

124



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"SINTESIS DE N,N'- DI- (4-R-FENIL)-  
ALCANODIAMIDAS Y EVALUACION DE SU  
ACTIVIDAD CITOTOXICA"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICO - BIOLOGICA  
P R E S E N T A :  
MARIA ELENA RODRIGUEZ PALACIOS



MEXICO, D. F. **EXAMENES PROFESIONALES**  
FACULTAD DE QUIMICA 2001.

293468



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

Presidente            Prof. **GUADALUPE MERCADO RAMIREZ**

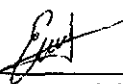
Vocal                Prof. **PATRICIA ELIZALDE GALVAN**

Secretario          Prof. **ROBERTO MARTINEZ**

1er. Suplente       Prof. **BLAS FLORES PEREZ**

2do. Suplente      Prof. **LINO JOEL REYES TREJO**

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 2-11  
del Instituto de Química, UNAM

  
\_\_\_\_\_  
**Maria Elena Rodriguez Palacios**  
Sustentante

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Roberto Martinez**  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. J. Gustavo Avila Zarraga**  
Supervisor Técnico

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2-11

Del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección  
del Dr. Roberto Martínez y del Dr. José Gustavo Ávila Zárraga.

Con apoyo económico de los proyectos:

DGAPA UNAM IN-206598 y

CONACYT 32633-E

## Dedicatoria:

Dedico todo el trabajo y esfuerzo que requirió mi tesis a las personas más importantes en mi vida, espero que estén tan orgullosos de mí, como lo estoy yo de ustedes...

✓ **A Dios:**

Son tantas las cosas que te agradezco día a día, pero nunca me había dado cuenta de la gracia más grande que me has brindado, el poder tener tantas personas a mi lado, a lo largo de mi vida: a mi familia y amigos. Gracias también por permitirme terminar una etapa más de mi vida, la más hermosa de todas

✓ **A mi papá: *Jorge Rodríguez***

Gracias por enseñarme tantas cosas, principalmente que *“la gratitud no es la más grande de las virtudes, sino que engendra a las demás”* y *“pedir a Dios que bendiga mi trabajo; pero no esperar que Él me lo haga”*, créeme que en varias ocasiones el recordar esto que siempre me dices ha provocado buenos efectos en mí. Ojalá llegue a ser la mitad de trabajadora que eres tú, ya que es ahora que he empezado a trabajar que me doy cuenta lo duro que ha sido para ti sacar adelante a tu familia, pero lo has hecho muy bien. Has sido un gran ejemplo para mí y estoy feliz de que seas mi papá.

✓ **A mi mamá: *Magdalena Palacios***

Eres la mejor mamá que hubiera podido pedir y gracias porque además te has convertido en mi amiga, lo mejor es que por encima de nuestras diferencias y opiniones tan dispares, hay algo muy grande que nos une. Gracias por saber ser firme, para apoyarme; suave para dulcificar mis asperezas; entusiasta, para darme ganas de luchar; sonriente, para secar en tí mis lágrimas; paciente, cuando mi desorden y desorganización te abruman.

✓ **A mi hermana: *Georgina Rodríguez Palacios***

Eres de las pocas personas que conozco desde que nacieron, y a pesar de que soy la mayor, tú te has convertido muchas veces en mi ejemplo a seguir. Agradezco a Dios que hayas llegado a mi vida, ya que eres mi compañera y a pesar de lo diferentes que somos nos hemos divertido, llorado, luchado y acompañado en cada instante. ¡Gracias por ser mi hermanita!

## **Gracias a:**

---

---

- **Dr. Roberto Martínez:**

Gracias por mi proyecto de tesis, por permitirme trabajar en su laboratorio, por enseñarme todo lo que implica realizar un trabajo de investigación y sobretodo gracias por el apoyo que me brindó a lo largo de la realización de este trabajo. Con su ayuda he aprendido lo importante que es luchar por conseguir lo que uno desea.

- **Dr. J. Gustavo Ávila:**

Gracias por sus consejos, por sus preguntas y ayuda durante mi trabajo experimental.

- **M en C. Yolanda González Quezada:**

No puedo dejar de mencionar la manera en que me enseñó la materia de Química Orgánica III, usted supo despertar mi interés en la síntesis orgánica. Gracias por permitirme realizar el Servicio Social con usted y aprender a trabajar en el laboratorio eso me facilitó la realización de mi tesis pero, principalmente gracias por sus consejos que en muchas ocasiones hicieron que tomara la mejor elección.

### **Agradecimientos :**

- Q.F.B. María del Rocío Patiño del laboratorio de Espectroscopía IR (Instituto de Química de la UNAM).
- M en C. Héctor Ríos Olivares y Q. María de los Angeles Peña González del laboratorio de Espectroscopía de RMN (Instituto de Química de la UNAM).
- M en C. Javier Pérez Flores y al Ing. Luis Velasco Ibarra del laboratorio de Espectrometría de Masas (Instituto de Química de la UNAM).
- M en C. María Teresa Ramírez Apan del laboratorio de Pruebas Biológicas (Instituto de Química de la UNAM).

## **Agradecimientos especiales:**

A todas las personas importantes que estuvieron ligadas directamente con la realización de mi tesis.

✓ **Alejandra y Cuauhtémoc:**

*“ Amistad es presencia, aun en la ausencia”* No hay mejor frase que ésta para agradecer estos más de 10 años de presencia continua, a pesar de la distancia y nuestras vidas tan diferentes. Gracias a su amistad muchas cosas se me han facilitado ... espero tener la dicha de contar con ustedes dos durante toda mi existencia.

✓ **Maribel y Angeles:**

Gracias a ustedes recordaré los 9 semestres de carrera que culminan con mi tesis. Me alegro de haberlas tenido a mi lado para aminorar toda la carga de trabajo y saber que la escuela también puede ser divertida.

✓ **Eleaneth:**

Gracias por ser la persona con la que hablé el primer día de clases, tú más que nadie sabes lo importante que eres para mí desde ese día: alejaste todos mis nervios, no pude tener mejor compañera de equipo y, como si eso fuera poco, tú junto con Maribel me enseñaron a valorar la oportunidad de tener a mi familia junto a mí. Cuando crezca quiero ser como ustedes dos.

✓ **Luis y Roberto:**

Mis recuerdos del Servicio Social no pueden ser mejores gracias a ustedes dos, que son tan “adorables”(¿no Roberto?). Lo mejor es que no se acabó ahí nuestra amistad, sino que es algo con lo que me alegro de contar hasta el día de hoy.



✓ **Luis Chacón, Víctor y María Esther:**

Nunca pensé todo el trabajo que requería realizar mi tesis, pero gracias a sus consejos, su amistad, su risa, los días fueron muy cortos y el trabajo ligero. Luis: gracias por sembrar en mí el amor a la investigación. Espero que estés ahí para mi tesis de Maestría. Gracias Víctor por convertirte en mi compañía durante este tiempo (¿cómo olvidar todas tus bromas y regaños?) y tantos momentos que vivimos juntos. Finalmente MaE muchas gracias por estar a mi lado, por ser una buena amiga y no dejarme comer sola.

✓ **Ruben:**

Tú eres de esas personas que uno no espera encontrar en el camino, pero que cuando llegan, es difícil separarse de ellas. Gracias por platicar conmigo mi primer día en el Instituto, desde ese momento hemos disfrutado muchas cosas en poco tiempo, pero la mejor de todas es saberte mi amigo.

✓ **David Tamayo, Gaby, Cinthya, Guímel, Juan Carlos, Heriberto, Rosa, Karen, Aldo, Rafa, Iván, Josefina, Elvira, Alvaro, Leonardo, Erik Fulgueira, Fernando Calderón:**

Mis amigos de la carrera, nunca podré olvidar todos los momentos que pasé con cada uno de ustedes ... gracias.

✓ **Marco M., Marco, Carlos, Araceli, Martha, Carmen, Irma:**

Todos ustedes fueron mis compañeros en el laboratorio 2-11, muchas gracias por estar ahí, y hacer que el año 2000 sea inolvidable para mí.

✓ **Jorge, Miguel Angel, Carlos:**

No por ser los últimos de esta lista son los menos importantes; al contrario, a pesar de que nuestra amistad ha surgido desde hace poco tiempo, se han preocupado por mí y por ver "como me va con mi tesis" y lo más importante, me han demostrado que ni la edad ni las diferentes actividades y gustos influyen en que los amigos se cuiden y quieran. Gracias por estar conmigo.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>2. ANTECEDENTES</b>	6
2.1. El cáncer	7
2.2. Entrecruzadores de Surco	9
2.3. Amidas	13
2.3.1. <i>Nomenclatura de Amidas</i>	13
2.3.2. <i>Síntesis de Amidas</i>	14
2.3.3. <i>Importancia de las Amidas</i>	15
<b>3. OBJETIVOS</b>	17
<b>4. METODOLOGÍA</b>	19
4.1. Síntesis	20
4.1.1. <i>Diagrama de Flujo</i>	23
4.2. Pruebas de Citotoxicidad	24
4.2.1. <i>Líneas Celulares y Medios de Cultivo</i>	25
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	27
5.1. Síntesis	30
5.1.1. <i>Mecanismo de Reacción</i>	31
5.2. Pruebas de Citotoxicidad	38
<b>6. CONCLUSIONES</b>	45
<b>7. PARTE EXPERIMENTAL</b>	47
7.1. Equipos Empleados	48
7.2. Experimentos realizados	49
7.3. Ensayo de Citotoxicidad	51
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	53

El cáncer es un problema serio de salud humana, ya que se trata de un grupo de enfermedades que afectan diferentes órganos y sistemas del cuerpo. Su desarrollo es debido al crecimiento sin control de las células.

Las estrategias tradicionales para su tratamiento son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. De esta manera el 50% de los enfermos se curan a través de uno de estos métodos o por una combinación de los mismos; pero es la quimioterapia la única solución efectiva contra algunos tipos de cáncer diseminado, porque los fármacos anticancerígenos viajan a través del sistema circulatorio.

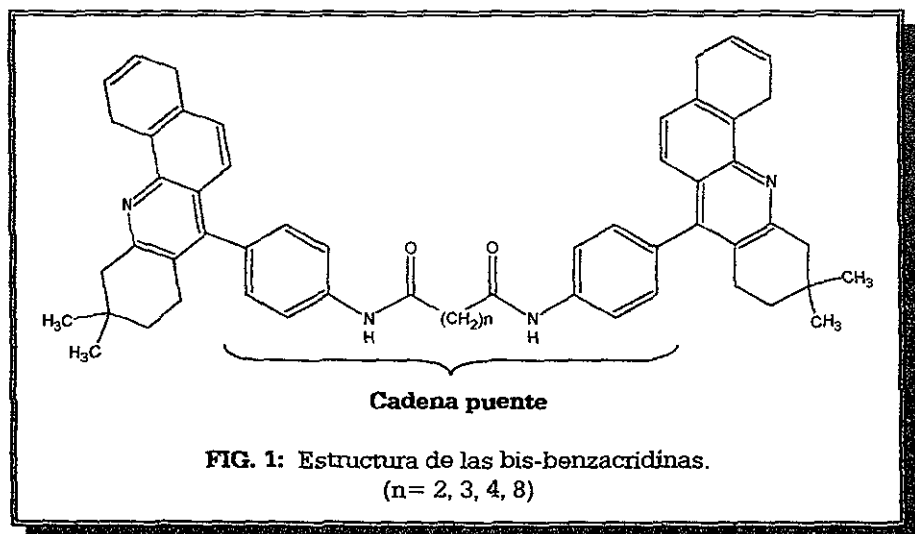
La investigación en el área de los fármacos anticancerígenos ha tenido un gran auge en los últimos años, ya que el cáncer es una de las enfermedades que causa el mayor número de muertes (sólo después de las enfermedades cardiovasculares).

Los fármacos que se conocen en la actualidad y que son empleados como agentes quimioterapéuticos no son del todo selectivos, por eso, uno de los grandes retos de los grupos de investigación en el área químico-biológica es la de sintetizar compuestos químicos que reúnan características, como el aumento a una respuesta farmacológica deseada a menor dosis, selectividad y disminución de los efectos secundarios indeseados.

Muchos de los compuestos citotóxicos actúan al interferir con la función normal del ADN, esto es, mediante la unión covalente con la cadena del ADN, o a través de interacciones no-covalentes como sucede con los intercaladores y los entrecruzadores de surco. La esencia de la intercalación es la inserción de moléculas entre pares de bases adyacentes de la doble hélice lo que provoca que ésta se extienda y se estabilice, y el proceso de transcripción y replicación del ADN se vean afectados.

La antraciclina se ha convertido en el intercalador más estudiado en los últimos años, sin embargo, fármacos como la 9-aminoacridina, han demostrado actuar a través de la intercalación entre pares de bases específicas.

Existen también los llamados bis-intercaladores, que consisten en dos grupos cromóforos unidos por una cadena puente, la bis-daunorubicina es un ejemplo típico de ello.

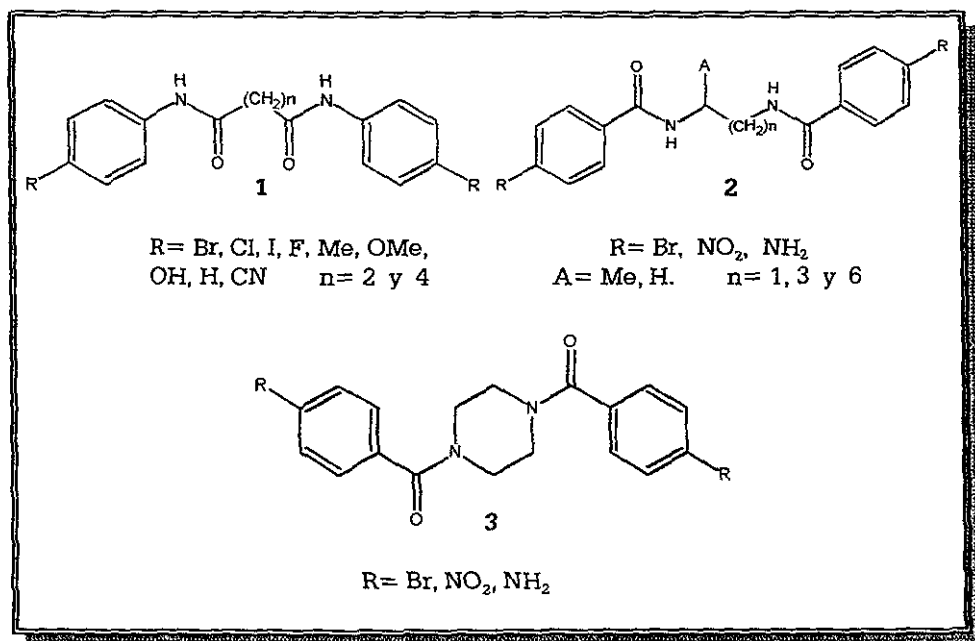


Debido al interés de nuestro grupo en este tema se realizó la síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de bis-benzacridinas <sup>1</sup> (FIG 1), en las que la cadena puente es una diarilalcanodiamida ( $n = 2, 3, 4$  y  $8$ ). Como algunas de estas moléculas tuvieron actividad citotóxica, el siguiente aspecto fue investigar el papel de la cadena puente en la actividad citotóxica mostrada por estos compuestos, así que se realizó la síntesis de una serie de diarilalcanodiamidas de cadenas alifáticas de distintos tamaños (desde 2 hasta 7 metilenos), con grupos nitro y amino en la posición 4 del anillo bencénico. La evaluación de su actividad citotóxica en 5 líneas celulares mostró que algunos compuestos son muy activos.<sup>2</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a los resultados obtenidos y a que las únicas variables manejadas en dicho proyecto fueron el tamaño de la cadena alifática y los sustituyentes nitro y amino, en el presente trabajo se describe la síntesis y evaluación de la actividad citotóxica, de tres diferentes series de diamidas, donde las variables que se toman en cuenta para completar el estudio son:

1. Diferentes sustituyentes en la posición para del anillo bencénico
2. Tamaño de la cadena alifática
3. Posición del grupo carbonilo de la amida
4. Rigidez de la cadena alifática.



## 2.1. EL CÁNCER.

El cáncer representa mundialmente un grave problema de salud pública, y México ha resentido los estragos de esta enfermedad ya que en nuestro país en la década de los 50's el cáncer era la segunda causa de muerte, para la década de los 80's se colocó en el primer lugar y a partir de 1990 se encuentra en el segundo lugar de mortalidad, justo después de las enfermedades cardiovasculares.<sup>3</sup> Actualmente ésta enfermedad se ha diagnosticado a 10 millones de personas cada año, de los cuales 6 millones mueren y se espera que para el año 2020 se diagnostiquen 20 millones de casos, de los cuales morirán 10 millones.

El cáncer afecta a los humanos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. La frecuencia de los diversos tipos de cáncer aumenta con la edad, de modo que conforme la gente sea más longeva, un número mayor desarrollará la enfermedad. Aunado al sufrimiento humano la carga económica para la sociedad es inmensa.

El término cáncer es empleado para catalogar las enfermedades en las que ocurre una división celular sin control. Las células cancerosas tienen tres propiedades características:

a) ***Disminución o ausencia del control del crecimiento;*** formando un nuevo tejido (tumor) que crece continuamente a través de la habilidad que tienen éstas células de proliferar indefinidamente.

b) ***Invasividad de tejidos locales;*** Asociado con el crecimiento y la división no controlados está la invasión de los tejidos sanos circundantes.

a) ***Dispersión o metástasis a otras partes del cuerpo;*** Ésta es la característica más temida, ya que las células malignas se separan del tumor original y viajan a través del sistema circulatorio, estableciendo colonias en sitios distantes.<sup>4,6</sup>

Por esta razón los métodos de tratamiento tienen como objetivos principales: combatir el crecimiento sin control, evitar la invasión del tejido y la metástasis. Los métodos tradicionales para el tratamiento del cáncer son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, gracias a los cuales, hoy en día el 50% de los pacientes diagnosticados con cáncer, se curan a través de uno de estos métodos o por una combinación de ellos. A continuación se explica brevemente cada uno, sus ventajas y limitaciones.

La **cirugía**, que controla la enfermedad al eliminar el tejido maligno es el método al que se debe el mayor número de curaciones, cuando la enfermedad es detectada a tiempo. La principal limitante es que no puede tratar el cáncer diseminado.

La **radioterapia** consiste en la radiación con Rayos X o  $\gamma$  del tumor canceroso pero estos tratamientos causan daños genéticos a las células, los cuales pueden ser suficientes para matar a las células directamente o para inducir suicidio celular, un proceso llamado *apoptosis*; debido a que las células sanas se recuperan más rápidamente de la exposición a la radiación, esta terapia preserva las células anatómicas que rodean al crecimiento canceroso. A pesar de esta ventaja, el tratamiento a veces no puede eliminar completamente el tumor, y como la cirugía, no puede tratar el cáncer metastásico.

La **quimioterapia** es uno de los caminos más efectivos para tratar algunos tipos de cáncer diseminados y consiste en la aplicación sistemática de fármacos citotóxicos que viajan a través del sistema circulatorio. Varios compuestos se utilizan actualmente como agentes anticancerígenos y se están probando más. Algunos de los fármacos quimioterapéuticos actúan en las células cancerosas evitando que se multipliquen, interfiriendo en su habilidad para replicar al ADN. El éxito de la quimioterapia se debe a que las células que proliferan muy rápidamente son más sensibles a los inhibidores de la replicación del ADN, y a que las propiedades metabólicas de las células tumorales difieren de las normales lo suficiente como para conferir ventajas quimioterapéuticas.<sup>6</sup>

La quimioterapia disponible en este momento tiene algunas desventajas: los fármacos matan también a muchas células sanas ocasionando que los pacientes presenten efectos colaterales graves lo que limita las dosis aplicables. Otro de los problemas es que muchos tumores se vuelven resistentes al tratamiento.

### 2.2 ENTRECRUZADORES DE SURCO.

Un objetivo importante para la química medicinal, consiste en el diseño de moléculas sintéticas que imiten varios aspectos de las moléculas biológicamente activas. En años recientes un gran avance en este aspecto ha comenzado a darse, al entender los procesos de reconocimiento molecular entre moléculas pequeñas y péptidos, proteínas o los ácidos nucleicos.<sup>7</sup> El ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico) llevan a cabo los primeros pasos para la producción de proteínas que son requeridas de manera natural y en ocasiones anormal por los procesos fisiológicos, por esta razón es natural que sean estas moléculas consideradas como "blancos" potenciales en el diseño de fármacos que prevengan o eliminen distintos tipos de enfermedades, pero esto mismo no ha podido realizarse sin la posibilidad de interrumpir o alterar una función normal en el organismo.

Es importante tener en cuenta que para que un fármaco actúe a nivel de ácidos nucleicos deben atravesar membranas biológicas, ya que el ADN se encuentra dentro del núcleo de las células y está doblemente protegido por membranas; el ADN eucariótico es aún más complicado por su organización cromosomal.



Hasta el momento, se sabe que todos los fármacos que interactúan con el ADN lo hacen en una o más de estas tres maneras:

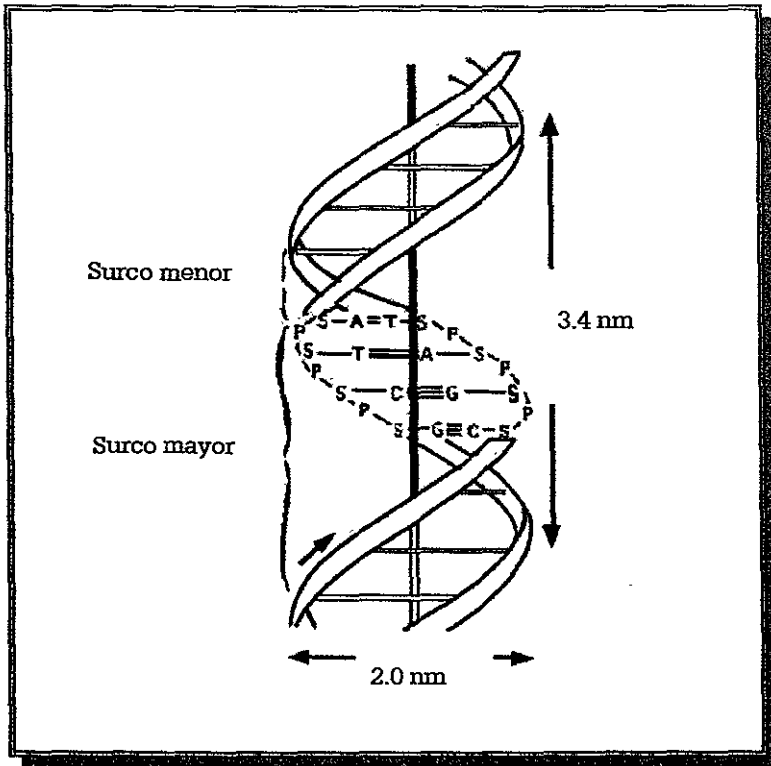
- a) Fármacos que se unen al surco mayor o menor, vía una interacción no-covalente llamados **entrecruzadores de surco** (cross-linkers).
- b) Fármacos que se intercalan entre los pares de bases.
- c) Fármacos que forman un enlace covalente con el ADN.

Las interacciones no covalentes por las cuales actúan las primeras dos vías pueden ser: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, y atracciones electrostáticas.

Para comprender mejor como se llevan a cabo estas interacciones recordemos que las moléculas del ADN adoptan una estructura de doble hélice que consiste en dos antiparalelos torcidos para las bases adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C) las cuales son soportadas sobre una columna de azúcar fosfatada.<sup>7</sup> El par de A con T y G con C ocurre vía la formación de puentes de hidrógeno. En las ranuras de la espiral, se forman dos huecos entre las dos cadenas de azúcares fosfatadas y son conocidos como el **surco mayor y surco menor** del ADN.

El surco mayor mide aproximadamente 24 Å de ancho, es frecuentemente usado para el control de proteínas así como promotores y represores porque recibe mayor contenido de información en la forma de grupos funcionales y de otros átomos expuestos a través de las paredes de las columnas de azúcar fosfatada.

A su vez, el surco menor mide aproximadamente 10 Å de ancho, y es preferido generalmente por las moléculas xenobióticas pequeñas, presumiblemente porque representa un sitio vulnerable a ataques, en una competencia con el material genético de los organismos. (FIG. 2)

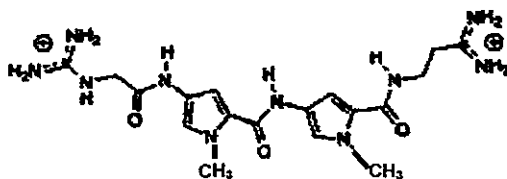


**FIG. 2.** Estructura helicoidal doble del ADN, donde se muestra el surco mayor y el surco menor que se forman, teniendo enlaces de adenina (A), con timina (T), citosina (C), con guanina (G). P se refiere a los fosfatos y S al azúcar.

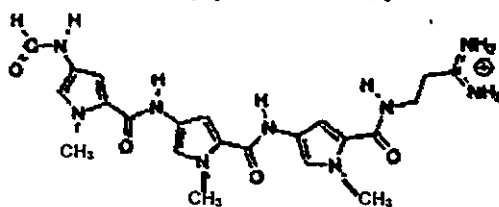
Las características químicas y biofísicas y las consecuencias bioquímicas y biológicas de los fármacos que interactúan con el ADN han sido evaluadas por varios métodos incluyendo cristalografía de rayos X, y análisis de RMN, entre otros.

Un ejemplo de moléculas que son entrecruzadores del surco menor son la *netropsina* y la *distamicina*, y éstas actúan gracias a su gran preferencia por las regiones ricas en A y T sobre las que contienen G y C. Se sabe que la primera se entrecruza en los segmentos que contienen 4 pares de bases consecutivos de AT, mientras que la *distamicina*, molécula más larga, cubre de 5 a 6 pares de AT continuas.<sup>8</sup> (FIG. 3)

Netropsina



Distamicina

**FIG. 3.** Fórmulas estructurales de dos entrecruzadores de surco

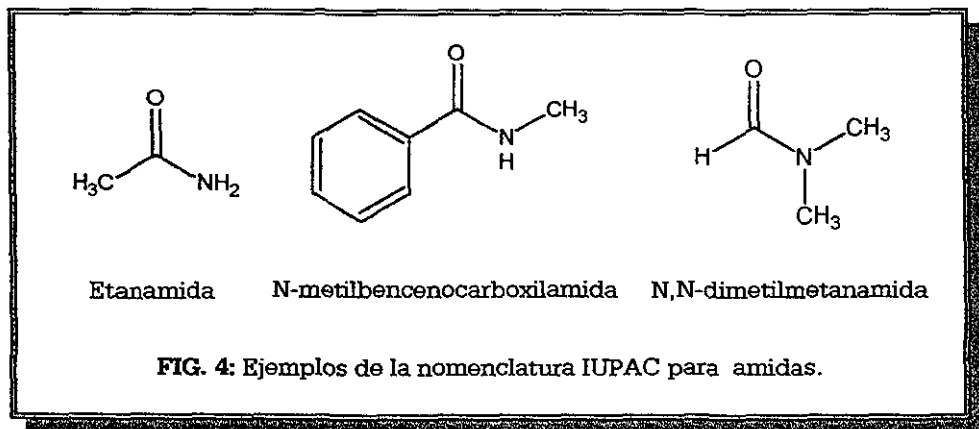
## 2.3 AMIDAS.

### 2.3.1 NOMENCLATURA DE AMIDAS:

Una amida es un compuesto que contiene un nitrógeno trivalente, unido a un grupo carbonilo. Las amidas se nombran, eliminando la palabra ácido (del que provienen) y cambiando la terminación **-oico** del ácido carboxílico por **-amida**.

Las amidas con sustituyentes alquílicos sobre el nitrógeno llevan sus nombres precedidos de N-alquilo, en donde N se refiere al átomo de nitrógeno.

(FIG. 4)



## 2.3.2. SÍNTESIS DE LAS AMIDAS

Los métodos más comunes para sintetizar amidas utilizan los derivados de ácidos carboxílicos y amoníaco o la amina apropiada.<sup>9</sup> (FIG. 5)

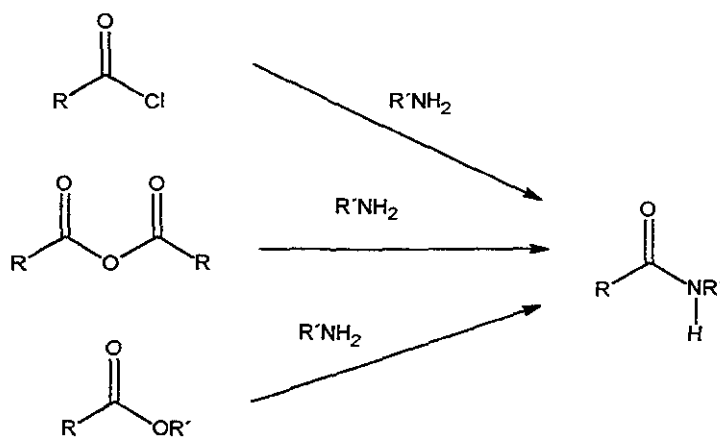
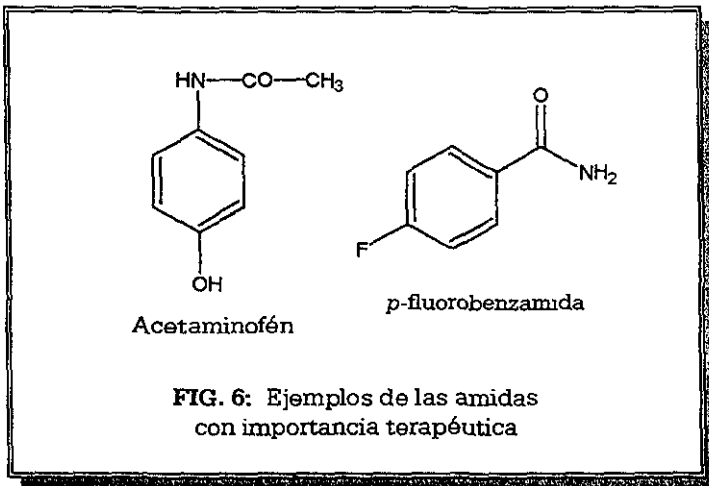


FIG. 5. Rutas de síntesis de amidas

### 2.3.3. IMPORTANCIA DE LAS AMIDAS:

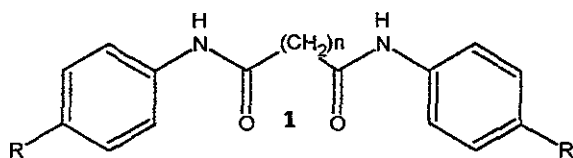
El grupo funcional amida forma parte de compuestos con una diversidad de usos:

- I. **POLIAMIDAS:** No hay duda que las más importantes son las *proteínas*.
- II. **POLIAMIDAS SINTÉTICAS:** El ejemplo más notable es el nailon 6.6 (porque se prepara a partir de un diácido y una diamina de 6 carbonos) del ácido adípico y hexametilendiamina.<sup>10</sup>
- III. **ESTABILIZADORES DE PLÁSTICOS:** Muy importante en la industria farmacéutica, etc.<sup>11</sup>
- IV. **ANTIBIÓTICOS**<sup>12</sup>
- V. **ANALGÉSICOS:** Los derivados del p-aminofenol (acetaminofén)<sup>12</sup> (FIG. 6)
- VI. **ANTHELMÍNTICOS:** Activos contra *Anglostoma ceylaricum* y *Hymenolepsis nana*<sup>13</sup>
- VII. **HERBICIDAS**<sup>14, 15</sup>

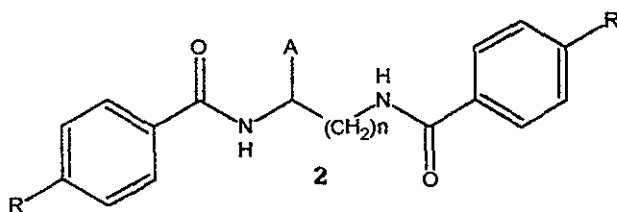


- VIII. CONTRA LA LEUCEMIA:** Como la *p*-fluorobenzamida. (FIG. 6) y la *p*-fluorofenilacetamida.<sup>16</sup>
- IX. PIGMENTOS:** Son tintas muy empleadas para las impresoras de inyección de tinta, con gran variedad de colores.<sup>17</sup>
- X. ENTRECruzadores DEL ADN:** Como algunas oligoamidas que interactúan de manera no covalente con el ADN.<sup>18</sup>
- XI. INHIBIDORES DEL VIH<sup>19</sup>** (Virus de Inmunodeficiencia Humana).

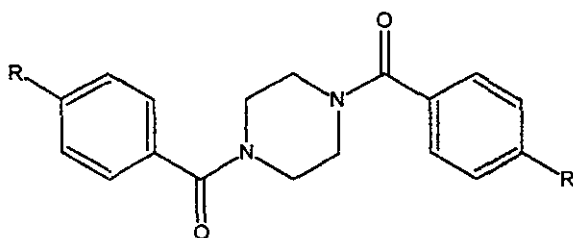
- La síntesis de las diamidas **1**, **2**, **3** y evaluación de su actividad citotóxica en 3 líneas celulares. (PC-3, U-251, K-562).



R= Br, Cl, I, F, Me, OMe,  
OH, H, CN      n= 2 y 4



R= Br, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>  
A= Me, H      n= 1, 3 y 6



**3**  
R= Br, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>



### 4.1. SÍNTESIS.

Para elegir el método más conveniente de síntesis de las distintas series de diarilalcanodiamidas, se llevó a cabo una investigación bibliográfica, con respecto a los métodos que fuesen más económicos, versátiles y con mejores rendimientos.

En la **TABLA A** se muestran las diferentes metodologías señaladas en la bibliografía para la obtención de diarilalcanodiamidas

Al analizar todas y cada una de las metodologías señaladas en dicha tabla se eligió realizar la primera<sup>20</sup>, porque las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción son sencillas y los rendimientos obtenidos elevados, pero se le hicieron algunas modificaciones:

- En lugar de emplear piridina como disolvente de la reacción se usó acetona, porque el producto no es soluble en ésta y precipita por lo que solo es necesario filtrar y verificar su pureza; además es mucho menos tóxica que la piridina, y más económica. La desventaja que pudiera tener el usar éste disolvente es que la piridina atrapa el cloruro que se libera en la reacción y se forma el clorhidrato de la piridina y no de la materia prima, elevando así el rendimiento, lo que no sucede al usar la acetona. Esto se evita al poner en agitación vigorosa la mezcla de reacción en agua (el mismo volumen que el usado de acetona) ya que de esta manera las posibles sales que se formaran se disuelven en el agua y solamente es necesario filtrar el sólido obtenido (producto)
- Se verificó que en las condiciones en las que se trabajó la técnica con acetona las reacciones finalizaban en promedio en 2 horas, un tiempo de reacción mucho menor al descrito.<sup>20</sup> (24 horas).
- Los rendimientos en ambas técnicas (con piridina y con acetona) fueron muy semejantes.

**TABLA A: Metodología de las síntesis más importantes de diamidas.**

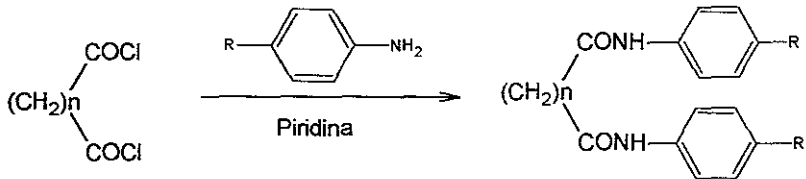
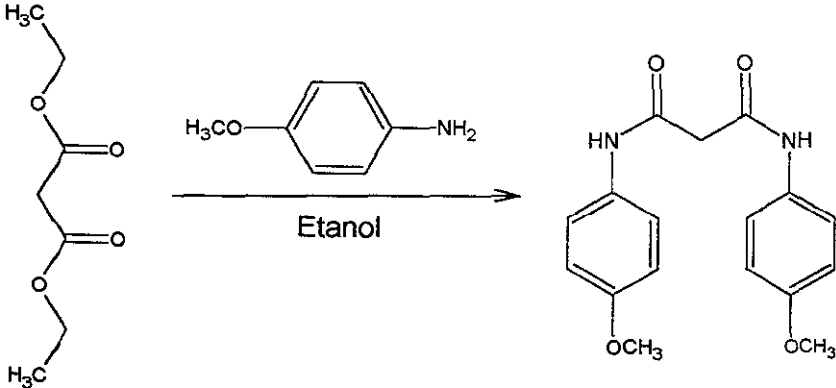
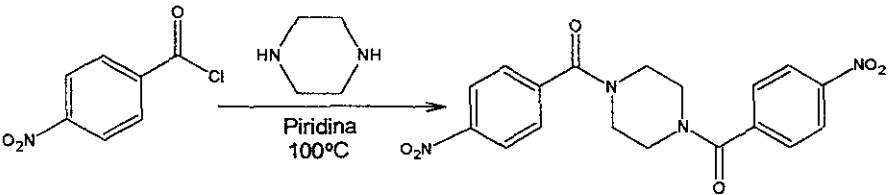
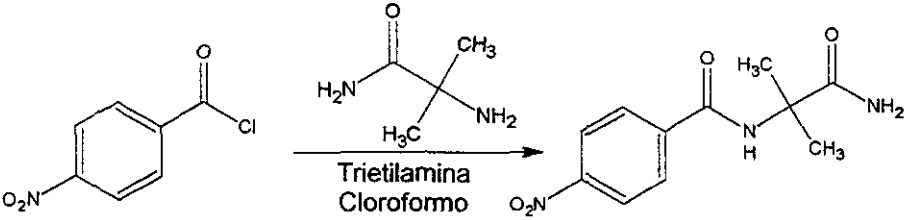
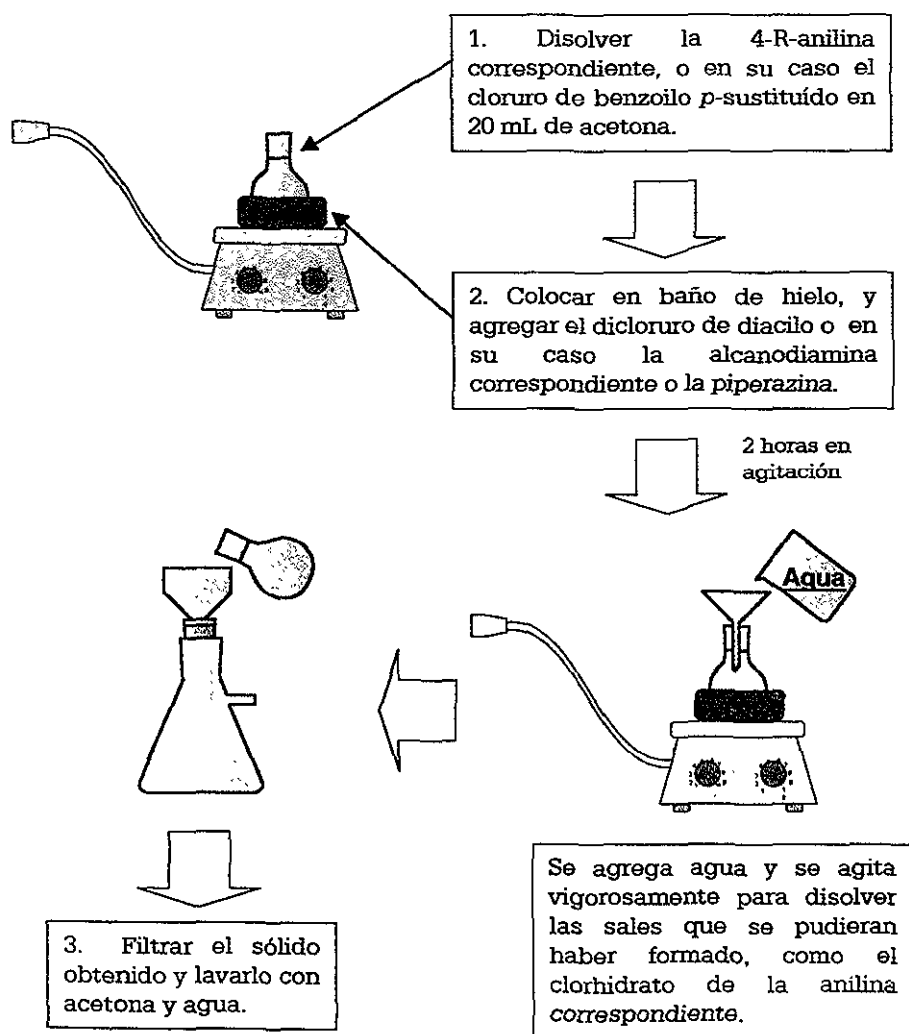
Metodología	Producto <small>referencia</small>
<p>Se agrega gota a gota cloruro de succinilo (0.016 mol) a una solución en agitación de la anilina apropiada (0.032 mol) en piridina (20 ml). La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente por 24 horas y después se añade a 100 mL de agua. El precipitado se filtra y recristaliza de etanol. (<b>Rendimiento &gt; 60%</b>)</p>	<p>N,N'- diarilbutanodiamidas (n=2,4,6,7)<sup>20</sup></p>
<b>Reacción</b>	
 <p style="text-align: center;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{COCl} \\   \\ (\text{CH}_2)_n \\   \\ \text{COCl} \end{array} + \text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \xrightarrow{\text{Piridina}} \begin{array}{c} \text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R} \\   \\ (\text{CH}_2)_n \\   \\ \text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R} \end{array}</math> </p>	
Metodología	Producto <small>referencia</small>
<p>Una mezcla malonato de dietilo (0.025 mol, 5.4 g) y p-anisidina (0.05 mol, 6.2 g) se agita a 160-170°C por 3 horas en etanol (1.3 g) . A la mezcla de reacción fría se le añade acetato de etilo (100 mL) y se agita por 45 minutos. El precipitado obtenido se filtra. (<b>Rendimiento = 75%</b>)</p>	<p>N,N'- di(4-metoxifenil)-malonamida<sup>21</sup></p>
<b>Reacción</b>	
 <p style="text-align: center;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} + \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \xrightarrow{\text{Etanol}} \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{HN}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O} \\   \qquad \qquad   \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3 \quad \text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3 \end{array}</math> </p>	

TABLA A: Metodología de las síntesis más importantes de diamidas.

Metodología	Producto <small>referencia</small>
<p>9.7 g de piperazina (0.05mol) se disuelve en 30 mL de piridina. A esta solución se agregan 18.6 g. (0.1 mol) de cloruro de <i>p</i>-nitrobenzoilo en 100 mL de piridina. Después de calentar la mezcla por una hora a 100°C, se vacía a un vaso con 700 mL de agua helada. Se filtra el sólido.</p> <p>(Rendimiento = no reportado)</p>	<p>1,4-dibencilpiperazina<sup>19</sup></p>
<b>Reacción</b>	
	
Metodología	Producto <small>referencia</small>
<p>Una solución del cloruro de benzoilo correspondiente (20 mmol) en 10 mL de cloroformo se trata con una solución de la aminoamida correspondiente (20 mmol) y trietilamina (20 mmol) en 35mL de cloroformo. Después de 1 hora de reacción, la mezcla se calienta a ebullición por 30 min, se enfría, y se extrae con agua (3 x 30 mL) y se seca con sulfato de sodio anhidro. Se evapora el disolvente y el precipitado se recristaliza de benceno.</p> <p>(Rendimiento = 60%)</p>	<p>2-Benzoil aminoamidas<sup>17</sup></p>
<b>Reacción</b>	
	

4.1.1. **DIAGRAMA DE FLUJO:**

## 4.2. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.

Las pruebas de citotoxicidad fueron realizadas por personal del laboratorio de pruebas de actividad biológica del Instituto de Química de la UNAM.

Para la determinación de la actividad citotóxica de las diamidas sintetizadas se realizó un ensayo colorimétrico que emplea un colorante que se une a las proteínas celulares: **Sulforhodamina B (SRB)** su fórmula se incluye en la Fig. 8, para medir el crecimiento y la viabilidad de las células.

La SRB se une a los aminoácidos básicos de las células, es de color rosa brillante, su estructura contiene dos grupos sulfónicos, su histoquímica es similar a la de otros pigmentos utilizados para el mismo fin: como el colorante de Coomassie azul brillante, el bromofenol azul, y el naftol amarillo S. Después de realizar varias pruebas se demostró que la SRB provoca una coloración más intensa, que su sensibilidad es comparable a la de los colorantes fluorescentes y superior a la de los pigmentos convencionales en el intervalo visible<sup>22</sup>.

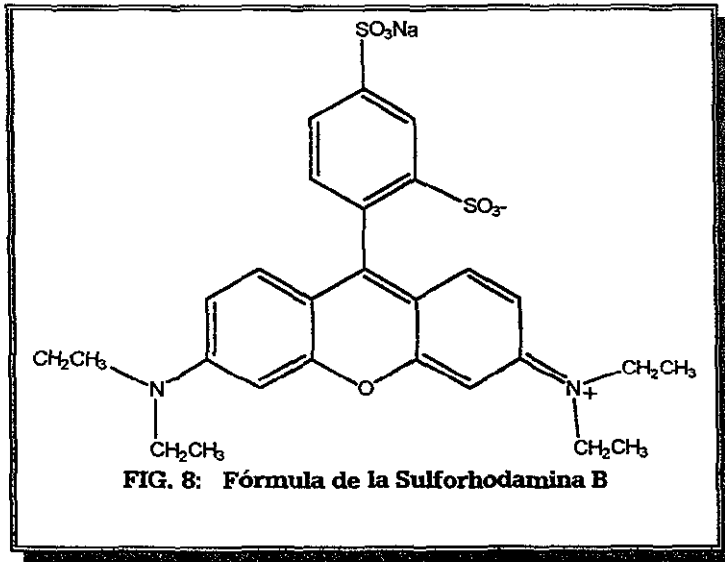
El desarrollo del color del SRB es rápido, estable y visible. Su densidad óptica puede ser medida en el rango de longitud de onda visible en espectrofotómetros o en lectores de platos de 96 pozos. (FIG. 7)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	D15	D14	D13	D12	D11	C8	C8	D21	D22	D23	D24	D25	B		
B						GC	GC							1	
C						GC	GC								2
D						GC	GC								
E						GC	GC							B	
F						GC	GC								B
G						GC	GC							B	
H	↓	↓	↓	↓	↓	C8	C8	↓	↓	↓	↓	↓			B

**FIG. 7:** Plato de 96 pozos usado para pruebas citotóxicas con 3 diferentes líneas celulares y 2 agentes de prueba (D1 y D2) cada uno inoculado en 5 concentraciones (D1<sub>1</sub>-D1<sub>5</sub> y D2<sub>1</sub>-D2<sub>5</sub>). G<sub>c</sub> es el control de crecimiento para obtener una curva dosis - respuesta por duplicado y 4 controles (solamente medio de crecimiento). B señala el Blanco sin células.

La SRB alcanza un punto final muy estable, que no es necesario medirlo dentro de un determinado periodo de tiempo, además de que las muestras teñidas con él pueden ser almacenadas indefinidamente *sin peligro de deterioro*.

Este método no es destructivo, es decir, no es necesario digerir las muestras.



#### 4.2.1: LÍNEAS CELULARES Y MEDIO DE CULTIVO:

Las líneas que se emplearon para determinar la actividad citotóxica de las amidas sintetizadas fueron:

- PC-3: Cáncer de próstata, proporcionada por el Centro Médico IMSS-México.
- U-251 Glioblastoma: Sistema Nervioso Central, proporcionadas por el National Cancer Institute (USA).
- K-562 CML: Leucemia, proporcionada por el Centro Médico IMSS-México.

#### 4. METODOLOGÍA

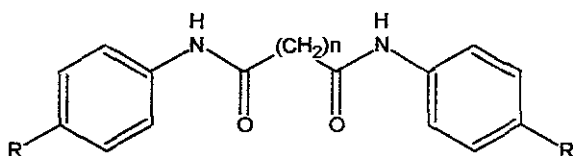
Todas fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEN sus siglas en inglés) enriquecido con 10% de suero inactivado de corazón fetal de bovino, 100 IU/mL de Penicilina G (Gibco), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B (Gibco), y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un estudio anterior, nuestro grupo sintetizó y evaluó la actividad citotóxica de los compuestos que se muestran en la **Tabla 1**. Los remarcados son los que presentaron actividad citotóxica elevada, pero de todos ellos sobresalen: el compuesto **1c** ( $n=4$ ,  $R=NO_2$ ), que presenta un porcentaje de inhibición del 81%, y que es selectivo ya que solo actuó en la línea PC-3; el compuestos **1f** ( $n=7$ ,  $R=NO_2$ ) con una inhibición celular del 82 %, y el compuesto **2a** ( $n=2$ ,  $R=NH_2$ ) con 67.4% de inhibición<sup>2</sup>.



**TABLA 1.** Porcentaje de inhibición del crecimiento celular a una concentración de 31 $\mu$ M.

Comp. No.	R	n	HeLa	Hep-2	PC-3	U251	K562
1a	NO <sub>2</sub>	2	5	0	0	0	+
1b	NO <sub>2</sub>	3	25	0	0	50	51
1c	NO <sub>2</sub>	4	8	0	81	0	+
1d	NO <sub>2</sub>	5	28	0.2	5	23	+
1e	NO <sub>2</sub>	6	9	0	2	20	+
1f	NO <sub>2</sub>	7	26	0	11	82	44
2a	NH <sub>2</sub>	2	0	0	17	15	67
2b	NH <sub>2</sub>	3	10	0	15	24	59
2c	NH <sub>2</sub>	4	2	0	5	24	52
2d	NH <sub>2</sub>	5	4	0	0	0	+
2e	NH <sub>2</sub>	6	5	0	21	21	54
2f	NH <sub>2</sub>	7	0	0	0	18	55

<sup>+</sup> La actividad no fue medida

  Compuestos que presentaron mayor actividad citotóxica

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Cabe mencionar que el criterio tomado en cuenta para que un compuesto sea considerado activo es que presente un porcentaje de inhibición del crecimiento celular mayor al 50% en la concentración manejada (31  $\mu\text{M}$ ).

Como se aprecia, las variables que se manejaron fueron el tamaño de la cadena alifática (n) y el sustituyente en la posición 4 del anillo aromático (amino o nitro), por lo que la información que pudieron aportar sobre los factores que intervienen en la actividad estuvo limitada a los mismos.

Las series de compuestos sintetizados en este trabajo se eligieron de acuerdo a lo anterior, de tal manera que pudieran dar una imagen representativa de los factores que intervienen en la actividad citotóxica que cada uno de ellos presenten.

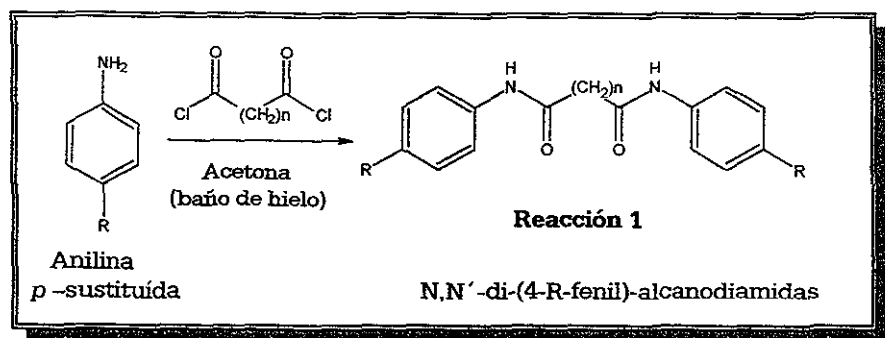
Los parámetros que se tomaron en cuenta para elegir las 3 series de los compuestos por sintetizar (indicados en las Tablas 2, 3 y 4 ) se describen a continuación:

- **Diferentes sustituyentes en la posición *para* del anillo bencénico:** lo cual ayudaría a determinar los factores estéricos y electrónicos que influyen en la actividad citotóxica. (Serie 1, 2, y 3)
- **Tamaño de la cadena:** el cual solo varió en 2 o 4 metilenos en la cadena alifática, ya que de acuerdo a los resultados señalados en la Tabla 1, este factor parece ser uno de los más importantes. (Serie 1 y 2)
- **Posición del carbonilo:** esto permitiría determinar si la actividad tiene que ver con la posición en la que se encuentra el grupo carbonilo de la amida. (Serie 2 y 3)
- **Cadena alifática no lineal:** lo que proporcionaría información acerca de la importancia de la linealidad de la cadena conectora de la diamidas. (Serie 2)
- **Rigidez de la cadena alifática:** lo que ayudaría a verificar si el factor conformacional es importante. (Serie 3)

## 5.1 SÍNTESIS.

Primera Serie:

La síntesis de las  $N,N'$ -di-(4-R-fenil)-alcanodiamidas (**1 - 21**) se realizó mediante la reacción de un cloruro de diacilo (1.0 eq) y una anilina *para*-sustituída (2.0 eq). (**Reacción 1**)

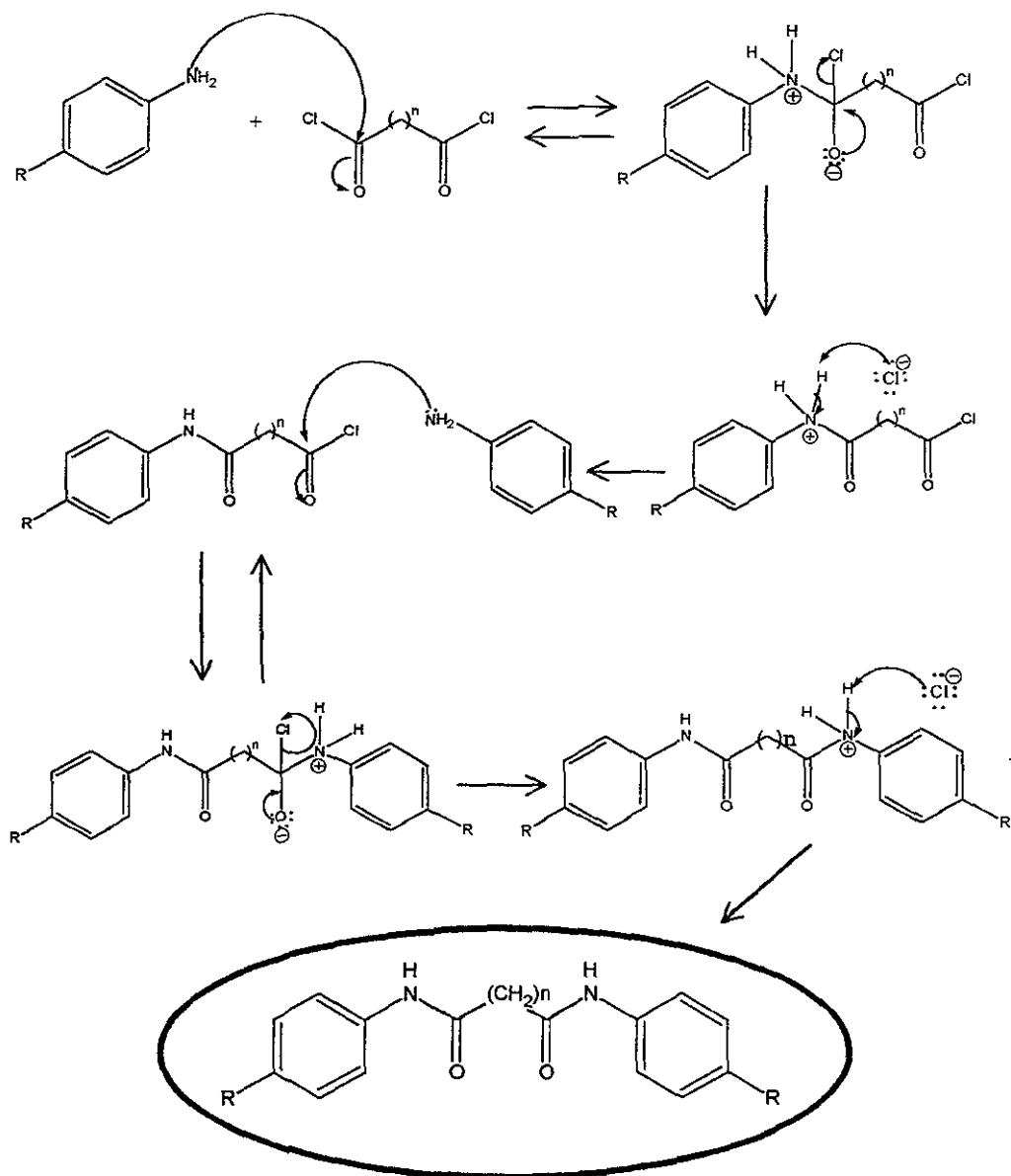


El rendimiento de esta reacción varió del 65 al 96%, dependiendo de la anilina *p*-sustituída que se haya empleado. (**Tabla 2**)

En la práctica se apreció que los tiempos de reacción para formar los compuestos varía. Los compuestos **5, 6, 7, 16, 17, y 18** ( $R = \text{Me, OMe, OH}$  y  $n = 2$  y  $4$ ), se formaron más rápido ya que conforme se adicionaba el cloruro de acilo, se observaba la formación de precipitado correspondiente al producto.

El mecanismo normal por el cual se lleva a cabo éste tipo de reacciones es de **adición - eliminación** sobre el grupo carbonilo. Al analizar el mecanismo de reacción (pág. 25), vemos que es comprensible porque con los sustituyentes antes mencionados, la reacción se llevó a cabo en un tiempo menor, ya que al tratarse de sustituyentes electrodonadores, ocasionan que su densidad electrónica se "deslocalice" (hacia el grupo amino de las anilinas correspondientes) y éste ataque al grupo carbonilo del cloruro de diacilo con mayor facilidad.

## 5.1.1 MECANISMO DE REACCIÓN.



Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Resonancia Magnética Nuclear de protón) se realizaron en  $\text{DMSO-d}_6$  (Dimetilsulfóxido hexadeuterado) y los espectros de IR (Infrarrojo) se realizaron en pastilla de KBr.

**Tabla 2: Propiedades físicas y rendimiento de la primera serie de N, N'-di-(4-R-fenil)-alcanodiamidas.**

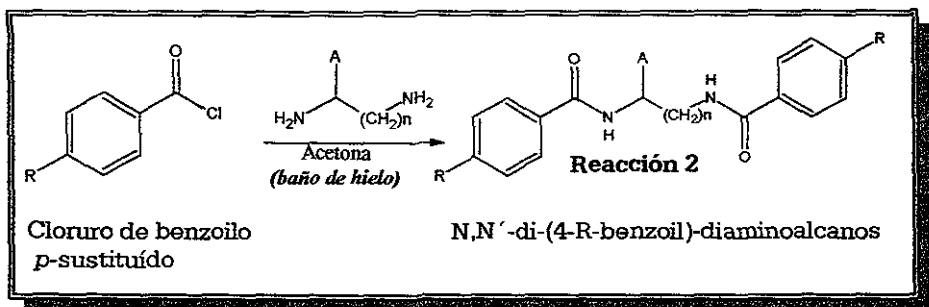
Compuesto Número	R	n	Rendi- miento (%)	Punto de fusión. (°C)	Punto de fusión (°C) <sup>referencia</sup>
1	F	2	65.0	243 - 245	244 - 245 <sup>20</sup>
2	Cl	2	65.0	287 - 290	288 - 290 <sup>20, 23</sup>
3	Br	2	69.0	281 - 282	281 - 282 <sup>20, 23, 24</sup>
4	I	2	85.0	246 - 248	
5	Me	2	87.0	274 - 275	273 - 275 <sup>20, 24</sup>
6	OMe	2	80.0	255 - 256	256 - 257 <sup>20</sup>
7	OH	2	92.0	273 - 274	275 - 276 <sup>12</sup>
8	H	2	83.0	231 - 232	231 - 233 <sup>20, 24</sup>
9	HNCOCH <sub>3</sub>	2	80.0	235 - 240 (*)	
10	CN	2	91.0	248 - 250 (*)	
11	Br	3	70.0	254 - 256	256 - 257 <sup>20</sup>
12	F	4	66.0	230 - 233	
13	Cl	4	75.0	255 - 256	258 - 259 <sup>20</sup>
14	Br	4	75.0	287 - 288	286 - 287 <sup>24</sup>
15	I	4	77.0	268 - 270 (*)	
16	Me	4	85.0	258 - 260	258 - 259 <sup>7, 20, 24</sup>
17	OMe	4	89.0	233 - 235	233 - 234 <sup>10, 20</sup>
18	OH	4	96.0	265 - 268 (*)	260 - 262 <sup>12, 26</sup>
19	H	4	95.0	244 - 245	247 - 248 <sup>20, 24</sup>
20	HNCOCH <sub>3</sub>	4	80.0	- 350	
21	CN	4	85.0	272 - 273	270 - 272 <sup>10</sup>

■ Compuestos nuevos

(\*) Temperatura de descomposición

**Segunda Serie:**

La preparación de la segunda serie de los  $N,N'$ -di-(4-R-benzoil)-diaminoalcanos (**22 - 28**) se llevó a cabo a través de la misma reacción de adición-eliminación, pero utilizando cloruro de benzoilo *para*-sustituído y las diaminas alifáticas correspondientes. (**Reacción 2**) En todos los casos se obtuvieron con rendimientos mayores al 75%. (**Tabla 3**).



En este caso para que la reacción se lleve a cabo más fácilmente es necesario que el sustituyente del anillo aromático sea electroattractor, para que el grupo carbonilo se encuentre más disponible al ataque del nucleófilo (grupo amino). Aunque éstas reacciones se obtuvieron con un rendimiento elevado, fueron más lentas que las de la serie anterior, en promedio 2 horas y media.

Al igual que las diamidas de la serie anterior, estos compuestos también fueron solubles en DMSO.

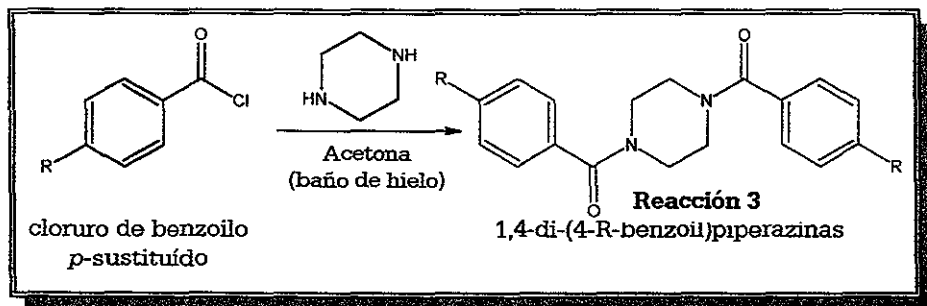
**TABLA 3.** Propiedades físicas y rendimiento de la segunda serie de  $N,N'$ -di-(4-R-benzoil)-diaminoalcanos

Compuesto Número	R	A	n	Rendimiento %	p.f. (°C)
22	Br	Me	1	75.0	268 - 270
23	Br	H	1	80.0	281 - 283
24	NO <sub>2</sub>	H	1	80.0	253 - 254
25	NH <sub>2</sub>	H	1	85.0	284 - 285
26	NO <sub>2</sub>	Me	1	75.0	235 - 237
27	NO <sub>2</sub>	H	3	79.0	270 - 272
28	NO <sub>2</sub>	H	6	82.0	148 - 150

■ Compuestos nuevos.

**Tercera Serie:**

Las 1,4-di-(4-R-benzoil)piperazinas (**29 y 30**) se obtuvieron al hacer reaccionar la piperazina con el cloruro de *p*-bromo y *p*-nitrobenzoilo. El rendimiento de estas reacciones fue 89 y 95% respectivamente. (**Reacción 3**)



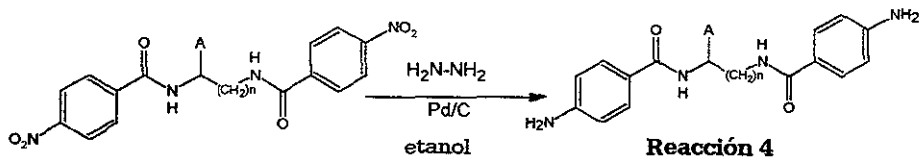
En este caso los compuestos resultaron ser más polares que todos los anteriores y difícilmente se podían disolver en DMSO, además de que son los que presentan un punto de fusión más elevado que el resto de las series sintetizadas (**Tabla 4**).

**TABLA 4.** Propiedades físicas y rendimiento de la tercera serie de 1,4-di (4-R-benzoil)piperazinas

Compuesto Número	R	Rendimiento (%)	Punto de fusión. (°C)	Punto de fusión (°C) <sup>referencia</sup>
<b>29</b>	Br	89.0	270-273	
<b>30</b>	NO <sub>2</sub>	95.0	> 300	318 - 320 <sup>26, 27</sup>
<b>31</b>	NH <sub>2</sub>	90.0	> 300	> 250 <sup>27</sup>

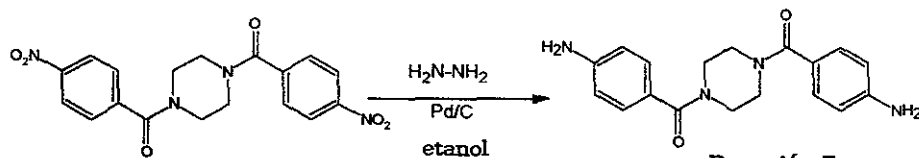
**■ Compuesto nuevo**

Para obtener los productos **25 y 31**, fue necesario realizar la reducción de las respectivas materias primas, es decir, de los compuestos **24 y 30**, empleando hidrazina y Pd/C (5%) como catalizador<sup>29</sup>. La reacción se lleva a cabo en reflujo en etanol por 2 horas. El rendimiento fue del 85 y 90%, respectivamente. (**Reacciones 4 y 5**)



**N,N'-di-(4-nitro-benzoyl)-  
diaminoalcanos**

**N,N'-di-(4-amino-benzoyl)-  
diaminoalcanos**



**1,4-di-(4-nitro-benzoyl)piperazina**

**1,4-di-(4-amino-benzoyl)piperazina**

Estas reacciones proceden también muy rápidamente, en este caso el paso en el que se tiene que ser más cuidadoso es la purificación del producto, ya que después del refluxo debe realizarse una filtración para separar el Pd/C y evitar la contaminación del sólido deseado. Pero dada la insolubilidad de las diamidas en el etanol, al filtrar no se separa el producto del Pd/C; por tal razón se optó por disolverlo en metanol caliente y rápidamente filtrarlo para así separarlo del catalizador.

Los datos espectroscópicos de IR, RMN de Hidrógeno y E. de Masas, de los compuestos nuevos se enlistan en la **Tabla 5**.



Tabla 5. Datos espectroscópicos

Compuesto No.	RMN <sup>1</sup> H δ (ppm)	IR ν(cm <sup>-1</sup> )	Masas M <sup>+</sup> (m/z)
4	2.62 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.41 (d, J=8.8 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.60 (d, J=8.8 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 10.09 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1652 (C=O) 3293 (N-H)	520
9	1.99 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.59 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.46 (s, 8H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 9.84 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> ), 9.91 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1657 (C=O) 3298 (N-H)	382
10	2.70 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.74 (s, 8H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 10.46 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1695 (C=O) 3338 (N-H) 2222 (C≡N)	318
12	1.60 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.30 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.10 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.57 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 9.94 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1652 (C=O) 3305 (N-H)	332
15	1.59 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.31 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.41 (d, J= 8.76 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.60 (d, J= 8.72 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 9.97 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1657 (C=O) 3292 (N-H)	548
20	1.59 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 1.99 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.28 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.46 (s, 8H, C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ), 9.80 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> ), 9.83 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1659 (C=O) 3298 (N-H)	410
22	1.15 (d, J= 6.64 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.35 (t, J=9Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.23 (m, 1H, CH), 7.64 (d, J=8.6 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.74 (d, J= 8.5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.76 (d, J= 8.5 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 8.34 (d, J= 8.2 Hz, 1H, NH <sub>amida</sub> ), 8.63 (t, J= 5.6 Hz, 1H, NH <sub>amida</sub> )	1637 (C=O) 3301 (N-H)	440

Tabla 5. Datos espectroscópicos

Compuesto No.	RMN <sup>1</sup> H δ (ppm)	IR ν(cm <sup>-1</sup> )	Masas M <sup>+</sup> (m/z)
23	1.33 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.65 (d, J= 8.5 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.77 (d, J= 8.5 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.67 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1633 (C=O) 3287 (N-H)	426
24	3.47 (d, J= 2.7 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.07 (d, J=8.8 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.30 (d, J= 8.9 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 9.00 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1640 (C=O) 3319 (N-H)	358
25	3.33 (d, J=7.2 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.58 (d, J= 3.18 Hz, 4H, NH <sub>2amino</sub> ), 6.51 (d, J= 8.5 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.54 (d, J= 8.5 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.12 (s, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1600 (C=O) 3333 (N-H) 3437 (NH) <sub>amino</sub>	298
26	1.20 (d, J= 6.7 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.45 (t, J= 6.32 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.30 (m, 1H, CH), 8.03 (d, J= 8.96 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 8.05 (d, J= 9.00 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 8.63 (d, J= 8.14 Hz, 1H, NH <sub>amida</sub> ), 8.92 (t, J= 5.66 Hz, 1H, NH <sub>amida</sub> )	1661 (C=O) 3318 (N-H)	372
27	1.58 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.77 (t, J= 6.7 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.06 (d, J= 8.8 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.29(d, J=8.9, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.84 (t, J= 5.3 Hz, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1637 (C=O) 3334 (N-H)	386
28	1.31 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 1.52 (t, J= 5.9 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.76 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ) 3.27 (q, J= 6.22 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 8.04 (d, J= 9.0 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.28 (d, J= 8.9 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 8.78 (t, J= 11.5 Hz, 2H, NH <sub>amida</sub> )	1647 (C=O) 3299 (N-H)	428
29	3.54 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 7.37 (d, J= 8.4, Hz, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.64 (d, J= 8.1 Hz, 4H, CH <sub>2</sub> )	1635 (C=O)	452

### 5.2 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.

Las líneas celulares utilizadas para medir la actividad citotóxica fueron:

**K-562** (Leucemia humano)

**PC-3** (Carcinoma prostático humano)

**U251** (Cél. Glia humano neoplásticas).

Se eligieron éstas, porque con ellas se obtuvieron los mejores resultados de actividad citotóxica de los derivados *p*-nitro y *p*-amino diarilalcanodiamidas (1a-2f), y de esta manera podríamos correlacionar tales resultados con los que se obtuvieran con los nuevos compuestos.

Pero sobre todo los resultados que más son de nuestro interés son los de la línea K-562 ya que fue en ella en la que los compuestos **2a** y **2c** ( $R=NH_2$ ,  $n=2$  y  $4$  respectivamente) manifestaron un mayor porcentaje de inhibición.

Antes de discutir los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad, cabe señalar que, primero se enviaron los compuestos **1, 3, 6, 7, 8, 12, 17, 18, 19, 22, 24, 25, 26, 30**. Considerando que con ellos se podía realizar un rastreo para determinar, en primera instancia, si los factores electrónicos intervienen en la actividad, eligiendo para ello alcanodiamidas con los sustituyentes F, Br, OMe, OH, H en el anillo bencénico y con 2 y 4 metilenos respectivamente. Como se aprecia en la **Tabla 6**, los compuestos con 4 metilenos en la cadena alifática, resultaron ser más activos, por ello se decidió que los siguientes a probar eran aquellos que contenían 4 metilenos en la cadena alifática.

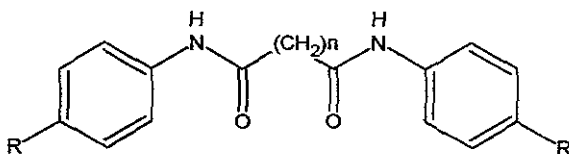


TABLE 6. Resultados de la prueba de citotoxicidad de las diarilcanodiamidas

Compuesto Número	R	N	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
			K562	PC-3	U251
2a	NH <sub>2</sub>	2	67.0	17.0	15.0
1a	NO <sub>2</sub>	2	∇	0	0
1	F	2	57.0	25.0	0
3	Br	2	40.0	6.0	0
5	OMe	2	22.0	13.0	10.0
7	OH	2	0	13.0	0
8	H	2	0	16.0	0
2b	NH <sub>2</sub>	3	60.0	15.0	24.0
11	Br	3	55.0	0	4.0
2c	NH <sub>2</sub>	4	52.0	5.0	24.0
1c	NO <sub>2</sub>	4	∇	81.0	0
12	F	4	96.0	10.0	39.0
13	Cl	4	13.0	0	0
14	Br	4	5.0	0	3.0
15	I	4	0	0	0
17	OMe	4	74.0	18.0	17.0
18	OH	4	80.0	34.0	4.0
19	H	4	24.0	18.0	0
20	HNCOCH <sub>3</sub>	4	0	0	0
21	CN	4	9.0	13.0	42.0

∇ = No se midió su actividad.

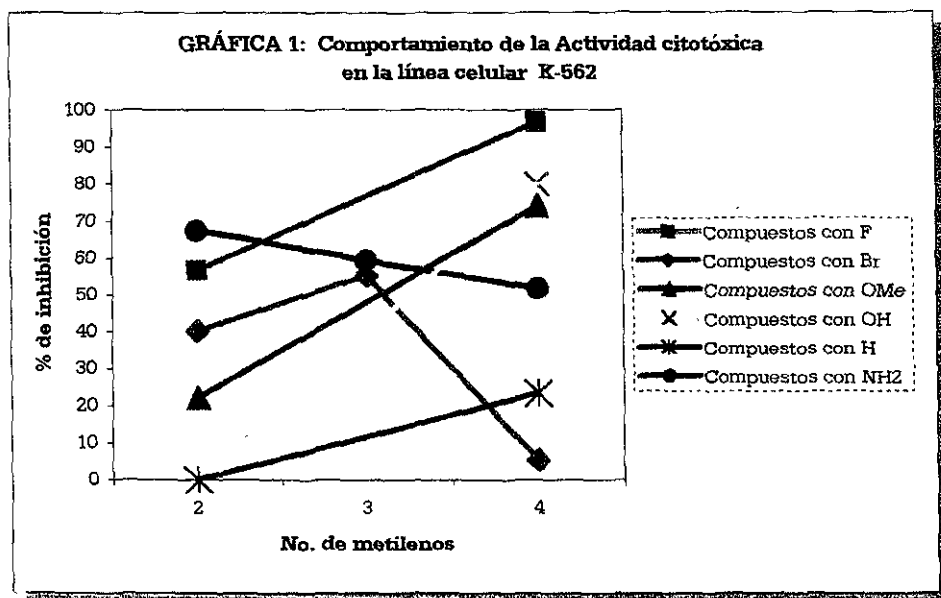
Los compuestos remarcados son los que presentan actividad citotóxica.

■ Compuestos que se evaluaron primero

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Analizando los resultados mostrados en la **Tabla 6** para la línea celular K-562, se aprecia que el compuesto más activo fue el **12** (R=F, n=4) el cual mostró una inhibición celular del 96%, sin embargo el compuesto **1** que contiene el mismo sustituyente, pero el tamaño de cadena es de 2 metilenos presentó una inhibición del 57%.

La **gráfica 1** nos permite tener una visión global del comportamiento de la actividad citotóxica, que mostró cada uno de los compuestos evaluados.



Estos resultados indican que aparentemente existe una tendencia entre el número de metilenos de la cadena alifática y la actividad citotóxica, sin embargo, al analizar los porcentajes de inhibición que presentaron las demás diamidas, descubrimos que para los compuestos **3**, **11** y **14** que contienen bromo como sustituyente en la posición 4 del anillo aromático, con cadenas alifáticas de 2, 3 y 4 metilenos respectivamente, no se observa la misma tendencia, ya que con 4 metilenos la actividad citotóxica es la menor de los tres; el compuesto más activo es el que contiene 3 metilenos, mientras que la actividad citotóxica para el que tiene 2 metilenos es intermedia.

En la gráfica también se puede analizar la influencia del sustituyente en la posición para del anillo aromático sobre el valor de la inhibición celular. Los compuestos que contienen 2 metilenos en la cadena alifática no presentaron la misma actividad citotóxica, por el contrario, se aprecia que el compuesto **2a** (R = NH<sub>2</sub>) fue el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición, seguido por el compuesto **1**. Los compuestos **3**, **6**, **7** y **8** (R = Br, OMe, OH, H), (enlistados en orden descendente con respecto al valor de inhibición celular mostrado), no son considerados activos.

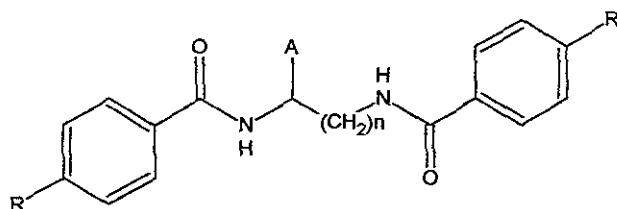
Con respecto a los compuestos que poseen 3 metilenos en la cadena alifática, solo se cuenta con la información de 2 sustituyentes del anillo bencénico, amino y bromo (**2b** y **11**), y la actividad citotóxica mostrada por ambos fue muy similar (59 y 55% respectivamente).

Por último, al analizar los resultados que presentaron los compuestos con 4 metilenos en la cadena alifática, se aprecia que los tuvieron un porcentaje mayor al 50% en orden ascendente fueron los compuestos **2c**, **17**, **18** y **12** (NH<sub>2</sub>, OMe, OH y F) teniendo este último un valor de 96% de inhibición celular, quedando los compuestos **14** y **19** que no presentaron actividad citotóxica.

Un aspecto a resaltar es la SELECTIVIDAD que tienen estos compuestos (**1-21**) en el grupo de líneas celulares probadas, al actuar solamente sobre una línea celular K-562 (Leucemia), ya que si revisamos cuidadosamente los resultados de la **Tabla 6**, ellos nos indican que ninguno de los compuestos fue activo en las otras dos líneas celulares (PC-3 y U-251).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de la segunda serie de diamidas, donde la posición del carbonilo de la amida se modificó, se trataba de evaluar el papel que pudiese jugar dicha posición con respecto a la actividad citotóxica. (Tabla 7)



**TABLA 7.** Resultados de la prueba de citotoxicidad de la Segunda serie de diamidas

Compuesto Número	R	A	n	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
				K562	PC-3	U251
22	Br	Me	1	83.0	72.0	100.0
23	Br	H	1	0	0	5.0
24	NO <sub>2</sub>	F	1	0	8.0	0
25	NH <sub>2</sub>	H	1	0	3.0	0
26	NO <sub>2</sub>	Me	1	0	26.0	0

Los compuestos remarcados son los que presentan actividad citotóxica.

Los compuestos que se probaron inicialmente fueron el 22, 24, 25 y 26. De ellos, solo el compuesto 22, que posee un solo grupo metileno y un metilo en la cadena alifática y como sustituyente bromo en la posición para del anillo bencénico, demostró tener una importante actividad citotóxica en las tres líneas celulares (por arriba del 70%), ya que los demás no poseen actividad citotóxica en ninguna de las líneas. Esto quiere decir que el compuestos 22 no es selectivo, pero su actividad es muy elevada, por lo que debe trabajarse posteriormente en ella para tratar de encontrar la razón por la cual es tan activa. Además ha sido de los pocos compuestos activos en la línea PC-3 y el único activo en la línea U-251.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al darnos cuenta de la actividad mostrada por el compuesto **22**, optamos por mandar a las pruebas citotóxicas el compuesto **23**, cuya diferencia es que no tiene el metilo de la cadena alifática, pero éste compuesto no presentó actividad citotóxica para ninguna de las tres líneas celulares.

Otro compuesto que permite comparar la actividad citotóxica del compuesto **22** es el **26**, donde la diferencia es el grupo nitro en la posición 4 del anillo bencénico en lugar de bromo, sin embargo, éste tampoco fue activo, lo que muestra que es necesario realizar estudios con más sustituyentes en la posición para del anillo aromático, manteniendo el metilo en la cadena alifática, para tratar de ver si existe una correlación adecuada, ya que aparentemente el metilo presente en la cadena alifática tiene importancia en la actividad citotóxica de la diamida.

Pero, la principal razón por la que se sintetizó esta serie de diamidas era, comparar la actividad que presentaban los compuestos **3** con **23**; **1a** con **24**; y **2a** con **25**, pero después de analizar los resultados obtenidos (**Tabla 8**) se observó que ésta segunda serie de diamidas no presentó mejor actividad que la primera, es decir, la posición en la que se encuentra el grupo carbonilo de la amida influye en la actividad citotóxica que poseen.

**TABLA 8. Resultados comparativos de la actividad citotóxica**

Compuesto Número	R	n	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
			K562	PC-3	U251
<b>1a</b>	NO <sub>2</sub>	2	∇	0	0
<b>24</b>	NO <sub>2</sub>	2	0	8.0	0
<b>2a</b>	NH <sub>2</sub>	2	<b>67.0</b>	17.0	15.0
<b>25</b>	NH <sub>2</sub>	2	0	3.0	0
<b>3</b>	Br	2	40.0	6.0	0
<b>23</b>	Br	2	0	0	4.0

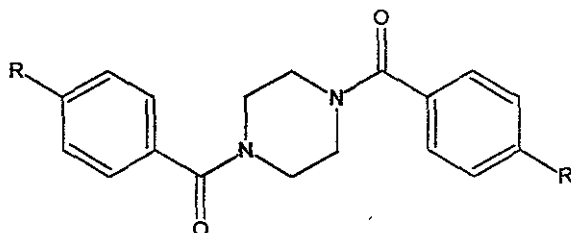
∇ = No se midió su actividad.

El compuesto remarcado es el que presenta actividad citotóxica.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la última serie de diamidas sintetizadas, los resultados que se obtuvieron con los compuestos **29** y **30**, nos dieron información importante, porque a pesar de que la distancia entre los nitrógenos del anillo de la piperazina, es casi la misma que la de los nitrógenos de las diamidas con 2 metilenos, ninguno de los dos compuestos fue activo, por lo que parece que el tipo de enlace entre las amidas es fundamental para que estos compuestos presenten actividad citotóxica. (Tabla 9)



**TABLA 9. Resultados de la prueba de citotoxicidad de las 1,4-di (4-R-benzoyl)piperazinas**

Compuesto Número	R	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN		
		K652	PC-3	U251
29	Br	0	0	5.4
30	NO <sub>2</sub>	0	3.9	0

También se comparó el compuesto **29** con el **22** de la serie anterior, ya que a pesar de que el primero presenta bromo como sustituyente en la posición para del anillo benzénico, no fue nada activo como lo fue el compuesto **22**, lo que refuerza la suposición atribuida a la importancia del tipo de enlace entre las dos amidas .

- Se sintetizaron tres series distintas de diamidas (31 compuestos), siguiendo las modificaciones propuestas y empleando una metodología que permite obtener rendimientos elevados en un tiempo corto (aproximadamente 2 horas).
- La actividad citotóxica de 22 de los 31 compuestos sintetizados fue evaluada en 3 líneas celulares. La mayor actividad citotóxica se presentó en la línea K-562 (Leucemia).
- El compuesto de la primera serie de diamidas sintetizadas que presentó la mayor actividad citotóxica fue el compuesto **12** (R=F, n=4) con 96% de inhibición citotóxica para la línea celular K-562.
- En el caso de la segunda serie de diamidas, el compuesto **22** (R=Br, A=Me, n=1), tuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento celular mayor del 70% para las tres líneas celulares probadas.
- Los compuestos probados de la tercera serie de diamidas no presentaron actividad citotóxica.

## 7.1 EQUIPOS EMPLEADOS.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato *Melt-temp II* y los resultados se reportan en °C sin corregirlos.

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro *Nicolet FT Magna-IR 750* empleando la técnica de pastilla de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) se obtuvieron en los equipos *Varian Gemini 200*, el desplazamiento químico está expresado en partes por millón (ppm), utilizando el parámetro  $\delta$  y están referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, los espectros se realizaron utilizando DMSO deuterado como disolvente.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas Jeol JMS - AX505HA de doble enfoque, empleándose la técnica de impacto electrónico (EIMS).

El avance de las reacciones se verificó por cromatografía en capa fina analítica de gel de sílice F-254 tipo 60 Merck, usando como revelador: luz ultravioleta, cámara de yodo y sulfato cérico.

## 7.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS.

### *Obtención de las N,N'-di-(4-R-fenil)-alcanodiamidas (1 - 21).*

En un matraz bola de 250 mL se disuelve 1.0 g (1.44 mmol) de las 4-R-anilinas (R=Br, F, Cl, I, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OH, H, CH<sub>2</sub>CONH, CN) en 20 ml de acetona. A continuación se coloca el matraz en un baño de hielo, y posteriormente se agrega el dicloruro de diacilo correspondiente (0.72 mmol): para n=2 (1 - 10) el cloruro de succinilo, para n= 4 (12 - 21) el cloruro de adipilo.

La mezcla de reacción resultante se mantiene en agitación constante y vigorosa, obteniéndose un precipitado a los pocos minutos.

Terminada la reacción (60 - 120 min), se agrega 20 mL agua al matraz y se deja en agitación vigorosa y constante por 30 minutos; se filtra el sólido y se lava con acetona y agua.

En la **Tabla 2** (pág.33) se enlista el rendimiento y punto de fusión de cada uno de estos compuestos.

### *Obtención de los N,N'-di-(4-R-benzoil)-diaminoalcanos (22 - 28).*

En un matraz bola de 250 mL se disuelve 1.0 g del cloruro de p-bromo o p-nitrobenzoilo (2.0 eq) en acetona. El matraz se enfría en un baño de hielo y posteriormente se añade la alcanodiamina correspondiente (1.0 eq): para n=2 (**23** y **24**) etilendiamina, para n=4 (**27**) 1,4-diaminobutano, para n=7 1,7-diaminoheptano (**28**) y 1,2-diaminopropano para **22** y **26**.

La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante y vigorosa, obteniéndose un precipitado. Transcurridos 120 a 180 min, se añade agua y la solución se mantiene en agitación vigorosa y posteriormente se filtra el sólido y se lava con acetona y agua.

En la **Tabla 3** (pág. 34) se enlista el punto de fusión y el rendimiento de cada uno de estos compuestos.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

***Obtención del N,N'-di-(4-amino-benzoil)-diaminoalcano y de la 1,4-di-(4-amino-benzoil)piperazina (25 y 31).***

En un matraz bola de 100 mL de una boca se coloca la N,N'-di-(4-nitro-fenil)-alcanodiamida (24), se disuelve en etanol (10mL), se añade la hidrazina (25.9 mmol) y el Pd/C 5% (0.046g) como catalizador y agua (1mL) y se mantiene la reacción en reflujo.

El avance de la reacción se comprueba mediante cromatografía en capa fina, hasta la desaparición de la materia prima. Se quita el reflujo y la mezcla de reacción se filtra en caliente, quedando el sólido formado junto con el catalizador, finalmente se disuelve el precipitado en metanol caliente y se vuelve a filtrar.

En las **Tablas 3 y 4** (págs. 34 y 35) se enlistan el rendimiento y punto de fusión de cada uno de estos compuestos.

***Obtención de 1,4-di (4-R-benzoil)piperazinas (29 y 30)***

En un matraz bola de 250 mL se disuelve 1.0 g del cloruro de para-nitro o para-bromo benzoilo (2.0 eq) en acetona, se coloca el matraz en un baño de hielo (0°C) y posteriormente se añade la piperazina (1.0 eq)

La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante y vigorosa, obteniéndose un precipitado a los pocos minutos de reacción.

Al transcurrir 2 horas, se agrega agua y se mantiene en agitación constante la solución aproximadamente por 30 minutos; se filtra el sólido obtenido, y se lava con acetona y agua. Se toma el punto de fusión.

En la **Tabla 4** (pág. 34) se describe el rendimiento y punto de fusión de estos dos compuestos.

### 7.3. Ensayo de citotoxicidad:

La citotoxicidad de las células tumorales después de su tratamiento con los compuestos a probar fue determinada empleando el colorante Sulforodamina B (SRB) en microcultivo para medir el crecimiento y la viabilidad de las células<sup>28</sup>.

Se prepararon soluciones concentradas 100 veces (20mM) de los compuestos por probar en DMSO (la pequeña cantidad de DMSO presente en los pozos (máximo 5%) no afecta los resultados) y se diluyeron con 100 mL con medio, se agregaron 100  $\mu$ L a los pozos, quedando una concentración final de 31  $\mu$ M. Se prueban por triplicado, se usa doxorubicina (sigma) como control positivo.

Las células se cosechan de las botellas de cultivo agregando tripsina diluida con medio fresco, se toman 100  $\mu$ L de la suspensión de células que contiene 7500 células y se depositan en un plato de 96 pozos y se incuban por 24 horas a 37°C y una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se agregan 100  $\mu$ L de la solución de los compuestos a probar en cada pozo. Los cultivos se exponen por 48 horas a los compuestos a la concentración de 0.031  $\mu$ g/mL.

Posteriormente del periodo de incubación, las células se fijan adicionando 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 50% frío. Los platos se incuban a 4°C por 1 hora y se lavan con agua 4 veces y se seca con aire. Las células fijas se tiñeron con una solución de SRB al 0.4% disuelto en ácido acético al 1% por 30 minutos, el SRB se remueve lavando con la misma solución de ácido acético por 4 veces.

Los platos se secan con aire, el colorante que se unió a las proteínas se disuelve al añadir un buffer de Tris (10 mM) pH = 10. Los platos se someten a agitación por 5 minutos y se determina la absorción a una longitud de onda de 515nm usando un lector de platos.

En cada caso el control se realizó al adicionar un número equivalente de células en varios pozos e incubarlos a 37°C por un periodo de 24 horas, las células se fijaron con TCA, y se sigue todo el procedimiento antes mencionado.

Finalmente, los valores de absorción son promediados y al valor promedio debe restarse el valor del Control. Este valor debe después expresarse en porcentaje, relacionado con la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) que es la concentración a la cual el compuesto probado ocasiona el 50% de la inhibición del crecimiento de las células tumorales.

1. Martínez, R., Cogordan, J.A., Mancera, C., Díaz, L., *II Farmaco*, (2000), **55**, 631-636
2. Martínez, R., Chacón-García, L., (aceptado por *Eur. J. Med. Chem.*)
3. <http://www.inegi.gob.mx/población/espanol/fpoblacion.html>
4. Murray, R. K., Granner, P. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., *Bioquímica de Harper*, 12ª Edición, Editorial Manual Moderno, México D.F. (1992), págs. 661-674.
5. Goyns, M., *Drugs of the Future* (1995), **20**, 601-608.
6. Propst, C.L., Perun, T.J., *Nucleic Acid Targeted Drug Design*, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, (1992).
7. Lown, J.W., *Drug Development Research*, (1993), **34**, 145-183.
8. Bhattacharya, S., Thomas, M., *Tetrahedron Lett.*, (2000), **41**, 5571-5575
9. Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., *Química Orgánica*, Segunda Edición, Editorial Grupo Editorial Iberoamérica, México, D.F. (1983), pág. 647.
10. Brisson, J., Gagné, J., Brisse, F., *Can. J. Chem.* (1989), **67**, 840-849.
11. Duennenberger, M., Biland, H. R., Ciba-Geigy, U.S. 3,906,033 (1975); *Chem. Abstr.*, (1976), **84**, 4633r
12. Takahashi, H., Nobuhara, A., Kimura, H., *Yakugaku Kenkyu*, (1965), **36** (5), 149-162; *Chem. Abstr.*, **1966**, 65, 2875f.
13. Abuzar, S., Satyavan, S., *Indian J. Chem. Sect. B.*, (1984), **23 B**, 73-76.
14. Sedlak, M., Halama, A., *Collect Czech. Chem. Commun.*, (1995), **60**, 150-160.
15. Moser, H., Ciba-Geigy, S. African 74,02,164, (1975); *Chem. Abstr.*, (1976), **84**, 4635t.
16. Jordin, M. W., Easterly, W. D., Hubbard, W.C., *J. Pharm. Sci.*, (1965), **54**, 1190-1193.
17. Colberg, H., Hahn, E., Ger. Offen. DE 3,536,196 (1987); *Chem. Abstr.*, (1987), **107**, 79476u.



18. Arya, D. P., Devlin, T. A., Jebaratnam, D., Warner, P., U.S. 5770,736; *Chem. Abstr.*, (1998), **129**, 81585b.
19. Serradji, N., Bensaid, O., *J. Med. Chem.*, (2000), **43**, 2149-2154.
20. Kubicova, L., Waisser, K., Kunes, J., Kralova, K., Odlerova, Z., Slosarek, M., Janota, J., Svoboda, Z., *Molecules*, (2000), **5**, 714-726.
21. Vennerstrom, J.L., Holmes, T. J., *J Med. Chem.*, (1987), **30**, 434-437.
22. Skehan, P., Storeng. R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., *J. Nat. Cancer Inst.*, (1990), **82**, 1107-1112.
23. Sanna, A., Repetto, G., *Gazz. Chim. Ital.*, (1927), **57**, 777-780
24. Richmond B. C., *J. Chem. Soc.*, (1927), 2923-2929.
25. Michio, N., Atsushi, T., JAPAN 70,37,009 (1970); *Chem. Abstr.*, (1970), **74**, 64086t
26. Stebemann, C., Schnitzer, J., *J. Am. Chem. Soc.*, (1943), 2126-2128.
27. Liyuan, Q., Haoyin, X., *Chem. Abstr.*, (1990), **113**, 191394r
28. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., *J. Nat. Cancer Inst.*, (1991), **83**, 757-765.
29. Avila Zárraga, J. G., Tesis Doctoral, "Síntesis de Terpenos policíclicos", Facultad de Química, UNAM. (2000) pág 137.