



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**REACTIVIDAD DE AZA-CHALCONAS FRENTE A
ACETALES DE *BIS*(TRIMETILSILIL)CETENA:
SÍNTESIS DE LACTONAS MEDIANTE ADICIONES
1,6.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

RIVERA MENDOZA MARTÍN EMILIANO



CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

H. Jurado

Presidente	Dr. Cecilio Álvarez Toledano	Instituto de Química, UNAM
Vocal	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Agustín Palma de la Cruz	Facultad de Química, UNAM
1er. Suplente	Juan Gómez Dueñas	Facultad de Química, UNAM
2do. Suplente	José Oscar Humberto Pérez Díaz	Facultad de Química, UNAM

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 del departamento de Química Inorgánica del Instituto de Química de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Cecilio Álvarez Toledano y la supervisión técnica del Dr. Ricardo Corona Sánchez.

Dr. Cecilio Álvarez Toledano
Tutor del proyecto

Dr. Ricardo Corona Sánchez
Asesor técnico del proyecto

Martin Emiliano Rivera Mendoza
Sustentante

*Dedicado a mis padres, Martin Rivera
y Julia Mendoza, y a mis
hermanos, Diego y Julieta.
Gracias por sus consejos, su apoyo,
su atención y por todo su amor
para conmigo, soy un reflejo de ustedes
y los amo con todo mi corazón.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Instituto de Química.

A mi familia, en especial a mis padres, Martín y Julia, y a mis hermanos, Diego y Julieta, por haberme acompañado en esta gran etapa de mi vida y jamás abandonarme; por su dedicación, esfuerzo, enseñanzas y todo su amor, el cual me han demostrado día tras día y pese a mis fallas, siempre han estado conmigo. Los amo con todo mi corazón y gracias por haberme dado la vida más maravillosa del mundo.

Al proyecto DGAPA-PAPITT IN025618 por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Cecilio Álvarez Toledano, por haberme dado su confianza y brindarme su amistad desde el primer día en que llegue a su laboratorio, por sus consejos y por su gran apoyo incondicional en todo momento, muchas gracias.

Al Dr. Ricardo Corona Sánchez, por brindarme sus conocimientos y su gran asesoría durante la realización de este proyecto y mejorar mi formación profesional.

Al H. Jurado, por sus grandes aportaciones y comentarios para la mejora de este trabajo.

A mis amigos, Erick V., Alberto C., David R., Geovanni G., Miguel B., Demetrio C., Jennyfer A., Jessica A. y Ameyali V., por todas las historias y momentos increíbles que pasamos en la Facultad. Sin ustedes nada hubiera sido igual y el conocerlos ha sido una de las mejores experiencias de mi vida, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas y ser un gran apoyo en esta etapa de mi vida.

A Gisela Abril, por ser mi mejor amiga durante este trayecto de innumerables aventuras, por haberme brindado su amistad y su apoyo, te considero una persona muy especial para mí y gracias por todos los momentos de sonrisas y alegrías que me diste...gracias por ser mi amiga.

A mis amigos del IN4, Ricardo C., Roberto G., Cesar M., Antonio G., Ricardo B., Víctor H., Saulo R., Jazmín D., Andrea R. y Alejandra V., por hacer del laboratorio un lugar muy agradable día con día y hacer más que ciencia, hacer una gran amistad.

ÍNDICE TEMÁTICO

Lista de abreviaturas	8
Compuestos sintetizados	9
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	12
2.1. Lactonas.	12
2.1.1.1. Importancia biológica de las lactonas.	12
2.1.1.2. Síntesis de lactonas.	14
2.2. Acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena.	17
2.2.1.1. Síntesis de acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena.	18
2.2.1.2. Reactividad de acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena.	19
2.3. Cetonas α,β insaturadas.	21
2.4. Reacciones tipo Michael.	23
2.4.1.1. Adiciones 1,6.	24
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	27
4.1. Objetivo general.	27
4.2. Objetivos particulares.	27
5. Resultados y discusión.....	28
5.1. Síntesis de chalconas.	28
5.2. Síntesis de acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena.	29
5.3. Adición de acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena a aza-chalconas activadas.	30
5.3.1.1. Espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C .	31
5.3.1.2. Espectroscopia de IR.	34
5.3.1.3. Espectroscopia de masas.	36

5.4. Propuesta de mecanismo de reacción.	37
5.5. Estudio de las condiciones de reacción.	39
5.6. Síntesis de la serie de lactonas con diferentes acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena.	41
5.7. Pruebas biológicas: ensayo de actividad citotóxica.	42
6. Conclusiones.....	46
7. Metodología experimental.....	47
7.1. Equipo, material, reactivos y disolventes.	47
7.2. Método general para la síntesis de los acetales de <i>bis</i> (trimetilsilil)cetena .	48
7.3. Método general para la síntesis de las chalconas.	48
7.4. Método general para la síntesis de las lactonas.	49
7.4.1.1. Resumen espectroscópico de las lactonas.	50
7.5. Pruebas biológicas: ensayo preliminar de citotoxicidad.	53
7.5.1.1. Determinación del porcentaje de inhibición celular.	53
7.5.1.2. Preparación de líneas celulares.	54
7.5.1.3. Conteo de células viables.	54
7.5.1.4. Ensayo de actividad citotóxica.	55
8. Bibliografía.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

a: Señal ancha

°C: Grados Celsius

δ: Desplazamiento químico

d: Señal doble

c: Señal cuádruple

DART⁺: Análisis directo en tiempo real

J: Constante de acoplamiento

ESI⁺: Ionización por electroespray

EM: Espectrometría de masas

h: Horas

mmol: Milimol

μM: Micromolar

IR: Infrarrojo

LDA: Diisopropilamido de litio

Ph: Fenilo

ppm: Partes por millón

nm: Nanómetros

m: Señal múltiple

m/z: Relación masa / carga

Py: Piridina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

T. A.: Temperatura ambiente

Tf: Grupo trifluorometansulfonilo

Tf₂O: Anhidrido

trifluorometansulfonico

TMS: Grupo trimetilsililo

TMSCI: Clorotrimetilsilano

DMSO: Dimetilsulfóxido

s: Señal simple

NBS: N-bromosuccinimida

mL: Mililitros

t: Señal triple

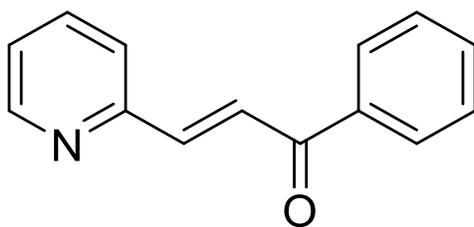
pf: punto de fusión

NCI: Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos.

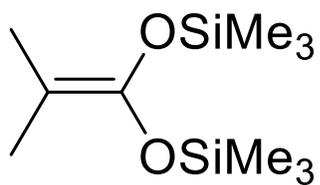
dd: Señal doble de doble

EMAR: EM de alta resolución.

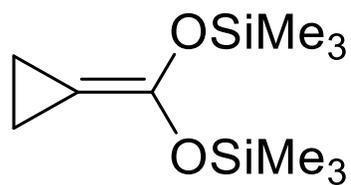
COMPUESTOS SINTETIZADOS



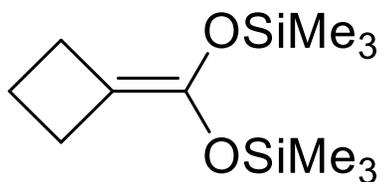
1a



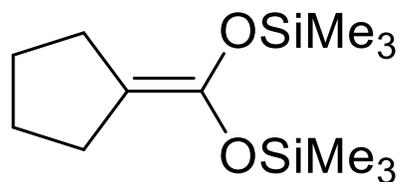
2a



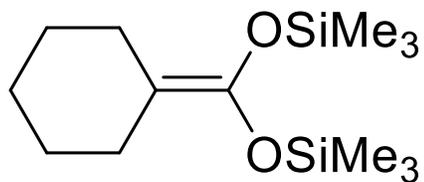
2b



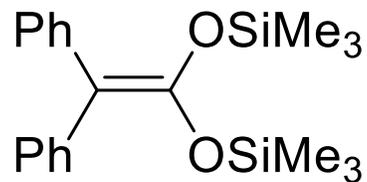
2c



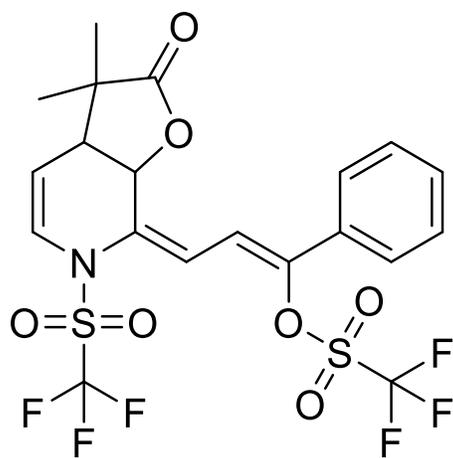
2d



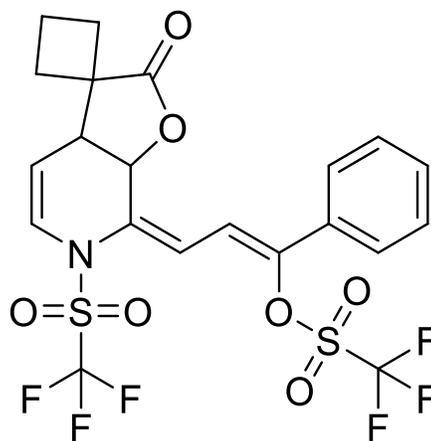
2e



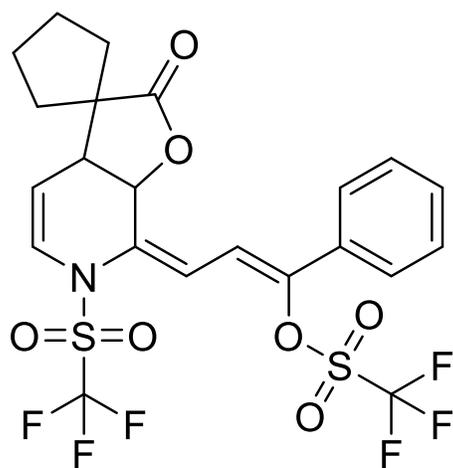
2f



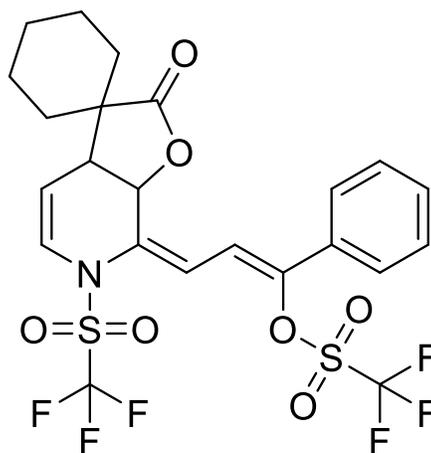
3a



3c



3d



3e

1. Introducción

En este trabajo se presenta la síntesis y la actividad citotóxica de una nueva familia de γ -lactonas preparadas a través de la adición nucleofílica de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena a compuestos α,β -insaturados previamente activados. Dicha reacción involucra como paso clave una reacción de adición 1,6 tipo Michael que se realiza en condiciones suaves de reacción y sin el empleo de catalizadores.

En los antecedentes mostrados en este trabajo, se planteará un marco de referencia con el propósito de darle un contexto a la investigación que se realizó. Se hablará de los aspectos químicos de las lactonas, así como de su reactividad, discutiendo sus métodos de síntesis y haciendo relevancia en su estructura dado que son moléculas que presentan amplias y diversas actividades biológicas.

Asimismo, para los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena, se discutirá sus métodos de síntesis, su reactividad para la formación de enlaces C-C y C-O y su relevancia dentro del grupo de investigación para la síntesis de compuestos tales como γ -lactonas.

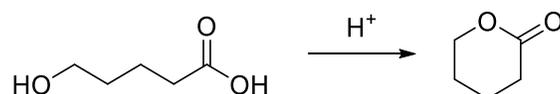
Por último, se hablará sobre las adiciones tipo Michael, haciendo énfasis en las reacciones de adición 1,6, considerando que este trabajo se enfoca en ese tipo de reacciones sin el uso de organocatalizadores y/o metales de transición como se hace comúnmente.

Dentro del análisis y discusión de resultados se abordarán los procesos químicos involucrados en cada uno de los pasos de reacción para los compuestos obtenidos y su debida caracterización espectroscópica. De igual manera, se discutirá acerca de la evaluación de la actividad citotóxica de dichos compuestos mediante ensayos para determinar el porcentaje de inhibición en diversas líneas celulares de cáncer humano.

2. Antecedentes

2.1. Lactonas

Las lactonas son compuestos orgánicos correspondientes a un éster cíclico que normalmente se derivan de la esterificación intramolecular de su correspondiente hidroxiácido (**Esquema 1**).



Esquema 1. Síntesis general de lactonas.

Las lactonas formadas de ácidos alifáticos sin sustitución se nombran reemplazando el prefijo ácido y el sufijo *-oico* del ácido carboxílico, por el sufijo *-ólido* de la lactona indicando la posición del átomo de oxígeno con un número. En nomenclatura común se sustituye la terminación *-ico* del hidroxiácido por *-lactona* indicando mediante una letra griega el átomo de carbono al que iba enlazado el grupo hidroxilo con el que se cierra el anillo. Los sustituyentes se nombran de la misma forma que los ácidos del que derivan. (**Figura 1**).

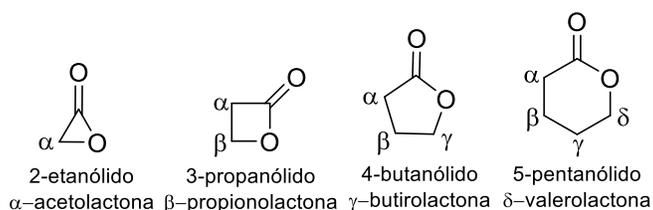


Figura 1. Nomenclatura de lactonas.

2.1.1. Importancia biológica de las lactonas.

Las lactonas se encuentran como subunidades estructurales en una amplia variedad de productos naturales con actividad biológica y son intermediarios para la síntesis de compuestos biológicamente activos y en materiales con propiedades tecnológicas interesantes.¹

Existen lactonas que van desde cuatro hasta 20 miembros dentro de su cadena heterocíclica, sin embargo, las más conocidas son las γ y δ lactonas² ya que contienen anillos 5 y 6 miembros respectivamente y muchas de estas presentan propiedades organolépticas, por ejemplo, la γ -butirolactona y la δ -decanolactona (Figura 2).

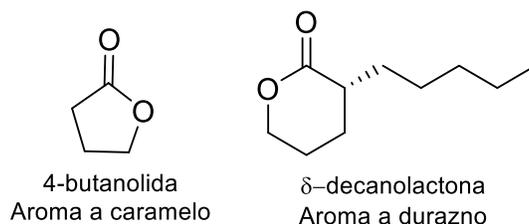


Figura 2. Ejemplos de lactonas con propiedades organolépticas.

De igual manera, existe un conjunto importante de lactonas que son las alquilidenlactonas, las cuales poseen como característica principal un anillo de γ -lactona en su estructura, y en la mayoría de los casos, un grupo α -metileno (Figura 3). Esta clase de compuestos tienen una amplia gama de actividades biológicas, entre las que destacan: actividad antitumoral (vernolepina), antiinflamatoria (helenina), citotóxica (cinaropícrina) y antibacteriana (xantatina).³

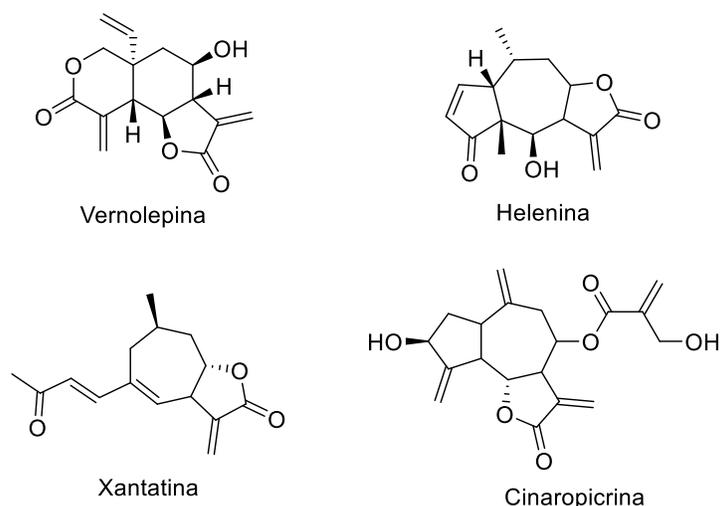


Figura 3. Ejemplos de alquilidenlactonas con actividad biológica.

Otro grupo interesante de lactonas son las denominadas macrocíclicas (Figura 4) las cuales contienen anillos de 12 a 22 miembros. Dichos compuestos han

demostrado tener un interesante perfil biológico al igual que sus análogos de 5 y 6 miembros, como él es caso de la aspergilida-A (actividad citotóxica), la dictiostatina (actividad antitumoral) y la eritromicina-A (actividad antibiótica).⁴

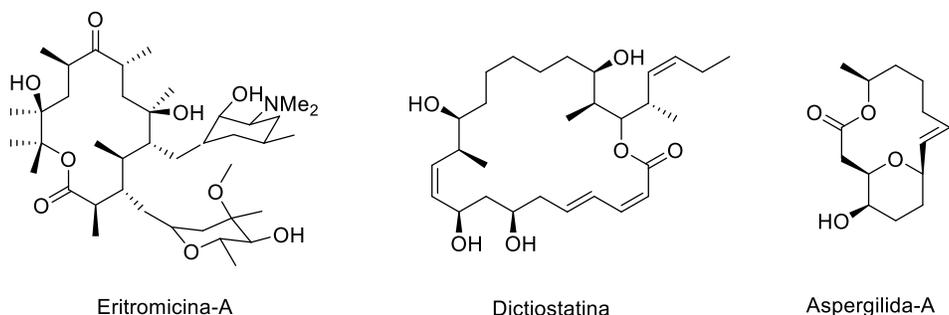


Figura 4. Ejemplos de lactonas macrocíclicas.

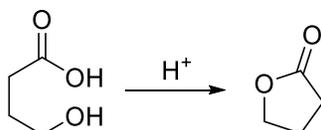
Además, si consideramos a las lactonas desde un punto de vista sintético, estos compuestos son de gran relevancia ya que son susceptibles de experimentar una amplia variedad de reacciones tanto nucleofílicas como electrofílicas, lo cual las convierten en intermediarios versátiles para la obtención de otros compuestos orgánicos de interés los cuales podrían presentar algún perfil biológico interesante.

2.1.2. Síntesis de lactonas

Considerando su alta importancia biológica, en los últimos años se ha prestado gran interés a la búsqueda de nuevas metodologías para la obtención de lactonas. Los métodos más comunes se describen a continuación y se dividen en dos grupos, los métodos por anillaciones y los métodos que involucran una reacción de oxidación.

a) Anillación intramolecular de hidroxiácidos.

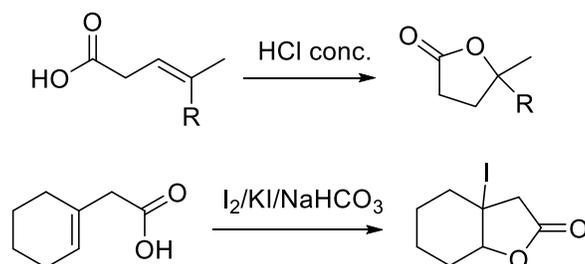
Uno de los métodos más simples para la obtención de lactonas, es a partir de hidroxiácidos, los cuales pueden producir lactonas por una esterificación intramolecular mediante la adición de cantidades catalíticas de ácidos minerales (**Esquema 2**).⁵



Esquema 2. Síntesis de lactonas vía anillación intramolecular de hidroxiacidos.

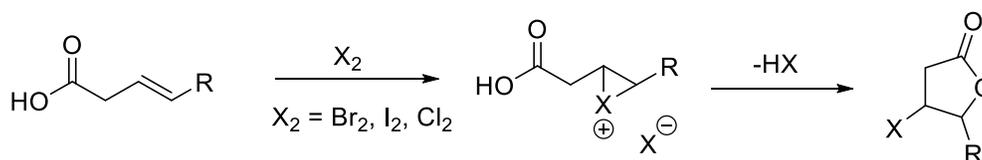
b) Anillación intramolecular de ácidos carboxílicos insaturados.

Otra reacción comúnmente utilizada para obtener lactonas es a partir de ácidos β - δ -insaturados. La reacción ocurre en presencia de ácidos fuertes o por adición electrofílica de halógenos tales como bromo y/o yodo (halolactonización) (**Esquema 3**).⁶



Esquema 3. Síntesis de lactonas vía anillación intramolecular de ácidos carboxílicos insaturados.

La reacción parte de una olefina la cual genera un ion halonio electrofílico, que es abierto intramolecularmente por el ataque nucleofílico del grupo $-OH$ de un ácido carboxílico (**Esquema 4**).⁷



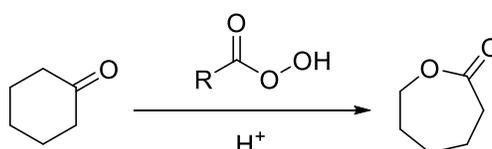
Esquema 4. Síntesis de lactonas mediante reacciones de lactonización con halógenos.

La reacción de lactonización con halógeno requiere del empleo de un ácido o una base ya que, dependiendo de estas condiciones, la reacción puede proceder por diferentes vías: en condiciones básicas ocurre primero la formación del ion carboxilato, seguida de la adición del halógeno al doble enlace para formar el intermediario halonio. Posteriormente, el anión carboxilato lleva a cabo una reacción de ciclación tipo S_N2 , sobre el intermediario halonio para formar la correspondiente lactona.

Cuando se emplea un ácido, la adición del halógeno sobre la olefina y el ataque del grupo $-OH$ del ácido carboxílico, ocurren de forma concertada, dando como resultado un ion oxonio intermediario, que es desprotonado por un ion halogenuro para formar la lactona deseada.

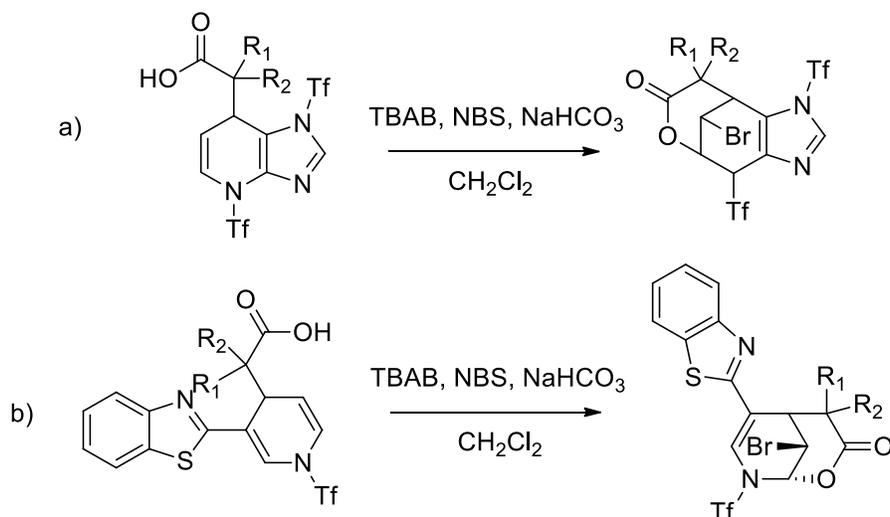
c) Oxidación de Baeyer-Villiger.

Otro método viable para la obtención de lactonas es mediante la oxidación de Baeyer-Villiger empleando un peroxiácido a partir de cetonas cíclicas (**Esquema 5**).⁸



Esquema 5. Síntesis de lactonas vía oxidación de Baeyer-Villiger.

Por su parte, dentro del grupo de investigación se han sintetizado una amplia variedad de δ -bromolactonas y γ -bromolactonas a partir de diferentes ácidos carboxílicos insaturados que se obtienen a través de la adición nucleofílica de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena a aza-compuestos activados. Como se mencionará más adelante, los aza-compuestos que se han empleado hasta el momento incluyen heterociclos como piridina, pirazina, quinoxalina, pirimidina, benzimidazol e imidazol. De manera general, para estas halolactonizaciones es necesario emplear *N*-bromosuccinimida (NBS) como fuente de bromo utilizando bicarbonato de sodio como base, en presencia de bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) (**Esquema 6**).⁹



Esquema 6. Síntesis de δ -bromolactonas a partir de derivados de piridina.

2.2. Acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

Como se acaba de mencionar, la química de lactonas que se desarrolla en el grupo de investigación involucra generalmente el uso de un acetal de *bis*(trimetilsilil)cetena.

La estructura general de los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena se muestra en la Figura 6, y su nombre de basa en el hecho de que pueden considerarse como el equivalente de un acetal de cetena y fueron descritos por primera vez por Ainsworth en 1972.¹⁰ Estos compuestos se pueden comportar como nucleófilos 1,3-carbono, oxígeno debido a la ruptura sucesiva de ambos enlaces O-Si, pudiendo de esta manera formar enlaces C-C y C-O.

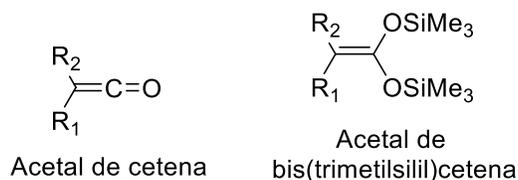
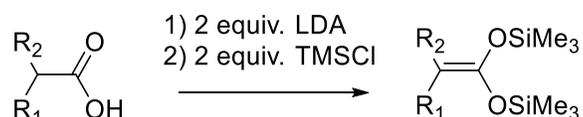


Figura 5. Estructura general de los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena.

2.2.1. Síntesis de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

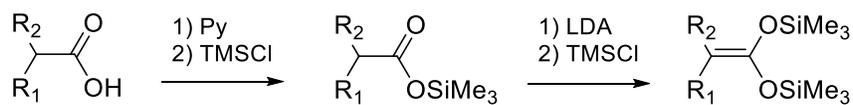
Existen dos principales métodos reportados en la literatura para la síntesis de estos nucleófilos; en ambas metodologías, se parte de un ácido carboxílico con al menos un átomo de hidrógeno en posición α :

- a) En el primer método, se agregan dos equivalentes de diisopropilamido de sodio (LDA) para formar el dianión en el ácido carboxílico, para posteriormente hacerlo reaccionar con dos equivalentes de clorotrimetilsilano (TMSCl) (**Esquema 7**).



Esquema 7. Método a) para la síntesis de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

- b) El segundo método se realiza en dos pasos y consiste primero en preparar el éster de trimetilsilicio a partir del ácido carboxílico vía la desprotonación del mismo con piridina y la posterior adición de TMSCl. En un segundo paso, una vez aislado el correspondiente éster de trimetilsilicio, este se hace reaccionar con LDA y finalmente con TMSCl, para formar el correspondiente acetal de *bis*(trimetilsilil)cetena (**Esquema 8**).



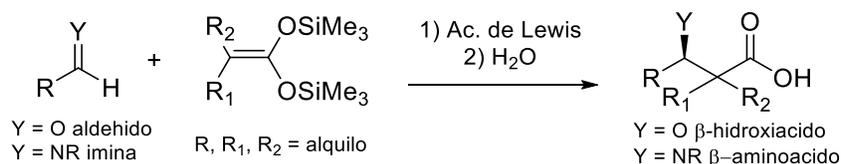
Esquema 8. Método b) para la síntesis de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

Cabe mencionar que de los dos métodos, se prefiere utilizar en primera instancia el método a, dado que en dicha síntesis, se pueden controlar más eficientemente las condiciones de reacción, y experimentalmente se han observado mejores rendimientos.

2.2.2. Reactividad de Acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

Los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena son ricos en densidad electrónica, siendo excelentes nucleófilos de carbono y su reactividad es comparada con los sililenol éteres y acetales de sililcetena, siendo equivalentes sintéticos a estas fuentes de aniones enolatos para la construcción de enlaces C-C y generar grupos carboxílicos o carbonílicos.

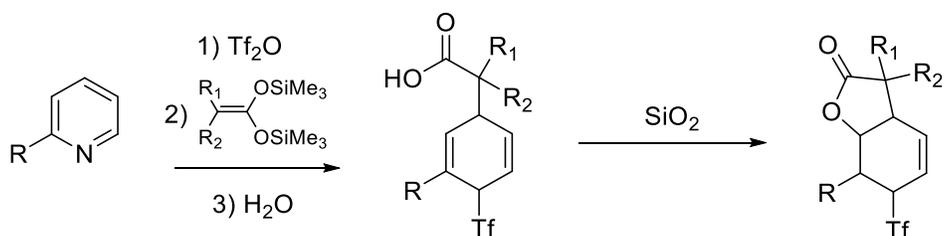
El estudio de la reactividad de estas especies nucleofílicas comenzó con la adición sobre electrófilos del tipo carbonilo como aldehídos y bases de Schiff en reacciones tipo aldólicas las cuales permiten sintetizar β -hidroxiácidos¹¹ o β -aminoácidos¹² según sea el caso (**Esquema 9**).



Esquema 9. Esquema general de reacción entre acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena con aldehídos y bases de Schiff.

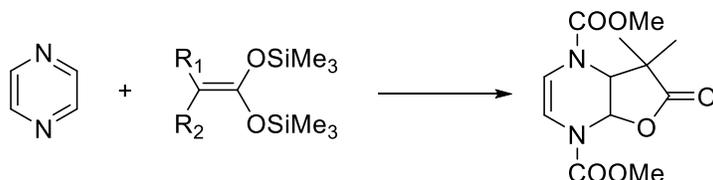
En presencia de ácidos de Lewis, la reacción de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena y aldehídos generan β -hidroxiácidos mientras que utilizando una base de Schiff, se obtiene un β -aminoácido.

La adición de acetales de cetena no está limitada a compuestos carbonílicos y como se indicó anteriormente, en nuestro grupo de investigación se han reportado adiciones nucleofílicas de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena a piridinas sustituidas activadas con anhídrido trifluorometansulfónico, generando los correspondientes ácidos dihidropiridin-carboxílicos que con el posterior tratamiento con sílice generan las lactonas bicíclicas correspondientes (**Esquema 10**).¹³



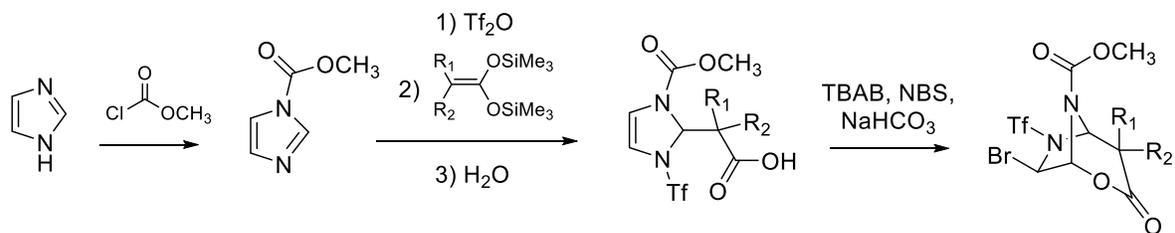
Esquema 10. Síntesis de γ -lactonas a partir de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena y piridinas previamente activadas.

Asimismo, se ha estudiado la reactividad de estos nucleófilos frente a otros *N*-heterociclos aromáticos tales como pirazina¹⁴, que mediante una previa activación con alquilcloroformiato producen de manera directa lactonas polifuncionalizadas. (**Esquema 11**).



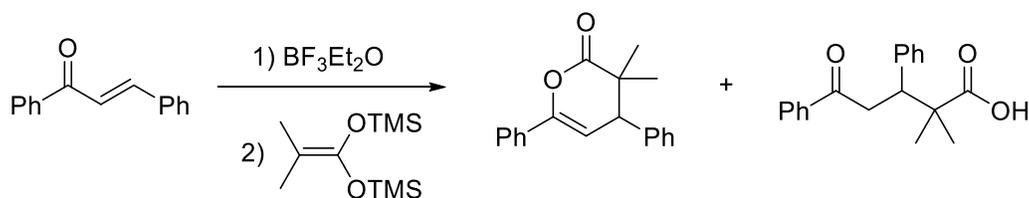
Esquema 11. Síntesis de lactonas a partir de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena y *N*-heterociclos.

De manera similar, derivados de quinoxalina, pirimidina y bencimidazol, previamente activados con anhídrido trifluorometansulfónico, producen los correspondientes ácidos carboxílicos, los cuales pueden ser anillados para formar las correspondientes lactonas mediante una reacción de halolactonización. En el caso particular del imidazol, adición de acetales de cetena en presencia de Tf_2O produce exclusivamente los correspondientes ácidos carboxílicos, sin embargo, si ocurre una doble activación, en una primera instancia con cloroformiato de metilo y posteriormente con anhídrido trifluorometansulfónico para obtener los correspondientes ácidos 2,3- dihidroimidazolincarboxílicos, es posible efectuar una reacción posterior de bromolactonización con NBS para generar δ -lactonas bicíclicas (**Esquema 12**).¹⁵



Esquema 12. Síntesis de γ -lactonas a través de una doble activación del imizadol.

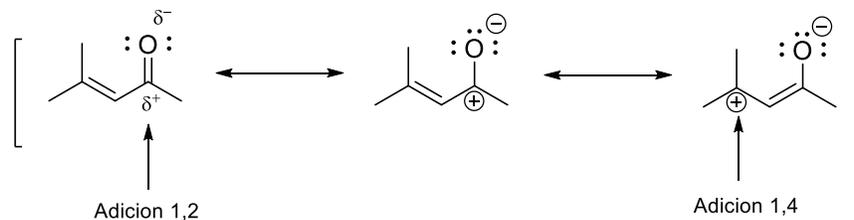
La adición de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena no está limitado al uso de aza-compuestos activados. En nuestro grupo de trabajo también se ha informado la adición de estas especies a diferentes chalconas que en presencia de un ácido de Lewis como el $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ generan nuevas δ -lactonas y ácidos insaturados que posteriormente pueden convertirse en lactonas mediante un proceso de anillación intramolecular (**Esquema 13**).¹⁶



Esquema 13. Síntesis de δ -lactonas a partir de chalconas.

2.3. Cetonas α,β -insaturadas

Las cetonas α,β -insaturadas son de gran importancia en síntesis orgánica dado que son bloques constructores versátiles para la preparación de un sin número de compuestos orgánicos. Estos compuestos generalmente funcionan como especies electrofílicas por lo que presentan una reactividad con sustratos del tipo nucleofílico.¹⁷ En el **Esquema 14**, se observa que dichos compuestos tienen 3 formas canónicas de resonancia, las cuales dan origen a dos posibilidades de ataque nucleofílico en estos sistemas, a) la adición 1,2 en donde el nucleófilo ataca directamente al carbono del grupo carbonilo y b) una adición 1,4 en donde el ataque al carbono del doble enlace carbono-carbono es el que experimenta el ataque nucleofílico.

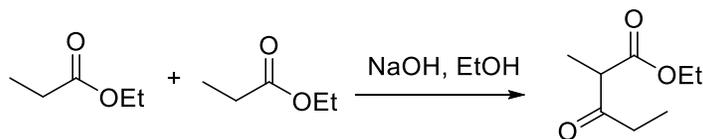


Esquema 14. Formas de resonancia de cetonas α,β -insaturadas.

Como consecuencia de la menor densidad electrónica π del doble enlace, tenemos que los aldehídos y las cetonas α,β -insaturadas sean menos reactivos que los alquenos respecto a la adición electrofílica.

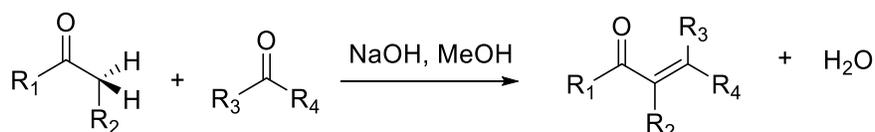
La adición nucleofílica en los compuestos carbonílicos α,β -insaturados puede estar gobernada por el control cinético o termodinámico. El control cinético funciona con nucleófilos fuertemente básicos, los cuales tienen la carga centrada en átomos pequeños y electronegativos, es decir, hay un control estático; algunos ejemplos de ellos son F^- , OH^- , OR^- , H_2O , ROH , NH_3 , $RMgBr$, RLi , por mencionar algunos; estos nucleófilos forman el producto de adición 1,2. Por otra parte, el control termodinámico forma el producto de adición 1,4 y funciona con nucleófilos débilmente básicos dado que, estos comúnmente poseen una carga (si la tienen) de manera difusa en átomos grandes, por ejemplo: R_2CuLi , I^- , RS^- , RSH .

Para la obtención de cetonas α,β -insaturadas existen varios métodos de síntesis; uno de los más comunes es la condensación de Claisen que consiste en el acoplamiento en medio básico de un éster que contiene un hidrógeno ácido en posición α al grupo carbonilo, con otra molécula del mismo tipo para formar un β -cetoéster (**Esquema 15**). Cuando los ésteres son diferentes, se tiene una condensación de Claisen cruzada, esta reacción tiene como requisito que al menos uno de los reactivos sea enolizable.¹⁸



Esquema 15. Condensación de Claisen.

Otro tipo de reacción para la síntesis de cetonas α,β -insaturadas es la condensación de Claisen-Schmidt, en la cual un enol o un ion enolato reacciona con un compuesto carbonílico para formar un β -hidroxialdehído o β -hidroxicetona (una reacción aldólica), seguido de una deshidratación para dar una enona conjugada (**Esquema 16**).



Esquema 16. Condensación de Claisen-Schmidt.

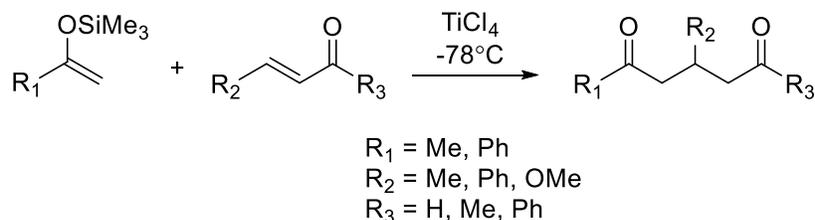
Una reacción útil que involucra cetonas α,β -insaturadas, es la reacción de Michael, que implica la adición 1,4 de nucleófilos a este tipo de sistemas.

2.4. Reacciones tipo Michael.

La reacción de Michael es un método ampliamente utilizado para la construcción de enlaces C-C¹⁹ dado que su éxito surge de la disponibilidad inmediata de un gran conjunto de nucleófilos y olefinas activadas. Se basa en la adición de especies nucleofílicas centradas en el carbono α a alquenos deficientes de electrones.

La reacción de Michael se puede llevar a cabo con una cantidad catalítica de base y bajo estas condiciones la reacción es reversible y procede bajo control termodinámico.

En 1974, T. Mukaiyama²⁰ informó el primer ejemplo de una reacción tipo Michael entre compuestos carbonílicos α,β -insaturados y éteres de enol de silicio, catalizada por un ácido de Lewis (**Esquema 17**). A partir de esta síntesis, se han realizado gran cantidad de reacciones de adición conjugada que involucran éteres de enol de silicio.²¹



Esquema 17. Ejemplo de una reacción Mukaiyama – Michael.

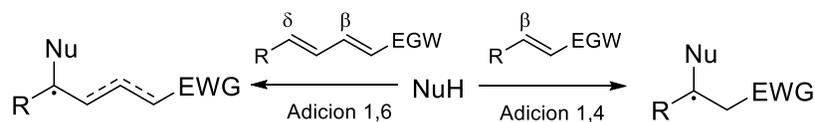
Cabe mencionar que los enolatos se pueden adicionar tanto en posición [1, 2] como en [1, 4] a cetonas α,β -insaturadas. La regioselectividad de esta adición depende de algunos factores, tales como los estéricos, temperatura, además de la naturaleza del enolato y los aditivos que se usen.

2.4.1. Adiciones 1,6.

La propagación de efectos electrónicos en los sistemas π conjugados, (cetonas α,β – insaturadas), conduce a la reactividad en la posición α y β , permitiendo así una adición 1,2 o 1,4 respectivamente, como ya se mencionó anteriormente; sin embargo, los efectos electrónicos se pueden transmitir a un doble enlace adicional, lo que conduce a una adición 1,6.²²

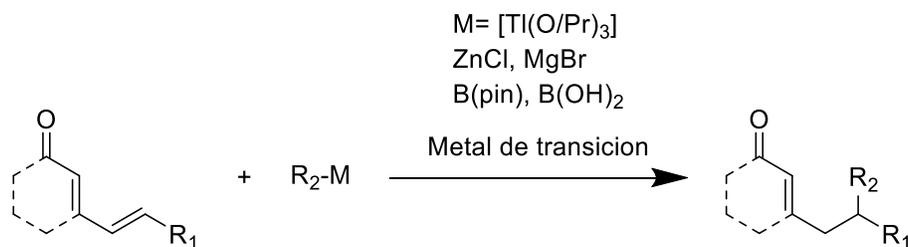
Las adiciones 1,6 tipo Michael, a comparación de las adiciones 1,2 y 1,4, son un tipo de conjugación difícil de concretar ya que su reactividad es menor dado la mala transferencia del efecto inductivo a través del sistema π conjugado, creando así un problema de regioselectividad. Otro factor importante es controlar la inducción asimétrica en el centro estereogénico remoto, ya que la extensión del entorno quiral a la posición δ de un sistema conjugado parece ser menos favorable. En el desarrollo de reacciones de adición 1,6, un diseño cuidadoso de los sustratos y los catalizadores es muy esencial, ya que estudios experimentales y computacionales han revelado que la adición 1,4 se encuentra frecuentemente favorecida sobre la 1,6.²³ Esto se puede lograr aumentando la aglomeración estérica en la posición β del sustrato o diseñando un modo de activación que pueda hacer que la posición δ sea más electropositiva y/o que el nucleófilo pueda acercarse a la posición δ

mediante enlaces de hidrogeno o interacciones electrostáticas con el catalizador (**Esquema 18**).²⁴



Esquema 18. Adición 1,6 vs adición 1,4.

De manera general, para que las reacciones de adición 1,6 se lleven a cabo de manera satisfactoria, es necesario que la adición a los sistemas conjugados extendidos sea catalizada por metales de transición o bien, por el empleo de un organocatalizador (**Esquema 19**).²⁵



Esquema 19. Adición 1,6 utilizando catalizadores metálicos.

3. HIPÓTESIS

Dado que se conoce que los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena pueden actuar como nucleófilos y adicionarse a diferentes aza-compuestos *N*-activados así como a compuestos α,β -insaturados en presencia de ácidos de Lewis, se espera que estos nucleófilos puedan reaccionar con diferentes aza-chalconas en presencia anhídrido trifluorometansulfónico para generar en un solo paso las correspondientes γ -lactonas a través de un proceso que involucre una reacción de adición 1,6 intramolecular tipo Michael.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Estudiar la reactividad de diferentes acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena frente a aza-chalconas *N*-activadas con el propósito de sintetizar una nueva familia de lactonas bicíclicas.

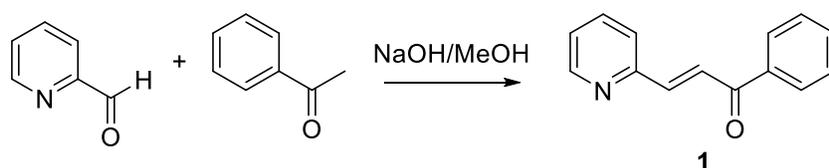
4.2. Objetivos particulares

- Sintetizar diferentes aza-chalconas mediante una reacción de condensación de Claisen-Schmit.
- Evaluar la reactividad de las aza-chalconas frente a diferentes acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena en presencia de anhídrido trifluometansulfónico.
- Caracterizar las lactonas formadas mediante las técnicas espectroscópicas convencionales.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de chalconas

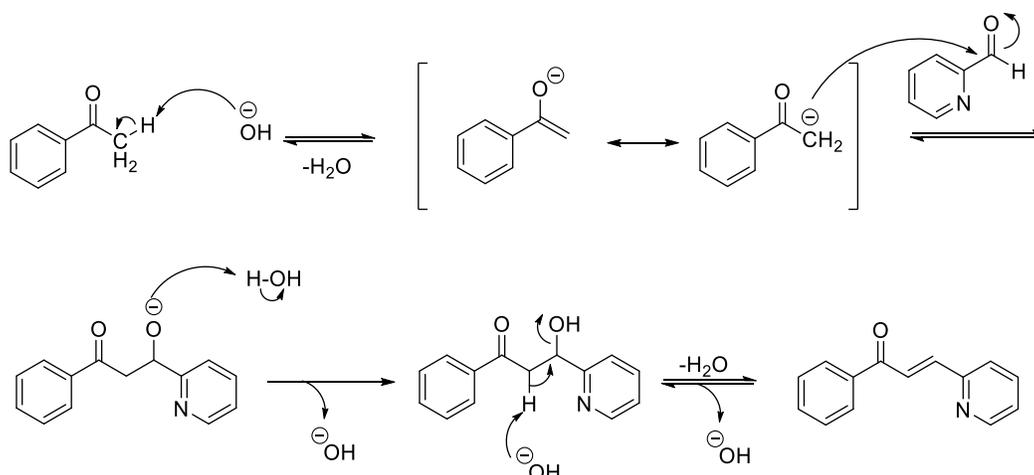
Con base en los objetivos planteados en este proyecto, la primera parte de este trabajo se enfocó en la preparación de una chalcona, específicamente la (*E*)-1-fenil-3-(piridin-3-il)prop-2-en-1-ona **1** que fungirá como sustrato de partida. Dicha chalcona fue preparada a partir del 2-piridincarboxaldehído y acetofenona como se muestra en el **Esquema 20**.



Esquema 20. Síntesis de la (*E*)-1-fenil-3-(piridin-3-il)prop-2-en-1-ona **1**.

Cuando a una solución del 2-piridincarboxaldehído e hidróxido de sodio en metanol a 0°C se adiciona gota a gota acetofenona, es posible obtener un precipitado color amarillo verdoso correspondiente a la chalcona esperada. Este compuesto se obtuvo con un rendimiento del 83%.

El mecanismo para la formación de este compuesto procede a través de una condensación de Claisen-Schmidt, en la cual, en un primer paso la elimina un protón en posición α de la acetofenona, formando el correspondiente ion enolato el cual posteriormente se adiciona al 2-piridincarboxaldehído. Posteriormente, la protonación del alcóxido formado como intermediario conduce al producto aldólico para que finalmente se elimine el hidróxido por deshidratación y se forme la chalcona correspondiente (**Esquema 21**).



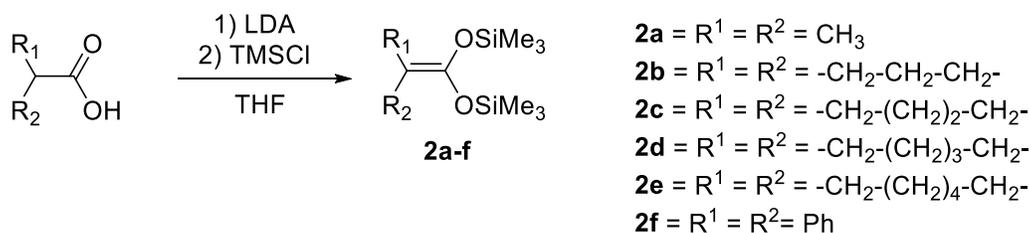
Esquema 21. Mecanismo para la formación de la chalcona.

La identidad de este sistema α,β -insaturado **1** fue corroborada por RMN de ^1H y ^{13}C . Cabe mencionar que este compuesto ya se encuentra reportado en la literatura y que las señales tanto en ^1H como en ^{13}C coinciden en su totalidad con los datos previamente reportados en la literatura.²⁶

5.2. Síntesis de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena

Una vez sintetizada la chalcona que servirá como sustrato, se procedió a realizar la síntesis de los nucleófilos de silicio que se utilizarán en las reacciones posteriores para la formación de las lactonas. De acuerdo con la metodología empleada por nuestro grupo de investigación, la formación de los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena consiste en tratar el correspondiente ácido carboxílico con dos equivalentes de diisopropilamido de litio (LDA), seguido de la adición de dos equivalentes de TMSCl a -78°C .

Siguiendo esta metodología, se sintetizaron un total de 6 acetales, con los sustituyentes alifáticos: dimetilo (**2a**), ciclopropilo (**2b**), ciclobutilo (**2c**), ciclopentilo (**2d**), ciclohexilo (**2e**), además de un acetal con dos anillos de fenilo (**2f**) en rendimientos que van del 40-60 % de rendimiento (**Esquema 22**).



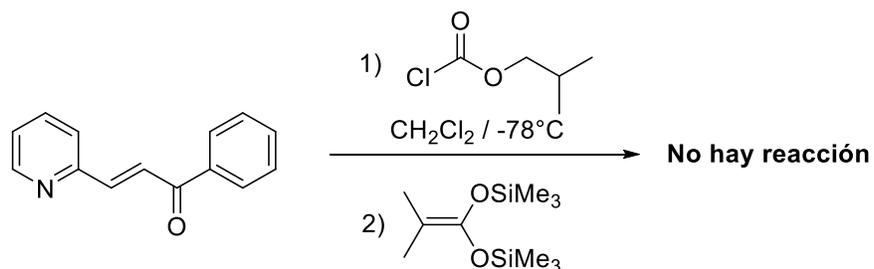
Esquema 22. Síntesis general de los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena.

En nuestro grupo de investigación se emplean constantemente acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena como precursores de ácidos carboxílicos por lo que ya fueron estudiados y caracterizados previamente.

5.3. Adición de acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena a aza-chalconas activadas

La siguiente etapa en este trabajo consistió en explorar la reactividad de la aza-chalcona **1** con diferentes acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena para probar nuestra hipótesis y evaluar la viabilidad de este proceso para formar una lactona en un solo paso. En primera instancia se hizo reaccionar la aza-chalcona **1** con dos diferentes agentes activantes, el cloroformiato de isobutilo y el anhídrido trifluorometansulfónico.

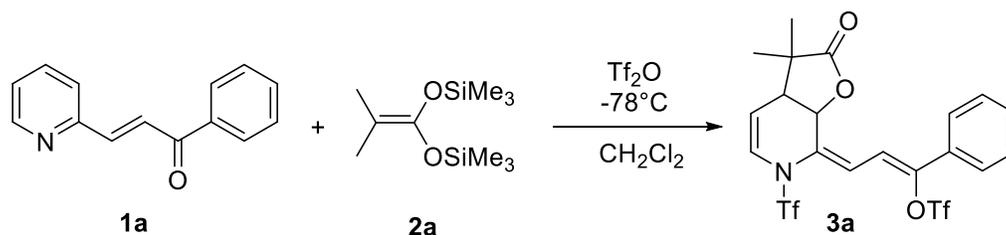
En una primera aproximación, la aza-chalcona **1** se hizo reaccionar dos equivalentes de cloroformiato de isobutilo en diclorometano a -78°C (**Esquema 23**). Después de 45 minutos de activación a esta temperatura, se adicionó 1.2 equivalentes del correspondiente acetal de cetena **2a** y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas.



Esquema 23. Reacción utilizando como agente activante cloroformiato de isobutilo.

Los resultados obtenidos para este experimento no fueron muy exitosos, dado que no se logró la formación de la lactona incluso después de tiempos prolongados de reacción. La activación tanto del átomo de nitrógeno como de oxígeno no se llevaron a cabo y por ende, el ataque del acetal no pudo ser posible.

Basado en resultados previos encontrados en el grupo de trabajo, la chalcona **1** se hizo reaccionar con dos equivalentes de anhídrido trifluorometansulfónico en diclorometano a -78°C . Después de media hora de activación a esta temperatura, se adicionó 1.2 equivalentes del correspondiente acetal de cetena **2a** y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta consumirse toda la chalcona de partida. (**Esquema 24**).



Esquema 24. Síntesis de lactona

Después de purificar el crudo de reacción por cromatografía en columna fue posible aislar un sólido blanco en un 21 % de rendimiento. El producto obtenido fue caracterizado por las técnicas espectroscópicas convencionales y los datos indican que el producto formado corresponde a la γ -lactona bicíclica **3a** que se muestra en el Esquema 24.

5.3.1. Espectroscopia de RMN ^1H Y ^{13}C de **3a**

En el espectro de RMN ^1H para la molécula **3a** (**Figura 6**) se puede apreciar una señal simple en 7.52 ppm con una integración para 5 hidrógenos que corresponden a los hidrógenos aromáticos H-9 al H-13.

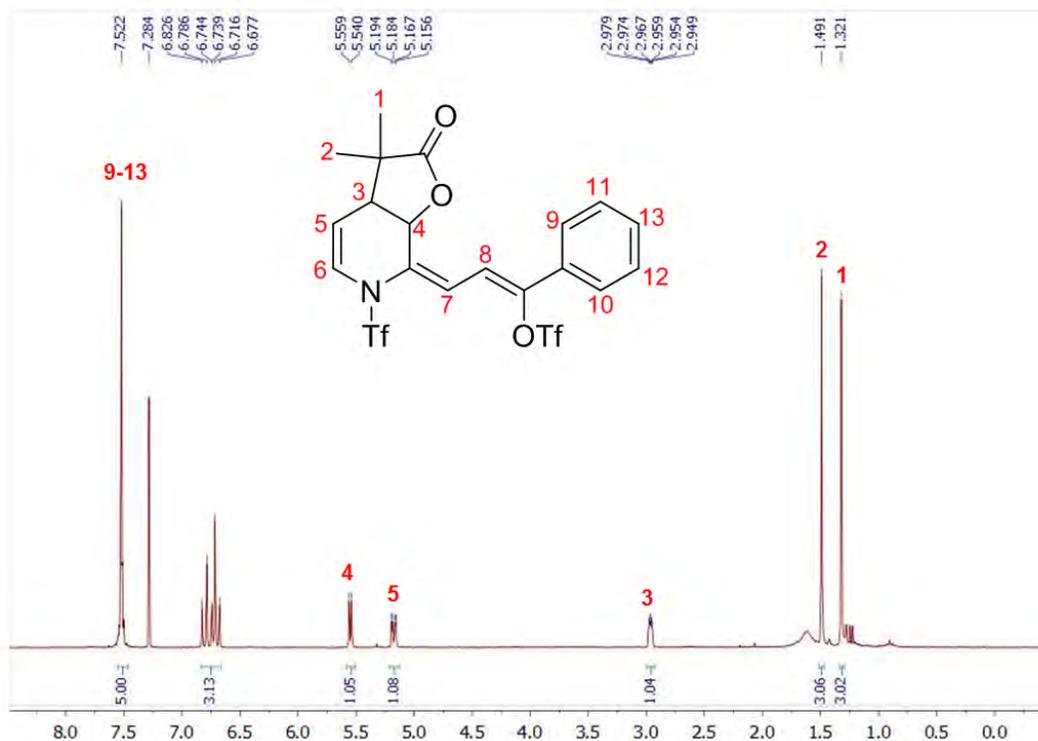


Figura 6. Espectro de RMN ^1H para el compuesto **3a**.

Las dos señales simples 1.32 y 1.49 ppm corresponden a los grupos metilos distinguibles mediante RMN. La señal en 2.97 ppm se asigna al H-3 (sitio donde ocurrió el ataque del acetal) y finalmente la señal doble en 5.54 ppm corresponde al H-4, el cual corresponde a un desplazamiento característico para este tipo de las lactonas. La Figura 8 muestra una ampliación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **3a** y es posible apreciar dos señales dobles en 6.70 y 6.81 ppm con la misma constante de acoplamiento ($J = 11.8$ Hz), los cuales corresponden a los hidrógenos vinílicos H-7 y H-8 respectivamente. Finalmente, el H-6 se observa como una señal doble en 6.74 ppm.

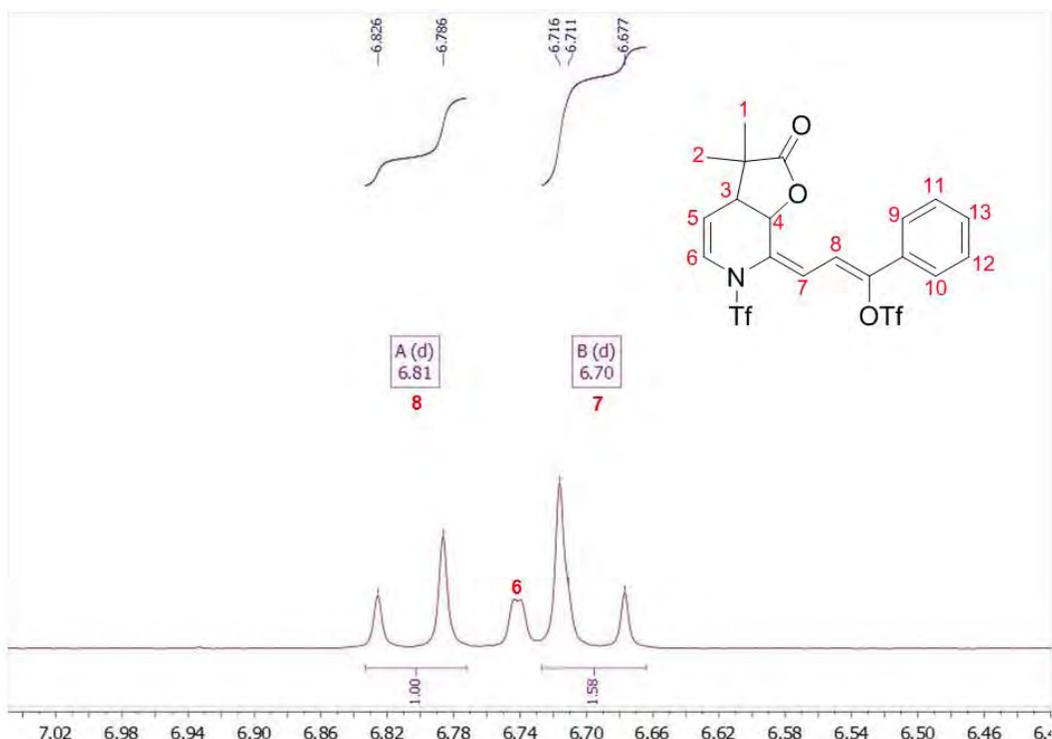


Figura 8. Espectro de RMN ^1H para el compuesto **3a** en la zona de 6.5 a 7.0 ppm.

Por su parte, en la Figura 9 se presenta el espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto **3a** donde se indica la asignación para todos los átomos de carbono de la molécula. Entre las señales sobresalientes para **3a** encontramos la que corresponde al átomo de carbono del grupo carbonilo en 178.79 ppm; asimismo, a campo alto se observan las dos señales de los metilos con desplazamientos en 20.97 y 24.77 ppm respectivamente. Una señal clave para corroborar la presencia de una lactona es la señal del carbono cabeza de puente entre la lactona y el anillo de piridina (C-5) que se encuentra en 70.01 ppm. Los carbonos de la parte aromática (C-14 al C-18) se encuentran distribuidos en la zona comprendida entre 129.03 y 129.73 ppm. Otro de los carbonos que también se encuentra desplazado hacia campo bajo es el C-12 que está unido al triflato con un desplazamiento de 156.82 ppm.

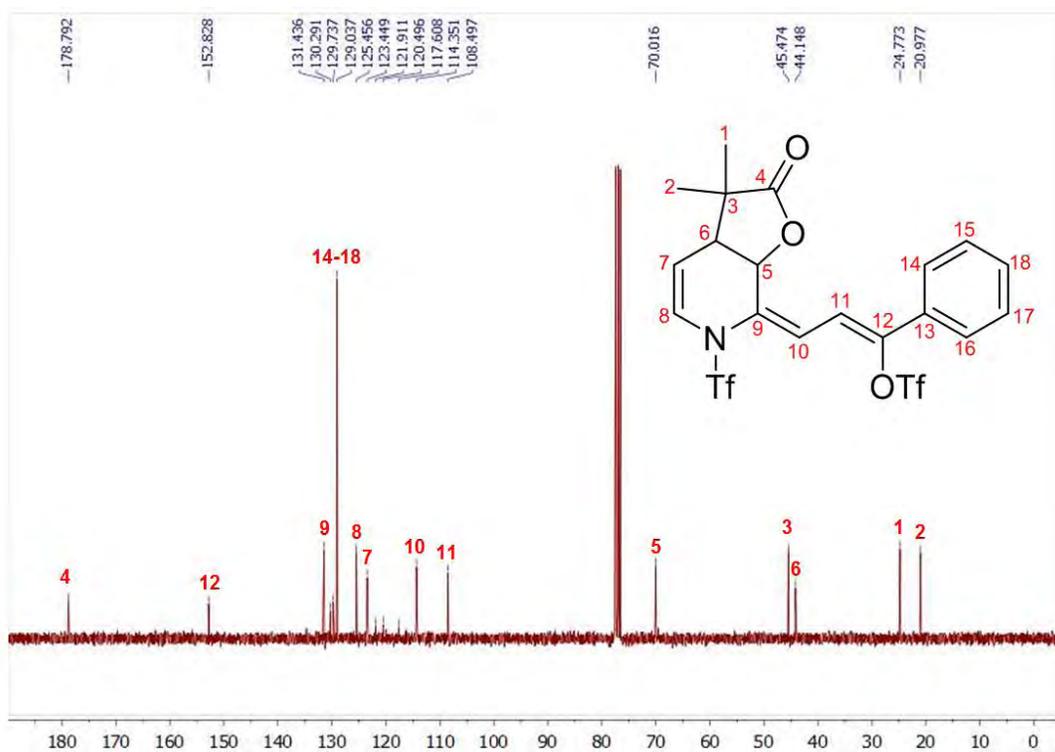


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **3a**.

5.3.2. Espectroscopia de IR

En el espectro de infrarrojo de **3a**, se observa una banda intensa 1785 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del doble enlace $\text{C}=\text{O}$ además de una señal en 1218 cm^{-1} asignada a la banda de estiramiento $\text{C}-\text{O}$ (**Figura 10**).

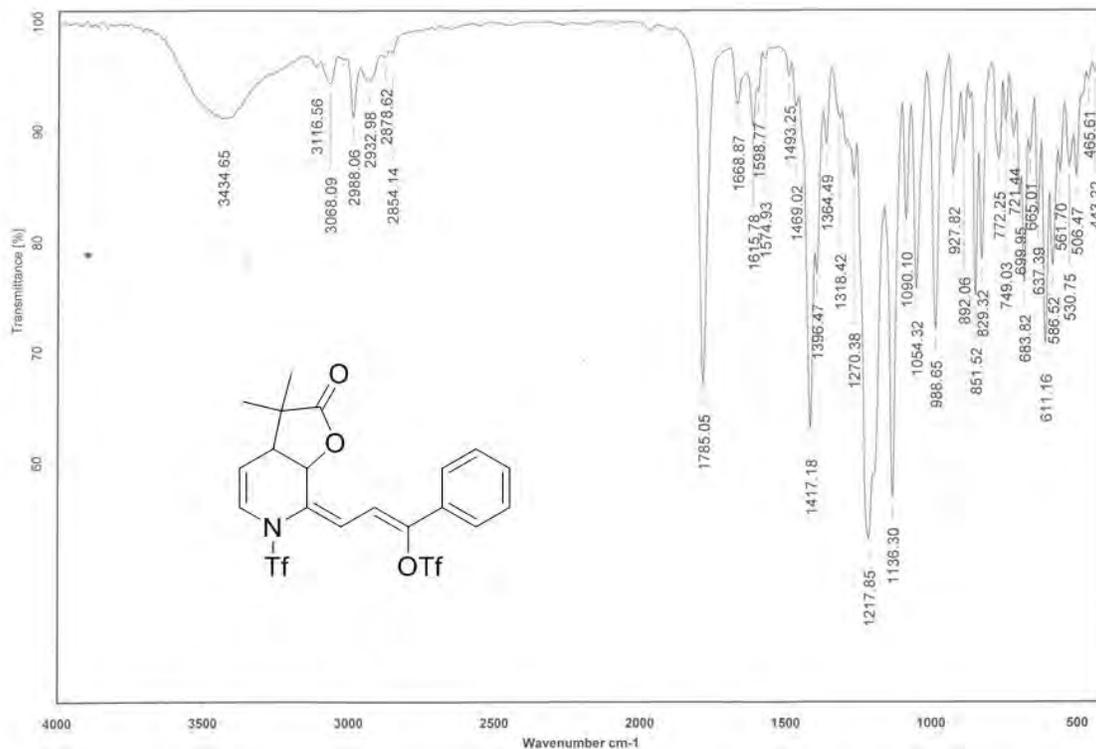


Figura 10. Espectro de IR (pastilla de KBr) para el compuesto **3a**.

De acuerdo con la literatura²⁷ para aquellas moléculas que en su estructura poseen una lactona y en específico una γ -lactona, las señales en el IR se deben dentro del intervalo comprendido entre $1795 - 1760 \text{ cm}^{-1}$. En nuestro caso, las señales si entran dentro de ese intervalo, por lo que podemos corroborar que el esqueleto de la γ -lactona si se encuentra presente en nuestra estructura.

5.3.3. Espectroscopia de masas

El espectro de masas de **3a** por ionización DART⁺ (Análisis directo en tiempo real), muestra un pico en 561 m/z asignado al ion molecular $[M]^+$ y que corresponde con la el peso molecular esperado para la estructura de la lactona propuesta. Además, se observa la presencia de un pico en 562 m/z $[M + H]^+$ y otro en 579 m/z correspondiente al ión molecular más amonio $[M + \text{NH}_4]^+$ (**Figura 11**).

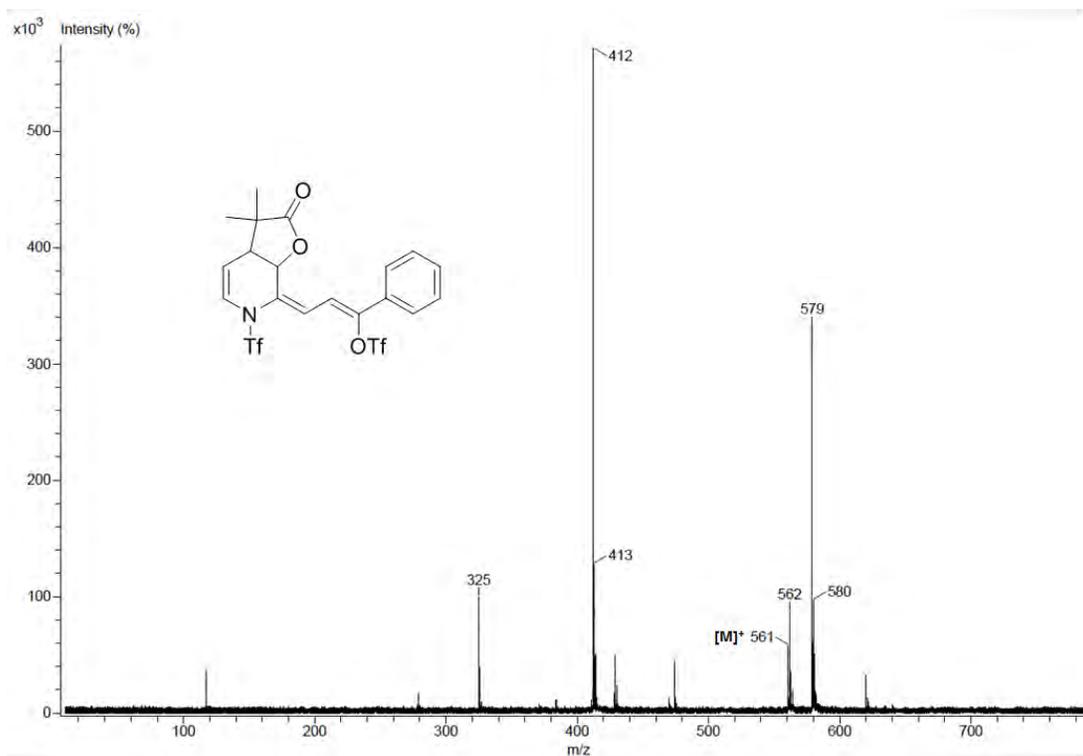


Figura 11. Espectro de masas para modo de ionización DART⁺ del compuesto **3a**.

Adicionalmente, el pico base del espectro corresponde a un pico en 412 *m/z*, que se asigna a la pérdida de 148 *m/z* debido a ruptura del fragmento [M - CF₃O₃S]⁺.

A partir de este análisis, se procedió a realizar un espectro de masas de alta resolución (EMAR) por ionización de electroespray (ESI⁺), confirmando de esta manera la relación masa – carga del compuesto **3a** (**Figura 12**), así como su fórmula mínima, mediante la estimación de su análisis elemental (**Tabla 1**).

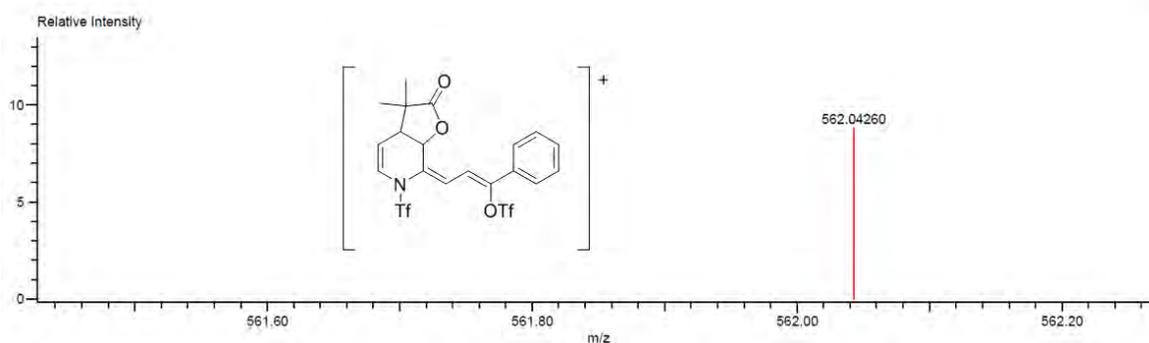


Figura 12. Espectro de masas exactas para modo de ionización por ESI⁺ del compuesto **3a**.

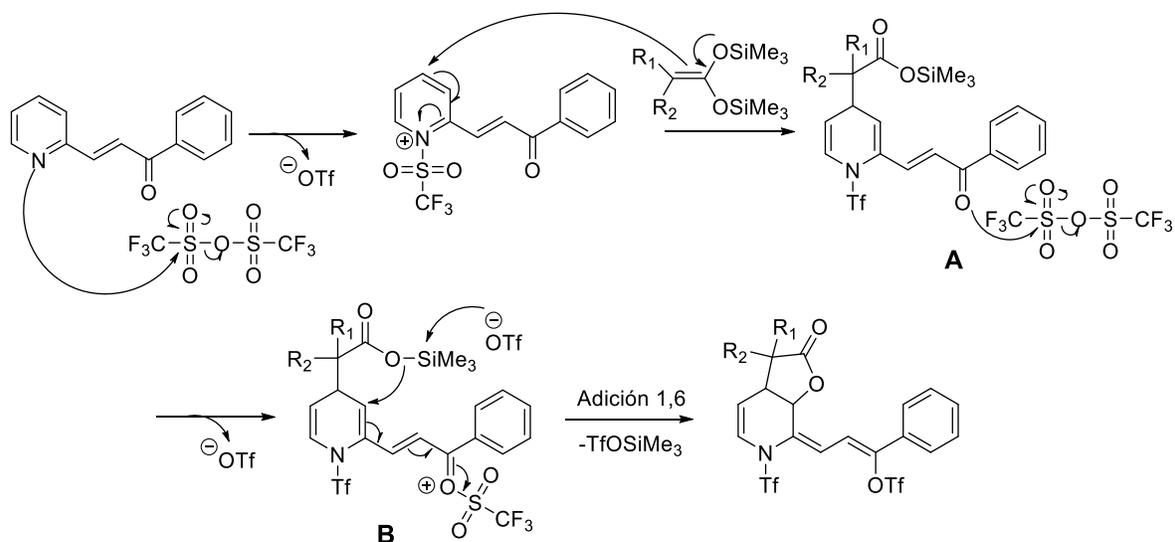
Masa calculada (uma)	Masa experimental (uma)	Diferencia de masa (uma)	Composición elemental	Numero de instauraciones
562.0429	562.0426	-0.29	C ₂₀ H ₁₈ F ₆ N ₁ O ₇ S ₂	11.5

Tabla 1. Masa y formula mínima para **3a**.

La masa obtenida experimentalmente para el compuesto **3a** es de 562.0426 uma, que concuerda con la composición elemental C₂₀H₁₈F₆N₁O₇S₂, correspondiente a la especie [M + H]⁺.

5.4. Propuesta de mecanismo de reacción.

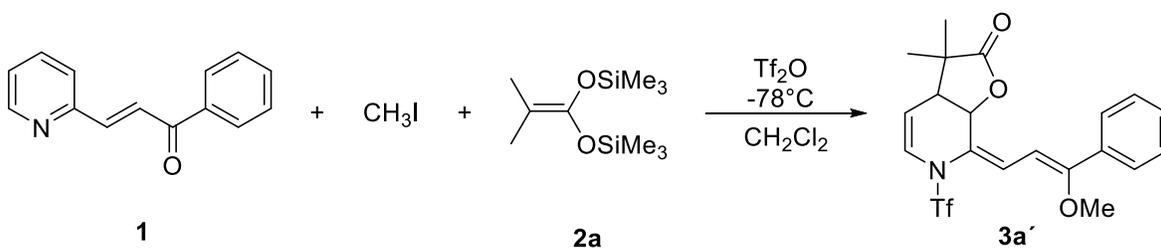
Una vez que se elucidó la estructura de la lactona **3a**, se realizó una propuesta de un mecanismo de reacción que explique su formación. El mecanismo que se propone es que en una primera instancia el átomo de nitrógeno de la piridina, al ser más nucleofílico que el oxígeno del carbonilo, se activa en presencia del anhídrido trifluorometansulfónico para formar una sal de *N*-piridinio, dicho de otra forma, se genera un intermediario iminio, convirtiendo a la estructura del anillo de piridina en un electrófilo susceptible a un ataque nucleofílico. Como ya se mencionó anteriormente, los acetales de *bis*(trimetilsilil) cetena son excelentes nucleófilos de carbono para la construcción de enlaces C-C. Después de la activación, el acetal de cetena ataca en posición 4 del anillo de piridina, obteniéndose la dihidropiridina A. Posteriormente, una segunda molécula de Tf₂O activa ahora al oxígeno del grupo carbonilo formando el intermediario B. Finalmente, mediante una adición 1,6 tipo Michael por parte del átomo de oxígeno del ester de silicio es posible obtener la lactona correspondiente. (**Esquema 25**).



Esquema 25. Mecanismo para la formación de la lactona **3a**.

Es importante resaltar que en la literatura se han informado adiciones 1,6 tipo Michael utilizando organocatalizadores de hierro²⁸, cobre²⁹ y fosforo³⁰, sin embargo, en esta reacción no se utilizó ningún metal de transición y/u organocatalizador.

Con la finalidad de corroborar el mecanismo de reacción propuesto, se realizó un experimento similar utilizando únicamente un equivalente de Tf₂O y adicionando a su vez yoduro de metilo en exceso después de la adición del acetal de cetena, Lo anterior con la finalidad de alquilar al átomo de oxígeno después de la activación y tener en esa posición, en vez de un fragmento de triflato, una cadena alquílica (**Esquema 26**).



Esquema 26. Reacción para la síntesis de la lactona agregando CH₃I.

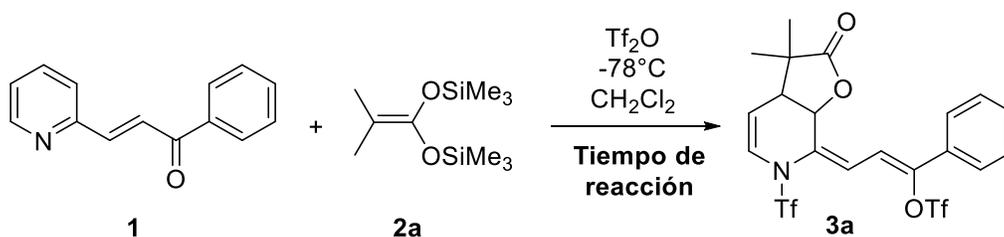
El objetivo de alquilar ha dicho átomo, era para comprobar que si mediante el enlace O-CH₃ se obtenía la misma reactividad para la formación de la lactona y la adición 1,6. El resultado de este experimento no fue exitoso, ya que únicamente se obtuvo

la lactona **3a** en un bajo rendimiento y no fue posible obtener la lactona **3a'**. Esto nos confirmó que el mecanismo propuesto en el Esquema 25 es correcto, ya que es necesario que dos moléculas de triflato interaccionen con el sustrato de partida para hacer el sistema conjugado lo suficientemente electrofílico para que se produzca la reacción de adición 1,6.

5.5. Estudio de las condiciones de reacción.

Posterior a la caracterización de las lactonas obtenidas, se procedió a realizar una evaluación sobre las condiciones de reacción con el objetivo de mejorar el rendimiento, manteniendo como constante en todos los experimentos, el número de equivalentes de agente activante (Tf_2O).

En una primera instancia, se variaron los tiempos totales de reacción (**Tabla 2**) observándose que a un tiempo global de 12 horas se obtenía un mejor rendimiento a comparación de los demás experimentos. Como observación, podemos ver que a un tiempo total de 24 horas, el rendimiento es muy bajo; esto se debe a la formación de varios productos secundarios, con lo cual, fue complicado aislar el producto de interés. Para este experimento, se tuvieron como constantes, la cantidad de agente activante (2 eq. de Tf_2O) así como la del acetal (1.2 eq.)



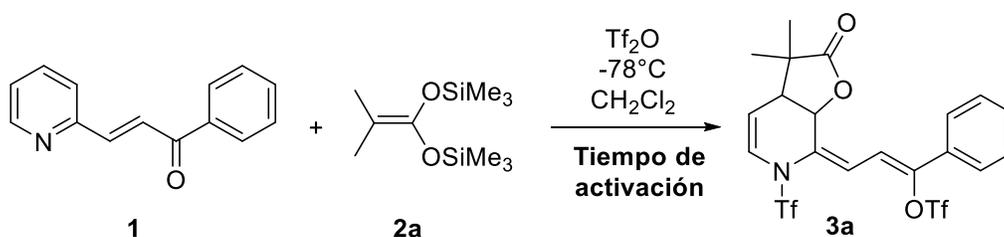
Esquema 27. Reacción de las síntesis de lactona con sustituyentes metilo.

Experimento	Tiempo de reacción (h)	% Rendimiento
1	4	50
2	8	52

3	12	64
4	24	21

Tabla 2. Rendimientos obtenidos del compuesto **3a** a diferentes tiempos de reacción.

Asimismo, se estudió el tiempo de activación para la cetona α,β -insaturada la cual posee el anillo de piridina, antes de adicionar a la mezcla de reacción el acetal de *bis*(trimetilsilil)cetena. La chalcona se mantuvo con Tf_2O por 30, 45, 60 y 120 minutos a -78°C (**Tabla 3**), adicionando un tiempo total de reacción de 12 horas, considerando el estudio previamente hecho en la **Tabla 2**.



Esquema 28. Reacción de las síntesis de lactona con sustituyentes metilo.

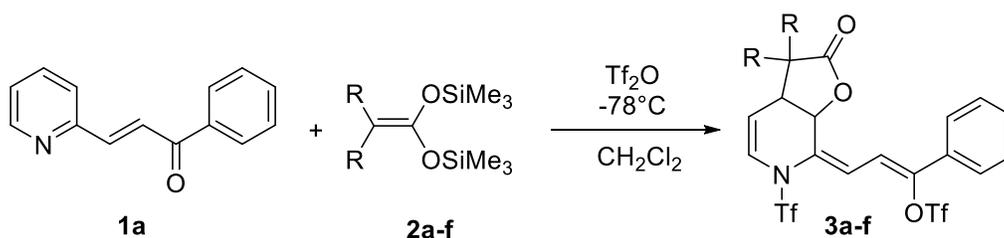
Experimento	t de activación (min)	t total de reacción	% Rendimiento
1	30	12 h, 30 min	55
2	45	12 h, 45 min	71
3	60	13 h	64
4	120	14h	49

Tabla 3. Análisis sobre los tiempos de activación con Tf_2O sobre la chalcona.

Los resultados de la tabla 5 muestran que, a un tiempo de activación mayor a 45 minutos, los rendimientos bajan de una manera importante, por lo cual, podemos concluir que las condiciones de reacción idóneas para realizar esta síntesis fueron: 2 equivalentes de Tf_2O con 45 minutos de activación; posteriormente de la adición del acetal, 12 horas de reacción total, de las cuales, la primera se mantuvo a -78°C y después se dejó que la temperatura llegara gradualmente a T. A.

5.6 Síntesis de la serie de lactonas con diferentes acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena.

Una vez caracterizada en su totalidad la lactona **3a** y teniendo las condiciones de reacción idóneas para su síntesis, se procedió a analizar el alcance de esta reacción al utilizar diferentes acetales de bis(trimetilsilil)cetena. Los resultados de estos experimentos se resumen en la **Tabla 4**.



Experimento	Acetal de cetena	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)
3a		71	134-136
3b		-----	-----
3c		45	136-138
3d		47	140-142
3e		58	145-147
3f		-----	-----

Tabla 4. Rendimiento y puntos de fusión de las lactonas sintetizadas.

Se obtuvieron un total cuatro nuevas lactonas, con los sustituyentes dimetilo (**3a**), ciclobutilo (**3c**), ciclopentilo (**3d**) y ciclohexilo (**3e**) en rendimientos que van desde el 40 al 70%. Sin embargo, cuando se utilizaron los acetales de cetena **2b** y **2f** no fue posible obtener las lactonas esperadas.

Si se compara el tamaño del anillo del acetal de cetena es probable que existe una relación con el rendimiento de la lactona obtenida ya que, al disminuir el tamaño de dicho anillo, el rendimiento disminuye. Por otra parte, cuando se utiliza el acetal con dos grupos fenilo tampoco fue posible aislar la lactona deseada probablemente

debido al menor carácter nucleofílico de este acetal en comparación con sus análogos con cicloalcanos.

Los compuestos sintetizados tienen una estructura similar, diferenciándose únicamente por la cadena alquílica en la posición α de la lactona, por lo tanto, muestran un patrón general de señales en sus espectros de RMN para ^1H Y ^{13}C , en los cuales solo varían las señales, tanto de multiplicidad, integración y desplazamiento químico para estos sustituyentes alquílicos.

Para la espectroscopia de IR, la frecuencia de vibración es similar para todos los compuestos. La siguiente tabla resume la frecuencia de estiramiento del enlace C=O para cada lactona:

Tipo de vibración	Compuesto	Frecuencia (cm^{-1})
C=O	3a	1765.14
	3b	1780.44
	3c	1786.94
	3d	1785.05

Tabla 5. Frecuencias de vibración características del enlace C=O para los compuestos sintetizados

Cabe mencionar que para todas las lactonas, las señales en el IR de la frecuencia del enlace C=O recae en el intervalo de $1795 - 1760 \text{ cm}^{-1}$, por lo cual podemos confirmar que todas son γ -lactonas.

5.7. Pruebas biológicas: ensayo de actividad citotóxica.

Una de las enfermedades de mayor incidencia en la población mundial es el cáncer. Este padecimiento se da a raíz del crecimiento descontrolado de las células al alterarse los mecanismos de división y muerte celular, lo que genera el desarrollo de tumores o masas anormales, las cuales se pueden presentar en cualquier parte del organismo, dando lugar a más de 100 tipos de cáncer que se denominan según la zona de desarrollo, por ejemplo: cáncer de mama, cáncer de colon, tumor cerebral, etc.³¹

En 2012, la OMS señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago. Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado.

Dicho lo anterior, hoy en día se puesto mucho énfasis en el tratamiento y prevención del cáncer, por lo que muchas instituciones han dedicado gran parte de su tiempo a la investigación tanto a nivel genético como bioquímico en el desarrollo de nuevos fármacos.

De esta manera, en nuestro grupo de trabajo, se han realizado evaluaciones de citotoxicidad a los compuestos sintetizados a partir de los sustratos activados y acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena. Dichos productos han mostrado buenos resultados en selectividad sobre líneas celulares cancerosas humanas, como por ejemplo las líneas celulares de mama y pulmón.

Es por dicha razón, que se decidió evaluar la actividad de las lactonas sintetizadas en este trabajo, en pruebas de citotoxicidad bajo el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI). Las líneas celulares cancerosas humanas utilizadas en la prueba fueron: Sistema Nervioso Central (U251), células de adenocarcinoma de próstata (PC-3), células de leucemia de mieloblástica crónica (K562), células de adenocarcinoma de colon (HCT-15), células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), células de adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1) y líneas celulares de riñón (COS7).

En el ensayo preliminar se valoró la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados, trabajando sobre un barrido primario donde las células fueron expuestas a la sustancia prueba en una concentración conocida de 25 μ M (conocido como screening primario).

El screening primario valoro la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas humanas; dicho ensayo mostro que los compuestos con mayor actividad citotóxica,

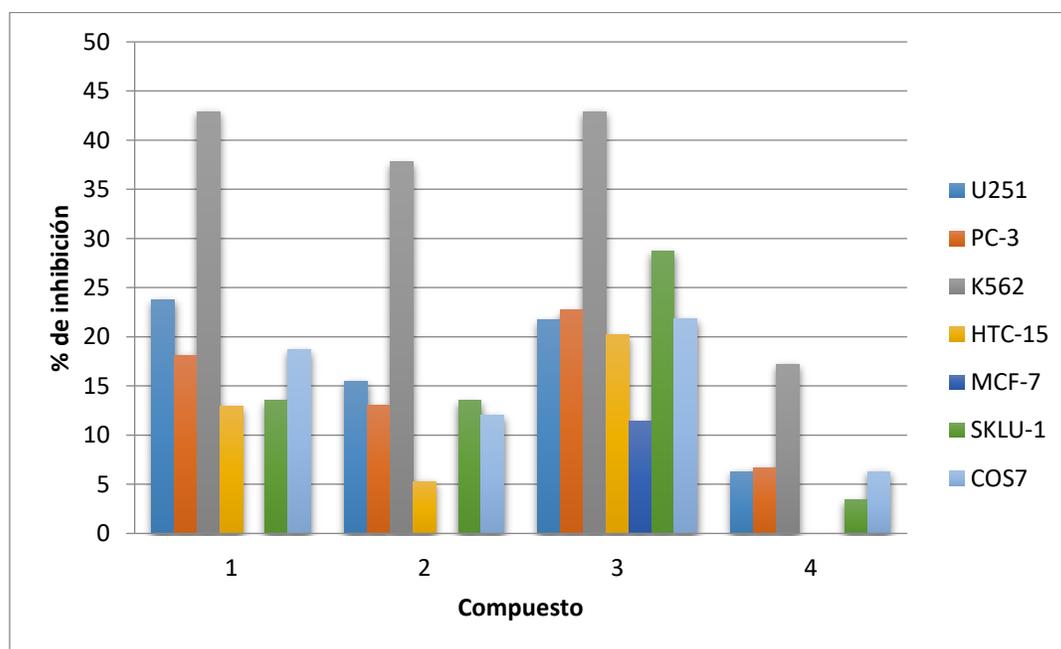
fueron las lactonas 3b y 3e para la línea K562, además de que las otras dos lactonas (3a y 3c) también mostraron una actividad mayor en esta línea de cáncer a comparación de las otras. Los resultados se resumen en la **Tabla 6** y la **Gráfica 1**:

Compuesto	Inhibición del crecimiento por línea celular						
	U251	PC-3	K562	HTC-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
3a	23.8	18.1	42.9	12.9	NC	13.5	18.7
3c	15.5	13.0	37.8	5.3	NC	13.5	12.0
3d	21.7	22.7	42.9	20.2	11.4	28.7	21.8
3e	6.3	6.7	17.2	NC	NC	3.4	6.3

Concentración: 25 µM
Vehículo: Metanol
Clave

- **U251: Sistema Nervioso Central**
- **PC-3: Células de adenocarcinoma de próstata**
- **K562: Células de leucemia de mieloblástica crónica**
- **HCT-15: Células de adenocarcinoma de colon**
- **MCF-7: Células de adenocarcinoma de mama**
- **SKLU-1: Células de adenocarcinoma de pulmón**
- **COS7: Líneas celulares de riñón**

Tabla 6. Screening primario de actividad citotóxica de compuestos sintetizados sobre líneas cancerosas humanas.



Grafica 1. Grafica de porcentaje de inhibición que genera cada lactona en las líneas celulares.

Con base en estos resultados, podemos ver que los compuestos **3a**, **3c** y **3d** tienen un porcentaje de inhibición mayor en la línea K562 (Células de leucemia de mieloblástica crónica), con lo cual podríamos decir que estos tres compuestos son específicos para esta línea de cáncer, sin embargo, sería necesario realizar un estudio más (Estudio CI_{50}) para verificar dicha información.

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un nuevo método para síntesis de γ -lactonas mediante una adición 1,6 tipo Michael sin la necesidad de utilizar organocatalizadores y/o metales de transición a través de una reacción nucleofílica entre azachalconas y diferentes acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena.

- Se establecieron las condiciones óptimas de reacción utilizando dos equivalentes de anhídrido trifluorometansulfónico como agente activante.
- Se sintetizó una familia de 4 diferentes γ -lactonas, las cuales son nuevas y no se encuentran reportadas en la literatura.
- Fue posible caracterizar los compuestos sintetizados mediante las técnicas de Infrarrojo (IR), Espectrometría de masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN ^1H) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C).
- Se evaluó la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados, llegando a la conclusión de que los compuestos **3a**, **3c** y **3d** son específicos para la línea K562 (Células de leucemia de mieloblástica crónica).

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

7.1. Equipos, material, reactivos y disolventes.

Todos los compuestos obtenidos se caracterizaron por espectroscopia de infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y ^{13}C) y espectrometría de masa (EM).

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27, empleando la técnica de pastilla con KBr. Los resultados son expresados en número de onda (ν , cm^{-1}).

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para todos los compuestos se determinó en un equipo Bruker Advance III de 300 MHz para el núcleo de ^1H y de 75 MHz para ^{13}C . Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en partes por millón (ppm), tomando como referencia al trimetilsilano (TMS): señal anchas (a), señal simple (s), señal doble (d), señal doble de doble (dd), señal triple (t), señal múltiple (m).

La espectrometría de masas de los compuestos sintetizados se realizó en un espectrómetro de masas Jeol, The AcuTOF JMS-T 100LC, para la técnica de análisis directo en tiempo real (DART).

Los puntos de fusión de los compuestos obtenidos, fueron medidos con un aparato Melt-Temp II y los datos obtenidos se reportan sin corrección.

Todos los reactivos y disolventes fueron adquiridos de proveedores especializados con pureza de grado analítico y fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

La infraestructura tanto de instalaciones, cristalería y equipo especializado para desarrollar este proyecto fue provída por el laboratorio de Departamento de Química Inorgánica del Instituto de Química de la UNAM.

7.2. Método general para la síntesis de los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena.

Los acetales de *bis*(trimetilsilil)cetena utilizados en este trabajo se prepararon siguiendo el procedimiento reportado por Ainsworth usando los ácidos carboxílicos como materiales de partida.

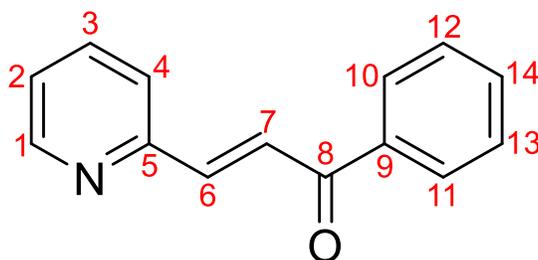
En un matraz bola de 100 mL, provisto de un agitador magnético, previamente purgado y puesto bajo atmosfera de N_2 , se disolvieron 0.1 mol de ácido correspondiente en 30 mL de THF anhidro. El sistema se llevó a -78°C utilizando una mezcla de CO_2 sólido y acetona. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionó mediante goteo lento, 2 equivalentes de LDA. Manteniendo la temperatura de -78°C se dejó transcurrir 30 minutos para posteriormente adicionar 2

equivalentes de TMSCl. Una vez realizado este paso, se deja transcurrir la reacción por hora y media a la misma temperatura y finalmente se deja alcanzar la temperatura ambiente. Se monta un equipo de filtración al vacío, muy bien sellado, purgado y bajo atmosfera de N₂, esto para eliminar las sales de silicio formadas. Empleando una cánula, se filtra y colecta la fase orgánica en un balón equipado para inmediatamente después purificar mediante un sistema de destilación a presión reducida, bajo condición anhidra e inerte.

7.3. Método general para la síntesis de las chalconas.

En un matraz bola de 100 mL, provisto de un agitador magnético, se agregó 0.025 mol del aldehído correspondiente (en este caso, 2-piridincarboxialdehído) junto con 2 mL de metanol, posteriormente, el sistema se llevó a una temperatura de 0°C utilizando un baño de hielo. Una vez alcanzada esta temperatura, se disolvió por aparte 0.013 mol de NaOH en la mínima cantidad de agua y se agregó a la mezcla de reacción; terminado este paso, se prosiguió a adicionar 0.013 mol de acetofenona mediante un goteo lento. Se dejó que la reacción transcurriera por 4 horas hasta que se formó un precipitado color amarillo; se filtró al vacío y se le realizaron lavados con metanol. Se procedió a purificar el compuesto mediante cromatografía en columna usando una sílice de tamaño de partícula de 60 – 200 nm y utilizando una mezcla de eluyentes hexano / acetato de etilo. Como producto final, se obtuvo un sólido color verde amarillento, el cual es soluble en disolventes tales como CHCl₃, CH₂Cl₂ y acetona.

Sus señales características en RMN de ¹H así como de ¹³C se muestran a continuación:



Compuesto 1a

Formula molecular: $C_{14}H_{11}N_1O_1$

Peso molecular: **209.08 g/mol**

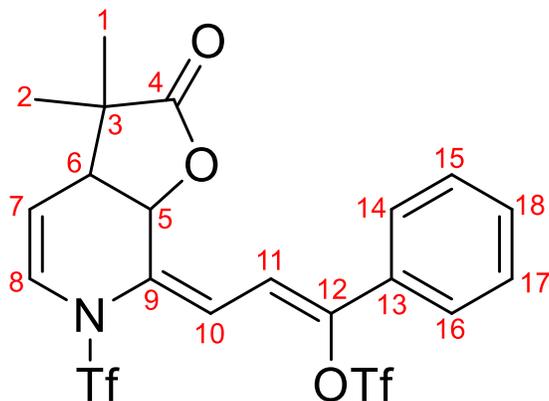
RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7.34 (dd, 1H, H-1); 7.54 (m, 3H, H-2 – H-4); 7.63 (t, 1H, H-5); 7.77 (dd, 1H, H-6); 7.82 (d, 1H, H-7); 8.13 (m, 3H, H-8 – H-10); 8.73 (d, 1H, H-11). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ ppm:** 124.4 (C₂), 125.4 (C₄), 125.6 (C₇), 128.6 (C₁₀ y C₁₁), 128.7 (C₁₂ y C₁₃), 133.0 (C₁₄), 136.9 (C₉), 137.8 (C₃), 142.6 (C₆), 150.1 (C₁), 153.1 (C₅), 190.4 (C₈).

7.4. Método general para la síntesis de las lactonas.

En un matraz bola de 100 mL, provisto de un agitador magnético, previamente purgado y puesto bajo atmosfera inerte de N_2 , se disolvieron 2 mmol de chalcona con 25 mL de CH_2Cl_2 anhidro. El sistema se llevó a $-78^\circ C$ utilizando una mezcla de CO_2 sólido y acetona. Una vez alcanzada esta temperatura, se adicionó de manera lenta, 2 equivalentes de Tf_2O . Manteniendo esta temperatura de reacción, se dejó transcurrir 45 minutos para posteriormente agregar 1.2 equivalentes del acetal de cetena correspondiente. Se conservó la temperatura de $-78^\circ C$ por una hora más y finalmente se dejó alcanzar la temperatura ambiente dejando la reacción por 6 horas más. Al crudo obtenido se le realizaron tres lavados de 15 mL cada uno con agua separando la fase orgánica para posteriormente secarla con Na_2SO_4 y llevarla a sequedad para su posterior purificación. Se purifico mediante cromatografía en columna usando una sílice de tamaño de partícula de 60 – 200 nm y utilizando una mezcla de eluyentes hexano / acetato de etilo. Para las 4 lactonas, se obtuvo como producto final un sólido, los cuales todos son solubles en $CHCl_3$, CH_2Cl_2 y acetona.

7.4.1. Resumen espectroscopio de las lactonas.

En el siguiente apartado se describe las señales características de los compuestos obtenidos mediante esta técnica de síntesis.

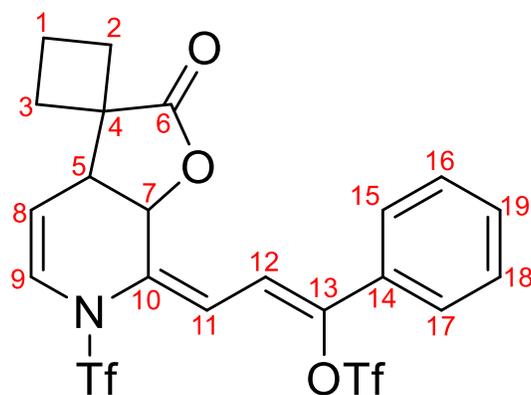


Compuesto 3a

Formula molecular: **C₂₀H₁₇F₆N₁O₇S₂**

Peso molecular: **561.04 g/mol**

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 1.32 (s, 3H, H-1); 1.49 (s, 3H, H-2); 2.96 (sa, 1H, H-6); 5.18 (dd, *J* = 8.3, 2.8 Hz, 1H, H-7); 5.54 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-5); 6.70 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-10); 6.74 (d, 1H, H-8); 6.81 (s, 1H, H-11); 7.52 (m, 5H, Arom.). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)** δ ppm: 20.9 (C₁); 24.7 (C₂); 45.4 (C₃); 178.7 (C₄); 70.0 (C₅); 44.1 (C₆); 123.4 (C₇); 125.4 (C₈); 131.4 (C₉); 114.3 (C₁₀); 108.4 (C₁₁); 152.8 (C₁₂); 130.2 (C₁₃); 129.0 (C₁₄); 129.7 (C₁₅); 129.0 (C₁₆); 129.7 (C₁₇); 129.0 (C₁₈). **IR (Pastilla KBr, ν, cm⁻¹):** 1785 (C=O). **EM (DART⁺, 19.8 eV, *m/z* %):** 561 [M]⁺; 561 [M + 1]⁺; 579 [M + 18]⁺; 412 [M - 148]⁺. **EMAR (ESI⁺, 1 eV, *m/z* %):** observado 562.04260, calculado 652.04289, C₂₀H₁₈F₆N₁O₇S₂, correspondiente al ion [M + H]⁺. **Otros datos:** solido color blanco inodoro soluble en CH₂Cl₂, CHCl₃, acetona.

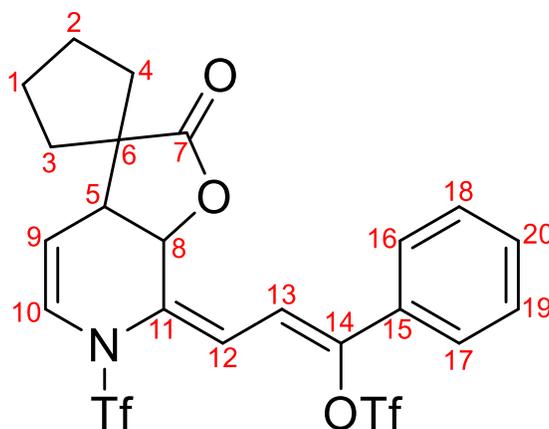


Compuesto 3c

Formula molecular: **C₂₁H₁₇F₆N₁O₇S₂**

Peso molecular: **573.04 g/mol**

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 1.59 (s, 2H, H-1); 2.25 (m, 2H, H-2); 2.43 (m, 2H, H-3); 2.53 (s, 1H, H-5); 5.11 (dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H, H-8); 5.36 (d, *J* = 5.6 Hz 1H, H-7); 6.63 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, H-11); 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9); 6.81 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, H-12); 7.51 (s, 5H, Arom.). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm:** 16.1 (C₁); 24.2 (C₂); 29.71 (C₃); 31.7 (C₅); 44.9 (C₄); 69.2 (C₇); 106.2 (C₁₂); 114.3 (C₈); 122.85 (C₁₁); 125.7 (C₉); 129.0 (C₁₅); 129.0 (C₁₇); 129.6 (C₁₈); 129.6 (C₁₉); 129.6 (C₁₆); 130.2 (C₁₄); 131.4 (C₁₀); 152.7 (C₁₃); 177.7 (C₆). **IR (Pastilla KBr, v, cm⁻¹):** 1786 (C=O). **EM (DART⁺, 19.8 eV, *m/z* %):** 591 [M + 18]⁺; 424 [M + 18 – 148]⁺. **EMAR (ESI⁺, 1 eV, *m/z* %):** observado 591.064846, calculado 591.06944, C₂₁H₂₁F₆N₂O₇S₂, correspondiente al ion [M + 18]⁺; **Otros datos:** solido color blanco amarillento inodoro soluble en CH₂Cl₂, CHCl₃, acetona.



Compuesto **3d**

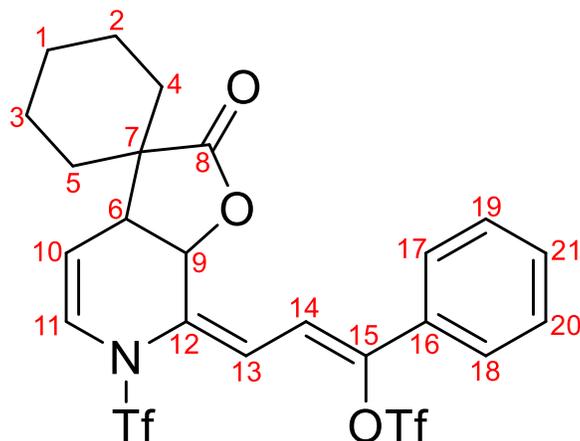
Formula molecular: **C₂₂H₁₉F₆N₁O₇S₂**

Peso molecular: **587.05 g/mol**

¹H NMR (301 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (d, *J* = 5.9 Hz, 5H), 6.58 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H),

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 1.55 (m, 2H, H-1); 1.58 (m, 2H, H-2); 1.84 (m, 2H, H-3); 1.94 (m, 2H, H-4); 2.72 (s, 1H, H-5); 4.92 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, H-9); 5.26 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-8); 6.47 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, H-12); 6.49 (d, *J* = 7.4 Hz

,1H, H-10); 6.58 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, H-13); 7.29 (s, 5H, Arom.). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm: 25.0 (C₁); 25.2 (C₂); 31.2 (C₅); 37.1 (C₃); 45.1 (C₄); 54.2 (C₆); 70.4 (C₈); 108.0 (C₁₃); 114.3 (C₉); 122.93 (C₁₂); 129.0 (C₁₆); 129.0 (C₂₀); 129.0 (C₁₇); 129.8 (C₁₀); 129.8 (C₁₈); 129.8 (C₁₉); 130.3 (C₁₅); 131.4 (C₁₁); 152.6 (C₁₄); 178.9 (C₇). IR (Pastilla KBr, ν , cm^{-1}): 1780 (C=O). EM (EI^+ , m/z %): 587 [M] $^+$. EMAR (ESI^+ , 1 eV, m/z %): Otros datos: solido color blanco inodoro soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 , acetona.



Compuesto 3e

Formula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_1\text{O}_7\text{S}_2$

Peso molecular: 601.07 g/mol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm: 1.28 (m, 2H, H-1); 1.58 (m, 2H, H-2); 1.83 (m, 2H, H-5 y H-6); 1.85 (m, 2H, H-3); 1.86 (m, 2H, H-4); 3.17 (sa, 1H, H-6); 5.18 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-10); 5.31 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-9); 6.63 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-13); 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-14); 6.82 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-11); 7.51 (s, 5H, Arom.). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm: 21.9 (C₂); 22.5 (C₃); 25.0 (C₁); 29.5 (C₄); 31.9 (C₅); 42.0 (C₆); 48.4 (C₇); 69.8 (C₉); 108.0 (C₁₄); 114.4 (C₁₀); 123.3 (C₁₃); 125.7 (C₁₁); 129.9 (C₁₇); 129.0 (C₁₉); 129.0 (C₂₀); 129.9 (C₁₈); 129.9 (C₂₁); 130.2 (C₁₆); 131.4 (C₁₂); 152.7 (C₁₅); 178.1 (C₈). IR (Pastilla KBr, ν , cm^{-1}): 1765 (C=O). EM (DART^+ , 19.8 eV, m/z %): 619 [$\text{M} + 18$] $^+$; 452 [$\text{M} + 18 - 148$] $^+$. EMAR (ESI^+ , 1 eV, m/z %): observado 619.09795, calculado 619.10074, $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$, correspondiente al

ion $[M + 18]^+$; **Otros datos:** solido color naranja inodoro soluble en CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, acetona.

7.5. Pruebas biológicas: ensayo preliminar de citotoxicidad.

7.5.1. Determinación del porcentaje de inhibición celular

Para los ensayos preliminares de citotoxicidad se utilizaron diferentes líneas celulares de cáncer humano que pertenecen al panel NCI (National Cancer Institute): células de cáncer de sistema nervioso central U251, adenocarcinoma de próstata PC-3, leucemia mieloblástica K562, adenocarcinoma de colon HCT-15, adenocarcinoma de mama MCF-7, adenocarcinoma de pulmón SKLU-1 y líneas celulares de riñón COS7.

7.5.2. Preparación de líneas celulares

Las células fueron adaptadas al medio de cultivo RMPI-1640 del Roswell Park Memorial Institute adicionando suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina. Con excepción de la línea K-562, las líneas restantes se adhirieron a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adiciono 1 mL de tripsina-EDTA al 0.05%. Una vez que las células se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo, se les adiciono 5-10 mL del medio de cultivo para inactivar la tripsina que produce la digestión de las proteínas de adherencia. Las células de suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugaron por tres minutos para resuspender las células. De la suspensión se tomaron 0.05 mL de inculo y se resuspendieron en 0.045 mL de azul de triptófano.

7.5.3. Conteo de células viables

Se tomó una alícuota de 10 μ L y el conteo de las células se realizó en una cámara Neubauer con ayuda de un microscopio. El número de células por mL se suspensión se calculó con la siguiente ecuación:

$$C = (RC)(10^{-4})$$

Dónde:

- C = número de células en 1 ml de suspensión
- RC = promedio de células obtenidas del conteo de la cámara Neubauer

Una vez determinado el número de células por mililitro se depositó el inóculo en un volumen celular de 10 μL /pozo.

7.5.4. Ensayo de actividad citotóxica.

Se utilizaron microplacas de plástico, cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado, se preincubó por 24 horas a 37 °C bajo atmósfera de CO₂ al 5% y 10% de humedad relativa. Una vez que las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento se adicionaron soluciones de los compuestos problema en concentración de 50 μL en 100 μL de DMSO y aforando hasta los 200 μL , para finalmente incubar las células durante 48 horas bajo las mismas condiciones.

Al finalizar el periodo de incubación se fijaron las células *in situ*, añadiendo 50 μL de ácido tricloroacético al 50 % para las células adheridas, y 80% para las células en suspensión, para incubarse nuevamente durante 60 minutos a 4 °C.

Las células se tiñeron con 100 μL de sulforodamina B (SRB) al 0.4% y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con una solución de ácido acético al 1% y secar completamente, se adicionaron 100 μL de solución *buffer tris* (Sigma).

Finalmente, la densidad óptica (DO) o absorbancia se determinó en un lector de microplacas, con una longitud de onda de 515 nm. La intensidad de color es directamente proporcional al número de células vivas, y por lo tanto, a mayor coloración, mayor porcentaje de inhibición de crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme a la siguiente ecuación:

$$\%inhibicion\ celular = 100 - \left[\frac{B}{A \times 100} \right]$$

Dónde:

- A = densidad óptica (DO) de las células sin tratamiento.
- B = DO de las células con los sustratos prueba o de referencia.

8. Bibliografía

¹ Sanchez Sancho, F; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 11, 3209.

² Patai, S., Supplement B: *The chemistry of acid derivates, Part 1*, John Wiley & Sons, London, **1979**, Capitulo 10.

³ a) Danishefsky, S.; Schuda, P, F.; Kitahara, T.; Etheredge, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 6066. b) Gertsch, J.; Stichner, O.; Schmidt, T.; Heilmann, J. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 66, 214. c) Cho, J. C.; Kim, A. R.; Jung, J. H.; Chun, T.; Rhee, M. H.; Yoo, E. S. *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, 492, 85. d) Picman, A. K. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1986**, 14, 225.

⁴ a) Nicolau, K. C., *Tetrahedron*, **1977**, 33, 683. b) Back, T. G., *Tetrahedron* **1977**, 33, 3041.

⁵ a) Shimada, S.; Hashimoto, Y.; Saigo, K. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 5226. B) Regen, S. L.; Kimura. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2064. C) Brocksom, T. J.; Coelho, F.; Depres, J, P.; Greene, A.

⁶ Hofman, R. E. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1841.

⁷ Muzler, J.; Altenbach, H. J.; Braun, M.; Krohn,.; Reissig, H. U. *Organic Synthesis Highlights*, OVCH Verlagsgesellschaft mbH, **1991**.

⁸ Renz, M.; Meunier, B. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737.

⁹ Merecias Aparicio Saul Romay (**2017**), *Sintesis y evaluacion biologica de δ-lactonas derivadas de 2-(piridin-3-il)-benzo[d]tiazol* (Tesis de maestria), Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico.

¹⁰ Ainsworth, C.; Kuo, Y-N. *J. Organomet. Chem.* **1972**, 46, 73.

- ¹¹ Dubois, J. E.; Axiotis, G. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2143.
- ¹² Miadenovaa. M.; Bellassoud, M. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 725.
- ¹³ Rivera H. A.; Chans G.; Rudler H.; Lopez C. J.; Toscano A.; Alvarez C. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 1861.
- ¹⁴ Garduño Alva, A.; Xu, Y.; Gaulo Soberanes, N.; Lopez Cortes, J. G.; Rudler, H.; Parlier, A.; Ortega Alfaro, M. C.; Alvarez Toledano, C.; Toscano, R. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3714.
- ¹⁵ Rivera H. A.; Lopez. J. I.; Carmona R. G.; Toscano A.; Penieres C. J.; Alvarez C. *Tetrahedron Letters*, **2015**, *56*, 4829.
- ¹⁶ Ávila Castro Alberto, (**2013**), *Reactividad de diazochalconas frente a acetales de bis(trimetilsilil)cetena*, (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- ¹⁷ Carey F., A., *Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis*; Elsevier, USA, **2005**.
- ¹⁸ Kurt L., Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Springer, USA, **2007**.
- ¹⁹ T. Poon, B.P. Mundy, T.W. Shattuck, *The Michael reaction*, J. Chem. Educ *79*, **2002**.
- ²⁰ Narasaka, K.; Soai, K.; Mukaiyama, T.; Chem. Lett. **1974**, 1223.
- ²¹ RajanBabu, T. V. J. Org. Chem. **1984**, *49*, 2083.
- ²² Akkattu T. Biju, *Organocatalytic Asymmetric 1,6-Addition Reactions*.
- ²³ Y. Hayashi, D. Okamura, S. Umemiya, T. Uchimaru, ChemCatChem **2012**, *4*, 959.
- ²⁴ Pankaj Chauhan, a Ugur Kaya, and Dieter Enders (**2017**), *Advances in Organocatalytic 1,6-Addition Reactions: Enantioselective Construction of Remote Stereogenic Centers*.
- ²⁵ Akkattu T. Biju, *Organocatalytic Asymmetric 1,6-Addition Reactions*.
- ²⁶ Downs Laura E., Wolfe Derek M., Schreiner Peter R., *Organic Base-Mediated Condensation of Pyridincarboxaldehydes to Azachalcones*, **2004**.
- ²⁷ Patai, S., Supplement B: *The chemistry of acid derivatives, Part 1*, John Wiley & Sons, London, **1979**, Chapter 8.

²⁸ Prakasham A.P., Gangwar M. K., Ghosh P., *Michael addition of cyclic β -oxo ester and α -methyl cyano ester substrates with activated olefins by iron complexes of benzimidazole derived N-heterocyclic carbene ligands*, Journal of Organometallic Chemistry, 859, **2018**, 106.

²⁹ Canisius J., Mobley T. A., Berger S., Krause N., *Mechanism of 1,6-Addition Reactions of Organocuprates: Detailed NMR Spectroscopic Study of a Cuprate-Enyne π Complex*, Chem. Eur. J. 7, **2001**, No. 12.

³⁰ Chauhan P., Kaya U., Enders D., *Advances in Organocatalytic 1,6-Addition Reactions: Enantioselective Construction of Remote Stereogenic Centers*, Advanced Synthesis & Catalysis, 359, **2017**, 888.

³¹ Medline Plus, 2016b; Organización Mundial de la Salud [OMS]