



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA**

**“EVALUACIÓN CITOTÓXICA SOBRE ALGUNAS LÍNEAS CELULARES
CANCEROSAS DE VARIAS HIDRAZONAS NITRADAS DERIVADAS DEL
FURANOCARBALDEHIDO”**

**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICA**

PRESENTA:

FREDY RAMÍREZ LÓPEZ

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. BLANCA MARTHA CABRERA
VIVAS**

**DR. JUAN CARLOS RAMÍREZ
GARCÍA**

ASESOR DE TESIS:

**DRA. CAROLINA BARRIENTOS
SALCEDO**

ÍNDICE

➤ ABREVIATURAS.....	2
➤ RESUMEN.....	4
➤ OBJETIVOS.....	5
➤ INTRODUCCIÓN.....	6
✓ PARTE EXPERIMENTAL.....	21
✓ Desarrollo experimental.....	22
➤ CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	26
✓ Caracterización por espectroscopia UV-visible.....	27
✓ Caracterización por espectroscopia IR.....	29
✓ Caracterización por RMN ¹ H	31
✓ Caracterización por RMN ¹³	39
✓ Caracterización por Difracción de rayos X.....	42
✓ Caracterización por espectrometría de masas.....	44
➤ EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD.....	46
✓ Preparación de soluciones.....	47
✓ Separación de células.....	48
✓ Inicio de cultivos.....	50
✓ Conteo de células.....	51
✓ Tratamiento.....	54
➤ DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
➤ CONCLUSIONES.....	63
➤ GLOSARIO.....	64
➤ BIBLIOGRAFÍA.....	65

ABREVIATURAS

δ : desplazamiento

$^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius

IE: Impacto Electrónico

IR: Infrarrojo

J: Constante de acoplamiento

m: Múltiple

ppm: Partes por millón

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMN ^1H : Resonancia Magnética Nuclear de ^1H

RMN ^{13}C : Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C

s: simple

d: Doble

t: triple

dd: Doble de dobles

td: triple dobleteada

UV: Ultravioleta

p.f: punto de fusión

La síntesis de los compuestos que se plantean en este trabajo fue realizada en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Química Orgánica Edificio 105 D.

Las pruebas de evaluación citotóxica se realizaron durante una estancia en la Universidad Veracruzana, en la Facultad de Bioanálisis.

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la síntesis de tres tipos de hidrazonas en particular, las que se obtuvieron a partir del 5-(4-nitrofenil)furan-2-carbaldehído (reactivo constante en las tres síntesis) y difenilhidracina, fenilhidracina e hidracina respectivamente.

Como disolvente se utilizó etanol, todo esto bajo las condiciones preestablecidas por el grupo de trabajo y apoyados en la literatura.

Los compuestos se analizaron por diferentes técnicas de caracterización como: espectroscopia infrarroja, espectroscopia UV-VIS, espectrometría de masas, RMN¹H, RMN¹³C y rayos X.

A-24

B-24

D-24

Figura 1. Estructura general de los compuestos sintetizados.

Dichos compuestos fueron sometidos a evaluación citotóxica en la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana, para observar su comportamiento y su posterior uso en células cancerosas.

OBJETIVOS

- Síntesis de los compuestos A-24, B-24 y D-24.
- Aplicar los principios de la química verde.
- Caracterización de los productos sintetizados.
- Observar el comportamiento de las tres hidrazonas en contacto con células humanas (linfocitos) para la evaluación de su citotoxicidad.
- Evaluar la citotoxicidad de los tres compuestos A-24, B-24 y D-24 en líneas celulares cancerosas.

INTRODUCCIÓN

Las hidrazonas tienen una gran variedad de usos, ya sea en el desarrollo de fármacos, productos químicos, etc., todo esto es posible debido a la estructura que poseen.

Existe una variedad muy grande de hidrazonas dependiendo de las materias primas con las que se preparan, pero en general la mayoría de estas presentan colores muy marcados, además de p.f. muy característicos entre otras cosas. Todas las hidrazonas, aunque pertenecen a un mismo tipo de grupo funcional, cambios en la estructura de la materia prima, hacen que adquieran características distintas los productos y por consiguiente tengan distintos usos y aplicaciones.

En el sector industrial son utilizadas como iniciadores de procesos de polimerización y como agentes plastificantes. En el área biológica, algunas hidrazonas son utilizadas como especies coordinantes de hierro con el objetivo de ser usadas como auxiliares en el tratamiento contra el cáncer. El principal uso que se le da a las hidrazonas en el área de química orgánica es el utilizarlas como identificador de compuestos de tipo carbonílico, debido a las características propias de las hidrazonas de ser coloreadas, formar precipitados y en ocasiones cristales. Las hidrazonas se obtienen a partir de hidracina y derivados, los cuales se condensan con los

compuestos carbonílicos bajo influencia de catalizadores ácidos (intervalo de pH= 4-5), eliminándose como subproducto agua. Estos son compuestos generalmente sólidos y algunas veces cristalinos.¹

Las hidrazonas provenientes de aldehídos, son la mayoría de las veces, más fáciles de reaccionar ya que solo se necesita una agitación continua a temperatura ambiente, mientras que en el caso de las hidrazonas provenientes de cetonas se recurre al calentamiento o a una reacción catalizada por un medio ácido. Esta modificación en las condiciones de reacción, se debe al grado de reactividad del grupo carbonilo, ya que los aldehídos tienen una reactividad mayor que el de las cetonas.

La naturaleza del aldehído presente en la obtención de hidrazonas juega un papel decisivo en las características de las mismas, por ejemplo la mayor parte de las hidrazonas derivadas de aldehídos aromáticos no muestran propiedades básicas, al contrario de estas hidrazonas de aldehídos alifáticos si presentan propiedades básicas.

Mecanismo de obtención de hidrazonas

En la figura 2 se ilustra el mecanismo de adición nucleofílica de hidracina para dar como producto la hidrazona.

Esquema 1. Mecanismo de reacción de obtención de hidrazonas.

El mecanismo ilustra la protonación del grupo carbonilo formando el ácido conjugado. La polaridad del carbono carbonilo favorece el ataque de la hidracina para formar el intermediario 1.

Este último intercambia un protón entre el nitrógeno de carga positiva y el oxígeno del alcohol, transformando el grupo hidroxilo en un buen grupo saliente.²

Estos compuestos contienen el enlace C = N, que se conjuga con un par solitario de electrones del átomo de nitrógeno funcional.³ Los átomos de nitrógeno de los hidrazonas son nucleófilicos y el átomo de carbono tiene naturaleza electrofílica.⁴ El α -hidrógeno de las hidrazonas es más ácido que de cetonas ácidas.⁵ La combinación de hidrazonas con otro grupo funcional conduce a compuestos con carácter físico y químico único.⁶ Debido a sus propiedades biológicas y farmacológicas, son consideradas importantes para la síntesis de compuestos heterocíclicos.⁷

El grupo carbonilo está formado por un átomo de carbono unido por un doble enlace a un oxígeno; las estructuras generales son:

Figura 2. Estructura general de grupo carbonilo de aldehídos y cetonas.

El grupo carbonilo es uno de los grupos funcionales más abundantes en biomoléculas, como grasas, carbohidratos, proteínas y esteroides, y en productos sintéticos para uso industrial, como formalina, acetaldehído y acetona. En la naturaleza, existen aldehídos y cetonas que por su olor agradable se emplean como aromatizantes o saborizantes; por ejemplo, la vainillina y alcanfor.

Estructuralmente hablando, el carbono del grupo carbonilo presenta una forma trigonal plana. En este tipo de hibridación los cuatro electrones del carbono se distribuyen de la siguiente manera:

- Tres electrones en tres orbitales híbridos atómicos sp^2 ; estos orbitales están en un mismo plano y separados entre sí por un ángulo de 120° .
- Un electrón en un orbital p, perpendicular a ese plano.

En el grupo carbonilo, el carbono forma tres enlaces sigma y un enlace pi. El doble enlace del carbono con el oxígeno, (C=O), ocurre cuando un orbital sp^2 del oxígeno se superpone con un orbital sp^2 del carbono y forma el enlace sigma (σ) C-O. Al oxígeno le quedan dos pares de

electrones no compartidos que ocupan los orbitales sp^2 correspondientes. Y el enlace pi (π) se forma por el traslapamiento de los orbitales p puros de cada átomo en cuestión. Esto se observa en la siguiente figura.⁸

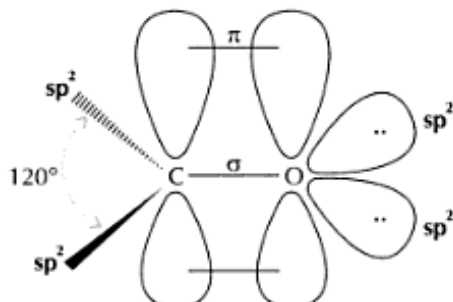


Figura 3. Enlace de C=O mostrado con orbitales.

Características de aldehídos y cetonas.

El grupo carbonilo, característico del aldehído y cetonas, confiere a éstos compuestos su reactividad especial. Como el átomo de oxígeno es mucho más electronegativo, atrae más a los electrones que el átomo de carbono. El carbono del grupo carbonilo al presentar hibridación sp^2 , como ya lo mencionamos, los 3 átomos que están unidos directamente a él se encuentran en un mismo plano con un ángulo de separación de aproximadamente 120° . Los aldehídos y cetonas se caracterizan por presentar reacciones comunes que se deben a dos características muy importantes de la estructura del carbonilo, la planaridad y la polarización del doble enlace. Sin embargo, la distinta ubicación del grupo carbonilo en la cadena hidrocarbonada (en el extremo para los aldehídos) supone ciertas diferencias entre las dos funciones. Los aldehídos y cetonas en el infrarrojo presentan una banda de absorción entre 1670 y 1730 cm^{-1} , debido a la vibración de tensión del enlace carbono-oxígeno. En el ultravioleta hay también una absorción débil entre los 2600 y 3000 Å . En la espectroscopia RMN se puede distinguir la función aldehído de la función cetona por su diferente desplazamiento químico en el espectro. Tanto aldehídos como la cetonas presentan una reacción característica con la 2,4-dinitrofenilhidracina para dar las correspondientes fenilhidrazonas con un precipitado rojo- naranja, lo cual permite evidenciar su presencia.

Los aldehídos y las cetonas no pueden formar enlaces intermoleculares de hidrógeno, porque al carecer de grupos hidroxilo (-OH) sus puntos de ebullición son más bajos que los alcoholes correspondientes. Sin embargo, los aldehídos y las cetonas pueden atraerse entre sí mediante las

interacciones dipolo-dipolo de sus grupos carbonilo por eso sus puntos de ebullición son más altos que los de los alcanos correspondientes. Con excepción del metanal, que es gaseoso a la temperatura ambiente, la mayor parte de los aldehídos y cetonas son líquidos y los homólogos superiores son sólidos. Los primeros miembros de la serie de los aldehídos alifáticos tienen olor fuerte e irritante, pero los demás aldehídos y casi todas las cetonas presentan olor agradable por lo que se utilizan en perfumería y como agentes aromatizantes.

Antecedentes del cáncer

El cáncer es un grupo de más de 100 enfermedades que incluyen tumores malignos con diferentes localizaciones; según la Organización Mundial para la Salud el cáncer se considera un problema de salud pública, siendo una de las principales causas de muerte en la población mundial. El cáncer se ha convertido en una enfermedad crónica gracias a la optimización de las terapias que se usan para controlar su progresión (cirugía, quimioterapia, radioterapia), pero aún no tiene cura. El obstáculo radica en la complejidad de los mecanismos moleculares subyacentes. En la última década, la comunidad científica se ha centrado en la búsqueda de compuestos para el desarrollo de nuevos tratamientos con diferentes aproximaciones, como la farmacogenómica⁹ o la inducción de la muerte de las células tumorales mediante la activación de rutas de muerte celular independientes de la apoptosis.¹⁰ Paralelamente, a esta búsqueda, también ha crecido la necesidad de encontrar nuevas identidades químicas con una actividad citotóxica potente y específica contra las células tumorales.

En 2012, el cáncer fue responsable de 8,2 millones de muertes, y se espera que los casos anuales aumentará de 14 millones en 2012 a 22 millones en los próximos dos decenios.^{11,12} En los últimos años, se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias para encontrar maneras seguras y eficaces de tratamiento de esta enfermedad, que incluye una mejor comprensión de los procesos biológicos implicados en la supervivencia de células de cáncer.¹³

En este contexto, los benzotiazoles representan una clase importante de compuestos heterocíclicos que han atraído una atención especial debido a sus diversas actividades biológicas, incluyendo antimicrobiana,¹⁴ anticonvulsionante,¹⁵ antiinflamatorio,¹⁶ antimalárica,¹⁷ antiparasitario,¹⁸ anticancerígena.¹⁹

La resistencia a los medicamentos constituye la falta de respuesta a muchos químicamente y agentes anticancerígenos mecánicamente no relacionadas por las células cancerosas. Es una de las principales causas de fracaso de la quimioterapia y puede conducir a recurrencia de la enfermedad o incluso la muerte.²⁰ La administración clínica de altas dosis de medicamentos contra el cáncer para superar la resistencia conduce a toxicidades inducidas por drogas.²¹ De ahí, que los agentes anticancerígenos nuevos necesitan ser sintetizado y probado por su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* para superar la resistencia a fármacos.

Actividad anticancerosa de las hidrazonas

Dandawate et al.,²² desarrolló plumbagina derivados de hidrazona (53) con una elevada actividad frente a cáncer de mama. Mohareb y Al-Omran²³ sintetizaron cianoacetilhidrazona con derivados de pregnanolona (54) activa contra múltiples líneas celulares de cáncer. Aydın et al.,²⁴ sintetizó y evaluó derivados flurbiprofenohidrazida (55) contra líneas celulares de cáncer de ovario y leucemia. Cui et al.,²⁵ sintetizó acilhidrazonas (56) e informó que tienen una potente actividad contra las células leucémicas humanas promielocítica (HL-60). Al-Said et al.,²⁶ sintetizaron ciertos compuestos (57) y reportaron tener actividad anticancerígena *in vitro* contra líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF7. Liu et al.,²⁷ sintetizó y evaluó derivados de acetyl hidrazona(58) para la actividad antitumoral contra A549, HCT11b, HepG2, líneas-9 PC y A375 líneas celular con un IC₅₀ de 4-17 μ M; Derivados de arilhidrazona (59) sintetizado por Vogel et al.²⁸

Se informó de un IC₅₀ de 6.7 nM frente a MDA-MB231 y MCF-7 líneas celulares de cáncer de mama. Xu et al.,²⁹ seleccionó derivados de hidrazona (60) para la inhibición de la quinasa en diferentes líneas celulares. Benites et al., sintetizó derivados de hidrazona(61) y reportó de su actividad antiproliferativa significativa. Derivados de hidrazona reportados por Hayakawa et al.,(62) mostraron una marcada inhibición de quinasa PI3 p110 α .

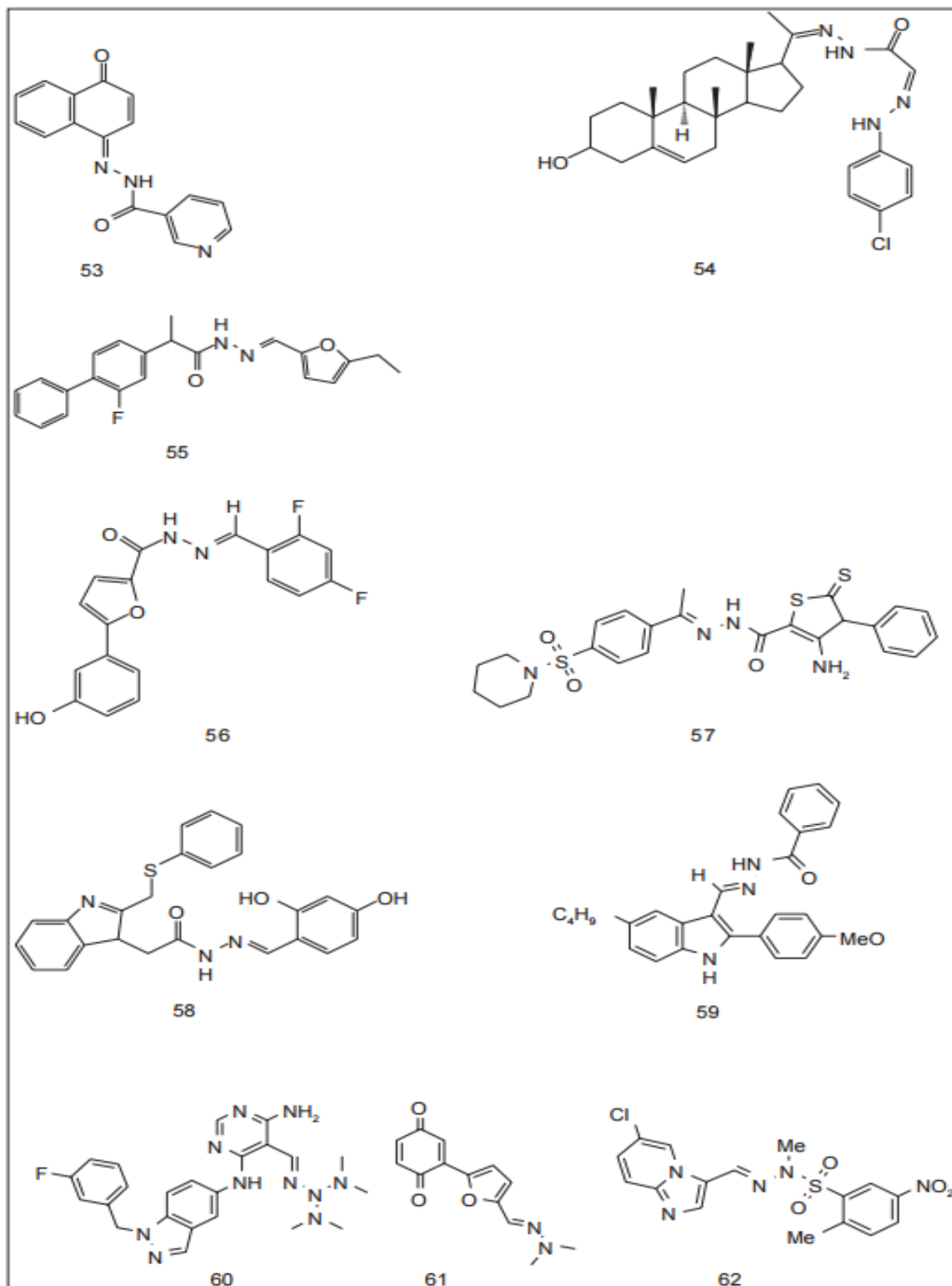


Figura 4. Estructura de hidrazonas reportadas como agentes anticancerosos.

Historia de los cultivos celulares

En 1878, Claude Bernard demostró que el medio interno, a pesar de ser producto del metabolismo celular, regulaba la actividad de los propios tejidos. Además, que para estudiar las células era necesario aislarlas en sistemas artificiales sin la influencia del organismo. Uno de los primeros pasos en este sentido fue dado por von Recklinghausen que en 1886, logró mantener glóbulos de anfibios por más de un mes bajo diferentes condiciones en recipientes esterilizados³⁰. En 1885, Wilhelm Roux, aisló a través de una técnica microquirúrgica la placaneural de embrión de pollo, en donde observó la formación de tubo neural, precursor del sistema nervioso central, estos resultados fueron considerados como el primer explante *in vitro*.

En 1898, Ljunggren mantuvo *in vitro*, por varias semanas, explantes de piel humana inmersos en líquido de ascitis³¹. En 1903, Jolly hizo las primeras observaciones detalladas sobre la supervivencia y la división celular *in vitro* logrando mantener, por 30 días, leucocitos de salamandra. Ross Harrison, describió la diferenciación de células de trozos de tubo neural de rana, en gota de linfa de rana, mostró que la función normal continuaba *in vitro*, marcando así el verdadero inicio del cultivo celular. M. Burrows, usó las técnicas de cultivo de tejidos de anfibios para los tejidos de animales homeotermos, descubriendo la importancia del plasma sanguíneo como medio de cultivo. Alexis Carrel, Premio Nobel en Cirugía Experimental, fue uno de los responsables del desarrollo de los métodos de cultivo celular, gran conocedor de las técnicas de asepsia, que usó técnicas quirúrgicas en su trabajo. Con una técnica innovadora, le permitió mantener una línea celular de tejido conectivo de pollo activa por 34 años³².

La perfección de los actuales métodos de cultivo celular fue desarrollada, en gran parte, por el grupo del National Cancer Institute de los EUA, liderado por Wilton Earle, quien fue el primero en mantener células en multiplicación sobre vidrio, siendo el primero en mantener células en suspensión. Entre 1911-1912, se inició el desarrollo de cultivo de células animales con los estudios realizados por Warren & Lewis. Otros estudios fueron realizados para la optimización de los cultivos de tejidos, tales como los componentes del medio de cultivo necesarios para el desarrollo y crecimiento de las células³³. De estas investigaciones se generó una variada gama de medios de cultivo disponibles en la actualidad, en donde inclusive actualmente se tienen condiciones libres de suero, siendo estas las condiciones más valiosas para los ensayos

farmacológicos. La idea del cultivo de células vegetales fue alcanzada por Haberlandt en 1902, pero los primeros intentos con éxito fueron realizados en 1921 por Molliardy, Kotte y Robbins, al lograr mantener raíces de vegetales vivas durante algunas semanas³⁴. Varios tipos de células animales, tanto de embriones como de adultos, han sido cultivados *in vitro* por períodos variables de tiempo, posibilitando su estudio sobre varias condiciones.

Entre los años cuarentas y los setentas los cultivos celulares pasaron a tener un importante papel en el aislamiento y estudio de los virus. Esto presentó un amplio soporte cuando Enders, Weller & Robbins en 1948, mostraron que el virus de la poliomielitis, tipo 2, podría replicarse en cultivo de tejidos de origen no nervioso de embriones humanos, determinando un efecto citopatogénico fácilmente observable en cultivos infectados. Asimismo, podría ser bloqueado por el uso de un suero inmune específico³⁵.

Actualmente, las neoplasias malignas, o cáncer, representan un conjunto de enfermedades responsables de siete millones de muertes anuales en todo el mundo. La comprensión de los mecanismos básicos involucrados en el crecimiento tumoral es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, especialmente para las formas más avanzadas de la enfermedad para las cuales las opciones actuales han mostrado impacto limitado en su eficiencia terapéutica. El proceso de proliferación, diferenciación y transformación tumoral promueve considerable diversidad genética entre las células neoplásicas en crecimiento.

Estas células son sometidas a innumerables mecanismos de presión selectiva, incluyendo la hipoxia por vascularización inadecuada y, probablemente, el ataque por el sistema inmune. La secuencia de eventos, desde la primera célula alterada hasta la metástasis, involucra una serie de interacciones entre la célula tumoral y células inmunes, estromales, endoteliales y macrófagos que están involucradas en procesos diversos como la angiogénesis, invasión y evasión inmune.

Recientemente, la comprensión sobre la relación entre inmunidad en neoplasias avanzó a partir de nuevas herramientas para los estudios experimentales, y abre un área de atención que es la inmunomodulación.

Las técnicas de cultivo celular se han perfeccionado, actualmente permitiendo el cultivo de tejidos, órganos e inclusive embriones en desarrollo, los sistemas de cultivo celular son ampliamente usados, ya que:

- Constituyen un sistema económico
- Son relativamente fáciles de mantener
- Necesitan de poco espacio físico
- Permiten aislar virus, preparar antígenos virales y realizar pruebas de neutralización
- Son convenientes para la producción de vacunas, pues proporcionan preparaciones con elevadas concentraciones virales, relativamente libres de materiales extraños
- Permiten aislar gran número de virus que anteriormente era imposible aislar y/o cultivarlos
- Incrementan la complejidad de los estudios o estrategias experimentales sobre la biología molecular de las respuestas celulares básicas.

Los resultados en este proceso son de gran interés biológico, citológico, fisiológico, bioquímico, farmacológico, patológico, genético, etc., y su importancia aumenta cada día. El uso de los cultivos celulares con fines experimentales ha sido posible gracias a la creación de bancos de células que es posible mantener congeladas en nitrógeno líquido (-190°C), almacenando así una gran diversidad de líneas celulares a disposición de la comunidad científica mundial.

Respuestas celulares básicas

Los diferentes tejidos que constituyen a los organismos multicelulares se encuentran en un proceso de continua adaptación a los diferentes estímulos que reciben. La señalización que perciben y su integración favorecen respuestas celulares básicas, destacan entre ellas la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular.

Linfocitos

Los linfocitos son las únicas células del organismo capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos, y por tanto, son responsables de las características que definen la respuesta inmunitaria adaptativa, especificidad y memoria. Los

linfocitos están formados por distintos subtipos que difieren en sus funciones y productos proteicos, aunque morfológicamente son indistinguibles.

Evaluación de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular. La toxicidad en tejidos y células se define como una alteración de las funciones celulares básicas por efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos. A través de estímulos las células pierden su equilibrio homeostático, que puede causar su adaptación o sufrir un proceso regresivo o morir (Figura 5). En los últimos años se están empezando a conocer los factores determinantes de la toxicidad en tejidos y células.

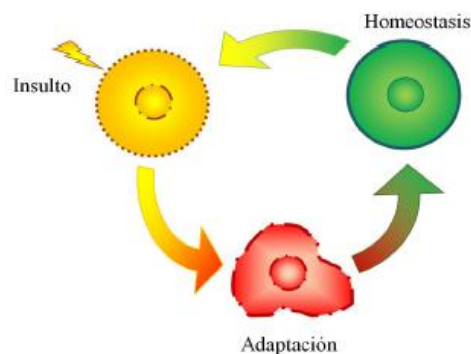


Figura 5. Esquema de la supervivencia celular. La célula recibe estímulos nocivos que de ser controlados se adapta, llevando a cabo diversos mecanismos metabólicos o tróficos que le pueden permitir regresar a su condición basal en un proceso homeostático.

La supervivencia celular es dependiente de la capacidad del organismo en sustituir las células lesionadas o muertas o reparar los tejidos. A partir de un estímulo o lesión se ejercen respuestas celulares, que son adaptación, degeneración o muerte celular. La adaptación puede tener un carácter fisiológico si el estímulo agresor es moderado. Las adaptaciones patológicas pueden tener mecanismos adaptativos propiciando que la célula module su medio ambiente y se adapte, escapando de las agresiones, siendo definido como un cambio morfológico resultante de una lesión no mortal de la célula. Cuando la célula no se adapta, se observa un metabolismo reducido, consecuentemente su función también será disminuida, por lo tanto, en este caso se puede decir que la célula sufrió una alteración regresiva.

Distintos agentes nocivos, al mismo tiempo que producen daños, ponen en marcha la reparación de los tejidos que comprende dos procesos: a) la regeneración o sustitución de las células lesionadas por otras de la misma clase y b) la sustitución del tejido conjuntivo llamada fibrosis, el cual lleva a una cicatriz permanente.

Estos dos procesos básicamente son los mismos mecanismos que intervienen en la migración, la proliferación, la diferenciación celular y las interacciones célula-matriz. Para la supervivencia, el organismo debe ser capaz de sustituir las células lesionadas o muertas y de reparar los tejidos.

Diversos fenómenos sirven para reducir los daños y también para que las células lesionadas supervivientes se multipliquen lo suficiente para reemplazar las células muertas. La Figura 5, describe los procesos de adaptación y homeostasis.

Cuando las células presentan una respuesta aumentada en consecuencia de la alteración sufrida, se reconoce como una alteración progresiva, la cual puede ser de cinco tipos: hipertrofia, hiperplasia, regeneración, metaplasia y neoplasia. Las alteraciones degenerativas debidas a la disminución de la función celular son tres respuestas celulares básicas: a) alteraciones del balance hidro-electrolito o hídrica; b) sobrecarga de productos catabólicos (glucógeno, lípidos y proteínas) y c) acumulo de productos complejos no degradables: pigmentos, minerales y sustancias exógenas.

Citotoxicidad celular

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos de producir una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Para la cuantificación de la citotoxicidad es necesaria la implementación de diferentes tipos de ensayos que se encuentran descritos empleando diversos métodos y estrategias para realizarlos. Entre los métodos para cuantificar la citotoxicidad de un compuesto se cuenta con los que miden actividad metabólica celular y por los que se basan en el principio de exclusión celular.

Química verde

La Química Orgánica es una ciencia que aporta una incuestionable contribución a la mejora de la calidad de vida y al bienestar del hombre, ideando soluciones en campos tan diferentes como la salud, la higiene, o la preparación de nuevos materiales.

Según el código de conducta de la American Chemical Society

"Los químicos tienen como responsabilidad profesional servir al interés público, al bienestar y al avance del conocimiento científico, preocuparse de la salud y el bienestar de sus compañeros, consumidores y la comunidad, comprender y anticiparse a las consecuencias medioambientales de su trabajo, evitar la contaminación y de proteger el medioambiente".

Esta preocupación por las cuestiones medioambientales ha hecho que en los últimos años surja todo un enfoque dentro de la Química, en general, y de la Química Orgánica, en particular que tiene por objetivo prevenir o minimizar la contaminación desde su origen, tanto a escala industrial como en los laboratorios de investigación o de carácter docente. Es lo que se denomina Química Verde. Esto supone un paso mucho más allá de lo que sería el mero hecho de un correcto tratamiento de los residuos potencialmente contaminantes que puedan generarse si no algo mucho más importante: evitar la formación de desechos contaminantes y propiciar la economía de tiempo y recursos.

La Química Verde o Química beneficiosa para el medio ambiente se ocupa del diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas.

Desde su concepción y definitivo impulso, en torno a 1991, la Química Verde ha crecido a nivel internacional como un enfoque especial en la Química. Se han creado organismos, redes, instituciones, revistas y programas educativos relacionados con la Química Verde.

El diseño de productos y procesos medioambientalmente benignos debe guiarse con los 12 principios de la química verde que se basan en

1. Prevención:

- Es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.

2. Economía atómica:

- Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.

3. Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida:

- Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.

4. Generar productos eficaces pero no tóxicos

- Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.

5. Reducir el uso de sustancias auxiliares

- Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible.

6. Disminuir el consumo energético

- Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambientales.

7. Utilización de materias primas renovables

- La materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.

8. Evitar la derivatización innecesaria

- Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).

9. Potenciación de la catálisis

- Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos

10. Generar productos biodegradables

- Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.

11. Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real

- Las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas

12. Minimizar el potencial de accidentes químicos.

- Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.³⁶

PARTE EXPERIMENTAL

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina empleando cromatoplasmas analíticas de aluminio DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ de 0.20 mm de espesor, utilizando para su revelado una lámpara de luz UV modelo UVGL-25 Multiband UV-254/366 nm.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un fusiómetro marca Tekno-Lab en grados centígrados y no fueron corregidos.

La caracterización por espectrometría de masas se realizó mediante el método de ionización de impacto electrónico (IE), en un intervalo de lectura m/z de 0-800, haciendo uso de un espectrómetro de masas marca JEOL modelo JMS-700. Los espectros de masas se obtuvieron con una energía de ionización de 70 eV a una temperatura de 250 °C en la cámara de ionización.

Los espectros de infrarrojo fueron realizados en un espectrómetro FTIR EXCALIBUR FTS3000 MX en soporte de KBr. Las frecuencias se expresan en cm^{-1} .

La caracterización de espectroscopia UV-VIS se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 UV / VIS.

Los experimentos de RMN de ^1H y de ^{13}C se realizaron en un equipo Mercury de 400 MHz respectivamente. Todos los experimentos se realizaron usando TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento en Hz (J) y la multiplicidad de las señales de ^1H es indicada con las siguientes abreviaturas: s =simple, d =doble, t =triple.

Los análisis de rayos-X para los productos A-24 y B-24, se realizaron en un difractómetro Bruker P4.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se muestran las reacciones generales en las que se centró el presente trabajo, realizadas bajo las condiciones y parámetros ya establecidos en el laboratorio de investigación.

Esquema 2. Esquema general de reacciones.

En este caso se trabajó con un compuesto carbonílico de aldehído el 5-(4-nitrofenil)furan-2-carbaldehído. Estas síntesis se realizaron utilizando como medio de disolución etanol ya que de acuerdo a muchos estudios hechos por el grupo de trabajo resulta ser idóneo para este tipo de reacciones.

El grado de solubilidad de los reactivos fue un factor importante durante la realización de obtención de estos compuestos, ya que el tiempo que duraba la reacción dependía directamente con el tiempo en que se disolvían ambas materias primas.

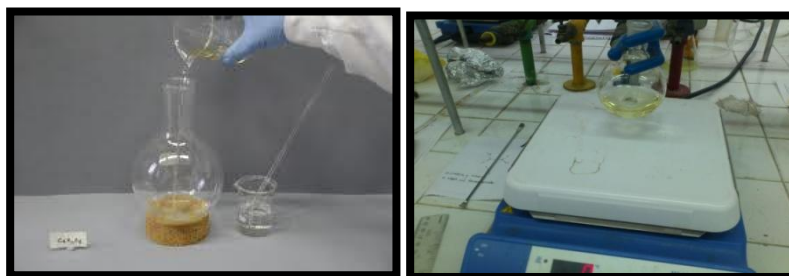


Figura 6. Disolución de reactivos.

Material y equipos

- 3 Matraz de bola de 100 ml
- 3 Barras magnéticas
- 4 Espátulas
- 3 Embudos de vidrio
- 3 Agitadores de vidrio
- 4 Vasos de precipitados de 50 ml

- Placas cromatográficas de aluminio
- Papel filtro
- 1 Balanza analítica
- 1 Manta de calentamiento
- 1 Lámpara UV

Reactivos

- 5-(4-nitrofenil)furan-2-carbaldehido
- Difenilhidracina
- Hidracina
- Fenilhidracina
- Etanol
- Eluyente acetato de etilo/hexano (8:2)

Se añadieron 0.3 g del compuesto carbonílico 5-(4-nitrofenil)furan-2-carbaldehído al matraz de bola de 100 mL, colocando una barra magnética para su posterior agitación. Después, se añadió gota la difenilhidracina, fenilhidracina o hidracina, previamente disueltas con la mínima cantidad de etanol.

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de aluminio con soporte de gel de sílice. El sistema empleado como eluyente para esta reacción fue una mezcla 8:2 de hexano y acetato de etilo respectivamente.



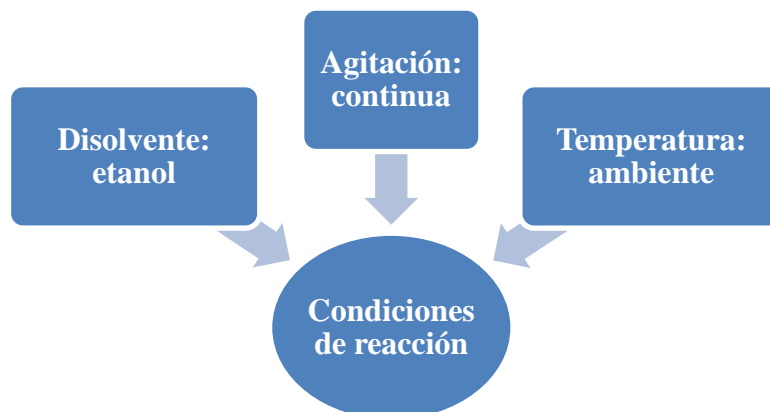
Figura 7. Monitoreo por cromatografía en capa fina.

Se tomaron alícuotas del matraz de reacción cada 15 min con el objetivo de monitorear la reacción.



Figura 8. Preparación de placa cromatografica.

Los parámetros que se utilizaron en el desarrollo de estareacción se muestran a continuación:



Una vez teniendo la seguridad de que ya no existía materia prima, basados en el análisis de los resultados de la cromatografía en capa fina, se procedió a realizar la filtración de los cristales, mediante una filtración simple. Debido a que el producto se encontraba como un sólido resultó ser apto para una recrystalización, esto con el fin de obtener la mayor pureza posible del compuesto.



Figura 9. Medición de punto de fusión.

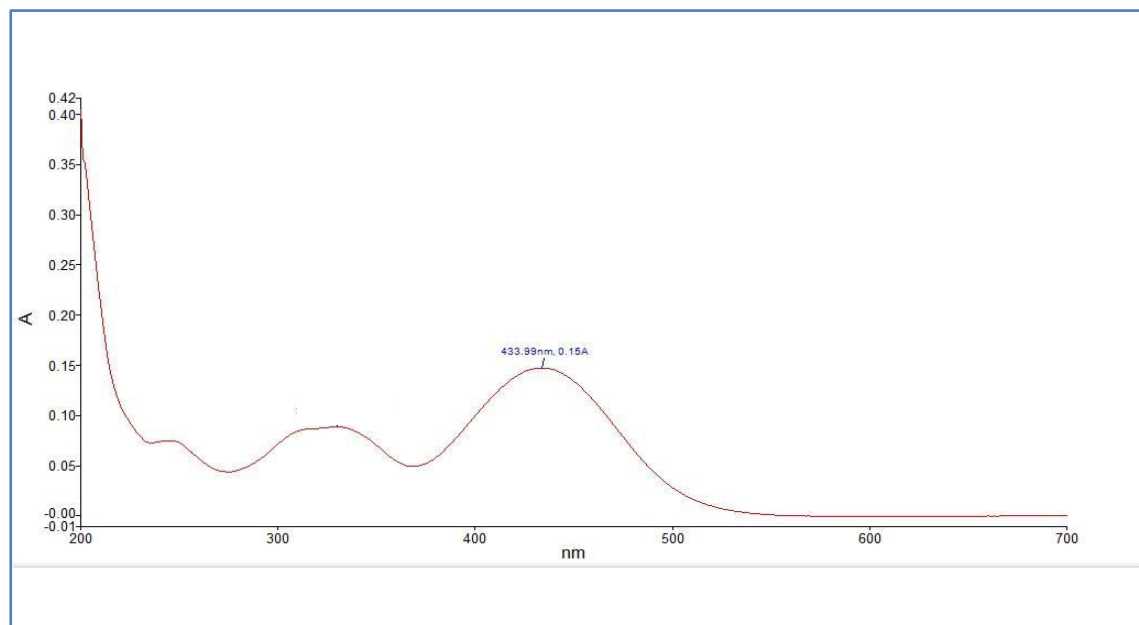
Además, una vez hecha la filtración se midió el punto de fusión del compuesto para observar su grado de pureza.

Después, se realizaron las caracterizaciones estructurales de los productos, mediante espectroscopia infrarroja, espectroscopia UV-VIS, espectrometría de masas, RMN¹H y RMN¹³C para comprobar las estructuras propuestas.

CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Caracterización por espectroscopia UV-visible

A-24

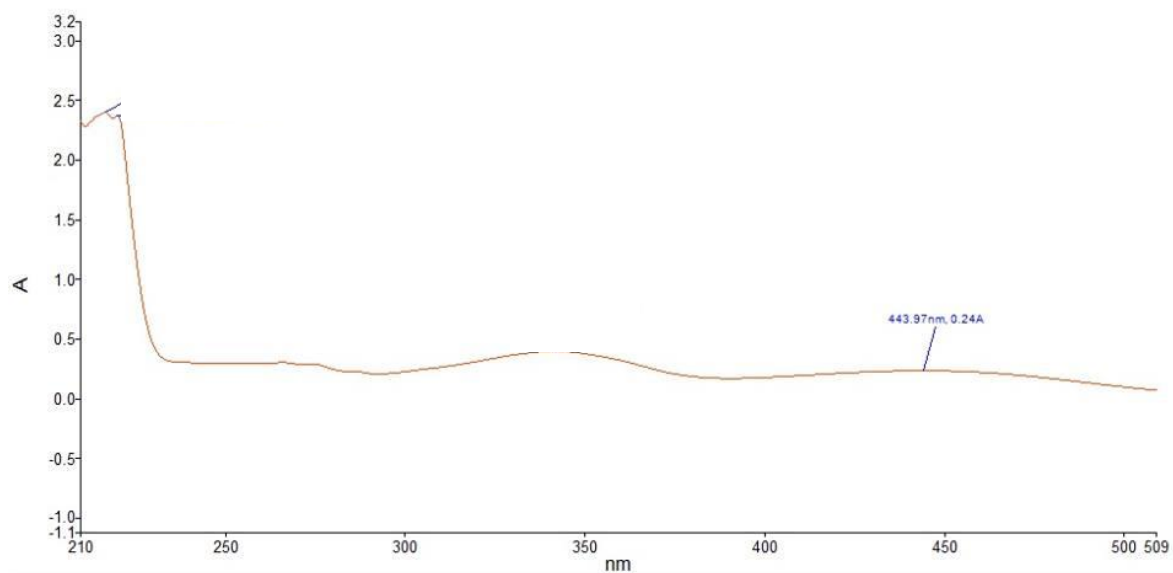


Espectro de UV-VIS del compuesto A-24

UV $\lambda_{\max} = 433.99\text{nm}$

En este espectro se puede observar claramente una señal localizada en 433.99 nm atribuida a los sistemas aromáticos, posiblemente también al enlace C=N presente en la estructura de este compuesto, ya que la banda es muy ancha.

B-24

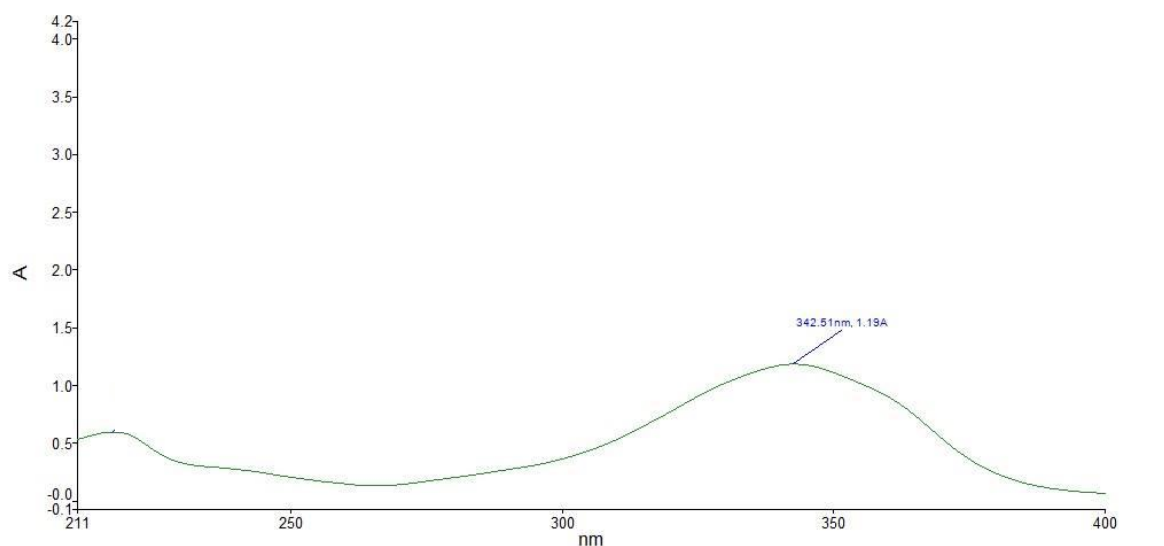


Espectro de UV-VIS del compuesto B-24

UV $\lambda_{\max} = 443.97\text{nm}$

En este espectro se pueden observar una señal localizada en 443.97 nm atribuida a los sistemas aromáticos, posiblemente también al enlace C=N presente en la estructura de este compuesto, ya que la banda es muy ancha.

D-24



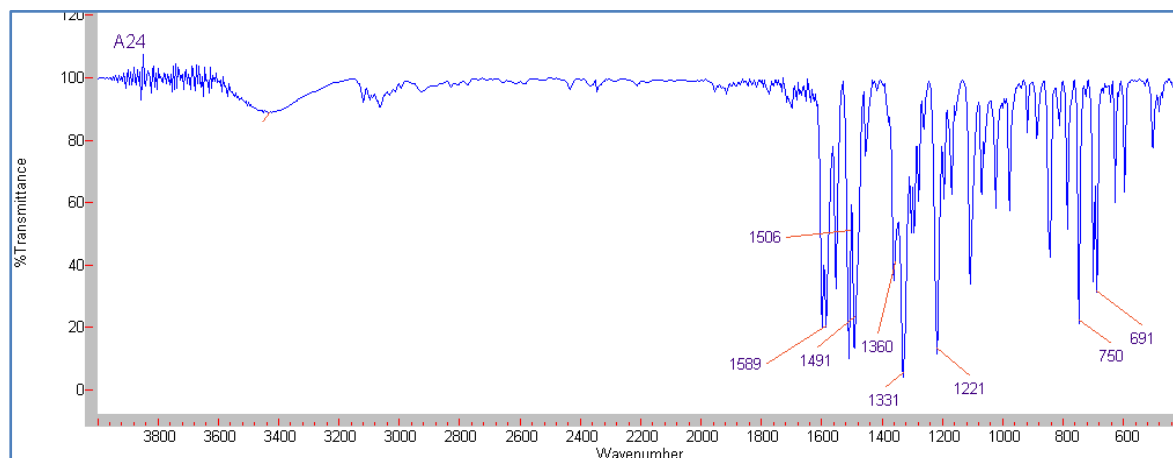
Espectro de UV-VIS del compuesto D-24

UV $\lambda_{\max} = 342.51\text{nm}$

En este espectro se puede observar claramente una señal, localizada en 342.51nm atribuida a los sistemas aromáticos, posiblemente también al enlace C=N presente en la estructura de este compuesto, ya que la banda es muy ancha.

Caracterización por espectroscopia IR

Este espectro del compuesto A-24 presenta diferentes bandas interpretándose en este caso solo las más significativas.



Espectro de IR del compuesto (*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-1,1-difenilhidracina

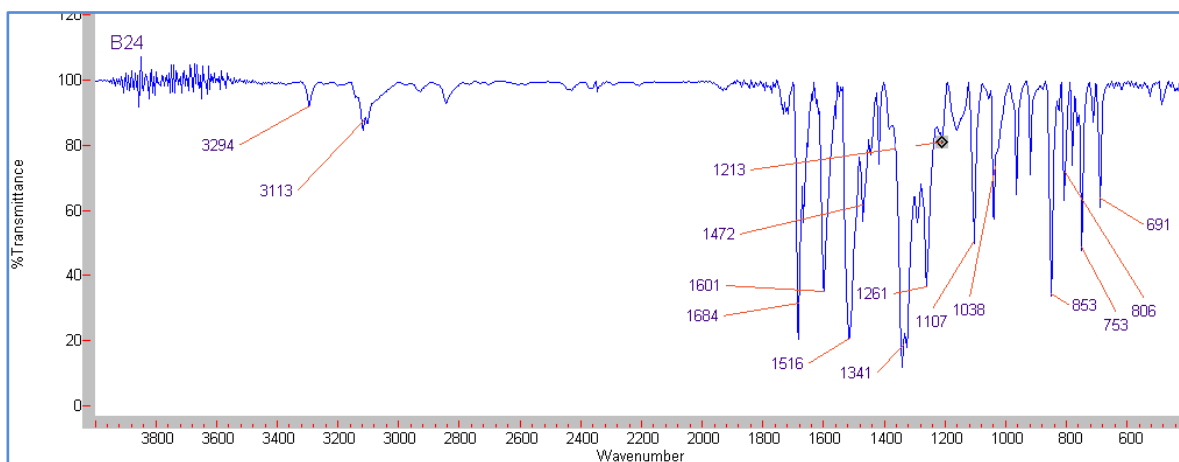
En su correspondiente espectro de infrarrojo se observa una banda media de absorción con frecuencia de 3433 cm^{-1} una banda pequeña asignada al enlace $C_{sp^2}\text{-H}$, en 1589 cm^{-1} asignada a la vibración del enlace $C=N$, en 1221 cm^{-1} una banda intensa asignada al enlace $N\text{-O}$ del grupo -NO_2 , en 750 cm^{-1} una banda intensa asignada al enlace $C\text{-H}$ aromático para-disustituido, en 691 cm^{-1} una banda media asignada al enlace $C\text{-H}$ aromático monosustituido.

Un resumen de las bandas de IR más características de este compuesto A-24, y el número de onda al que aparece cada una de ellas se indican en la siguiente tabla:

Asignación	Intervalo (cm^{-1})
$\nu\text{N}=\text{C}$	1589
νNno_2	1221
$\delta\text{C-H}$ aromático para-disustituido	750
$\delta\text{C-H}$ aromático monosustituido	691

Tabla 1: Valores de las señales más características del compuesto con clave A-24.

(*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-1,1-difenilhidracina



Espectro de IR del compuesto (*E*) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-2-fenilhidracina

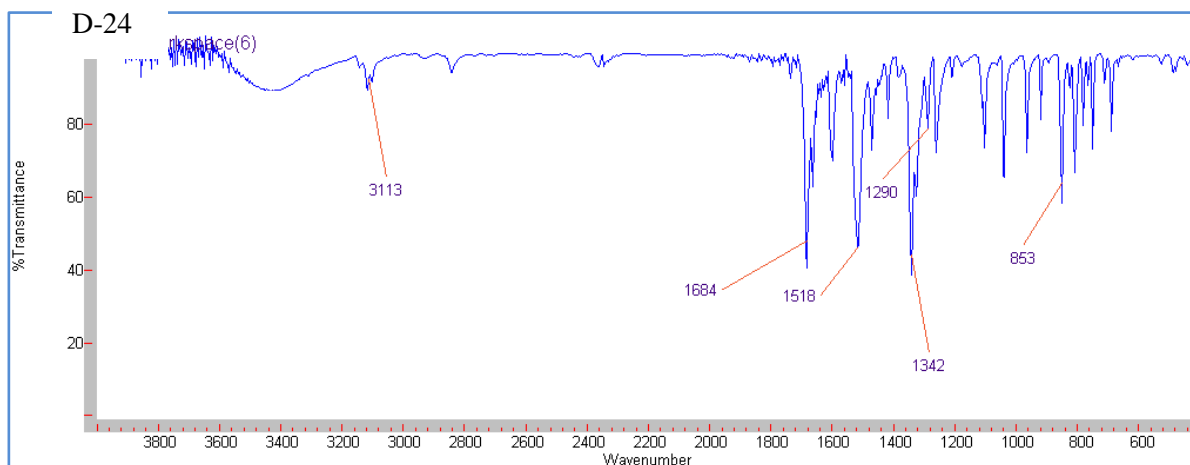
En el espectro de IR del compuesto B-24 se aprecian los siguientes picos:

Se observa una banda intensa de absorción con frecuencia de 3294 cm^{-1} asignada al enlace N-H y en 3113 cm^{-1} una banda pequeña asignada al enlace $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$. En 1684 y 1601 cm^{-1} asignada a la vibración del enlace $\text{N}=\text{C}$, en 1261 cm^{-1} una banda media asignada al grupo nitro NO_2 , en 853 cm^{-1} una banda intensa asignada al enlace C-H aromático para-disustituido, en 753 cm^{-1} una banda media asignada al enlace C-H aromático monosustituido.

Asignación	Intervalo (cm^{-1})
$\nu\text{N-H RNHR}'$ (secundaria)	3294
$\text{VC}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3113
$\nu\text{C}=\text{N}$	1684, 1601
νNO_2	1261
$\delta\text{C-H}$ aromático para-disustituido	853
$\delta\text{C-H}$ aromático monosustituido	753

Tabla 2: Valores de las señales más características del compuesto con clave B-24,

(*E*) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-2-fenilhidracina



Espectro de IR del compuesto D-24, (1*E*,2*E*)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina.

Se observa una banda intensa de absorción con frecuencia de 3113 cm^{-1} asignada al enlace $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, 1684 y 1518 cm^{-1} asignada a la vibración del enlace $\text{N}=\text{C}$, en 1290 cm^{-1} una banda pequeña asignada al enlace N-O del grupo NO_2 , en 853 cm^{-1} una banda media asignada al enlace C-H aromático para-disustituido.

En la siguiente tabla se aprecia de manera resumida los datos que se obtuvieron del espectro IR de este compuesto.

Asignación	Intervalo (cm^{-1})
$\nu\text{ C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3113
$\nu\text{ N}=\text{C}$	1684, 1518
$\nu\text{ NO}_2$	1342
$\delta\text{C-H}$ aromático para-disustituido	853

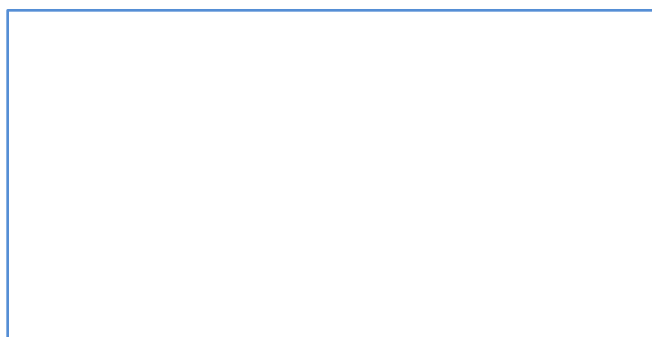
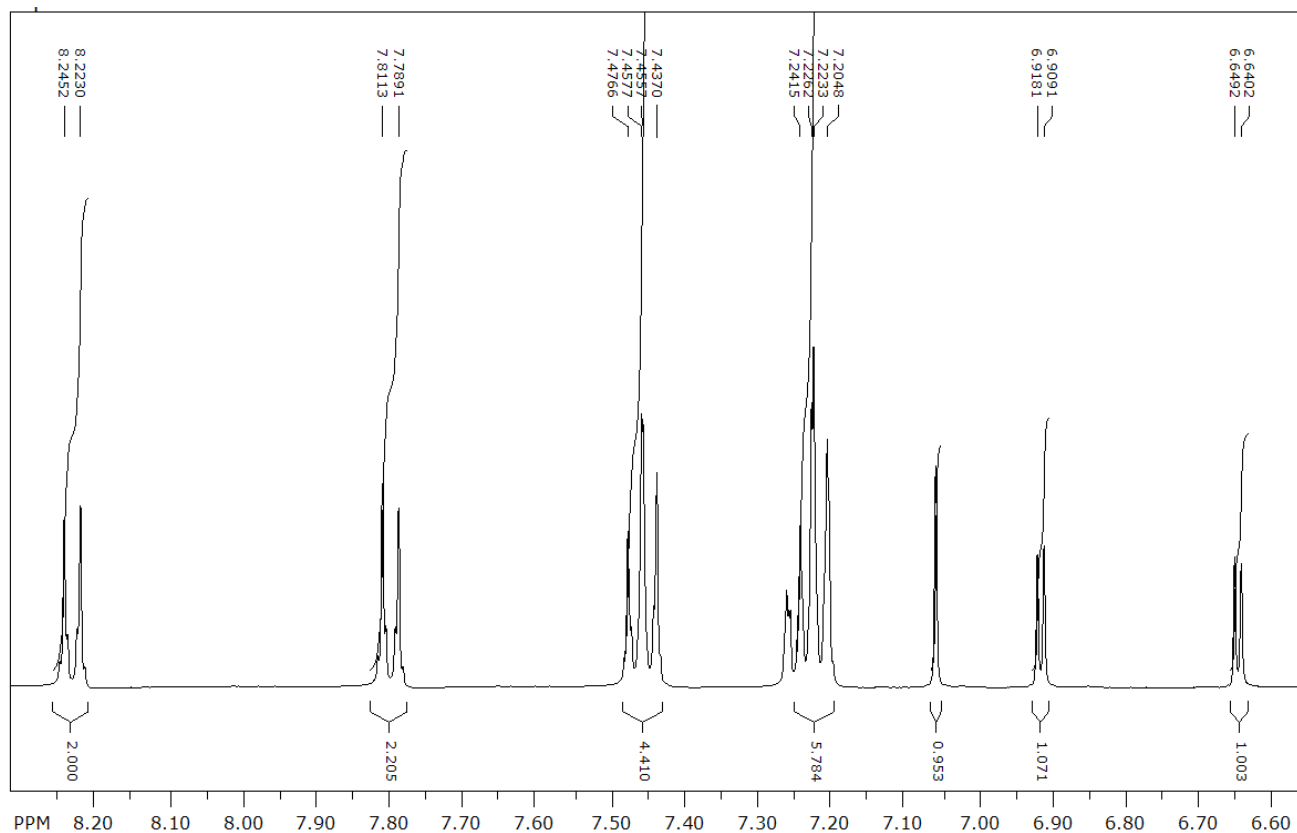
Tabla 3: Valores de las señales más características del compuesto con clave D-24, (1*E*,2*E*)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina

Caracterización por RMN^1H

En el espectro de RMN^1H del compuesto con clave A-24 se observa una señal doble en 8.23 ppm asignada a 2 hidrógenos $\text{CH}(3')$ con una $J = 8.88\text{ Hz}$ del $\text{C}3' - \text{C}2'$; en 7.80 ppm se aprecia una señal doble asignada a 2 hidrógenos $\text{CH}(2')$ con una $J = 8.88\text{ Hz}$ del $\text{C}2' - \text{C}3'$; en 7.45 ppm se observa una señal triple asignada a 4 hidrógenos $\text{CH}(3'')$, en 7.24 ppm se encuentra una señal

múltiple asignada a 4 hidrógenos al CH(2'') y CH(4''); en 7.22 ppm se encuentra una señal triple que integra para 2 hidrógenos asignada a CH(4''); en 7.06 ppm se observa una señal simple asignada al H-imínico, en 6.91 ppm se observa una señal doble asignada al CH(4) con una $J = 3.60$ Hz del C4 - C3 que integra para 1 hidrogeno y en 6.64 ppm se observa una señal doble asignada al CH(3) que integra para 1 hidrogeno con una $J = 3.60$ Hz del C3 - C4.

A-24



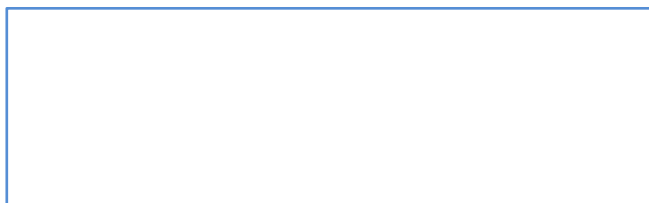
Estructura del compuesto A-24, (*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-1,1-difenilhidracina

En la siguiente tabla se pueden apreciar los 8 distintos tipos de hidrógenos los cuales están presentes en la estructura de esta molécula:

RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ 400MHz δ (ppm) de A24,(<i>E</i>)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-1,1-difenilhidracina			
Tipode hidrógeno	Multiplicidad	Integración	ppm
CH(3')	Doblete (<i>d</i>)	2	8.23
CH(2')	Doblete (<i>d</i>)	2	7.80
CH(3'')	Triplete (<i>t</i>)	4	7.45
CH(2'')	Multiplete (<i>m</i>)	4	7.24
CH(4'')	Triplete (<i>t</i>)	2	7.22
CH(i)	Singulete (<i>s</i>)	1	7.06

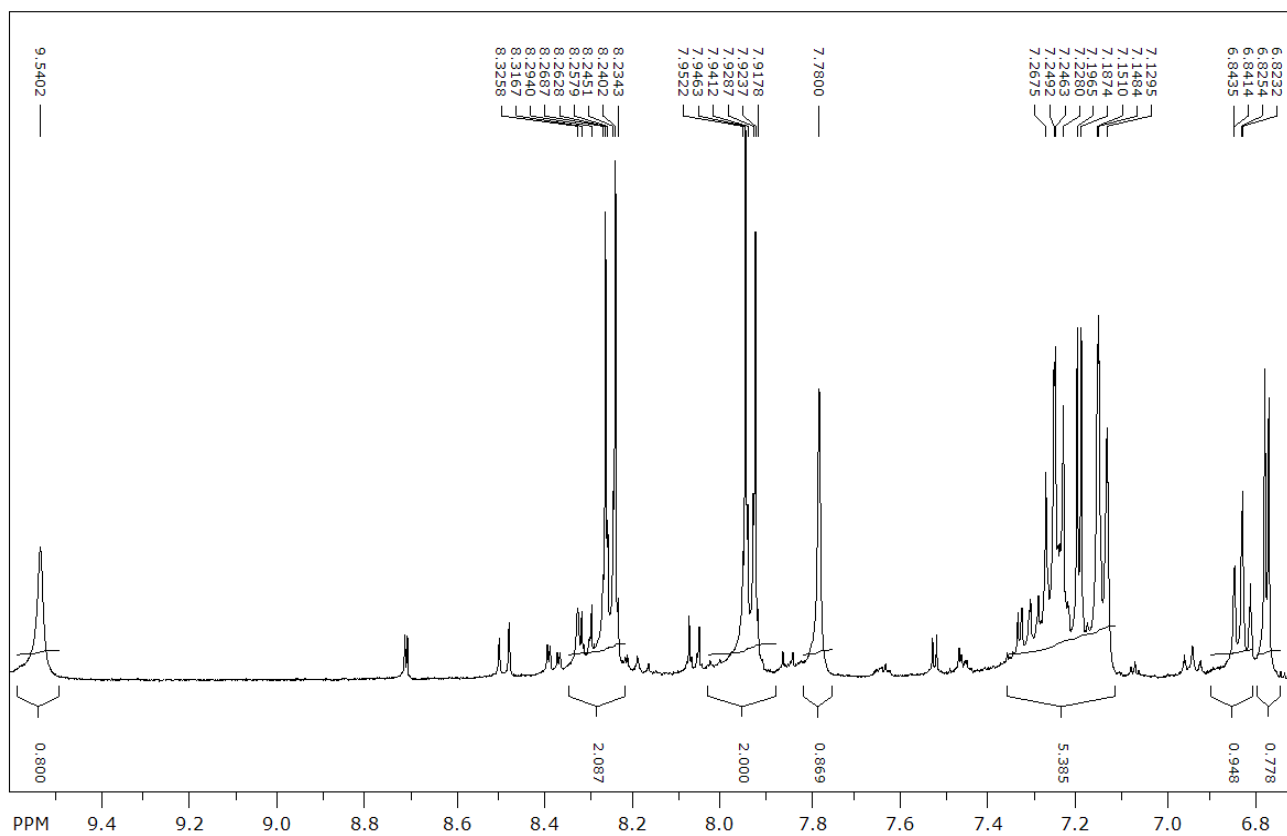
CH(3)	Doblete (<i>d</i>)	1	6.91
CH(4)	Doblete (<i>d</i>)	1	6,64

En el espectro de RMN ¹H del compuesto B-24 se puede observar en 9.54 ppm una señal simple que integra para 1 hidrógeno asignado al NH, también se aprecia una señal triple dobleteada centrada en 8.25 ppm que integra para 2 hidrógenos asignados al CH (3'') $J=9.2$ C3''-C2''; una señal doble centrada en 7.93 ppm que integra para 2 hidrógenos asignados al CH (2'') con $J=9.2$ C2''-C3''; en 7.78 ppm se aprecia otra señal simple asignado al CH(i) (hidrógeno imínico); con un valor de 7.25 ppm aparece una señal doble de doble que integra para 2 hidrógenos asignados a CH(3') con $J=7.25$ C2'-C3', $J=7.25$ C2'-C4'; una señal doble en 7.19 ppm que integra para 1 hidrogeno asignada a CH(4'); en 7.15 ppm aparece una señal doble de doble que integra para 2 hidrógenos asignada a CH(2'); otra señal triple dobleteada en 6.82 ppm que integra para 1 hidrógeno asignado al CH(3); finalmente en aparece también una señal doble en 6.77 ppm integrando para 1 hidrógeno asignado al CH(4);



Estructura del compuesto B-24, (*E*) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-2-fenilhidracina.

B-24



El compuesto B-24 presenta diferentes tipos de hidrógenos, a continuación se presentan sus multiplicidades, integraciones y el valor en ppm en que aparecen:

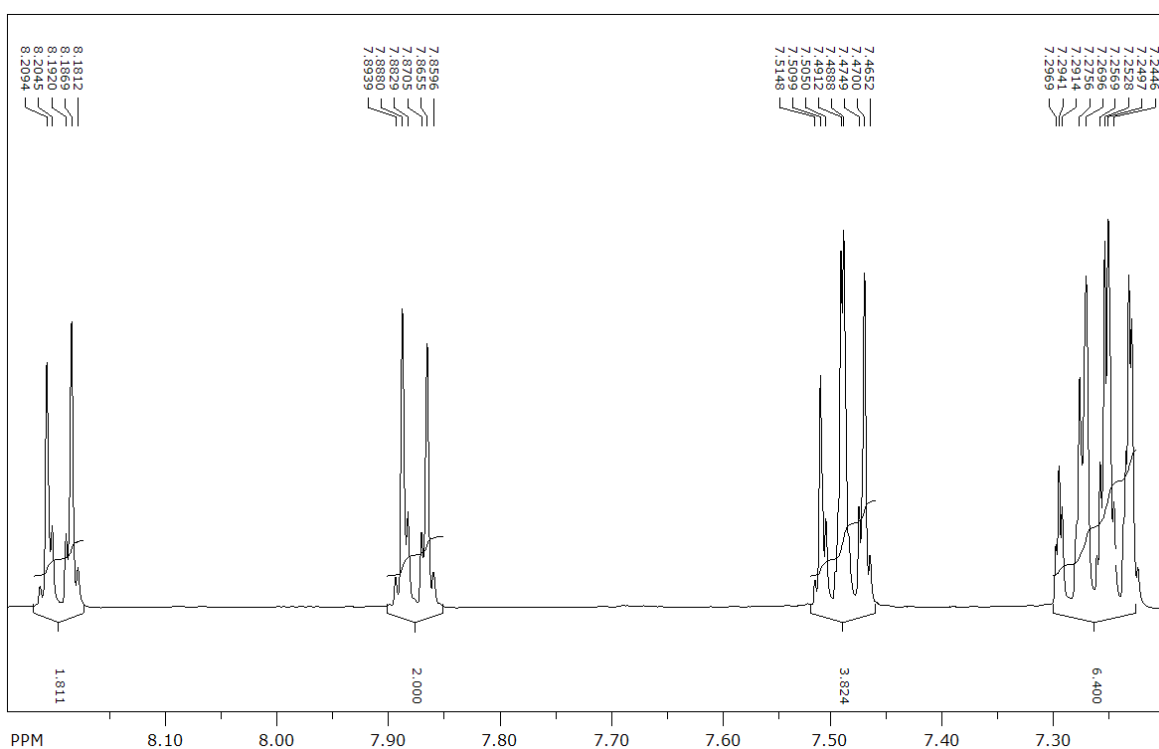
RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ 400MHz δ (ppm) deB-24, ,(E) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-2-fenilhidracina			
Tipo de hidrógeno	Multiplicidad	Integración	ppm
NH	Singulete (s)	1	9.54

CH(3'')	Triplete dobleteado (<i>td</i>)	2	8.25
CH(2'')	Triplete dobleteado (<i>td</i>)	2	7.93
CH(i)	Singulete (<i>s</i>)	1	7.78
CH(3')	Doble de doble (<i>dd</i>)	2	7.25
CH(4')	Doblete (<i>d</i>)	1	7.19
CH(2')	Doble de doble (<i>dd</i>)	2	7.15
CH(4)	Triplete dobleteado (<i>td</i>)	1	6.82
CH(3)	Doblete (<i>d</i>)	1	6.77

En el espectro del compuesto D-24 se pueden observar varias señales que se describen a continuación:

En 8.19 ppm aparece una señal múltiple que integra para 2 hidrógenos asignados al CH(3) con una $J=9.00$; en 7.88 ppm aparece una señal doble tripleteada que integra para 2 hidrógenos asignados al CH(4) con una $J=9.00$, también aparece una señal múltiple a 7.49 ppm que integra para 4 hidrógenos asignados al CH(3'); en 7.28 ppm aparece una señal simple que integra para 1 hidrógeno asignado al CH(i) (hidrógeno imínico). En 7.26 ppm aparece otra señal múltiple que integra para 4 hidrógenos asignados al CH(2').

D-24



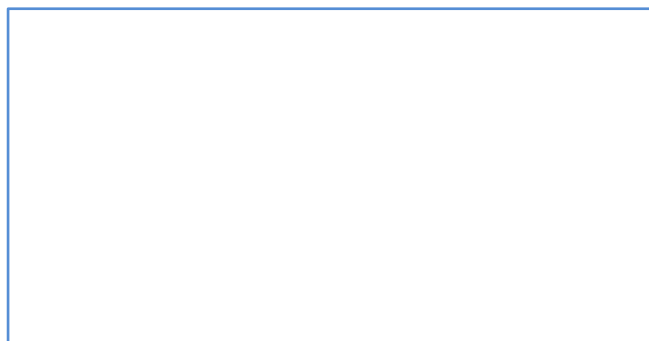
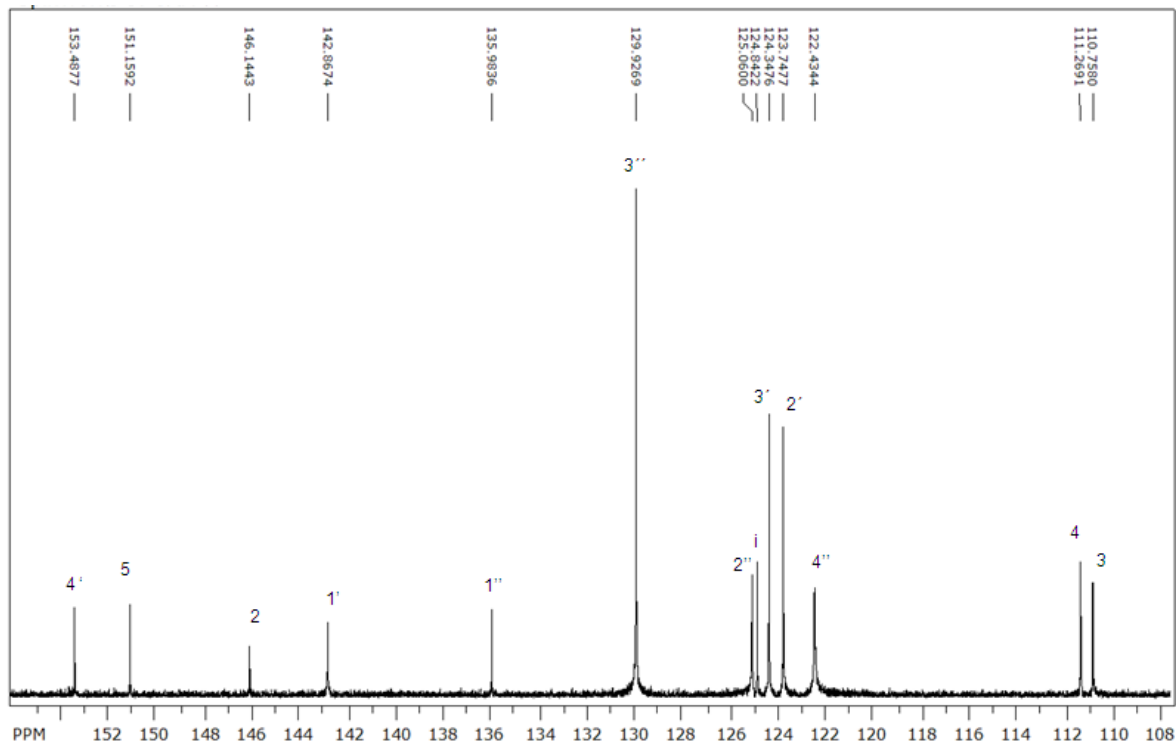
Estructura del compuesto D-24, (1*E*,2*E*)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina.

En la siguiente tabla se muestra la información del compuesto D-24 que presenta 5 tipos de hidrógenos diferentes esto debido a la simetría de la molécula, a continuación se muestran los datos que arrojó el espectro:

RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ 400MHz δ (ppm) deD-24, (1 <i>E</i> ,2 <i>E</i>)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina			
Tipo de hidrógeno	Multiplicidad	Integración	ppm
CH(3)	Multiplete (<i>m</i>)	2	8.19
CH(4)	Doblete tripleteado (<i>dt</i>)	2	7.88
CH(3')	Triplete (<i>d</i>)	4	7.49
CH(i)	Singulete (<i>s</i>)	2	7.28
CH(2')	Triplete (<i>d</i>)	4	7.26

Caracterización por RMN ^{13}C

A-24

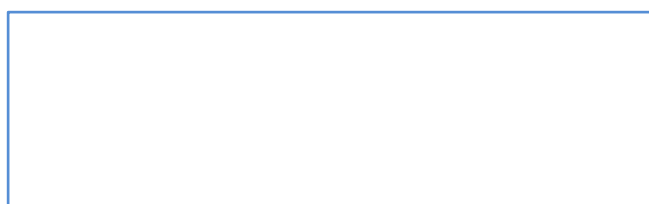
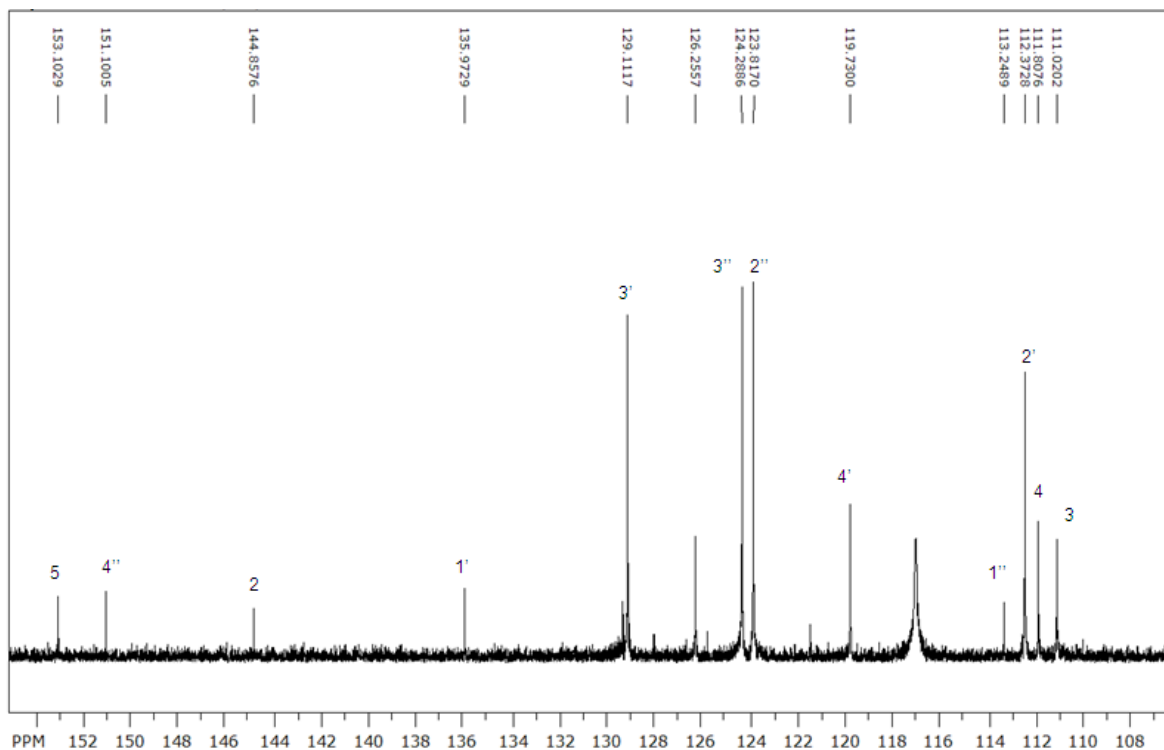


Estructura del compuesto A-24, (*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-1,1-difenilhidracina

En este espectro podemos observar en 153.48 ppm una señal pequeña asignada al C4', en 151.15 ppm otra señal pequeña asignada al C5, en 146.14 ppm una señal más pequeña asignada al C2, en 142.86 ppm una señal pequeña asignada al C1', En 135.98 ppm otra señal pequeña asignada al C1'', en 129.92 una señal intensa asignada al C3'', en 125.06 ppm una señal pequeña asignada al C2'', en 124.84 ppm una señal pequeña asignada al Ci, en 124.34 ppm una señal media asignada al C3', en 123.74 ppm otra señal media asignada al C2', en 122.43 ppm una señal pequeña

asignada al C2', en 111.26 ppm una señal pequeña asignada al C4 y en 110.75 ppm otra señal pequeña asignada al C3.

B-24

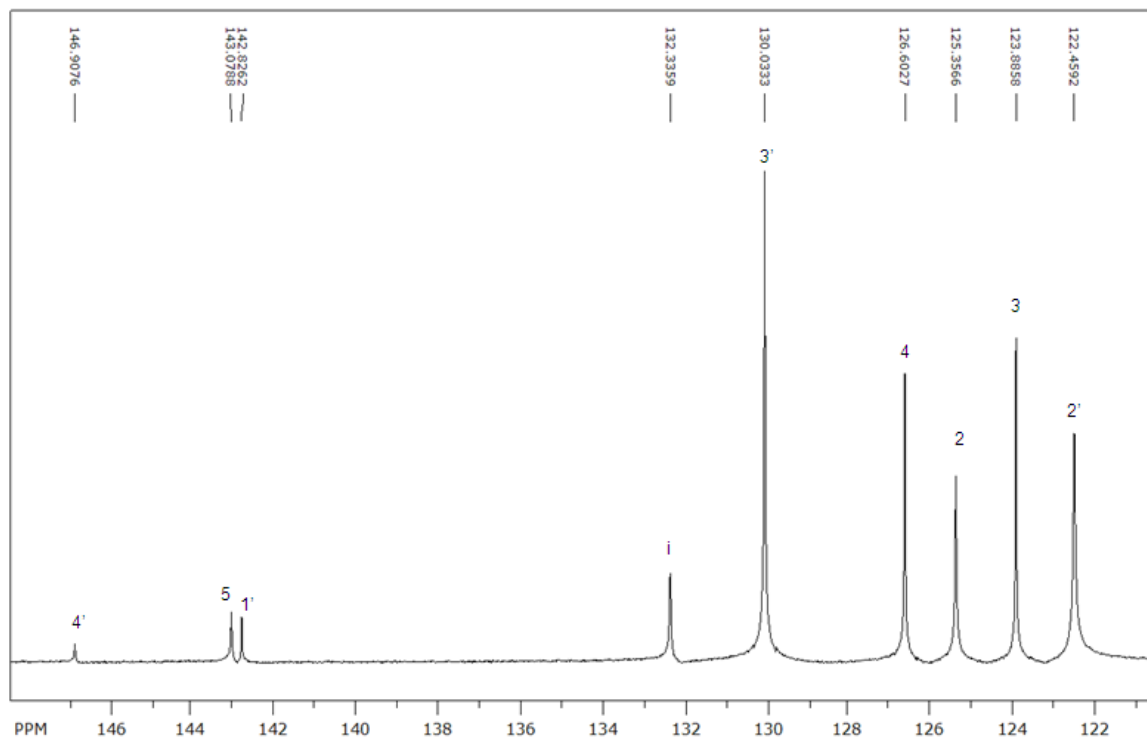


Estructura del compuesto B-24, (*E*) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-2-fenilhidracina.

En este otro espectro podemos observar en 153.10 ppm una señal pequeña asignada al C5, en 151.10 ppm otra señal pequeña asignada al C4'', en 144.85 ppm una señal más pequeña asignada al C2, en 135.97 ppm una señal pequeña asignada al C1', en 129.11 ppm una señal intensa asignada al C3', en 126.25 una señal intensa asignada al C1, en 124.28 ppm una señal intensa asignada al C3'', en 123.81 ppm una señal intensa asignada al C2'', en 119.73 ppm una señal pequeña asignada al C4', en 113.24 ppm otra señal pequeña asignada al C1'', en 112.37 ppm una

señal media asignada al C2', en 111.80 ppm una señal pequeña asignada al C4 y en 111.02 ppm otra señal pequeña asignada al C3.

D-24

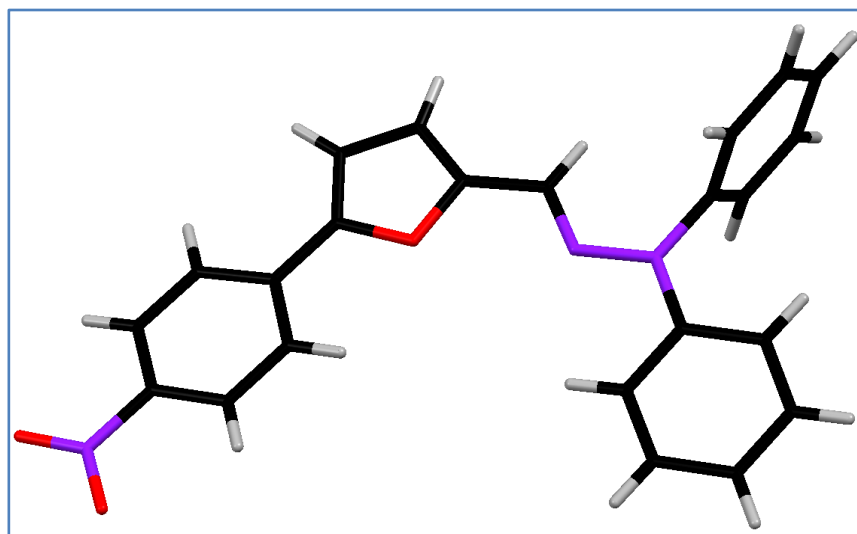


Estructura del compuesto D-24, (1*E*,2*E*)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)hidracina.

En este espectro podemos observar en 146.90 ppm una señal pequeña asignada al C4', en 143.07 ppm otra señal pequeña asignada al C5, en 144.82 ppm una señal más pequeña asignada al C1', en 132.33 ppm una señal pequeña asignada al Ci, en 130.03 ppm una señal intensa asignada al C3', en 126.25 una señal intensa asignada al Ci, en 126.60 ppm una señal intensa asignada al C4, en 125.35 ppm una señal intensa asignada al C2, en 123.88 ppm una señal pequeña asignada al C3, en 122.45 ppm otra señal pequeña asignada al C2'.

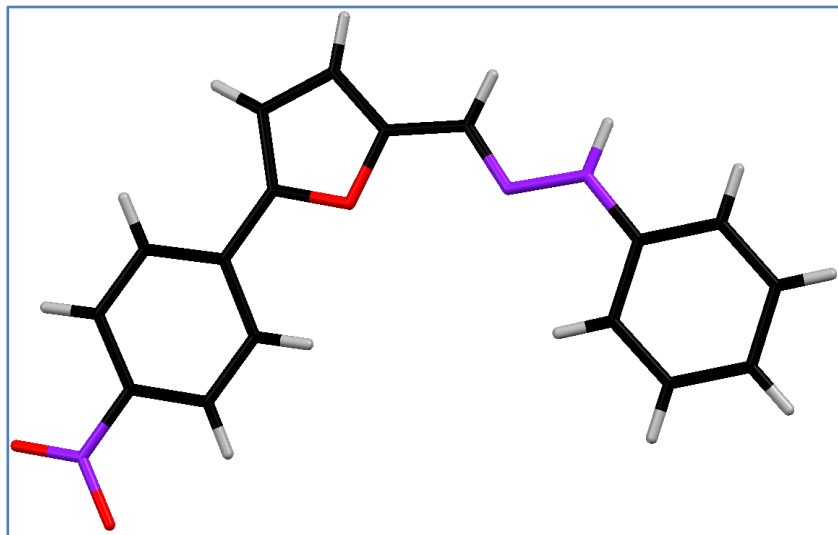
Caracterización por Difracción de rayos X

A-24



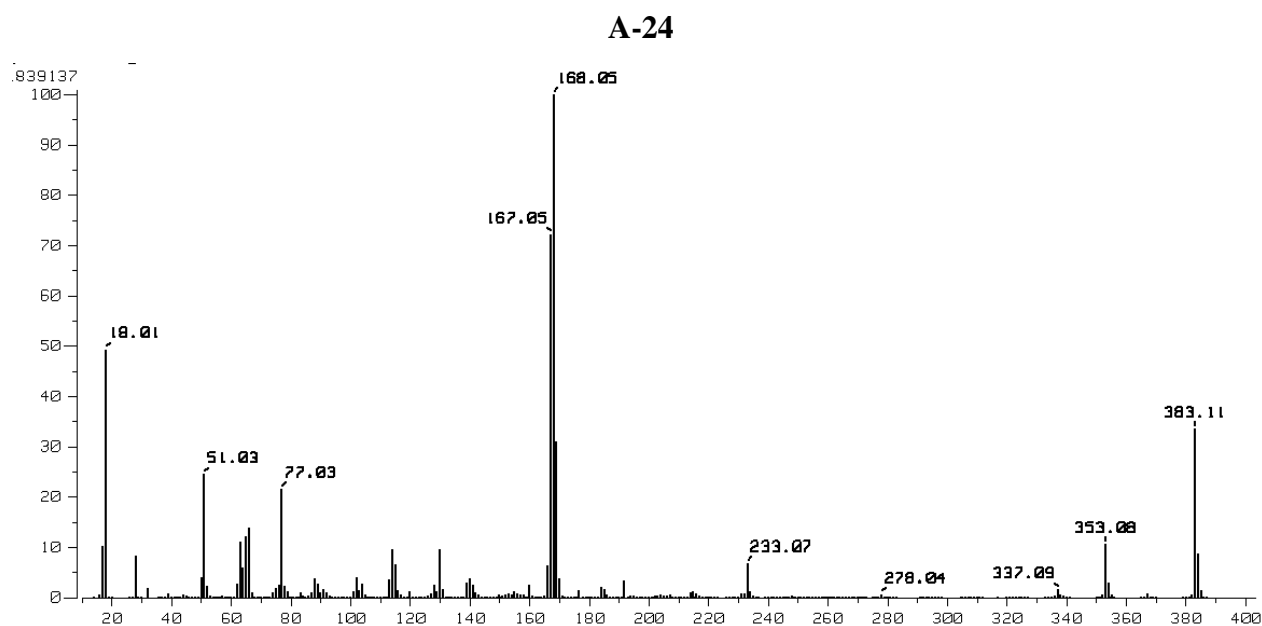
Espectro de rayos X del compuesto A-24

Nombre:			
(E)-2-((5-(4-nitrofenil) furan-2-il) metileno)-1,1-difenilhidracina			
Aspecto físico: cristales rojos peso molecular: 383 g/mol	Rendimiento: 78% a 25 ° C	Punto de fusión: 163-165 ° C	UV λ_{\max} = 415 nm EM-IE:m / z = 383 M ⁺
<p>RMN ¹H (CD₃COCD₃ 400MHz δ (ppm)) (δ / ppm, J / Hz): 8,23 (d, 2H, C3', J = 8,88), 7,80 (d, 2H, C2' J = 8,88), 7,46 (dd, 4H, C3''), 7,22, (m, 6H, C2', C4'), 7,06 (s, 1H, C = N), 6,91 (d, 1H, C4), 6,64 (d, 1H, C3)</p>			
<p>RMN ¹³C (CD₃COCD₃ 400MHz δ (ppm): (δ / ppm): 153,49 (C4), 151,16(C5), 146.14 (C2), 142.87 (C1), 135.98 (C1'), 129.93 (C3''), 125.06 (C2''), 124.84 (C = N), 124.35 (C3), 123.75 (C2), 122.43 (C4''), 111.27 (C4), 110.76 (C3)</p>			

B-24**Espectro de rayos X del compuesto B-24**

Nombre:			
<i>(E)</i> -1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-2-fenilhidracina			
Aspecto físico: Cristales color vino Peso molecular: 307 g/mol	Rendimiento: 75% a 25 ° C	Punto de fusión: 175-176 ° C	UV $\lambda_{\max} = 419 \text{ nm}$ EM-IE:m / z = 307 M ⁺
RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ 400MHz δ (ppm): (δ / ppm, J / Hz): 9,54 (s, 1H, NH), 8,25 (td, 2H, C3''), 7,93 (td, 2H, C2''), 7,78 (s, 1H, C = N), 7,25 (dd, 2H, C3'), 7,19 (d, 1H, 4'), 7,15 (dd, 2H, C2'), 6,82 (td, 1H, C4), 6,77 (d, 1H, C3)			
RMN ¹³ C (CD ₃ COCD ₃ 400MHz δ (ppm): (δ / ppm): 153,10 (C5), 151,10 (C4'), 144,86 (C2), 135,97 (C1'), 129,11 (C3'), 126,26 (C = N), 124,29 (C3''), 123,82 (C2''), 119,73 (C4''), 113,25 (C1''), 112,37 (C2''), 111,81 (C4), 111,02 (C3)			

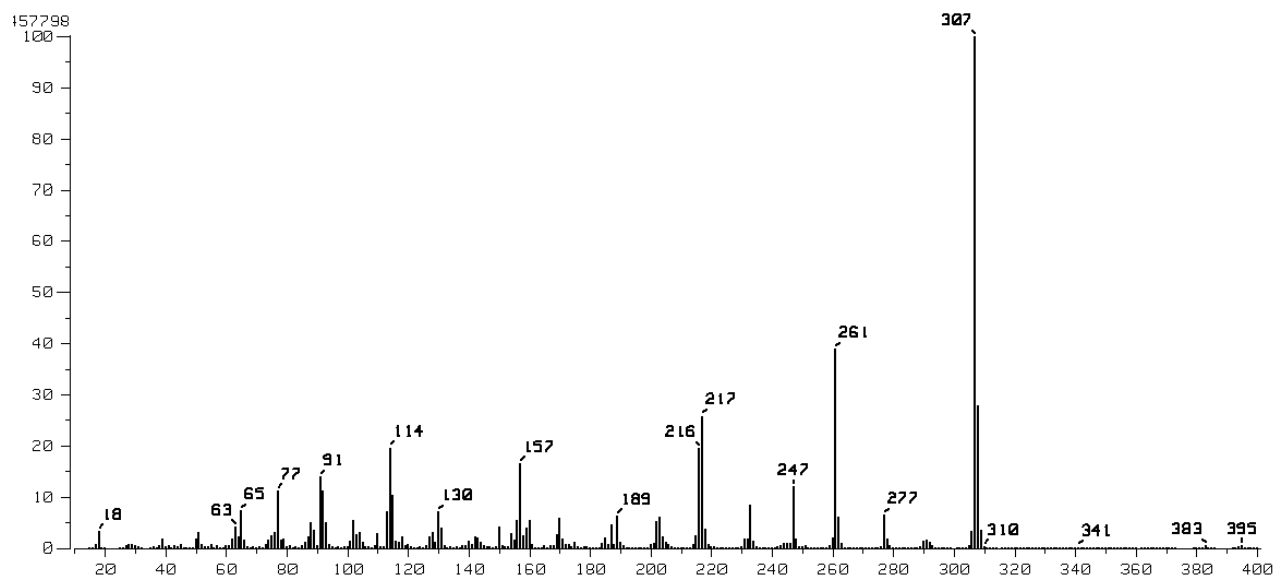
Caracterización por Espectrometría de masas



Espectro de masas del compuesto A-24

El espectro de masas del compuesto A-24, (*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-1,1-difenilhidracina, da lugar a dos fragmentos característicos, siendo el de mayor intensidad el de 383.11 m/z M^+ , y con menor intensidad el fragmento de 168.05 m/z.

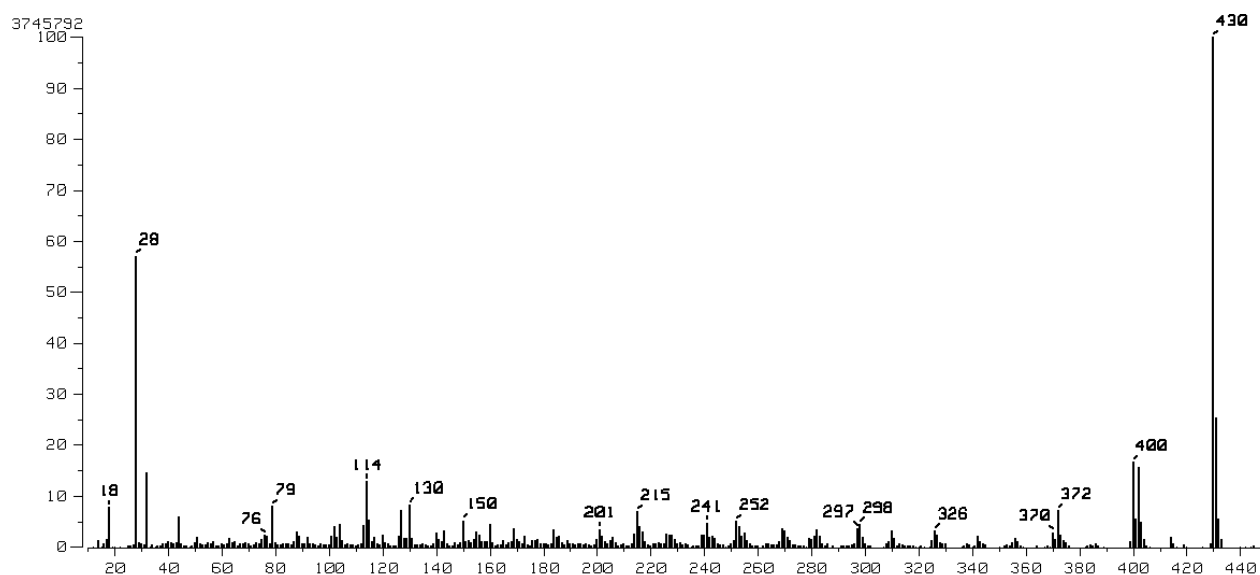
B-24



Espectro de masas del compuesto B-24

El espectro de masas del compuesto B-24, (*E*) 1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metilen)-2-fenilhidracina, da lugar a dos fragmentos característicos, siendo el de mayor intensidad el de 307 m/z M^+ , y con menor intensidad el fragmento de 261 m/z.

D-24



Espectro de masas del compuesto D-24

El espectro de masas del compuesto D-24, (1E,2E)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina, da lugar a dos fragmentos característicos, siendo el de mayor intensidad el de 430 m/z M^+ , y con menor intensidad el fragmento de 28 m/z.

EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD

Reactivos

-Compuestos de hidrazonas a concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL y 0.100 mg/mL para linfocitos y 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M para las líneas celulares HTB-38 cáncer de colon, HTB-17 cáncer de pulmón, MOLT-4 leucemia linfoblástica aguda, MCF-7 cáncer de mama.

-Ficol

-Sangre

-Azul de tripano (colorante azoico) 0.4%

-Medio suplementado (10% suero fetal bovino, 1% antibiótico y antimicótico)

-DMSO, PBS

Preparación de soluciones

Se preparó un stock de 1mg/mL de los compuestos de hidrazonas con DMSO.

CÁLCULOS

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \qquad V_1 = V_2 C_2 / C_1$$

1. $V_1 = (200\mu\text{L}) (0.5\text{mg/mL}) / 1\text{mg/mL} = 100\mu\text{L}$

2. $V_1 = (200\mu\text{L}) (0.250\text{mg/mL}) / 1\text{mg/mL} = 50\mu\text{L}$

3. $V_1 = (200\mu\text{L}) (0.100\text{mg/mL}) / 1\text{mg/mL} = 20\mu\text{L}$



Figura 10. Preparación de disoluciones.

Se colocó 1 mg de la hidrazona correspondiente en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se añadió 1 mL de DMSO para así preparar el stock de cada uno de los 3 compuestos.

Seguido de esto, se prepararon volúmenes de 200 μ L con concentraciones de 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL y 0.100 mg/mL.

Anteriormente, se realizaron las pruebas de solubilidad de dichos compuestos en dos medios PBS y DMSO respectivamente, la mayoría de los compuestos analizados resultaron ser solubles en DMSO, por lo tanto el disolvente elegido fue el DMSO. Una vez preparadas dichas soluciones fueron almacenadas en el refrigerador.

Separación de células

Paso 1

Se colocaron 5 mL de ficol dentro de un tubo cónico de 15 mL utilizando una micropipeta de 1000 μ L.

Paso 2

Se añadió a este mismo tubo 5 mL de sangre humana de un paciente sano.

Nota: La sangre fue adicionada por la pared del tubo para así evitar el rompimiento del gradiente (fases), de igual forma se añadió con la micropipeta de 1000 μ L cambiando solo la punta esterilizada por una nueva.

Paso 3

A continuación, dicho tubo se colocó dentro de la Centrifuga Hamilton Bell (Van guardV6500) durante 35 minutos aproximadamente.



Figura 11. Centrifugación de sangre.

Paso 4

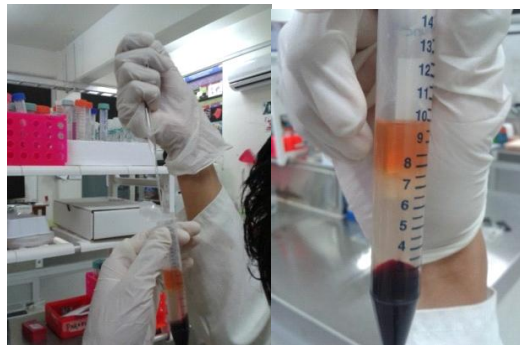


Figura 12. Separación de fases de la sangre.

Después se extrajeron los leucocitos de este mismo tubo con ayuda de una pipeta Pasteur y una goma.

Observación: El tubo presentaba 3 colores perfectamente marcados que son los siguientes: Amarillo en la parte superior (suero), blanco en el centro (zona de blancos) y rojo en la parte inferior (plasma). Los leucocitos extraídos se tomaron de la parte superior de la zona de blancos.

Paso 5

Posteriormente, los leucocitos extraídos del tubo fueron depositados en un nuevo tubo e introducidos en un contenedor para transportarlo y evitar contaminaciones.

Paso 6

Posteriormente, se llevaron al cuarto de cultivo de tejidos para iniciar el proceso.



Figura 13. Gabinete de bioseguridad.

Observación: Se atemperaron las células en el gabinete de bioseguridad y se encendió la luz UV del cuarto de cultivo para mantener estéril el ambiente durante 20 minutos aproximadamente.

Inicio de cultivos

Paso 1

Se colocaron los leucocitos dentro de una caja de cultivo, la cual poseía un tapón con un filtro para evitar algún contaminante.

Paso 2

Primero, este medio se colocó en un baño de agua a 37 grados para poder usarse.

Se añadieron 10 mL de medio suplementado a la caja de cultivo con ayuda del pipeteador automático y una de las pipetas estériles de vidrio.



Figura 14. Conteo celular.

Nota: El medio suplementado se encontraba congelado, para evitar la desnaturalización de las proteínas que contiene dicho medio y por lo tanto dejaría de funcionar como tal.

Observación: La pipeta estéril siempre debe encontrarse dentro del espacio estéril del gabinete de bioseguridad para evitar su contaminación.

Paso 3

Después de haber realizado todo este trabajo dentro del gabinete de bioseguridad, se observaron las células en el microscopio invertido para conocer el cultivo antes del crecimiento celular.

Paso 4

Se colocó la caja de cultivo dentro del gabinete de incubación, el cual se encontraba bajo atmosfera de CO₂.



Figura 15. Gabinete de incubación-

Nota: Esta incubación tuvo una duración de 24 horas.

Conteo de células

Paso 1

Se tomó la caja de cultivo del gabinete de incubación realizando un movimiento circular para homogenizar el contenido del cultivo.

Paso 2

Se colocaron 50 μL de azul de tripano y 50 μL de cultivo celular en un tubo cónico pequeño y se homogenizó la mezcla.

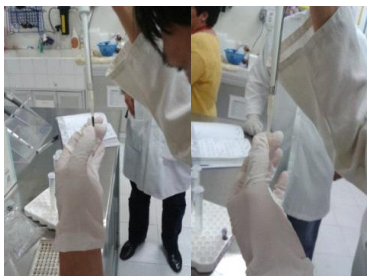


Figura 16. Preparación de cultivo celular con azul de tripano.

Paso 3

Posteriormente, se colocaron 20 μL de dicha mezcla en la cámara de Neubauer hasta llenarla completamente. Hay que subrayar que el llenado de la cámara se debe realizar cuando la cámara ya se encuentre sobre la superficie de observación del microscopio.

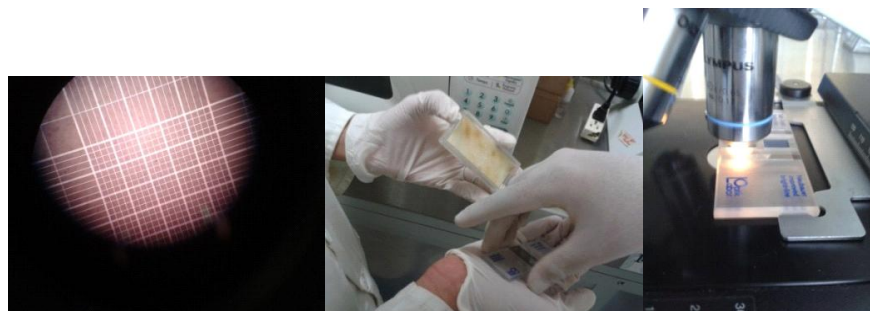


Figura 17. Llenado de cámara de Neubauer.

Finalmente una vez llenada la cámara se observa al microscopio para el conteo de células.

- Célula que debe ser contada
- Célula que no debe ser contada

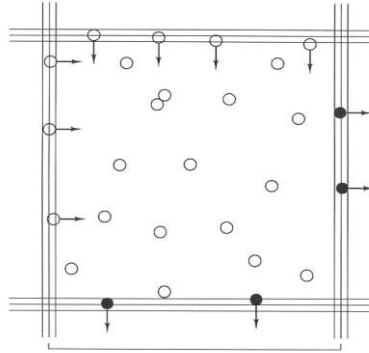


Diagrama que indica las células que deben ser contadas

Observación: Las células vivas se observaban circulares con el centro transparente, las muertas de la misma forma con la diferencia de que tienen el centro en color azul (debido a la presencia del azul de tripano).

Tratamiento

Paso 1

Para probar la citotoxicidad de las hidrazonas, éstas se atemperaron con un baño a 37 grados para su posterior uso.

Paso 2

Se destapó la placa de 96 pozos y se comenzó a llenar con el cultivo de células en volúmenes de 14 μL .



Figura 18. Llenado de pozos para el tratamiento.

Paso 3

Posteriormente, se colocaron cada una de las soluciones preparadas (0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL y 0.100 mg/mL) con estas concentraciones de los compuestos de hidrazona con volúmenes de 186 μL en cada pozo, que ya contenía los 14 μL de cultivo celular, para así, obtener un volumen total de 200 μL por pozo.



Figura 19. Cierre de caja de cultivo.

Nota: Esta relación de volúmenes se obtuvo de la siguiente manera:

Número Total de células = (número de células) (2) (FC) (V)

2= proporción de dilución

V= volumen total de cada pozo (200 μ L)

FC= factor de corrección

Número total de células= (110 células) (2) (10000) (10mL) = 22000000 células totales

Ya que el volumen total de sangre y ficol fue de 1mL entonces se realizó esta relación:

10mL.....22000000

1m L.....X= 2200000

Después se realizó el siguiente cálculo:

Si en 10 mL hay 22, 000,000 células entonces, para 30,000 células se requieren:

0.014 mL = 14 μ L de cultivo celular.

Después se realizó el siguiente cálculo:

Si en 10 mL hay 22, 000,000 células entonces, para 30,000 células se requieren:

0.014 mL = 14 μ L de cultivo celular.

Antes del tratamiento se realizó un conteo celular para verificar la población de células, el cual nos arrojó un total de 110 células por los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

Observación: Cada vez que se utilizaba un compuesto a una concentración determinada la punta de la micropipeta era reemplazada por una nueva, realizando esta operación dentro de la campana de bioseguridad.

Paso 4

Una vez terminado el llenado de los pozos de la placa se colocó dentro del gabinete de incubación con las mismas condiciones del cultivo de las células, arribaindicadas.

Observación: Lo antes mencionado se realizó con el objetivo de observar el efecto de las hidrazonas dentro del cultivo celular, para lo cual se dejaron actuar durante 24 horas para su posterior conteo.

Para poder llevar un control del número de células vivas después de añadir las hidrazonas, es decir para observar el efecto de citotoxicidad de las hidrazonas en el cultivo celular, se añadieron en tres pozos de la misma placa, solo el cultivo celular con medio suplementado.

Para las líneas celulares cancerosas MOLT-4, HTB-38, HTB-177, MCF-7, se partió de 1.5-2 millones de células por mililitro en un volumen de 10mL. de cultivo, para su evaluación citotóxica, se aplicó de igual forma el procedimiento antes mencionado, a excepción de la separación de células con ficol. Este reactivo tiene la característica de separar las fases de la sangre, pero como se contaba con las líneas celulares aisladas, no fue necesaria su utilización, por último, hay que subrayar que el cultivo de las células cancerosas se realizó directo del vial a la caja de cultivo.

RESULTADOS

Los resultados del conteo celular después del tratamiento en linfocitos, se muestran a continuación en la tabla 4:

Compuesto	Promedio de células	
	AT ⁺	AT ⁻
Control 1	11	141
Control 2	14	123
Control 3	13	153
A24 (0.100 mg/mL)	48	12
A24 (0.250 mg/mL)	37	22
A24 (0.5 mg/mL)	41	11
A24 (1 mg/mL)	32	21
D24 (0.100 mg/mL)	33	20
D24 (0.250 mg/mL)	23	74
D24 (0.5 mg/mL)	13	22
D24 (1 mg/mL)	14	63
B24 (0.100 mg/mL)	18	32
B24 (0.250 mg/mL)	16	31
B24 (0.5 mg/mL)	25	43
B24 (1 mg/mL)	39	21

AT⁺= Células muertas

AT⁻= Células vivas

Como se puede observar en la tabla 1 los compuestos con la menor toxicidad en linfocitos resultaron ser:

D24 (0.250mg/m L)

D24 (1mg/m L)

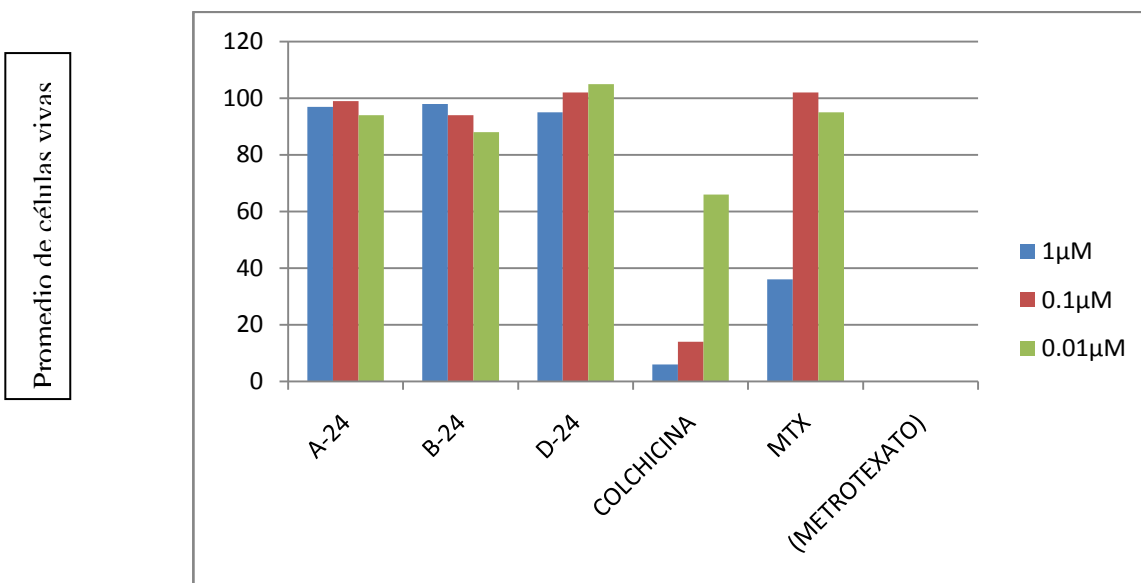
B24 (0.5mg/m L)

En las siguientes tablas podemos observar el promedio de células vivas después del tratamiento en las líneas celulares cancerosas MOLT-4, HTB-38, HTB-177, MCF-7. Se usaron Colchicina y Metrotexato que son medicamentos auxiliares en el tratamiento del cáncer como controles para poder hacer una buena comparación además de tener una referencia en cuanto a la cantidad de células vivas resultantes.

Línea celular HTB-38

COMPUESTO	Promedio de células vivas		
	1 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M
A-24	97	99	94
B-24	98	94	88
D-24	95	102	105
COLCHICINA	6	14	66
MTX (METROTEXATO)	36	102	95

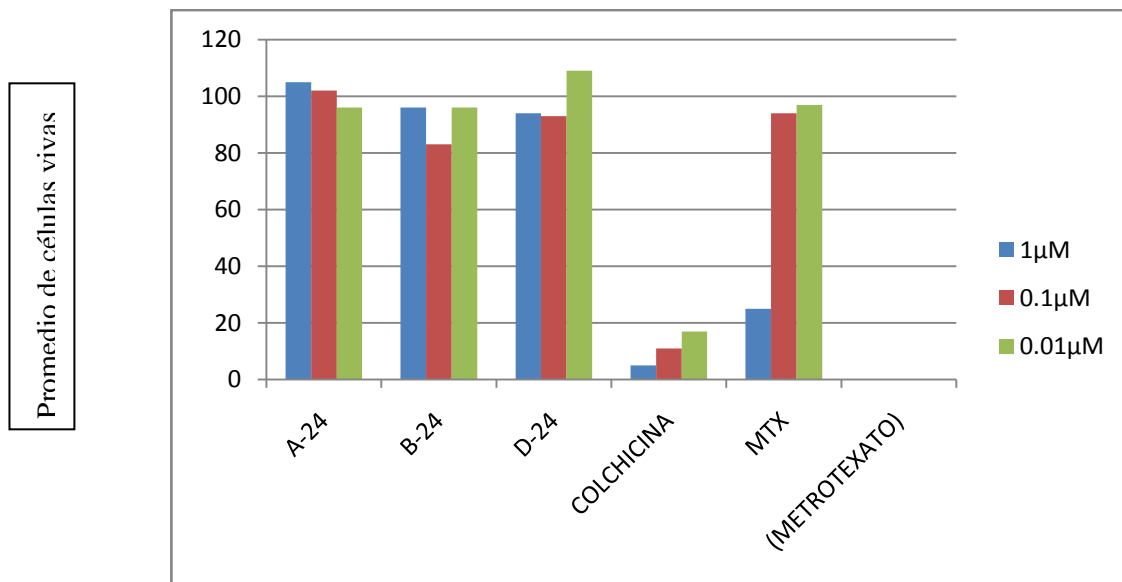
Gráfica 1. Comportamiento de los compuestos en la línea celular cancerosa HTB-38



Línea celular HTB-177

Promedio de células vivas			
COMPUESTO	1 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M
A-24	105	102	96
B-24	96	83	96
D-24	94	93	109
COLCHICINA	5	11	17
MTX (METROTEXATO)	25	94	97

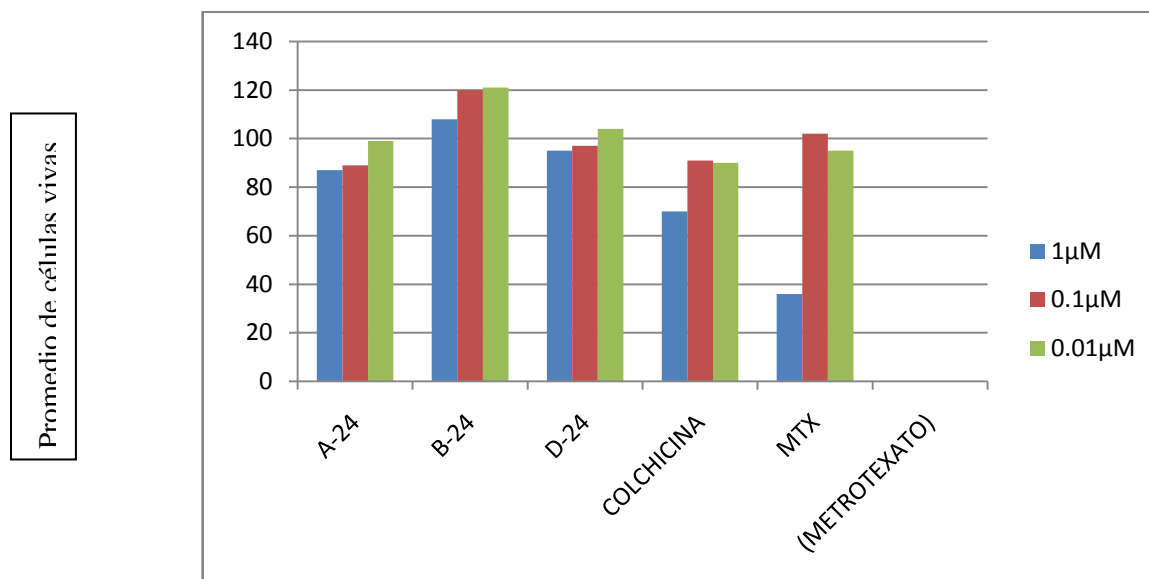
Gráfica 2. Comportamiento de los compuestos en la línea celular cancerosa HTB-177



Línea celular MOLT-4

Promedio de células vivas			
COMPUESTO	1 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M
A-24	87	89	99
B-24	108	120	121
D-24	95	97	104
COLCHICINA	70	91	90
MTX (METROTEXATO)	36	102	95

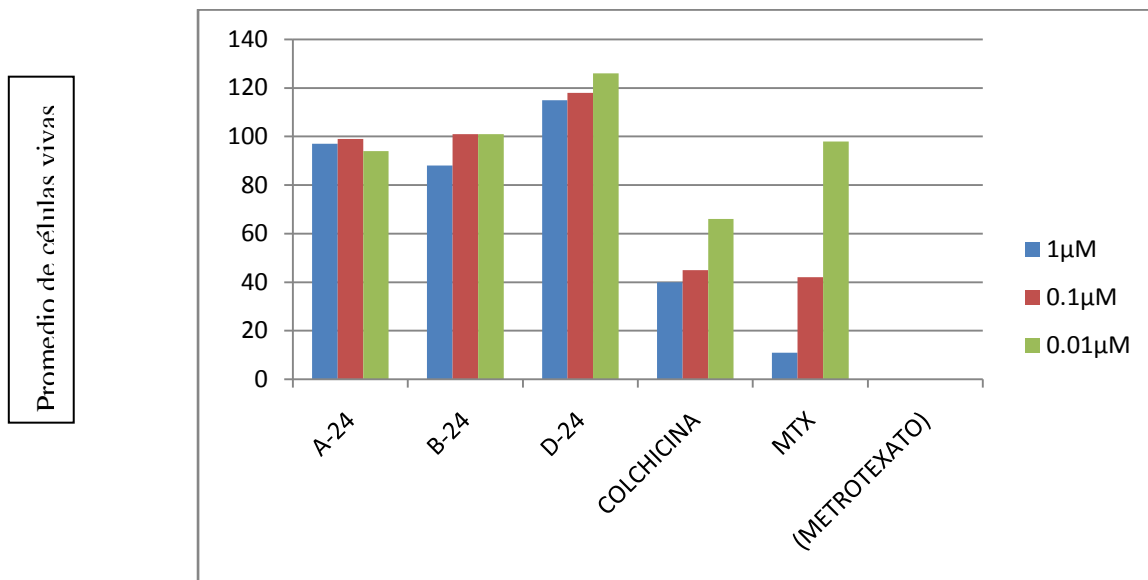
Gráfica 3. Comportamiento de los compuestos en la línea celular cancerosa MOLT-4



Línea celular MCF-7

Promedio de células vivas			
COMPUESTO	1 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M
A-24	97	99	94
B-24	88	101	101
D-24	115	118	126
COLCHICINA	40	45	66
MTX (METROTEXATO)	11	42	98

Gráfica 4. Comportamiento de los compuestos en la línea celular cancerosa MCF-7



Por otra parte, el compuesto D-24 con concentración de $0.01\mu\text{M}$ resultó ser en las cuatro líneas celulares el compuesto menos citotóxico de los utilizados en el tratamiento, ya que dejó una cantidad elevada de células vivas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se puede apreciar, el compuesto D-24 resultó ser el menos citotóxico de los tres compuestos en las pruebas realizadas en linfocitos. La particularidad que presenta dicho compuesto es una doble adición de 5-(4-nitrofenil) furan-2-carbaldehído en ambos lados de la hidracina a diferencia de los otros dos compuestos donde la adición de 5-(4-nitrofenil) furan-2-carbaldehído solo se hace de un lado del compuesto de hidracina, otra particularidad del compuesto D-24 es la ausencia de grupos fenilos en la estructura de la hidracina y su gran voluminosidad en comparación con los compuestos A-24 y B-24.

Por su parte, en los resultados arrojados en el tratamiento de las líneas celulares cancerosas MOLT-4, HTB-38, HTB-177, MCF-7, se pudo apreciar que el compuesto D-24 en concentración de $0.01\mu\text{M}$ resultó ser el menos citotóxico ya que dejó la mayor cantidad de células vivas en dichas líneas celulares cancerosas, sin embargo, el propósito de los fármacos auxiliares para el tratamiento del cáncer es eliminar a las células infectadas, este propósito fue cumplido bien por el compuesto B-24 en concentración de $0.01\mu\text{M}$ para las líneas celulares cancerosas HTB-38, HTB-177, el cual dejó una cantidad menor de células vivas en las líneas celulares cancerosas. Por parte, del compuesto A-24 en concentración de $0.01\mu\text{M}$ para las líneas celulares cancerosas MOLT-4 y MCF-7, de la misma forma, dejó una cantidad menor de células vivas en comparación con los otros dos compuestos probados B-24 y D-24 respectivamente.

Se puede observar que en general el compuesto D-24 resultó ser el menos citotóxico durante el tratamiento, ya que en los linfocitos, como en las líneas celulares cancerosas dejaron un gran número de células vivas, mientras que el compuesto A-24 en concentración de $0.01\mu\text{M}$ resultó ser el más citotóxico en el tratamiento de los linfocitos al igual que en dos de las líneas celulares cancerosas MOLT-4 y MCF-7. Sin embargo, resulta tener un buen uso el compuesto A24, ya que eliminó de la mejor manera a las células infectadas de estas dos líneas celulares.

Dichos resultados pueden ser atribuidos a la naturaleza química de los compuestos, su estructura, su tamaño y su concentración.

Una de las razones más significativas del por qué estos compuestos dan estos resultados podría ser la participación del grupo azometino, el cual se encuentra presente en las tres estructuras, y también está de acuerdo con la literatura consultada para la realización de este trabajo.

CONCLUSIONES

1.- Se efectuó la síntesis de 3 hidrazonas a partir de aldehídos derivados del furano:

I. A24, (*E*)-2-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-1,1-difenilhidracina

II. B-24, (*E*)-1-((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)-2-fenilhidracina

III. D-24, (1*E*,2*E*)-1,2-bis((5-(4-nitrofenil)furan-2-il)metileno)hidracina

- 1) Se establecieron las condiciones de reacción para la obtención de las hidrazonas y se obtuvo un rendimiento elevado en para los tres compuestos.
- 2) Los compuestos obtenidos fueron totalmente caracterizados mediante Espectrometría de masas y estudios espectroscópicos de UV, IR, RMN de ^1H y ^{13}C , y Difracción de Rayos-X.
- 3) La química verde tuvo un papel importante en la elaboración de los compuestos debido a que se aplicaron algunos de sus principios con el fin de disminuir la contaminación y de esta forma ser amigables con el medio ambiente.
- 4) Se realizaron las correspondientes evaluaciones citotóxicas para los tres compuestos sintetizados en células sanas (linfocitos).
- 5) Se realizaron y analizaron las evaluaciones citotóxicas de los tres compuestos en las líneas celulares cancerosas: HTB-38 cáncer de colon, HTB-17cáncer de pulmón, MOLT-4 leucemia linfoblástica aguda, MCF-7 cáncer de mama.

GLOSARIO

-Ficol: es un polisacárido hidrofílico altamente ramificado, y es soluble en soluciones acuosas. Marca registrada propiedad de la empresa GE Healthcare.

-PBS: es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio.

-Metrotexato: es un fármaco usado en el tratamiento de cánceres y enfermedades autoinmunes.

-Colchicina: es un fármaco antimitótico que detiene o inhibe la división celular en metafase o en anafase.

-Azul de tripano: es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas.

BIBLIOGRAFÍA

1. P. Vicini, F. Zani, P. Cozzini, I. Doytchinova; *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, *37*, 553-564.
2. T. H. Lowry, K. S Richardson; *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, Harper and Row, **1976**, 432-433.
3. Corey E. J., Enders D. *Applications of N, N-dimethyl hydrazones to synthesis. Use in efficient, positionally and stereochemically selective C=C bond formation, oxidative hydrolysis of carbonyl compounds*. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *17*, 3-6.
4. Corey E. J., Enders D. *Synthetic routes to polyfunctional molecules via metalated N, N-dimethyl hydrazones*. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *17*, 11-4.
5. Belskaya N. P., Dehaen W, Bakulev V.A. *Synthesis and properties of hydrazones bearing amide, thioamide and amidine functions*. *ArchOrgChem* **2010**, *1*, 275-332.
6. Xavier A. J., Thakur M, Marie J.M. *Synthesis and spectral characterization of hydrazone based 14-membered octaazamacrocyclic Ni (II) complexes*. *J Chem Pharm Res.*, **2012**, *4*, 986-90.
7. Banerjee S, Mondal S, Chakraborty W, Sen S, Gachhui R, Butcher R. J., et al. *Syntheses, X-ray crystal structures, DNA binding, oxidative cleavage and antimicrobial studies of two Cu (II) hydrazone complex*. *Polyhedron* **2009**, *28*, 2785-93.
8. Flora Acuña Arias, *Química Orgánica*, editorial EUNED, San José Costa Rica, 1ª edición, **2006**, 167-168.

9. McLeod, H.L. *Cancer pharmacogenomics: Early promise, but concerted effort needed*. *Science*, **2013**, 1563-1566.
10. Kreuzaler, P. & Watson, C.J. *Killing a cancer: what are the alternatives?*, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 411-424.
11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
12. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
13. I. Caleta, M. Krali, M. Marjanovic, B. Bertosa, S. Tomic, G. Pavilovic, K. Pavelic, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1744-1756.
14. S. Rollas, N. Gulerman, H. Erdeniz II, *Fármaco*, 2002, *57*, 171-174.
15. F. D. Popp; *Eur. J. Med. Chem.*, **1989**, *24*, 313-316.
16. S. C. Parrinib, E. J. Barreiro; *J. Med. Chem.*, **1988**, *33*, 189-199.
17. P. M. Virginie L., Christian S. and Philippe G.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, *16*, 51-55.
18. Conor R. C., Marvin S., Joseph N.N.; *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2002**, *19*, 227-231.
19. Sztanke, K., Pasterhak, K., Rzymowska, J., Sztanke, M. and Kandefor-Szerszen, M.; *Eur. J. Med. Chem.*, **1997**, *43*, 404-419.
20. G.I. Solyanik, *Experimental Oncology*, **2011**, *32*, 181-185.

21. S. Vijayaraghavalu, C. Peetla, S. Lu, V. Labhasetwar, *Molecular Pharmaceutics*, **2012**, *9*, 2730-2742.
22. Dandawate P, Khan E, Padhye S, Gaba H, Sinha S, Deshpande J, et al. *Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbaginhydrazones against breast cancer cells. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3104-3108.
23. Mohareb R. M., Al-Omran F. *Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide-hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their Cytotoxicity evaluations. Steroids*, **2012**, *77*, 1551-1559.
24. Aydın S, Kaushik-Basu N, Arora P, Basu A, Nichols BD, Talele TT, et al. *Microwave assisted synthesis of some novel flurbiprofenhydrazidehydrazones as anti-HCV NS5B and anticancer agents. Marmara Pharm J*, **2013**, *17*, 26-34.
25. Cui Z, Li Y, Ling Y, Huang J, Cui J, Wang R, et al. *New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5576-5584.
26. Al-Said M.S., Bashandy M.S., Al-Qasoumi S.I., Ghorab M.M. *Antibreast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 137-141.
27. Liu T, Sun C, Xing X, Jing L, Tan R, Luo Y, et al. *Synthesis and evaluation of 2-[2-(phenylthiomethyl)1Hbenzo[d]imidazol-1-yl]acetohydrazide derivatives as antitumor agents. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3122-3125.
28. Vogel S, Kaufmann D, Pojarová M, Müller C, Pfaller T, Kühne S, et al. *Aroylhydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6436-6447.

- 29.** Xu G, Abad M. C., Connolly P. J., Neeper M. P., Struble G. T., Springer B. A., et al. *4-Amino-6-arylamino-pyrimidine-5-carbaldehyde hydrazones as potent ErbB-2/EGFR dual kinase inhibitors. Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2008**, *18*, 4615-4619
- 30.** J.L. Buss, B.T. Greene, J. Turner, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1623.
- 31.** G. Tennant. "*Comprehensive Organic Chemistry*", (ed. D. Barton and W.D. Ollis), **1996**, 25-77.
- 32.** McLeod, H.L. *Cancer pharmacogenomics, Science*, **2013**. *339*, 1563-1566.
- 33.** Kreuzaler, P. & Watson, C.J. *Killing a cancer, Nat.Rev. Cancer*, **2012**. *12*, 411-424.
- 34.** A. Herraiz. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*, Editorial Elsevier, Segunda edición **2006**.
- 35.** A. K. Abbas, A. H. Lichtman, *Inmunología celular y molecular*. Elsevier. Quinta edición **2004**.
- 36.** A. S. Matlack, *Introduction to Green Chemistry*, Marcel Dekker, **2001**.