public Health. 11 (2014) 3650–3660.

[36] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish., Dev. Dyn. 203 (1995) 253–310.

[37] C. Zhang, C. Willett, T. Fremgen, Zebrafish: an animal model for toxicological studies, Curr. Protoc. Toxicol. (2003) 1.7.1-1.7.18.

[38] R.M. Castillo, E. Stashenko, J.E. Duque, Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against Aedes Aegypti, J. Am. Mosq. Control Assoc. 33 (2017) 25–35.

[39] S.S. Vera, J.E. Duque Luna, S.C. Méndez-Sanchez, D.F. Zambrano, F.

Rodríguez-Sanabria, E.E. Stashenko, Essential oils with insecticidal activity against larvae of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), Parasitol. Res. 113 (2014) 2647–2654.

[40] D. Valle, I.R. Montella, R. Ribeiro, P. Medeiros, A. Martins-Júnior, J.B.P. Lima, Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegyptil*, 2006.

[41] T.C. Sparks, R. Nauen, IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management, Pestic. Biochem. Physiol. 121 (2015) 122–128.

[42] M.C. Hardstone, J.G. Scott, A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci, Pestic. Biochem. Physiol. 97 (2010) 123–128.

[43] R. Maheswaran, S. Ignacimuthu, A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes Aedes aegypti and Aedes albopictus., Parasitol. Res. 110 (2012) 1801–13.

[44] K. Suwansirisilp, S. Visetson, A. Prabaripai, S. Tanasinchayakul, J.P. Grieco,
M.J. Bangs, T. Chareonviriyaphap, Behavioral responses of Aedes aegypti and
Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) to four essential oils in Thailand, J. Pest
Sci. (2004). 86 (2012) 309–320.

[45] J. Vontas, E. Kioulos, N. Pavlidi, E. Morou, A. Torre, H. Ranson, Insecticide resistance in the major dengue vectors Aedes albopictus and Aedes aegypti, Pestic.
 Biochem. Physiol. 104 (2012) 126–131.

[46] E.S. Autran, I. a Neves, C.S.B. da Silva, G.K.N. Santos, C. a G. da Câmara,
D.M. a F. Navarro, Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against Aedes aegypti of essential oils from Piper marginatum Jacq.
(Piperaceae)., Bioresour. Technol. 100 (2009) 2284–8.

[47] a O. Oyedele, a a Gbolade, M.B. Sosan, F.B. Adewoyin, O.L. Soyelu, O.O.Orafidiya, Formulation of an effective mosquito-repellent topical product fromlemongrass oil., Phytomedicine. 9 (2002) 259–62.

[48] N. Grisales, R. Poupardin, S. Gomez, I. Fonseca-Gonzalez, H. Ranson, A. Lenhart, Temephos resistance in Aedes aegypti in Colombia compromises dengue vector control., PLoS Negl. Trop. Dis. 7 (2013) e2438.

[49] T. Perry, P. Batterham, P.J. Daborn, The biology of insecticidal activity and resistance, Insect Biochem. Mol. Biol. 41 (2011) 411–422.

[50] T.A. Miller, Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides, ParasitologyToday. 4 (1988) S8-12.

[51] S. Terhzaz, P. Cabrero, R.A. Brinzer, K.A. Halberg, J.A.T. Dow, S.A. Davies,A novel role of Drosophila cytochrome P450-4e3 in permethrin insecticide tolerance,Insect Biochem. Mol. Biol. 67 (2015) 38–46. doi:10.1016/j.ibmb.2015.06.002.

[52] J. Zhou, Y. Shu, G. Zhang, Q. Zhou, Lead exposure improves the tolerance of Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae) to cypermethrin, Chemosphere. 88 (2012) 507–513. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.011.

[53] E.G. Kakani, S. Bon, J. Massoulié, K.D. Mathiopoulos, Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides, Insect Biochem. Mol. Biol. 41 (2011) 150–158. doi:10.1016/j.ibmb.2010.11.005.

[54] J.R. Misra, M.A. Horner, G. Lam, C.S. Thummel, Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in Drosophila, Genes Dev. 25 (2011) 1796–1806. doi:10.1101/gad.17280911.

[55] R. Poupardin, S. Reynaud, C. Strode, H. Ranson, J. Vontas, J.-P. David, Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito Aedes aegypti: impact on larval tolerance to chemical insecticides., Insect Biochem. Mol. Biol. 38 (2008) 540–51. doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.004.

[56] M.A. Riaz, A. Chandor-Proust, C. Dauphin-Villemant, R. Poupardin, C.M. Jones, C. Strode, M. Régent-Kloeckner, J.-P. David, S. Reynaud, Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide

imidacloprid in the dengue vector Aedes aegypti., Aquat. Toxicol. 126 (2013) 326– 37. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.010.

[57] S. Boyer, J. Sérandour, G. Lempérière, M. Raveton, P. Ravanel, Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides?, Chemosphere.
65 (2006) 721–724. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.02.032.

[58] D. Fournier, A. Mutero, Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides, Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. 108 (1994) 19–31. doi:10.1016/1367-8280(94)90084-1.

[59] F. Liéby-Muller, T. Constantieux, J. Rodriguez, Highly efficient access to original polycyclic pyrrolopiperazine scaffolds by a three-component reaction with 1,3-dicarbonyls, Synlett. (2007) 1323–1325. doi:10.1055/s-2007-973906.

[60] P. Vasantha-Srinivasan, S. Senthil-Nathan, A. Ponsankar, A. Thanigaivel, E.S. Edwin, S. Selin-Rani, M. Chellappandian, V. Pradeepa, J. Lija-Escaline, K.
Kalaivani, W.B. Hunter, V. Duraipandiyan, N.A. Al-Dhabi, Comparative analysis of mosquito (Diptera: Culicidae: Aedes aegypti Liston) responses to the insecticide
Temephos and plant derived essential oil derived from Piper betle L., Ecotoxicol.
Environ. Saf. 139 (2017) 439–446.

[61] M.B. Isman, Pesticides based on plant essential oils, in: Med. Aromat. Crop. Prod. Phytochem. Util., American Chemical Society, Washington, 2016: pp. 13–26.

[62] Z. Wang, Z. Zhao, X. Cheng, S. Liu, Q. Wei, I.M. Scott, Conifer flavonoid compounds inhibit detoxification enzymes and synergize insecticides, Pestic.
 Biochem. Physiol. 127 (2016) 1–7.

[63] N. Faraone, N.K. Hillier, G.C. Cutler, Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)., PLoS One. 10 (2015) e0127774.

[64] M. Chauzat, J. Faucon, Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (Apis mellifera L.) in France, Pest Manag. Sci. 1106 (2007)

1100–1106.

[65] A. Grzybowski, M. Tiboni, M.A.N. Silva, R.F. Chitolina, M. Passos, J.D. Fontana, Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of Annona muricata and Piper nigrum against the dengue fever vector Aedes aegypti, Pest Manag. Sci. 69 (2013) 589–601.

[66] S.L. Abd Kadir, H. Yaakob, R. Mohamed Zulkifli, Potential anti-dengue medicinal plants: a review., J. Nat. Med. 67 (2013) 677–89.

[67] Q. Ai, Y. Jing, R. Jiang, L. Lin, J. Dai, Q. Che, D. Zhou, M. Jia, J. Wan, L. Zhang, Rotenone, a mitochondrial respiratory complex i inhibitor, ameliorates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatitis in mice, Int. Immunopharmacol. 21 (2014) 200–207.

[68] R. Fato, C. Bergamini, M. Bortolus, A.L. Maniero, S. Leoni, T. Ohnishi, G. Lenaz, Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species, Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1787 (2009) 384–392.

[69] N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P.
Robinson, Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, J. Biol. Chem. 278 (2003) 8516–8525.

[70] M. Martín, M. Macías, G. Escames, R.J. Reiter, M.T. Agapito, G.G. Ortiz, D. Acuña-Castroviejo, Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo., J. Pineal Res. 28 (2000) 242–8.

[71] G. Scaini, D.D. Maggi, B.T. De-Nês, C.L. Gonçalves, G.K. Ferreira, B.P. Teodorak, G.D. Bez, G.C. Ferreira, P.F. Schuck, J. Quevedo, E.L. Streck, Activity of mitochondrial respiratory chain is increased by chronic administration of antidepressants, Acta Neuropsychiatr. 23 (2011) 112–118.

[72] A.J. Lambert, M.D. Brand, Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid

superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), J. Biol. Chem. 279 (2004) 39414–39420.

[73] G. Lenaz, R. Fato, M.L. Genova, C. Bergamini, C. Bianchi, A. Biondi,Mitochondrial Complex I : Structural and functional aspects, 1757 (2006) 1406–1420.

[74] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, Mol. Aspects Med. 30 (2009)42–59.

[75] S. Pal, S.K. Dey, C. Saha, Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: A biophysical approach, PLoS One. 9 (2014) e102460.

[76] L. Yang, X.L. Zheng, H. Sun, Y.J. Zhong, Q. Wang, H.N. He, X.W. Shi, B.
Zhou, J.K. Li, Y. Lin, L. Zhang, X. Wang, Catalase suppression-mediated
H2O2accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis
factor-induced NF-κB activation and sensitizes apoptosis, Cancer Sci. 102 (2011)
870–876.

[77] F. Guhl, Enfermedad de Chagas : Realidad y perspectivas, Rev Biomed. 20 (2009) 228–234.

[78] A. Rassi, A. Rassi, J. Marcondes de Rezende, American Trypanosomiasis (Chagas Disease), Infect. Dis. Clin. North Am. 26 (2012) 275–291.

[79] G. Mougabure-Cueto, M.I. Picollo, Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management., Acta Trop. 149 (2015) 70–85.

[80] T.N. Bolívar, L.A. Cortés, H.A. Suárez, Triatominos (Reduviidae : Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en, Biomédica. 25 (2005) 568–574.

[81] A. Carabarin-Lima, M.C. González-Vázquez, O. Rodríguez-Morales, L.
Baylón-Pacheco, J.L. Rosales-Encina, P.A. Reyes-López, M. Arce-Fonseca, Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update, Acta Trop. 127 (2013) 126–135.

[82] M.C. Cecere, R.E. Gürtler, D. Canale, R. Chuit, J.E. Cohen, The role of the

peridomiciliary area in the elimination of Triatoma infestans from rural Argentine communities., Rev. Panam. Salud Publica. 1 (1997) 273–9.

[83] M.R. Cortez, a Provençano, C.E. Silva, C.B. Mello, L.T. Zimmermann, G. a Schaub, E.S. Garcia, P. Azambuja, M.S. Gonzalez, Trypanosoma cruzi: effects of azadirachtin and ecdysone on the dynamic development in *Rhodnius prolixus* larvae., Exp. Parasitol. 131 (2012) 363–71.

[84] S. Basu, C. Sachidanandan, Zebra fi sh : A Multifaceted Tool for Chemical Biologists, (2013).

[85] L.R. Donaldson, S. Wallace, D. Haigh, E.E. Patton, A.N. Hulme, Rapid synthesis and zebrafish evaluation of a phenanthridine-based small molecule library., Org. Biomol. Chem. 9 (2011) 2233–9.

[86] P. McGrath, C.Q. Li, Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity, Drug Discov. Today. 13 (2008) 394–401.

[87] M.R. Pandey, H. Guo, Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos, Toxicol. Vitr. 28 (2014) 340–353.

5. CONCLUSIÓN

5.1. CONCLUSIÓN GENERAL

- Empleando la reacción de Strecker en su versión catalizada, se diseñaron y sintetizaron 83 α-aminonitrilos análogos del alcaloide girgensohnina **1** con buenos rendimientos. Su evaluación *in vivo* e *in vitro* sobre diferentes modelos enzimáticos y animales mostraron su capacidad para actuar como insecticidas sobre especies del género *Aedes aegypti* y *Rhodnius prolixus.*

5.2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

- La determinación por cribado virtual de los perfiles teóricos de biodisponibilidad de análogos de la girgensohnina, llevó a proponer una nueva serie de análogos del alcaloide natural girgensohnina, incorporando fragmentos con reportada acción biológica. Los perfiles farmacocinéticos encontrados permiten proponerlas como blancos atractivos para su evaluación biológica.

- Se empleó la reacción de Strecker, utilizando acetona cianhídrina y KCN como fuentes de cianuro y ácido sulfónico soportado en gel de sílice SSA, para la obtención de los α-aminonitrilos 1 a 71. Los compuestos 72 a 78 se obtuvieron bajo un protocolo sin catalizador usando agua como disolvente en la reacción y KCN como fuente de cianuro. Se empleó una reacción de aminación reductiva para la síntesis de los compuestos 79 a 84, los cuales fueron obtenidos con altos rendimientos. Estas reacciones *one-pot* permitieron la síntesis de las moléculas 1 a 84 bajo condiciones suaves y amigables con el medio ambiente.

- Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos demostrando la obtención de los productos

esperados. Los resultados de empaquetamiento, producto del análisis de difracción de rayos X, mostraron que los productos se obtienen como mezclas enantioméricas.

- La evaluación *in vitro* de la actividad de los 84 análogos sobre la AChE de *Electrophorus electricus*, mostró que 45 de las moléculas evaluadas presentaban concentraciones de inhibición media mas bajas que las reportadas para el alcaloide natural (IC₅₀ = 92,9 μ M). Se destacó el compuesto 2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo **60** con un valor IC₅₀ = 1,93 μ M comparable con el encontrado para el insecticida comercial diazinón (IC₅₀ = 1,87 μ M).

- Los valores de la energía de acoplamiento de los 84 análogos en el sitio activo de la cadena A de la AChE de *Homo sapiens* (AP 1D: 1B41) se determinaron empleando herramientas de docking molecular. Principalmente se observaron interacciones de los compuestos con los residuos Tyr124 y Tyr337, interacciones π - π , π -catión y/o π -H con uno o más de los residuos pertenecientes al PAS e interacciones tipo puente de hidrógeno. La comparación de los diferentes enantiómeros de los análogos evaluados permitió determinar como tendencia que los enantiómeros *R* presentaban una mayor afinidad por el sitio activo que los enantiómeros *S*.

- La evaluación *in vivo* de diferentes análogos sobre larvas de *A. aegypti* de tercer estadio y ninfas de *R. prolixus* mostró que análogos de la girgensohnina afectan el desarrollo biológico de estas especies bajo condiciones de laboratorio. Mientras que los compuestos **1**, **2**, **4**, **7** y **23** se destacaron cuando se evaluó su acción sobre larvas de *A. aegypti*, el compuesto 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-(morfolin-1-il)acetonitrilo **11** lo hizo al emplear ninfas de *R. prolixus*. El compuesto 2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-(pirrolidin-1-il)acetonitrilo **23** con un valor IC₅₀ = 1,93 µM sobre AChE comercial también presentó la mejor actividad insecticida sobre larvas *A. aegypti* con valores CL₅₀ de 48,96 mg L⁻¹ a las 24 h y una CL₅₀ menor de 38,65 mg L⁻¹, a las 48 h.

- Cuando el 2-(3,4-dimetoxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo **7** se evaluó sobre las enzimas detoxificantes se observaron perfiles conservados en la actividad de estas enzimas, contrario a lo observado para el aceite esencial *Cymbopogon flexuosus*, CFEO. Esto sugirió que el análogo de girgensohnina no es reconocido por las enzimas desintoxicantes en las larvas contrario a lo observado para el CFEO. La evaluación de la AChE de adultos mostró que la mortalidad observada en los ensayos *in vivo* puede no ser completamente atribuida a la inhibición de la AChE siendo posible la interacción de los análogos con otros sistemas biológicos.

- La evaluación de los compuestos 7, 10, 13 y 16 sobre la bioenergética mitocondrial mostró que estos α-aminonitrilos alteran la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias inhibiendo la actividad del complejo I. Se destacan los compuestos 10 y 16 los cuales presentan a la pirrolidina, anillo de 5 miembros, como fragmento amínico.

- Se determinaron los CL₅₀ para los compuestos 1, 2, 7, 11 y 23 empleando el modelo de pez cebra, encontrando que modificaciones sobre los sustituyentes del arilo de sus estructuras generaron sistemas menos tóxicos (2: 952,2 μmol L⁻¹, 7: 534,5 μmol L⁻¹, 11: 597,4 μmol L⁻¹ y 23: 608,3 μmol L⁻¹) que el determinado para el alcaloide natural 1 (409,3 μmol L⁻¹), bajo las mismas condiciones de evaluación.

BIBLIOGRAFÍA

Arasappan, Ashok, *et al.* "Practical and Efficient Method for Amino Acid Derivatives Containing Quaternary Center: Application toward Synthesis of Hepatitis C Virus NS3 Serine Protease Inhibitors." Tetrahedron Letters, 2007, 48(36): 6343–47.

Bosch, Lluís y Jaume Vilarrasa. "Cu2(OTf)2-Catalyzed and Microwave-Controlled Preparation of Tetrazoles from Nitriles and Organic Azides under Mild, Safe Conditions." Angewandte Chemie - International Edition, 2007, 46(21): 3926–30.

Carreño, Aurora, *et al.* "Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girgensohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil" Comparative Biochemistry and Physiology. Part C-Toxicology, 2018, 204, 14 - 25.

Carreño, Aurora, *et al.* "Structure determination of 2-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1h)yl)-2-[4-(dimethylamino)phenyl]acetonitrile, an α -amino nitrile obtained by a modified Strecker reaction" Journal Of Chemical Crystallography, 2017, 48, 1-7.

Carreño, Aurora, *et al.* "Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girgensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever". European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 78, 392-400.

Cativiela, Carlos y María D. Díaz-de-Villegas. "Recent Progress on the Stereoselective Synthesis of Acyclic Quaternary α-Amino Acids." Tetrahedron: Asymmetry, 2007, 18(5): 569–623.

Das, Biswanath, *et al.* "A Simple, Advantageous Synthesis of 5-Substituted 1 h - Tetrazoles." Synlett, 2010, (3): 391–94.

Dvir, Hay, *et al.* "Acetycholinesterase: From 3D Structure to Function." Chemico-Biological Interactions, 2010, 187(1–3): 10–22.

Galletti, Paola, Matteo Pori y Daria Giacomini. "Catalyst-Free Strecker Reaction in Water: A Simple and Efficient Protocol Using Acetone Cyanohydrin as Cyanide Source." European Journal of Organic Chemistry, 2011, (20–21): 3896–3903.

Gröger, Harald. "Catalytic Enantioselective Strecker Reactions and Analogous Syntheses." Chemical reviews, 2003, 103(8): 2795–2828.

Järvinen, Päivi, Pia Vuorela, Annele Hatakka, y Adyary Fallarero. "Potency Determinations of Acetylcholinesterase Inhibitors Using Ellman's Reaction-Based Assay in Screening: Effect of Assay Variants." Analytical biochemistry, 2011, 408(1): 166–68.

Jin, Tienan, Fukuzou Kitahara, Shin Kamijo, y Yoshinori Yamamoto. "Copper-Catalyzed Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles via the [3+2] Cycloaddition of Nitriles and Trimethylsilyl Azide." Tetrahedron Letters, 2008, 49: 2824–27.

Kais, Britta, Daniel Stengel, Annika Batel, and Thomas Braunbeck. "Acetylcholinesterase in Zebrafish Embryos as a Tool to Identify Neurotoxic Effects in Sediments." Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(21): 16329–39.

Küster, Eberhard. "Cholin- and Carboxylesterase Activities in Developing Zebrafish Embryos (Danio Rerio) and Their Potential Use for Insecticide Hazard Assessment." Aquatic Toxicology, 2005, 75(1): 76–85.

Mohamed, Magda A. *et al.* "The Activity of Detoxifying Enzymes in the Infective Juveniles of Heterorhabditis Bacteriophora Strains: Purification and Characterization of Two Acetylcholinesterases." Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology, 2016, 180: 11–22.

Nammalwar, Baskar, Chelsea Fortenberry y Richard, Bunce. "Synthesis of Aminonitriles under Mild Catalytic, Metal-Free Conditions." Tetrahedron Letters, 2014, 55(2): 379–81.

Opatz, Till, y Dorota Ferenc. "An Unexpected Three-Component Condensation Leading to Amino- Acetonitriles." J. Org. Chem. 2004, (12): 8496–99. Oliver Kappe, David Cantillo y Bernhard Gutmann. "Mechanistic Insights on Azide -Nitrile Cycloadditions: On the Dialkyltin Oxide-Trimethylsilyl Azide Route" Organocatalyst, 2011, (Ii): 4465–75.

Pandey, Manish Raj, y Huarong Guo. "Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Embryotoxicity of Insecticide Propoxur Using Flounder Gill (FG) Cells and Zebrafish Embryos." Toxicology in Vitro, 2014, 28(3): 340–53.

Polson, Karen, William G Brogdon, Samuel C Rawlins y Dave D Chadee."Characterization of Insecticide Resistance in Trinidadian Strains of Aedes Aegypti Mosquitoes." Acta tropica, 2011, 117(1): 31–38.

Regnier, Thomas, y Olivier Lavastre. "General and Environmentally Friendly Synthesis of Heterocyclic Multidentate Molecules Based on Microwave-Assisted Heating Protocol." Tetrahedron, 2006, 62(1): 155–59.

Tukulula, Matshawandile *et al.* 2012. "The Design, Synthesis, in Silico ADME Profiling, Antiplasmodial and Antimycobacterial Evaluation of New Arylamino Quinoline Derivatives." European journal of medicinal chemistry 57C: 259–67.

Vorona, Svetlana, *et al.* 2014. "An Improved Protocol for the Preparation of 5-Substituted Tetrazoles from Organic Thiocyanates and Nitriles." Synthesis (Germany), 2014, 46(6): 781–86.

Welsch, Matthew E, Scott Snyder, y Brent R Stockwell. "Privileged Scaffolds for Library Design and Drug Discovery." Current opinion in chemical biology, 2010, 14(3): 347–61.