



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE TIENOPIRIDINAS DISEÑADOS COMO  
INHIBIDORES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX M1

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB CÉSAR SEBASTIAN HUERTA GARCÍA

TUTOR

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

CD. MX., MAYO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE TIENOPIRIDINAS  
DISEÑADOS COMO INHIBIDORES DEL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX M1**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**QFB CÉSAR SEBASTIAN HUERTA GARCÍA**



Ciudad de México, mayo 2020

---

## **Jurado asignado**

- **Presidente:** Dr. José Alfredo Vázquez Martínez      Facultad de Química, UNAM
- **Vocal:**      Dr. Marcos Hernández Rodríguez      Instituto de Química, UNAM
- **Vocal:**      Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha      Facultad de Química, UNAM
- **Vocal:**      Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar      Facultad de Química, UNAM
- **Secretario:** Dr. Jaime Pérez Villanueva      UAM-Xochimilco

## **Sitio donde se desarrolló el tema**

FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,  
LABORATORIO 122, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## **Adicionalmente se llevó a cabo una estancia en**

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS FARMACÉUTICAS, KATZ GROUP-REXALL  
CENTRE FOR PHARMACY & HEALTH RESEARCH, LABORATORIO 2-081, UNIVERSIDAD  
DE ALBERTA, CANADÁ

## **Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en**

*258<sup>th</sup> American Chemical Society National Meeting and Exposition* llevada a cabo en San  
Diego, California en agosto de 2019 bajo la modalidad póster:

*Synthesis of new FDI-6 derivatives as inhibitors and radiotracers of FOXM1*

### **Agradecimientos institucionales**

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional para estudios de posgrado y la beca de movilidad internacional recibidas (CVU: 889098), así como por el apoyo brindado dentro del proyecto 251807.
- Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), UNAM, proyecto 5000-9133, cuyo apoyo resulta fundamental en el funcionamiento de nuestro laboratorio.
- Al *Noujaim Fund for Strategic Initiatives* por el apoyo recibido para el trabajo llevado a cabo en la Universidad de Alberta.
- Al Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, por el apoyo brindado para asistir a la *258<sup>th</sup> ACS National Meeting* en San Diego, California y poder presentar parte de los resultados de este trabajo en la modalidad póster.
- Al personal de la USAII por la determinación de la espectroscopía y espectrometría presentada en esta tesis: M. en C. Nayeli López Balbiaux y M. en C. Rosa Isela del Villar Morales (RMN), Q. Georgina Duarte Lisci (EM) y Q. Marisela Gutiérrez Franco (IR).

### **Agradecimientos personales**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y particularmente a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en sus aulas y laboratorios, proporcionándome lo necesario para mi desarrollo académico y personal. Así mismo al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por el apoyo otorgado durante mi estancia en el programa.
- Al Dr. Rafael Castillo y la Dra. Alicia Hernández por toda la experiencia y conocimiento que me han compartido; así como por el apoyo recibido tanto en la parte académica como personal.
- Al Dr. Carlos Velázquez por darme la oportunidad de incorporarme a su proyecto, e invitarme y apoyarme para realizar una estancia en su laboratorio; lo que aportó mucho en mi crecimiento académico y personal.
- Al Dr. David Pérez por todo el tiempo dedicado a mi aprendizaje y al avance de mi proyecto durante la estancia, así como a todo el tiempo invertido en ayudarme a entender y conocer Edmonton. También le agradezco la revisión que hizo de este texto.

## **AGRADECIMIENTOS**

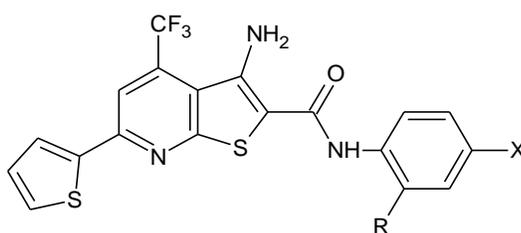
---

- A los miembros del Jurado por sus valiosos comentarios y observaciones para mejorar este trabajo.
- Al Dr. José G. López Cortés por el apoyo brindado en la parte inicial de mis estudios de maestría.
- A la M. en C. Mara I. Campos Almazán por ayudarme a resolver muchas dudas operativas y de discusión de resultados en la parte computacional y biológica.
- A la QFB Diana Prado Romero por su revisión, comentarios y discusiones entabladas que aportaron mucho a que este proyecto y este texto tuviera y me hiciera más sentido.
- Al alumno de estancia corta de investigación Oscar Rincón Garduño, por su ayuda en la obtención de cuatro de los derivados de FDI-6.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio 122: Carlos Naranjo, Cristian Nava, Daniela Rubalcava, David Tovar, Diana Prado, Francisco Barrera, Hugo Jiménez, Jorge Victoria, José Becerril, Mara Campos y Miguel Flores.

## Resumen

En el presente trabajo se reporta la síntesis, caracterización, evaluación biológica y estudios de acoplamiento molecular de 19 nuevas tieno[2,3-*b*]piridinas con un sustituyente de tipo fenilacetamida, sustituida con un halógeno en la posición cuatro (F, Cl, Br y I) y en posición dos con grupos de diferente densidad electrónica (-H, -CH<sub>3</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>) (**FDI-6**, **1-19**, Figura A), diseñados como inhibidores del factor de transcripción FOXM1. Los ensayos biológicos consistieron en la medición de los niveles de expresión de la proteína en la línea celular de cáncer de mama **MDA-MB-231**, a través del ensayo de Western Blot después del tratamiento con los compuestos, así como la determinación de la CI<sub>50</sub> en la misma línea celular.

Los compuestos **1-19** presentaron diversos valores de porcentaje de expresión de la proteína en el ensayo de Western Blot, siendo los compuestos con sustituyente nitrilo los que redujeron significativamente los niveles de la proteína, destacando entre estos los compuestos **7** y **17**. Esto se relacionó con los ensayos de viabilidad celular donde estos compuestos también fueron los que menor CI<sub>50</sub> presentaron. Estos resultados dan pauta a establecer un punto de partida para la optimización de las estructuras anteriormente mencionadas, con la finalidad de encontrar moléculas con potencial anticancerígeno.



<b>FDI-6:</b> R = H, X = F	<b>5:</b> R = H, X = Cl	<b>10:</b> R = H, X = Br	<b>15:</b> R = H, X = I
<b>1:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = F	<b>6:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Cl	<b>11:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Br	<b>16:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = I
<b>2:</b> R = CN, X = F	<b>7:</b> R = CN, X = Cl	<b>12:</b> R = CN, X = Br	<b>17:</b> R = CN, X = I
<b>3:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = F	<b>8:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Cl	<b>13:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Br	<b>18:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = I
<b>4:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = F	<b>9:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Cl	<b>14:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Br	<b>19:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = I

**Figura A.** Compuestos sintetizados y evaluados en este trabajo.

Adicionalmente, se trabajó en la estandarización del ensayo de desplazamiento térmico celular (CETSA, por sus siglas en inglés) para la FOXM1, el cual promete ser un ensayo útil para determinar si los compuestos interactúan con la proteína blanco en un sistema celular completo.



**Abreviaturas y símbolos**

%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
AcOET	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> / Ionización química a presión atmosférica
Arg	Arginina
ARN	Ácido Ribonucleico
Asn	Asparagina
Atm	Atmósfera
ATR	Reflexión atenuada total
cat.	Catalítico
CCF	Cromatografía en capa fina
CETSA	<i>Cellular Thermal Shift Assay</i> / Ensayo de desplazamiento térmico celular
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
d	Señal doble
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
dd	Señal doble de dobles
DMF	Dimetiformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPBS	Buffer salino fosfatado Dulbecco de GIBCO
DUA	Dominio de Unión a ADN
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ENT	Enfermedad No Transmisible
eq.	Equivalentes
ESI	<i>Electrospray ionization</i> / Ionización en electrospray
EtOH	Etanol

FDI-6	Inhibidor directo de la FOXM1-6
FOXM1	Proteína Forkhead Box M1
FT	Factor de transcripción
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier
g	Gramo
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
h	Horas
HER2	Factor de crecimiento epidérmico 2
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlaton spectroscopy</i> / Espectroscopía de correlación heteronuclear a múltiples enlaces de distancia
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i> / Espectroscopía de correlación heteronuclear a un enlace de distancia
Hz	<i>Hertz</i> / Hercio
IE	Impacto electrónico
IEE	Incidencia Estandarizada por Edad
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
M	Molaridad
mARN	ARN mensajero
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama triple negativo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MTT	Bromuro de 2-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)-3,5-difenil-2H-tetrazol-3-io
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida
<b>ND</b>	No determinado
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i> / Banco de datos de proteínas
<b>pf</b>	Punto de fusión
<b>pH</b>	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio
<b>pKa</b>	Logaritmo negativo de la constante de acidez
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>RIPA</b>	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RPMI</b>	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>s</b>	Señal simple
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>S<sub>N</sub>2</b>	Sustitución nucleofílica bimolecular
<b>t</b>	Triplete
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TAD</b>	Dominio de transactivación
<b>TBST</b>	Solución salina tamponada con tris(hidroximetil)aminometano y polisorbato 20
<b>TIP3P</b>	Potencial intermolecular transferible con 3 puntos
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>USAI</b>	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria
<b>UV</b>	Luz Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular

<b>W</b>	Watts
----------	-------

• **ÍNDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1. EL CÁNCER</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA .....	3
2.1.2. GENERALIDADES.....	4
<b>2.2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. GENERALIDADES.....	6
2.2.2. TERAPIA DIRIGIDA.....	8
<b>2.3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</b> .....	<b>11</b>
2.3.1. TRANSCRIPCIÓN.....	11
2.3.2. GENERALIDADES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	12
2.3.3. USO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN COMO BLANCOS BIOLÓGICOS .....	12
2.3.4. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX M1 .....	16
2.3.5. INHIBIDORES <i>IN VITRO</i> DE FOXM1 .....	18
<b>2.4. TIENOPIRIDINAS</b> .....	<b>20</b>
2.4.1. GENERALIDADES.....	20
2.4.2. TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINAS .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>29</b>
<b>6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
<b>6.1. PARTE QUÍMICA</b> .....	<b>31</b>
6.1.1. SÍNTESIS DE LAS ANILINAS ADECUADAMENTE SUSTITUIDAS.....	31
6.1.2. SÍNTESIS DE LAS 2-CLORO- <i>N</i> -FENILACETAMIDAS .....	32
6.1.3. SÍNTESIS DE 6-(TIOFEN-2-IL)-2-TIOXO-4-(TRIFLUOROMETIL)-1,2-DIHDROPIRIDINA-3-CARBONITRILO (TPR) .....	33
6.1.4. SÍNTESIS DEL ANILLO DE TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA .....	33

<b>6.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>34</b>
6.2.1. CULTIVO CELULAR.....	34
6.2.2. EXPRESIÓN DE FOXM1 (WESTERN BLOT).....	34
6.2.3. ENSAYO DE MTT.....	35
6.2.4. CETSA.....	36
<b>6.3. ESTUDIOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>37</b>
6.3.1. PREPARACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	37
6.3.2. PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS.....	38
6.3.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	38
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>7.1. PARTE QUÍMICA.....</b>	<b>39</b>
7.1.1. OBTENCIÓN DE LAS ANILINAS ADECUADAMENTE SUSTITUIDAS.....	39
7.1.2. SÍNTESIS DE LAS 2-CLORO- <i>N</i> -FENILACETAMIDAS (CFDI-6, C1–C19).....	48
7.1.3. SÍNTESIS DEL 6-(TIOFEN-2-IL)-2-TIOXO-4-(TRIFLUOROMETIL)-1,2-DIHIROPIDRIDINA-3-CARBONITRILLO (TPR).....	52
7.1.4. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE FDI-6.....	58
<b>7.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>65</b>
7.2.1. ENSAYO DE WESTERN BLOT.....	65
7.2.2. ENSAYO DE MTT.....	68
7.2.3. ENSAYO CETSA.....	71
<b>7.3. ESTUDIOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>74</b>
7.3.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	74
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>83</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
<b>11. ANEXO I–SECCIÓN QUÍMICA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>93</b>
11.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES.....	93
11.2. TÉCNICAS PARA LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS.....	95
11.2.2. 4-BROMOANILINA (A10).....	97
11.2.3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LAS 4-BROMOANILINAS (A12–A13).....	98
11.2.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LAS 2-CLORO- <i>N</i> -FENILACETAMIDAS (CFDI-6, C1–C20).....	100
11.2.5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE 6-(TIOFEN-2-IL)-2-TIOXO-4-(TRIFLUOROMETIL)-1,2-DIHIROPIDRIDINA-3-CARBONITRILLO (TPR).....	108
11.2.6. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE 3-AMINO- <i>N</i> -FENIL-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (FDI-6, 1-19).....	109

<b>12. ANEXO II–DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	<b>121</b>
12.1. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES .....	121
12.2. PROCEDIMIENTO DETALLADO DEL ENSAYO DE WESTERN BLOT.....	122
12.3. RESULTADOS DE WESTERN BLOT DE CADA REPETICIÓN.....	125
12.4. PROCEDIMIENTO DETALLADO DE LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT .....	133
12.5. PROCEDIMIENTO DETALLADO DEL ENSAYO CETSA .....	133
12.6. RESULTADOS DE CETSA DE CADA REPETICIÓN .....	136
<b>13. ANEXO III–ESPECTROS</b>	<b>139</b>
13.1. 2-AMINO-5-BROMOBENZONITRILLO (A12).....	139
13.1. 2-BROMO-4-NITROANILINA (A13).....	140
13.2. <i>P</i> -IODOANILINA (A15) .....	142
13.3. 2-AMINO-5-YODOBENZONITRILLO (A17) .....	143
13.1. 2-NITRO-4-YODOANILINA (A18) .....	144
13.2. 2-(TRIFLUOROMETIL)-4-YODOANILINA (A19).....	145
13.3. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-FLUOROFENIL)ACETAMIDA (CFDI-6).....	146
13.4. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-FLUORO-2-METILFENIL)ACETAMIDA (C1).....	147
13.5. 2-CLORO- <i>N</i> -(2-CIANO-4-FLUOROFENIL)ACETAMIDA (C2) .....	148
13.6. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-FLUORO-2-NITROFENIL)ACETAMIDA (C3) .....	149
13.7. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-FLUORO-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)ACETAMIDA (C4).....	150
13.8. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-CLOROFENIL)ACETAMIDA (C5) .....	151
13.9. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-METILFENIL)ACETAMIDA (C6) .....	152
13.10. 2-CLORO- <i>N</i> -(2-CIANO-4-CLOROFENIL)ACETAMIDA (C7).....	153
13.11. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-NITROFENIL)ACETAMIDA (C8) .....	155
13.12. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)ACETAMIDA (C9).....	156
13.13. <i>N</i> -(4-BROMOFENIL)-2-CLOROACETAMIDA (C10).....	157
13.14. <i>N</i> -(4-BROMO-2-METILFENIL)-2-CLOROACETAMIDA (C11).....	158
13.15. <i>N</i> -(4-BROMO-2-CIANOFENIL)-2-CLOROACETAMIDA (C12) .....	159
13.16. <i>N</i> -(4-BROMO-2-NITROFENIL)-2-CLOROACETAMIDA (C13) .....	160
13.17. <i>N</i> -(4-BROMO-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)-2-CLOROACETAMIDA (C14).....	162
13.18. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-YODOFENIL)ACETAMIDA (C15) .....	163
13.19. 2-CLORO- <i>N</i> -(2-METIL-4-YODOFENIL)ACETAMIDA (C16) .....	165
13.20. 2-CLORO- <i>N</i> -(4-YODO-2-CIANOFENIL)ACETAMIDA (C17).....	166
13.21. 2-CLORO- <i>N</i> -(2-NITRO-4-YODOFENIL)ACETAMIDA (C18).....	167
13.22. 2-CLORO- <i>N</i> -(2-(TRIFLUOROMETIL)-4-YODOFENIL)ACETAMIDA (C19) .....	169
13.23. 6-(TIOFEN-2-IL)-2-TIOXO-4-(TRIFLUOROMETIL)-1,2-DIHDROPIRIDINA-3-CARBONITRILLO (TPR).....	171
13.24. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-FLUOROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENTO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (FDI-6).....	172
13.25. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-FLUORO-2-METILFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENTO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (1).....	174
13.26. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-CIANO-4-FLUOROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENTO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (2).....	176

13.27. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-FLUORO-2-NITROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (3).....	178
13.28. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-FLUOR-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (4) .....	180
13.29. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-CLOROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (5).....	182
13.30. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-METILFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (6).....	184
13.31. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-CIANO-4-CLOROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (7).....	186
13.32. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-NITROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (8).....	188
13.33. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-CLORO-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (9) .....	190
13.34. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-BROMOFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (10).....	192
13.35. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-BROMO-2-METILFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (11).....	194
13.36. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-BROMO-2-CIANO FENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (12).....	196
13.37. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-BROMO-2-NITROFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (13).....	198
13.38. 3-AMINO- <i>N</i> -(4-BROMO-2-(TRIFLUOROMETIL)FENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (14) .....	200
13.39. 3-AMINO-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)- <i>N</i> -(4-YODOFENIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (15).....	202
13.40. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-METIL-4-YODOFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (16).....	204
13.41. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-CIANO-4-YODOFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (17).....	206
13.42. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-NITRO-4-YODOFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (18).....	208
13.43. 3-AMINO- <i>N</i> -(2-(TRIFLUOROMETIL)-4-YODOFENIL)-6-(TIOFEN-2-IL)-4-(TRIFLUOROMETIL)TIENO[2,3- <i>B</i> ]PIRIDINA-2-CARBOXAMIDA (19) .....	210

• Índice de Figuras

**Figura 1.** Tasas de incidencia estandarizadas por edad (IEE) a nivel mundial para todos los cánceres en ambos sexos en 2018. .... 3

**Figura 2.** Papel de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo del cáncer. .... 5

**Figura 3.** Etapas de la carcinogénesis. .... 6

**Figura 4.** Tratamientos para el cáncer disponibles actualmente. .... 7

**Figura 5.** Ejemplos de fármacos usados como terapia dirigida contra el cáncer ..... 8

**Figura 6.** Proceso de diseño de fármacos basado en la estructura ..... 10

**Figura 7.** Dogma central de la biología molecular. .... 11

**Figura 8.** Los factores de transcripción. .... 12

**Figura 9.** Estrategia para modular la actividad de los FT mediante inhibición de la interacción proteína-proteína. .... 14

**Figura 10.** Estrategia para modular la actividad de los FT empleando como blanco el DUA.. 14

**Figura 11.** Estrategia para modular la actividad de los FT usando como blanco proteínas moduladoras epigenéticas. .... 15

**Figura 12.** Estrategia para modular la actividad de los FT evitando la unión de la proteína al ADN. .... 15

**Figura 13.** Estructura del DUA de la FOXM1c unido a una secuencia promotora obtenida por cristalografía de rayos X a 2.2 Å de resolución. .... 16

**Figura 14.** Roles del factor de transcripción FOXM1. .... 17

**Figura 15.** Ejemplos de inhibidores reportados para la FOXM1. .... 19

**Figura 16.** FDI-6 en el DUA de la FOXM1 de acuerdo a los estudios realizados por el grupo del Dr. Velázquez. .... 20

**Figura 17.** Interacción del fragmento 4-halógenofenil con la Arg297. .... 20

**Figura 18.** Estructuras isoméricas de tienopiridinas. .... 21

**Figura 19.** Métodos para Tieno[2,3-*b*]piridinas formando el anillo de piridina como último paso. .... 22

**Figura 20.** Métodos para obtener Tieno[2,3-*b*]piridinas formando el anillo de tiofeno como último paso. .... 23

**Figura 21.** Síntesis de compuestos de tipo 2-Tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo. .... 24

**Figura 22.** Equilibrio tautomérico tiol-tiona presente en el 2-Tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo. .... 24

**Figura 23.** Procedimiento para el Western Blot. .... 35

**Figura 24.** Procedimiento ensayo CETSA. .... 36

**Figura 25.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) de la 4-Yodoanilina (**A15**). 42

**Figura 26.** Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) de la 4-Yodoanilina (**A15**). .... 43

**Figura 27.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (**A12**). .... 46

**Figura 28.** Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) del 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (**A12**). .... 47

**Figura 29.** Espectro de masas por CGEM/IE [M<sup>+</sup>] (Esperada: 197) de la 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (**A12**) . .... 47

**Figura 30.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) de la 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (**C15**). .... 51

<b>Figura 31.</b> Espectro de IR por reflectancia ATR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de la 2-Cloro- <i>N</i> -(4-yodofenil)acetamida ( <b>C15</b> ).....	51
<b>Figura 32.</b> Espectro de masas por CGEM/IE [ $\text{M}^+$ ] (Esperada: 295) de la 2-Cloro- <i>N</i> -(4-yodofenil)acetamida ( <b>C15</b> ).....	52
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo ( <b>TPR</b> ). .....	55
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo ( <b>TPR</b> ). .....	56
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) del 2-(Metilsulfanil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)piridina-3-carbonitrilo ( <b>TPRmet</b> ). .....	57
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) del 2-(Metilsulfanil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)piridina-3-carbonitrilo ( <b>TPRmet</b> ). .....	57
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)- <i>N</i> -(4-yodofenil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	60
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm). Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm). Experimento HSQC de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)- <i>N</i> -(4-yodofenil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	61
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm). Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm). Experimento HMBC de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)- <i>N</i> -(4-yodofenil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	62
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $\delta$ en ppm) de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)- <i>N</i> -(4-yodofenil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	63
<b>Figura 41.</b> Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) de la 3-Amino- <i>N</i> -(4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	64
<b>Figura 42.</b> EMAR (APCI, $[\text{M}+\text{H}]^+$ , $m/z$ ) de la 3-Amino- <i>N</i> -(4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina-2-carboxamida ( <b>15</b> ). .....	64
<b>Figura 43.</b> Principio biofísico de estabilización térmica inducida por el ligando. ....	71
<b>Figura 44.</b> Conformaciones superpuestas de los 20 compuestos obtenidas de docking en Glide. ....	77
<b>Figura 45.</b> Conformaciones superpuestas de los 20 compuestos obtenidas de docking en Vina. ....	77
<b>Figura 46.</b> Diagramas de interacciones de algunos de los resultados obtenidos en Glide. ....	78
<b>Figura 47.</b> Diagramas de interacciones de algunos de los resultados obtenidos en Vina. ....	79
<b>Figura 48.</b> 1a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para FOXM1. ....	125
<b>Figura 49.</b> 1a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para $\beta$ -actina. ....	126
<b>Figura 50.</b> 2a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para FOXM1. ....	127
<b>Figura 51.</b> 2a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para $\beta$ -actina. ....	128
<b>Figura 52.</b> 3a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para FOXM1. ....	129
<b>Figura 53.</b> 3a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6</b> , <b>1-19</b> . Con anticuerpo para $\beta$ -actina. ....	130

<b>Figura 54.</b> 4a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6, 1-19</b> . Con anticuerpo para FOXM1. ....	131
<b>Figura 55.</b> 4a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos <b>FDI-6, 1-19</b> . Con anticuerpo para $\beta$ -actina. ....	132
<b>Figura 56.</b> Estudio de barrido de temperatura para observar el comportamiento de la FOXM1. ....	136
<b>Figura 57.</b> 1a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.....	136
<b>Figura 58.</b> 2a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.....	137
<b>Figura 59.</b> 3a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.....	137
<b>Figura 60.</b> 1a prueba del ensayo CETSA con tratamiento de <b>FDI-6</b> . 40 $\mu$ M, 3h. de tratamiento. ....	138

- **Índice de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Diferencias en la terapia dirigida entre moléculas de bajo peso molecular y anticuerpos monoclonales .....	9
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento, constantes físicas y espectroscópicas de los productos obtenidos en las reacciones de yodación .....	41
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento, y constantes físicas y espectroscópicas de los productos obtenidos en las reacciones de bromación con NBS .....	44
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento y constantes físicas de la obtención de la 4-Bromoanilina .....	45
<b>Tabla 5.</b> $CI_{50}$ determinada por el ensayo de MTT .....	70
<b>Tabla 6.</b> Energía de unión para cada ligando en Autodock Vina y Glide .....	74

**Índice de Esquemas**

**Esquema 1.** Ruta de síntesis general. .... 31

**Esquema 2.** Yodación de la anilina y sus derivados. .... 32

**Esquema 3.** Bromación de Anilina y sus derivados. .... 32

**Esquema 4.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas ..... 33

**Esquema 5.** Síntesis del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**) ..... 33

**Esquema 6.** Síntesis del anillo de Tieno[2,3-*b*]piridina. .... 34

**Esquema 8.** Reacción de yodación de la Anilina y sus derivados. .... 39

**Esquema 8.** Síntesis de las 4-bromoanilinas sustituidas (**A12-A13**). .... 44

**Esquema 9.** Síntesis de la 4-Bromoanilina (**A10**). .... 45

**Esquema 10.** pKa predicho para las 4-Yodoanilinas con los diferentes sustituyentes usados. .... 48

**Esquema 11.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas en condiciones de catálisis ácida... 48

**Esquema 12.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas en condiciones básicas. .... 49

**Esquema 13.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas bajo condiciones neutras. .... 49

**Esquema 14.** Síntesis del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**). .... 52

**Esquema 15.** Mecanismo de formación del compuesto **TPR**. .... 53

**Esquema 16.** Posibles subproductos de la reacción de obtención de **TPR**. .... 54

**Esquema 17.** Metilación de **TPR**. .... 56

**Esquema 18.** Síntesis de los derivados de FDI-6. .... 58

**Esquema 21.** Reacción de reducción del MTT a formazán. .... 68



## **1. INTRODUCCIÓN**

El término cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por la división no controlada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales generando un tumor. Se espera que el cáncer se posicione como la principal causa de muerte y la más importante barrera a superar para aumentar la expectativa de vida en cada país del mundo en el siglo XXI. Aunque se han desarrollado diversas opciones terapéuticas para tales problemáticas, no todas han sido viables debido a que resultan altamente invasivas o presentan severos efectos adversos.

Gracias a los recientes avances en la biología molecular y en el uso de múltiples técnicas computacionales, ha sido posible el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a determinadas proteínas relacionadas con aspectos fisiológicos desregulados en las células cancerosas, obteniendo así a una nueva generación de compuestos que presentan mayor selectividad y por consiguiente menores efectos adversos.

Se han detectado niveles elevados de expresión de FOXM1 en diversos subtipos de cáncer como: cáncer de hígado, próstata, cerebro, mama, pulmón, colon, páncreas, piel, cérvix, ovario, boca, sangre y sistema nervioso. Estos descubrimientos apuntan a que la FOXM1 tiene un rol principal dentro de la tumorigénesis, lo que la ha vuelto un blanco farmacológico de interés en el tratamiento de este grupo de enfermedades. En estudios previos a este trabajo se identificó al compuesto 3-amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida conocido como **FDI-6**, como un inhibidor directo de la proteína FOXM1.

El grupo de investigación del Dr. Carlos Velázquez, sintetizó y evaluó una serie de derivados de FDI-6 con los que demostró la importancia de ciertas interacciones entre los compuestos y proteína FOXM1, siendo una de las más importantes la del halógeno en la posición 4 del fenilo con la Arg297.

En este trabajo se presenta la síntesis de 18 nuevos derivados de **FDI-6** variando el halógeno en la posición 4 del fenilo, así como el sustituyente de la posición 2, con el fin de mejorar de manera electrónica o estérica las interacciones generadas con la FOXM1. Asimismo, se evaluó el porcentaje de inhibición de la expresión de la FOXM1 a través de Western Blot encontrando dos compuestos con actividad equiparable a **FDI-6**, cuya actividad citotóxica además se demostró con el ensayo de MTT.

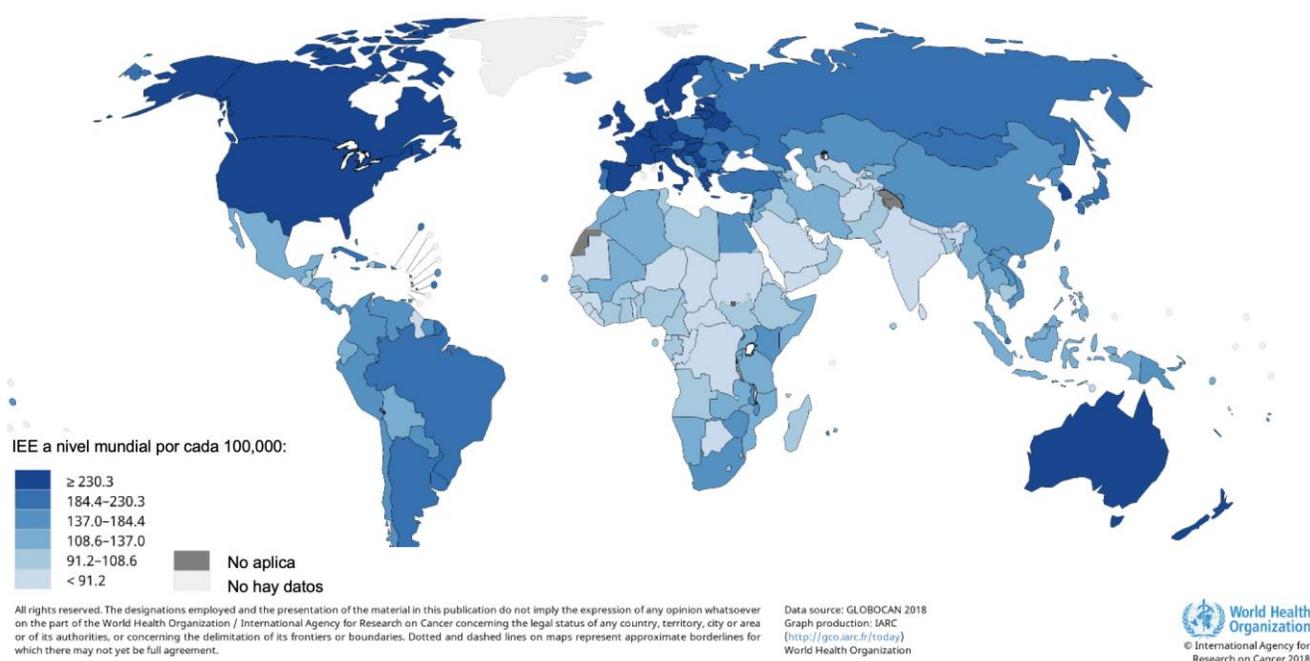


## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El cáncer

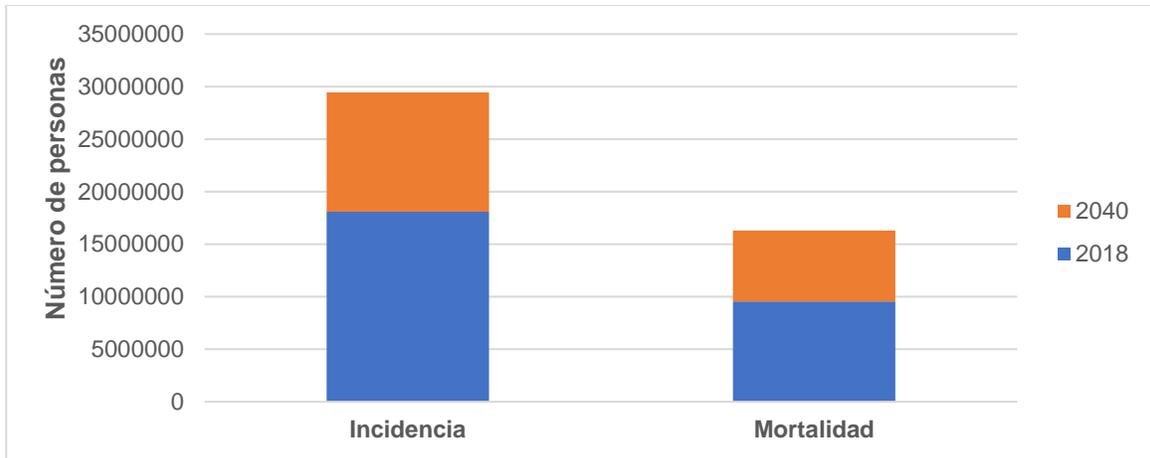
#### 2.1.1. Un problema de salud pública

Proyecciones actuales sitúan al cáncer como la futura principal causa de muerte y la barrera más importante a superar para aumentar la expectativa de vida en cada país del mundo en el siglo XXI.<sup>1</sup> De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 el cáncer fue la segunda causa de defunciones con un estimado de 9.6 millones de muertes, lo que equivale a una de cada seis muertes a nivel mundial (Figura 1).<sup>2</sup>



**Figura 1.** Tasas de incidencia estandarizadas por edad (IEE) a nivel mundial para todos los cánceres en ambos sexos en 2018.<sup>1</sup>

La incidencia y la mortalidad del cáncer están creciendo rápidamente en todo el mundo. Para 2040, se espera que la carga global crezca de 18 a 29.5 millones de nuevos casos y de 9.5 a 16.3 millones de muertes (Gráfica 1). Además, se espera que la carga en un futuro siga al alza debido al aumento de la prevalencia de los factores de riesgo como fumar, dietas poco sanas, sedentarismo y pocos embarazos en la población joven; todos asociados al desarrollo socioeconómico. Los tipos de cáncer relacionados a estas causas (pulmón, mama y colorrectales) ya están en aumento, tendencia que continuará si no se adoptan las medidas preventivas adecuadas.<sup>1,3</sup>



**Gráfica 1.** Incidencia y mortalidad esperada para 2040.<sup>1</sup>

Además del costo humano, el costo financiero causado por el cáncer es considerable. Los costos directos incluyen gastos por tratamientos, así como la atención y la rehabilitación. Los costos indirectos incluyen la pérdida de producción económica debido al trabajo perdido (costos de morbilidad) y muerte prematura (costos de mortalidad). También hay costos ocultos del cáncer, como las primas del seguro médico y los gastos no médicos (transporte, cuidado de niños o ancianos, asistencia de limpieza, pelucas, etc.).<sup>3</sup> El costo total de 2014 para México se estimó en 16,242 billones de pesos.<sup>4</sup>

La creación de diferentes centros e institutos, en México y alrededor del mundo, dedicados al estudio del cáncer han permitido entender varias de las causas de la enfermedad, además de cómo esta evoluciona en el organismo, entendiendo su funcionamiento a nivel bioquímico y genético. Sin embargo, el encontrar una cura continúa siendo el gran objetivo no resuelto de estos centros de investigación, en parte, debido al gran potencial de mutación de las células cancerosas y el desarrollo de resistencia a los fármacos usados para el tratamiento en recaídas de la enfermedad. La resistencia a los fármacos de quimioterapia es uno de los grandes problemas en la oncología y afecta a las terapias establecidas, a las dirigidas a nuevos blancos y a los tratamientos personalizados.

### **2.1.2. Generalidades**

El término cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por la división no controlada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales generando un tumor.<sup>5,6</sup>

Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que pueden esparcirse, invadir y destruir tejidos cercanos. Además, conforme los tumores crecen, algunas células cancerosas pueden desprenderse y viajar a lugares distantes del cuerpo a través de la sangre o del sistema linfático para formar nuevos tumores lejanos del tumor original. El proceso por el cual un tumor primario se propaga a otras regiones del cuerpo se conoce como metástasis.<sup>5,6</sup>

La carcinogénesis es el conjunto de fenómenos que determinan la aparición y desarrollo de un cáncer,<sup>7</sup> resultado de una interacción entre la herencia genética del individuo y agentes externos (Figura 2),<sup>8</sup> los cuales pueden ser divididos en tres categorías según la OMS:<sup>2</sup>

- Carcinógenos físicos, v.g. luz ultravioleta, radiación ionizante.
- Carcinógenos químicos, v.g. asbestos, componentes del humo del tabaco, aflatoxinas, arsénico.
- Carcinógenos biológicos, v.g. infecciones de ciertos virus, bacterias y parásitos.

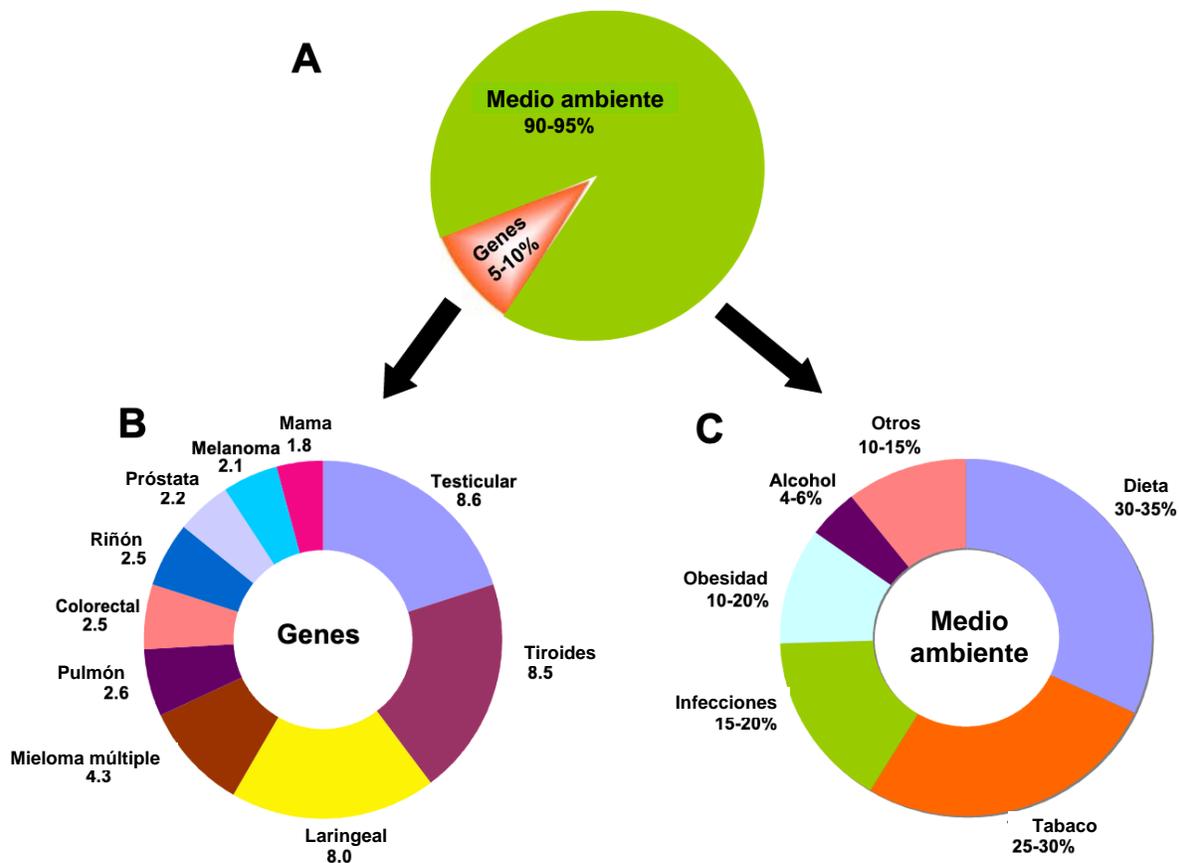


Figura 2. Papel de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo del cáncer.<sup>8</sup>

## ANTECEDENTES

Por lo general la carcinogénesis es un proceso en el que se identifica una serie de etapas definidas y reproducibles: iniciación, promoción, conversión y progresión. A continuación, se describen estas etapas brevemente (Figura 3):<sup>7</sup>

- **Iniciación:** un carcinógeno químico causa un error genético al modificar la estructura molecular del ADN, lo cual puede llevar a una mutación durante la síntesis de ADN.
- **Promoción:** se genera una cantidad de células con mayor riesgo de sufrir cambios genéticos y entrar a la siguiente etapa.
- **Conversión:** consiste en la transformación de una lesión preneoplásica a una que exprese un fenotipo maligno. Este proceso requiere cambios genéticos mayores.
- **Progresión:** comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de células ya malignas a adquirir características cada vez más agresivas con el paso del tiempo.

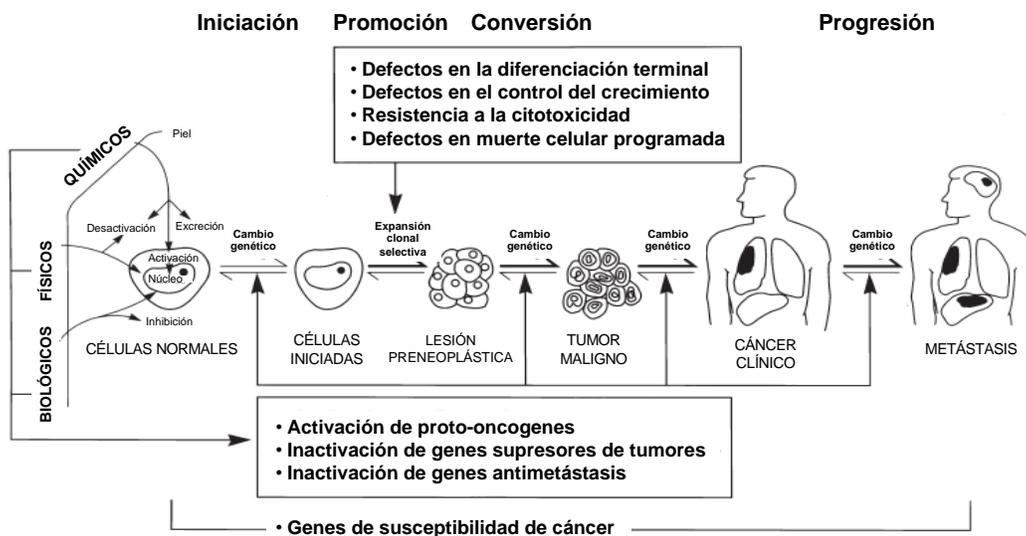


Figura 3. Etapas de la carcinogénesis.<sup>7</sup>

## 2.2. Tratamiento del cáncer

### 2.2.1. Generalidades

Existen tres estrategias principales para el tratamiento del cáncer – cirugía, radioterapia y quimioterapia –. Sin embargo, han surgido diferentes estrategias específicas, generando un amplio abanico de tratamientos para esta enfermedad (Figura 4).<sup>9,10</sup>

La elección del tratamiento dependerá del tipo de cáncer y que tan avanzado se encuentre este. En algunos de los casos un solo tratamiento es suficiente, mientras que para la mayoría de los

casos se requerirá una combinación de tratamientos; por ejemplo: cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.<sup>9</sup> Además, frecuentemente el uso de terapias combinadas (utilizar varios fármacos anticancerígenos con diferentes mecanismos de acción de manera simultánea) frecuentemente es más efectivo que emplear un solo fármaco.<sup>10</sup>



**Figura 4.** Tratamientos para el cáncer disponibles actualmente.<sup>11</sup>

La quimioterapia citotóxica tradicional trabaja primeramente a través de la inhibición de la división celular. Como las células cancerígenas provienen de células normales, identificar blancos que sean únicos para las células cancerígenas no es fácil. Como resultado, los fármacos anticancerígenos convencionales actúan contra blancos presentes en ambos tipos de células, afectando a otras células de rápida reproducción (cabello, epitelio gastrointestinal, médula ósea). Esto genera efectos secundarios como cicatrización lenta, pérdida de cabello, esterilidad, teratogenicidad, náuseas y problemas de riñón.<sup>10</sup> Adicionalmente, solo el 50% de

## ANTECEDENTES

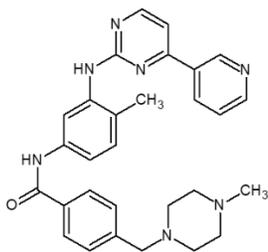
los pacientes con cáncer obtienen una prolongación de su vida y no son curados por una quimioterapia sistémica.<sup>5</sup>

El progreso en el entendimiento de la bioquímica de las células cancerígenas ha permitido generar agentes altamente selectivos que tengan como diana blancos moleculares específicos únicos o sobreexpresados en células cancerígenas, esto se conoce como terapia molecular dirigida, un área de la terapia que promete ser la nueva era de la quimioterapia contra el cáncer.<sup>10</sup>

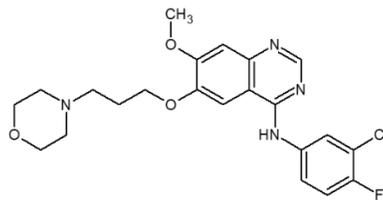
### 2.2.2. Terapia dirigida

Al reunir más conocimientos acerca de los cambios celulares que causan el cáncer, los investigadores tienen más posibilidades de crear tratamientos con alta probabilidad de éxito que actúen sobre estos cambios o que bloqueen sus efectos. La terapia dirigida es un tipo de tratamiento contra el cáncer que actúa de manera específica sobre un blanco bien definido o en una ruta biológica de las células cancerígenas, que al ser inactivada causará que estas dejen de crecer, dividirse y/o esparcirse.<sup>12-14</sup>

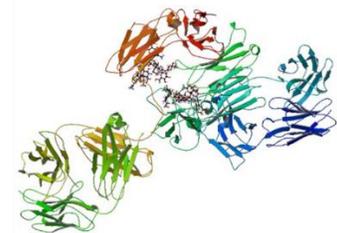
La mayoría de las terapias dirigidas utiliza fármacos de bajo peso molecular o anticuerpos monoclonales. Algunos ejemplos de fármacos exitosos diseñados para atacar eventos genéticos específicos o rutas biológicas críticas para el crecimiento, invasión y metástasis del cáncer se muestran a continuación:<sup>14</sup>



Imatinib: Inhibidor de las enzimas tirosina cinasa



Gefitinib: Inhibidor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)



Bevacizumab: Inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

**Figura 5.** Ejemplos de fármacos usados como terapia dirigida contra el cáncer.

Las terapias dirigidas tratan al cáncer de maneras diferentes y pueden hacer lo siguiente:<sup>12</sup>

- Ayudar al sistema inmune a destruir las células cancerosas.

- Detener el crecimiento de las células cancerosas.
- Detener las señales que ayudan a formar los vasos sanguíneos.
- Llevar sustancias destructoras a las células cancerosas.
- Causar la muerte de las células cancerosas.
- Evitar que el cáncer reciba las hormonas que necesita para crecer.

Las moléculas inhibidoras de bajo peso molecular difieren de los anticuerpos monoclonales en varias maneras:

**Tabla 1.** Diferencias en la terapia dirigida entre moléculas de bajo peso molecular y anticuerpos monoclonales<sup>12</sup>

Moléculas de bajo peso molecular	Anticuerpos monoclonales
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Pueden acceder a blancos intramoleculares por su tamaño.</b></li> <li>• <b>Usualmente se administran oralmente.</b></li> <li>• <b>Son químicamente manufacturadas.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Son menos costosas de fabricar.</b></li> <li>• <b>Son menos específicas.</b></li> </ul> </li> <li>• <b>Son metabolizadas por enzimas citocromo P450, que puede resultar en interacciones medicamentosas.</b></li> <li>• <b>Vida media baja, por lo que se requieren dosis frecuentes.</b></li> <li>• <b>Las células pueden adquirir resistencia.</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Se adhieren a blancos específicos fuera de las células.</b></li> <li>• <b>Usualmente se administran intravenosamente.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Son manufacturados por bioingeniería.</b></li> <li>• <b>Son más caros de fabricar.</b></li> <li>• <b>Son sumamente específicos.</b></li> </ul> </li> <li>• <b>Las células pueden adquirir resistencia.</b></li> </ul>

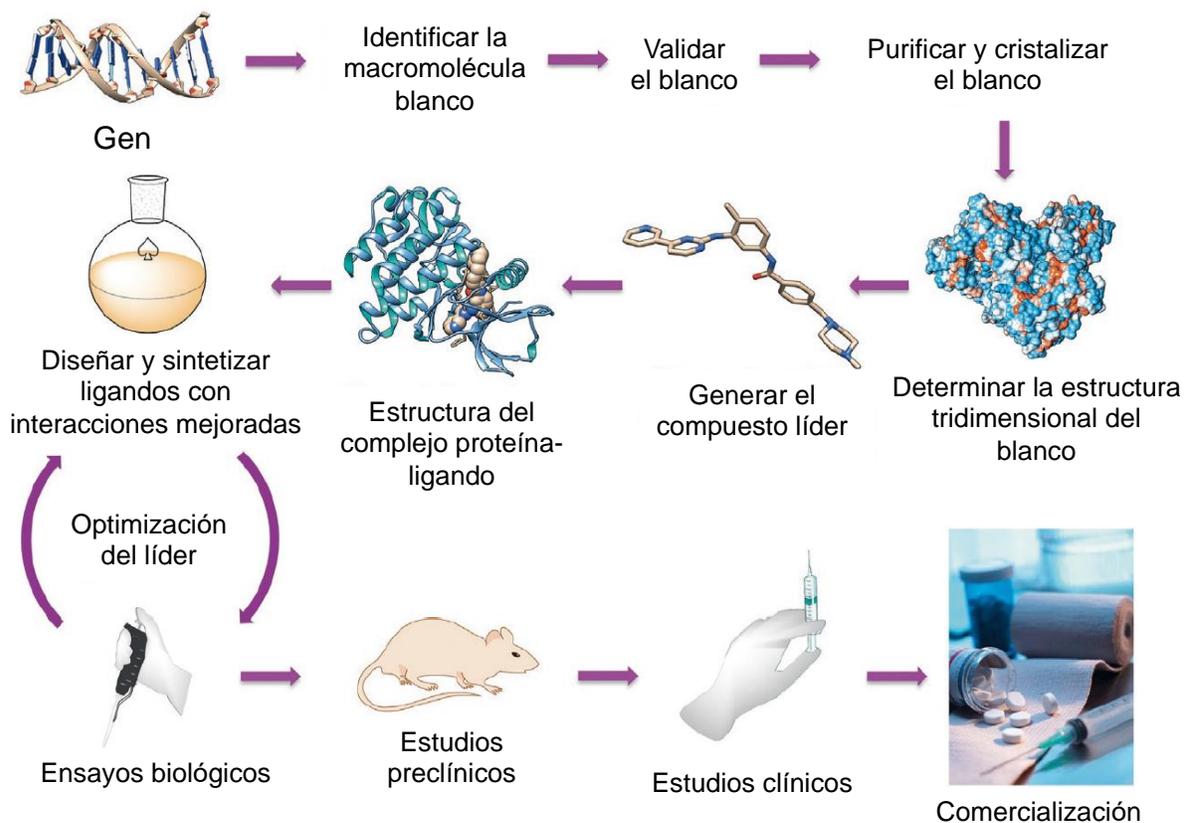
El blanco ideal para una terapia dirigida debe de tener las siguientes características:<sup>14,15</sup>

- Una macromolécula que es crucial para el fenotipo maligno y que no está significativamente expresada en órganos vitales y tejidos.
- Está involucrado en un proceso crítico que provee a las células malignas:
  - Resistencia a la apoptosis.
  - Proliferación/Progresión en el ciclo celular.
  - Invasión y metástasis.
  - Angiogénesis.
- Que las vías que promuevan de manera redundante el mismo proceso maligno sean limitadas, para que la célula cancerígena dependa de la función de ese blanco.

## ANTECEDENTES

- Tiene relevancia biológica que puede ser medida de manera reproducible en muestras clínicas.
- La inhibición de la expresión del blanco inhibe el proceso maligno.
- La expresión ectópica del blanco regenera el proceso maligno.
- El blanco está disponible al fármaco en circulación.
- El blanco tiene limitada homología con genes o proteínas relacionadas, lo que genera un bajo riesgo de reactividad cruzada con genes o proteínas que no son la diana biológica de interés.

El conocimiento de la estructura tridimensional de un número mayor de macromoléculas, normalmente proteínas, a través del uso de cristalografía de rayos X u otras técnicas, permite el diseño racional de moléculas de bajo peso molecular con características electrónicas y estéricas que le permitan unirse a los dominios funcionales de la proteína.<sup>5</sup> Los pasos principales de un diseño de fármacos basado en la estructura se ilustran en la Figura 6.



**Figura 6.** Proceso de diseño de fármacos basado en la estructura.<sup>5</sup>

Los factores de transcripción (FT) son los reguladores centrales de la transcripción, y un gran número de enfermedades como los desórdenes degenerativos, diabetes y también cáncer, están asociados con la desregulación de redes transcripcionales. El entendimiento de estas complejas redes, así como el desarrollo de estrategias farmacológicas para modular la actividad de distintos factores de transcripción, será esencial para el surgimiento de nuevas opciones de terapia.<sup>16</sup>

## 2.3. Factores de transcripción

### 2.3.1. Transcripción

El ADN en el genoma no se convierte en proteínas de manera directa, sino que usa el ARN como intermediario. Cuando las células necesitan una proteína en particular, la secuencia de nucleótidos de la porción apropiada de la inmensamente larga cadena de ADN se copia primero a ARN en un proceso conocido como transcripción. Son estas copias de ARN provenientes de segmentos de ADN las que se usan como moldes para dirigir la síntesis de una proteína en el proceso de traducción mediado por ribosomas (Figura 7).

Todas las células, desde las bacterias hasta los humanos, expresan su información genética de esta manera, un principio tan fundamental que se conoce como dogma central de la biología molecular.<sup>17</sup>

Para transcribir un gen adecuadamente y reconocer el sitio del genoma en el que debe de empezar y terminar este proceso se requieren muchos cofactores llamados factores de transcripción.<sup>17</sup>

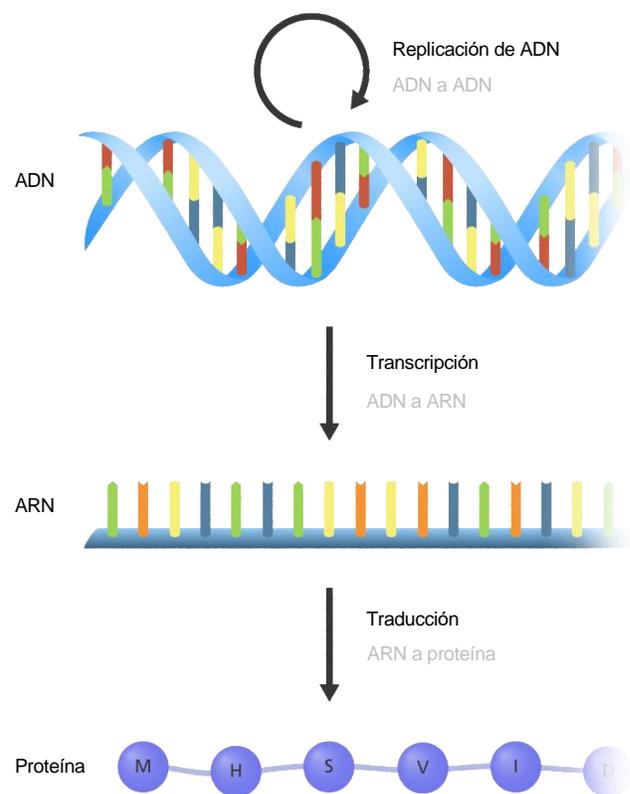


Figura 7. Dogma central de la biología molecular.

### 2.3.2. Generalidades de los factores de transcripción

Los factores de transcripción se definen de manera general como proteínas auxiliares necesarias para que la ARN polimerasa inicie la transcripción (Figura 8).<sup>18</sup>

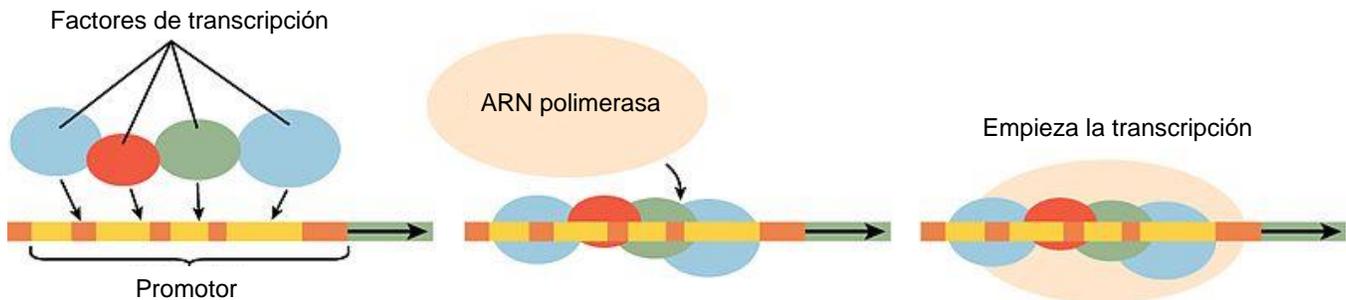


Figura 8. Los factores de transcripción.

Estos factores incluyen una gran cantidad de proteínas que inician y regulan la transcripción de genes. Una característica distintiva de los factores de transcripción es que tienen dominios de unión al ADN (DUA) que les dan la capacidad de unirse a secuencias específicas de ADN llamadas secuencias potenciadoras o promotoras. Algunos factores de transcripción se unen a una secuencia promotora de ADN cerca del sitio de inicio de la transcripción y ayudan a formar el complejo que posiciona a la ARN polimerasa correctamente en el promotor. Esto ayuda a separar las dos cadenas de ADN para permitir que la transcripción comience, y libera la ARN polimerasa del promotor para que entre en su modo de elongación.<sup>17</sup>

Otros factores de transcripción se unen a secuencias reguladoras, como las secuencias potenciadoras y pueden estimular o reprimir la transcripción del gen relacionado, regulando la cantidad de ARN mensajero (mARN) producido. La regulación de la transcripción es la forma más común de control de genes. La acción de los factores de transcripción permite una expresión única de cada gen en diferentes tipos de células y durante el desarrollo.<sup>17,19</sup>

### 2.3.3. Uso de los factores de transcripción como blancos biológicos

La desregulación de los FT caracteriza a la mayoría de los cánceres humanos. Además, muchas vías de señalización oncogénicas alteran la función de estos como un medio para implementar cambios en la expresión de genes, lo que da pie a la generación de las células cancerosas.<sup>20</sup>

Las estrategias actuales para modular la expresión de genes durante tratamientos de cáncer afectan de manera indirecta la actividad de los FT, ya que la inhibición de cinasas en vías

superiores de señalización por compuestos de bajo peso molecular resulta en la modulación de múltiples vías inferiores de señalización y, por lo tanto, usualmente no afecta un FT de manera individual. Para mejorar la intervención terapéutica, minimizar los efectos secundarios y desarrollar una terapia específica de paciente, el interés por tener como blanco directo a los FT ha aumentado.<sup>16</sup>

Debido a su actividad incrementada en un gran porcentaje de los cánceres, los FT pueden servir como los blancos más directos y prometedores para desarrollo terapéutico, ya que son menos numerosos que las enzimas en vías superiores de señalización, y residen en un punto focal en las vías desreguladas.<sup>21</sup> Ya que muchas vías de señalización pueden converger en un único FT, y este puede regular el programa de expresión de un gen que dirige a la transformación oncogénica, alterar la actividad de estas enzimas puede tener poderosas consecuencias.<sup>15</sup>

Muchos FT se consideraban no aptos para ser usados como dianas biológicas debido a la falta de sitios de unión hidrofóbicos para moléculas pequeñas y por lo tanto fueron ignorados de estrategias de descubrimiento. Afortunadamente, el entendimiento de cada una de estas proteínas ha llevado a múltiples historias de éxito que han cambiado las creencias previamente existentes sobre usar estas moléculas como blanco.<sup>16</sup>

Las cuatro estrategias principales para modular la actividad de los FT usadas hasta el momento, así como algunos de los casos de éxito o en investigación, son:<sup>16</sup>

- a) **Inhibición de las interacciones proteína-proteína** para todos aquellos factores que requieren formar dímeros o que dependen de cofactores para una función apropiada (Figura 9).
- b) **Usar como blanco el DUA** cambiando su conformación o previniendo la unión del ADN (Figura 10).
- c) **Usar como blanco las proteínas remodeladoras de cromatina/lectoras epigenéticas.** Para que el ADN quepa en el núcleo celular, este se empaqueta enrollado en histonas formando la cromatina, la cual es la sustancia que forma un cromosoma. Los cambios en la estructura de la cromatina se producen cuando el ADN se duplica y durante la expresión génica, por lo que resultan esenciales para que los factores de transcripción puedan acceder al ADN (Figura 11).<sup>22</sup>

- d) Evitar la unión de la proteína al ADN a través de compuestos que compitan con los factores de transcripción por la interacción con secuencias consenso, o que cambien la conformación 3D de las secuencias de ADN blanco de manera que ya no puedan ser reconocidas (Figura 12).

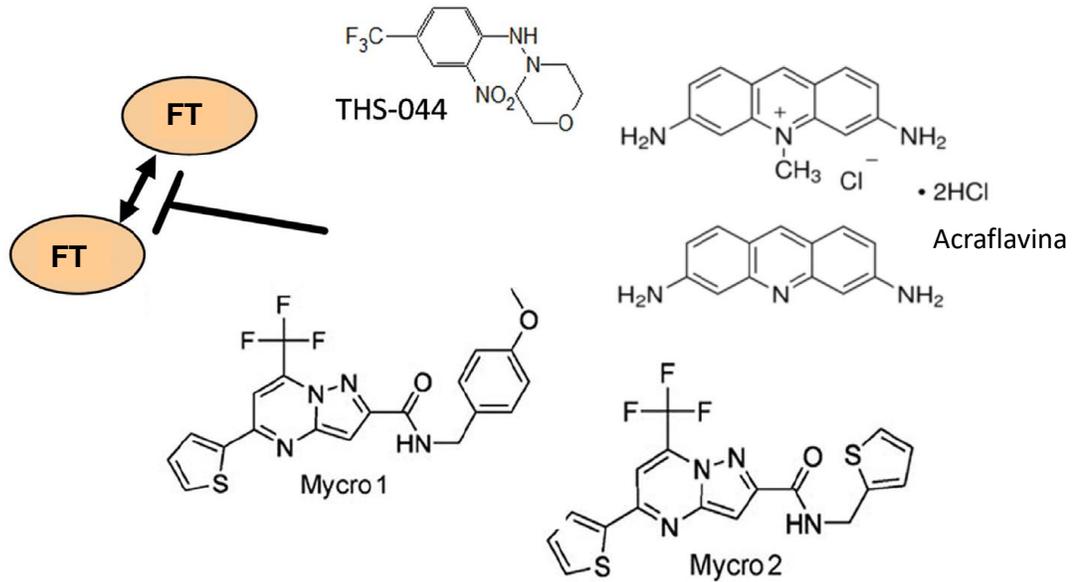


Figura 9. Estrategia para modular la actividad de los FT mediante inhibición de la interacción proteína-proteína.

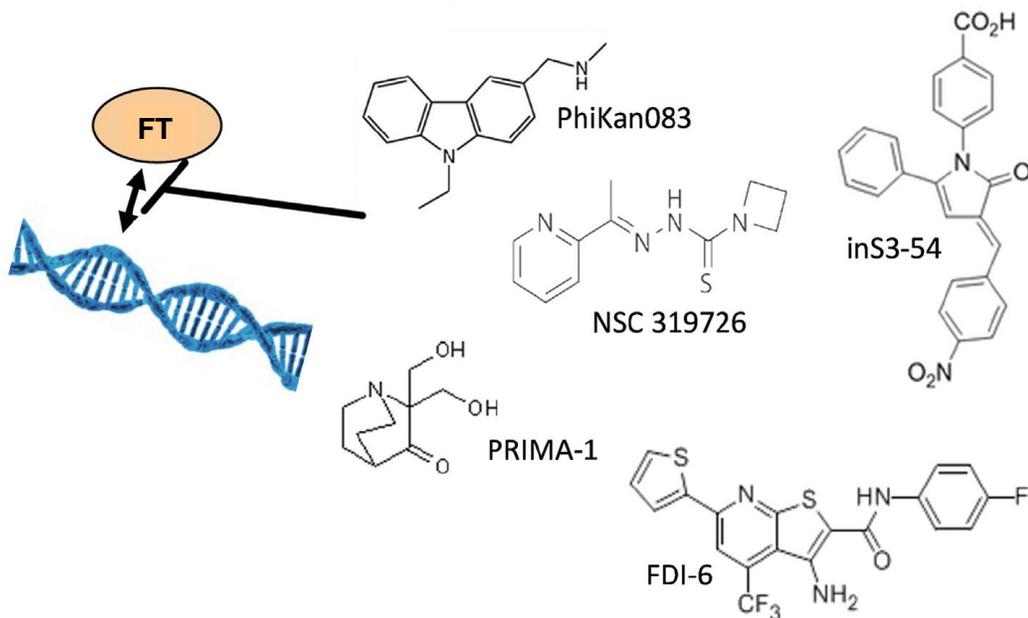


Figura 10. Estrategia para modular la actividad de los FT empleando como blanco el DUA.

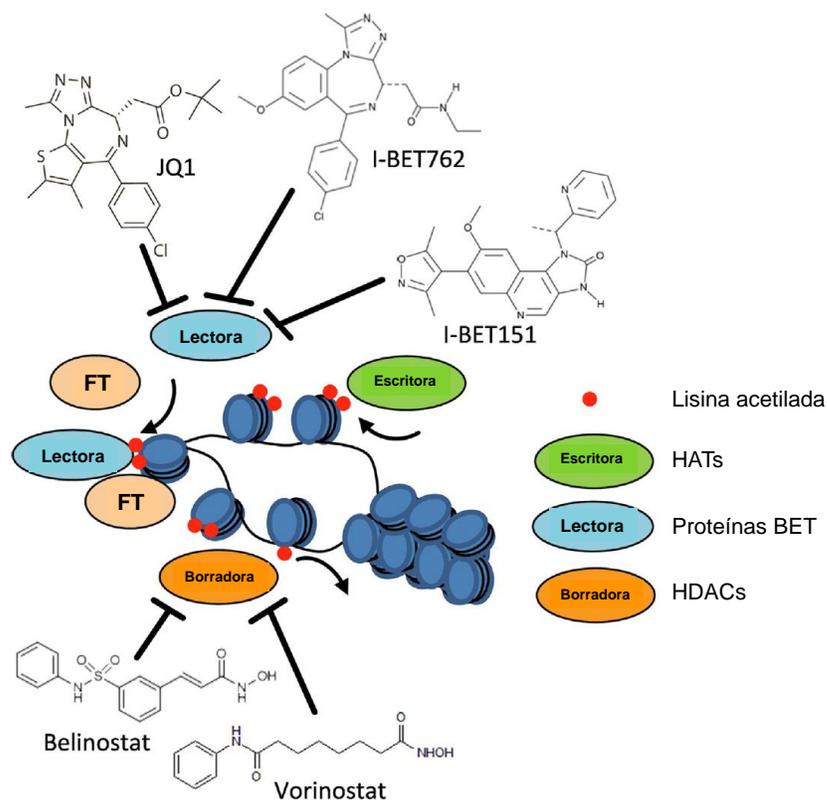


Figura 11. Estrategia para modular la actividad de los FT usando como blanco proteínas moduladoras epigenéticas.

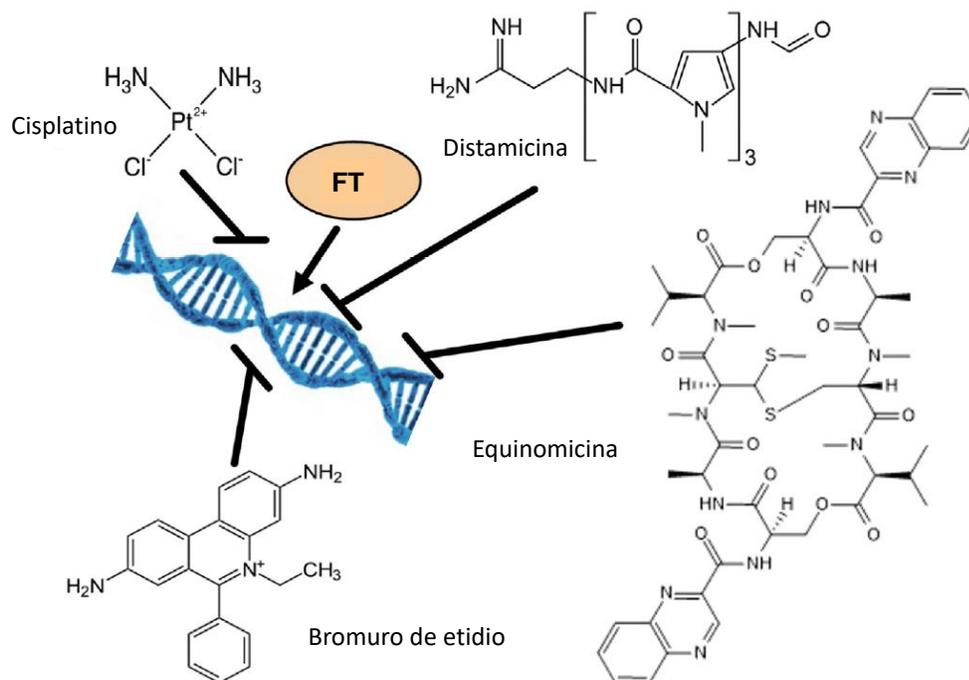
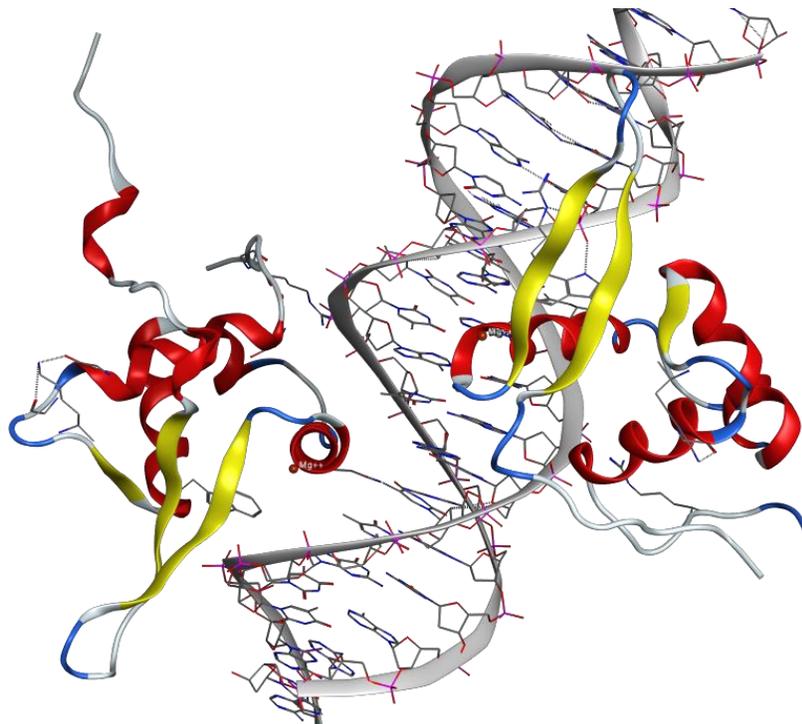


Figura 12. Estrategia para modular la actividad de los FT evitando la unión de la proteína al ADN.

### **2.3.4. El factor de transcripción Forkhead Box M1**

La proteína **Forkhead box M1** (FOXM1), también conocida como HFH-11, MPP-2, WIN, FKHL16 o tridente, es un factor de transcripción típico asociado a la proliferación celular. Este es un factor de transcripción activante perteneciente a la superfamilia de factores de transcripción Forkhead, en la que todos comparten un DUA “cabeza de tenedor” (*forkhead*) evolutivamente conservado (Figura 13). La FOXM1 humana se expresa en tres diferentes variantes que resultan del mismo gen pero con diferentes empalmes de los dos exones facultativos A1 y A2, dando lugar a 3 distintas variantes: FOXM1a, -b, -c.<sup>23,24</sup>



**Figura 13.** Estructura del DUA de la FOXM1c unido a una secuencia promotora obtenida por cristalografía de rayos X a 2.2 Å de resolución.<sup>25</sup>

La FOXM1 regula la expresión de más de 220 genes a través de la unión a una secuencia consenso TAAACA. Esta induce la transcripción del mRNA de 199 proteínas codificantes de genes y regula a la baja la expresión del mRNA de 21 proteínas codificantes de genes. Este FT juega un papel esencial en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo: proliferación celular, ejecución de la mitosis controlando la transición G1/S, G2/M, y la progresión a través de la fase S y la fase M, diferenciación celular, replicación del ADN, reparación de daño al ADN, homeostasis de tejidos, angiogénesis y apoptosis (Figura 14).<sup>23,24</sup>

La proteína FOXM1 se expresa en células en proceso de proliferación, pero su expresión no se da en células terminalmente diferenciadas o quiescentes.<sup>26</sup>

La FOXM1 se sobreexpresa en múltiples padecimientos, incluyendo cáncer de hígado, próstata, cerebro, mama, pulmón, colon, páncreas, piel, cérvix, ovario, boca, sangre y sistema nervioso. Estos descubrimientos apuntan a que FOXM1 tiene un rol principal dentro de la tumorigénesis. Además, investigación reciente sugiere una correlación entre la desregulación de FOXM1 con la progresión de cáncer y el desarrollo de resistencia a los fármacos anticancerígenos.<sup>23,26</sup>

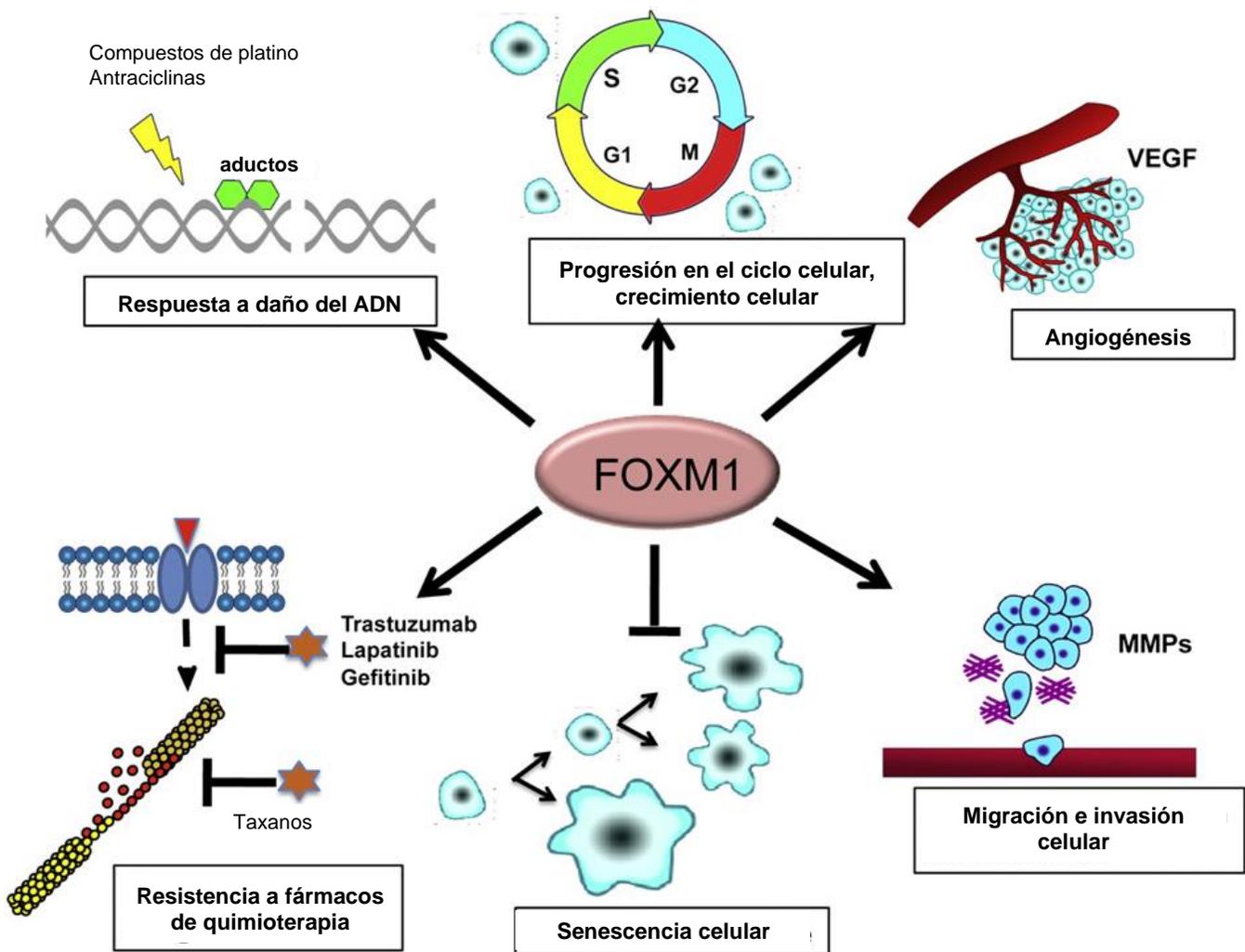


Figura 14. Roles del factor de transcripción FOXM1.<sup>23</sup>

La evidencia acumulada indica que la FOXM1 conduce a la tumorigénesis, no sólo al incrementar la proliferación, sino también afectando diversas características en el desarrollo y progresión del cáncer; incluyendo la evasión de la acción de los supresores de tumor,

incrementando la resistencia de las células cancerígenas a apoptosis, induciendo inmortalidad replicativa, contribuyendo a inestabilidad genómica y del metabolismo.

### 2.3.5. Inhibidores *in vitro* de FOXM1

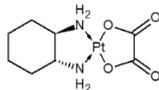
Hay varios reportes de moléculas con la habilidad de interferir con la actividad transcripcional *in vitro* de la FOXM1.<sup>26-31</sup> Desde un punto de vista mecanístico, las moléculas dirigidas a la actividad transcripcional de FOXM1 pueden actuar de manera directa o indirecta. En este sentido, los inhibidores indirectos tienen como blanco proteínas río arriba que de manera normal promueven la expresión de FOXM1, mientras que los inhibidores directos deben disociar el complejo FOXM1-ADN.<sup>32</sup>

Dentro de los inhibidores indirectos de la FOXM1 se incluye una gran variedad de moléculas que tienen blancos presentes en las células cancerígenas, pero que están relacionados en algún punto con la cascada de señalización de la FOXM1, afectando la actividad de esta. En la Figura 15 se muestran algunos ejemplos.<sup>28</sup>

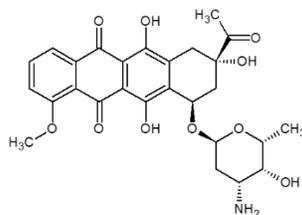
En esta misma figura también podemos observar los inhibidores directos reportados para la FOXM1. Por ejemplo, la troglitazona, que pertenece al grupo de fármacos conocido como tiazolidindionas, cuya función original fue como agonistas del factor de transcripción PPAR $\gamma$ , en el tratamiento de la diabetes.<sup>26</sup> Por otro lado, observamos al tiostrepton, el cual se trata de un producto natural aislado de *Streptomyces azureus*.<sup>26,33</sup>

Otra importante aportación fue la serie de moléculas FDI, reportada en 2014 por Gormally, dentro de las cuales el compuesto denominado FDI-6 mostró ser el más potente supresor de la actividad transcripcional de FOXM1, por la disociación directa del complejo FOXM1-ADN.<sup>29</sup>

### Inhibidores indirectos de la FOXM1



**Oxaliplatino:** Agente alquilante de ADN derivado de platino. Inhibe la FOXM1 a través de p53 y p21

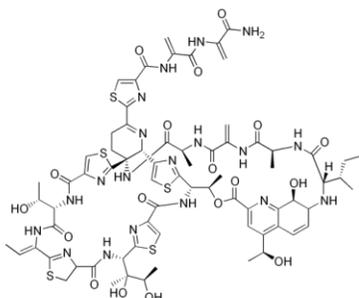


**Daunorubicina:** Antraciclina natural aislada de *Streptomyces peucetius*. Inhibe la FOXM1 a través de p53 y p21

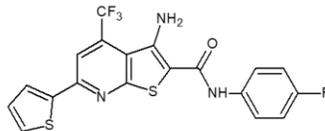


**Trastuzumab:** Anticuerpo monoclonal. Inhibe la FOXM1 a través de la inhibición de HER2

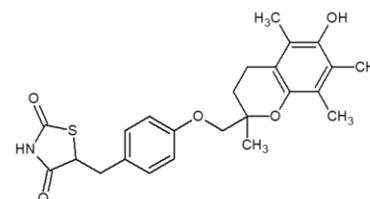
### Inhibidores directos de la FOXM1



Tioestrepton



FDI-6

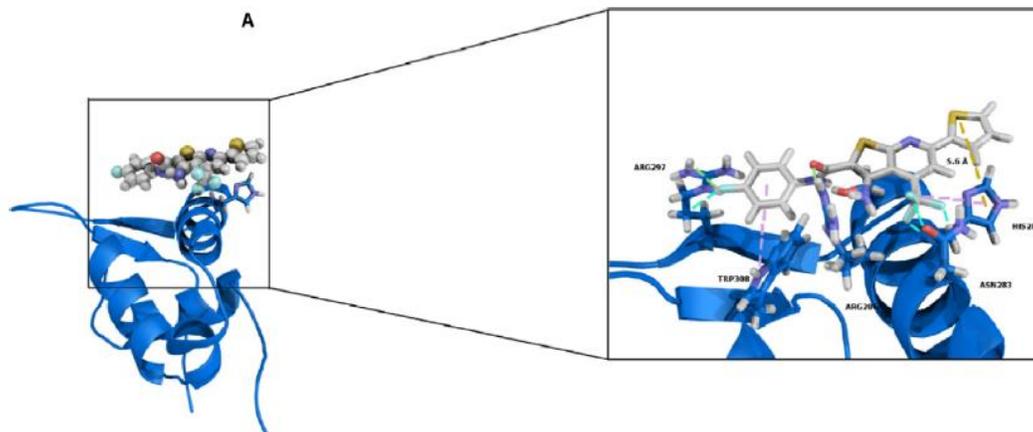


Troglitazona

**Figura 15.** Ejemplos de inhibidores reportados para la FOXM1.

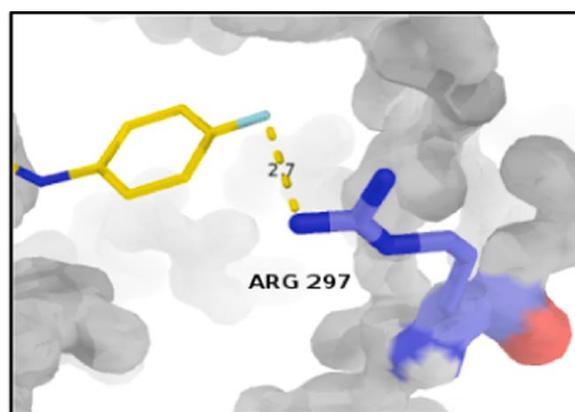
La troglitazona, tioestrepton y FDI-6 constituyen un grupo de compuestos estructuralmente diversos que parecen ejercer interacciones de unión similares dentro del DUA de la FOXM1. El grupo de investigación del Dr. Carlos Velázquez ha realizado trabajos previos de acoplamiento y dinámica molecular, en los que proponen un mecanismo de unión de dichos compuestos y las interacciones clave con el DUA.<sup>32</sup>

En este estudio se concluye que todos los compuestos se unen al mismo sitio de la proteína FOXM1 e interactúan con los aminoácidos Arg297, Arg283, Arg286, Trp208, Asn283 y, principalmente His287 llevando a cabo una interacción con el azufre presente en todas las moléculas, en particular para el caso de FDI-6 de tipo  $\pi$ -azufre (Figura 16).<sup>32</sup>



**Figura 16.** FDI-6 en el DUA de la FOXM1 de acuerdo a los estudios realizados por el grupo del Dr. Velázquez.<sup>32</sup>

El grupo del Dr. Velázquez se ha encargado, además, de seguir optimizando esta molécula,<sup>34</sup> donde se ha observado lo esencial que resulta la presencia de un fragmento de tipo 4-halofenilo en la estructura de los derivados del FDI-6 para mantener una interacción con la Arg297 (Figura 17), siendo la actividad equipotente para todos los halógenos; por lo que resulta interesante explorar la adición de un nuevo sustituyente al anillo, que modifique su densidad electrónica.



**Figura 17.** Interacción del fragmento 4-halógenofenil con la Arg297.<sup>34</sup>

## 2.4. Tienopiridinas

### 2.4.1. Generalidades

En la Química Orgánica, los derivados de piridina atraen considerable interés debido a su gran utilidad práctica, principalmente, debido a su gran variedad de actividades biológicas. Los compuestos que contienen el anillo de piridina o piperidina están presentes en más del 10% de los fármacos usados actualmente.<sup>35</sup>

Dentro de los derivados de piridina, los fusionados son muchas veces de mayor interés biológico que los compuestos monocíclicos. Cualitativamente, las nuevas propiedades de los anillos fusionados aumentan las posibilidades de variar los grupos farmacofóricos en diferentes posiciones, y su habilidad para interactuar o reaccionar con un amplio grupo de receptores juega un papel decisivo; sumado al interés teórico y biológico de tener anillos  $\pi$ -excedentes y  $\pi$ -deficientes juntos.<sup>36</sup>

Dentro de estos sistemas heterocíclicos, las tienopiridinas ocupan un lugar especial y han atraído considerable atención.<sup>36</sup> Las características de estos sistemas varían debido a las diferentes posiciones de anillación posibles de los fragmentos aromáticos, existiendo seis posibles estructuras isoméricas (Figura 18). Moléculas con estos núcleos se han reportado como antiarrítmicos, antisépticos, antidepresivos, espasmolíticos, neurolépticos,<sup>35,37</sup> y recientemente como antiproliferativos.<sup>29,38,39</sup>

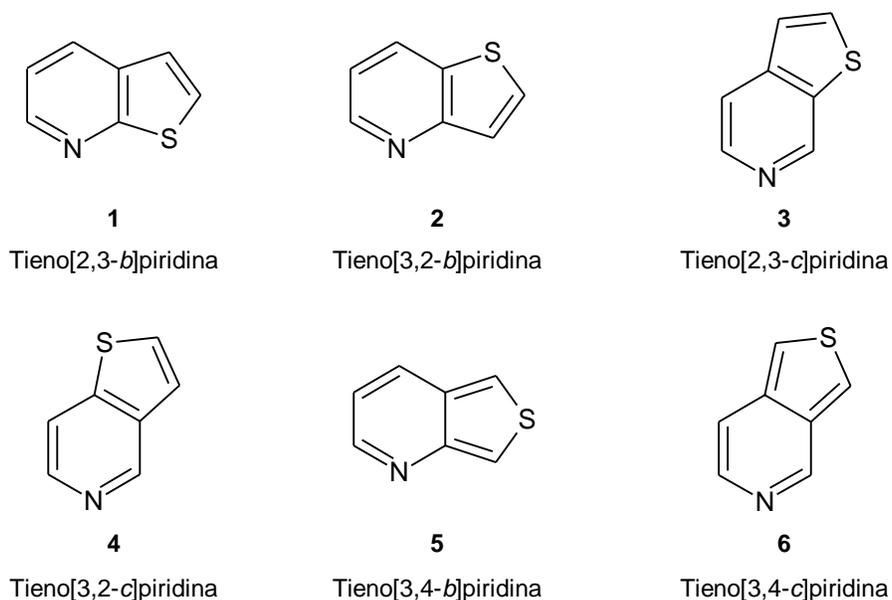


Figura 18. Estructuras isoméricas de tienopiridinas.

#### 2.4.2. Tieno[2,3-*b*]piridinas

Las tieno[2,3-*b*]piridinas se conocen desde 1913, tiempo a partir del que la química de estos compuestos ha avanzado considerablemente. El espectro de actividades biológicas de esta clase de compuestos es amplio e incluye actividad antiinflamatoria, antidepresiva, antimicrobial,<sup>35,36</sup> antitumoral,<sup>29,38,40</sup> y de uso en enfermedades del sistema nervioso central.<sup>41</sup>

## ANTECEDENTES

Los métodos sintéticos para la obtención de este núcleo se dividen en dos estrategias, dependiendo cuál de los dos anillos se esté tratando de formar:

### a) Sintetizar el anillo de piridina en derivados de tiofeno

De manera general, las estrategias de síntesis que involucran la formación del anillo de piridina son adaptaciones de las síntesis clásicas de quinolina e isoquinolina<sup>42</sup> y se basan en usar derivados de 2-aminotiofenos.<sup>35</sup>

En la Figura 19 se muestran algunos de los métodos clásicos. El Método A, conocido como reacción de Skraup, consiste en el uso de 2-aminotiofenos con compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, permitiendo variar los sustituyentes de las posiciones 4 y 6. Este método presenta la desventaja de obtener tanto el isómero generado por la adición de Michael como por la base de Schiff, siendo el de la adición de Michael el que predomina.

El Método B consiste en la reacción de 2-aminotiofenos con compuestos 1,3-dicarbonílicos pasando por el intermediario de la base de Schiff. Finalmente, en el Método C se ciclan *o*-aminocarbonilotiofenos con derivados de cetonas. La principal dificultad de este método es la preparación de los tiofenos adecuadamente sustituidos.<sup>42</sup>

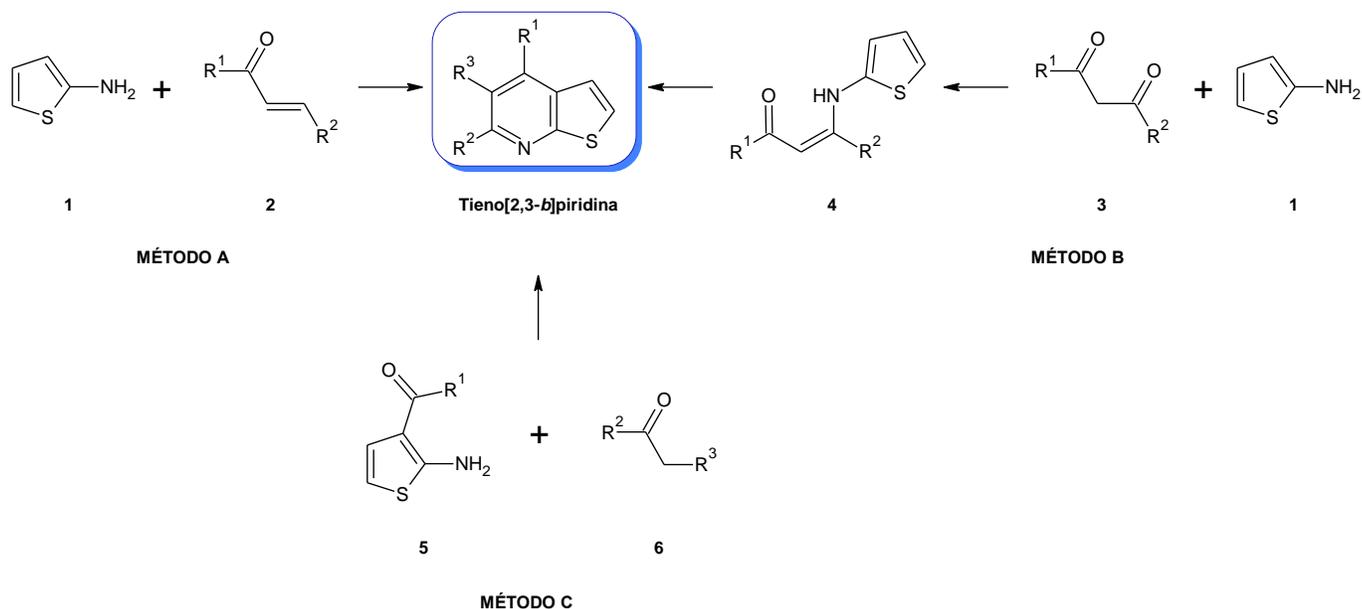
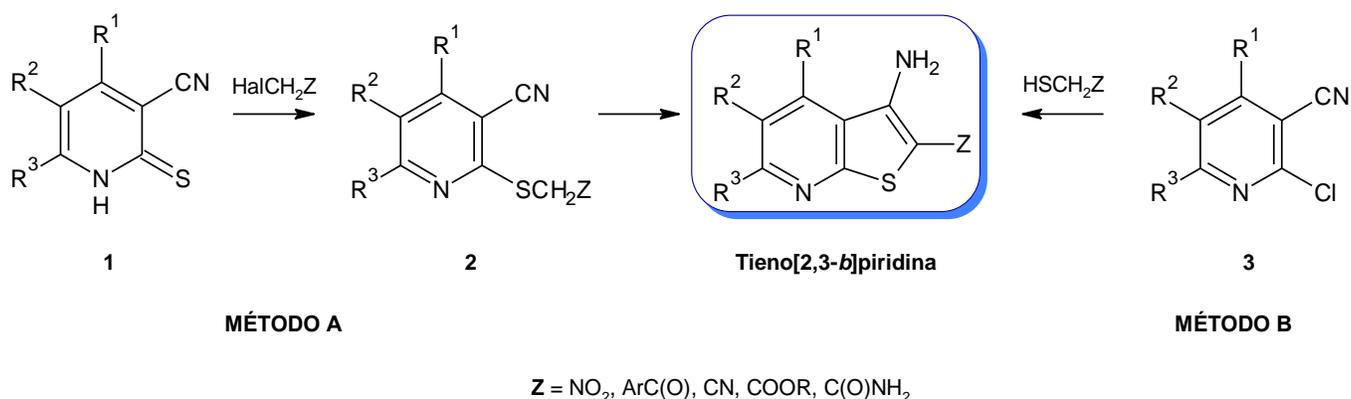


Figura 19. Métodos para Tieno[2,3-b]piridinas formando el anillo de piridina como último paso.<sup>42</sup>

## b) Sintetizar el anillo de tiofeno en derivados de piridina

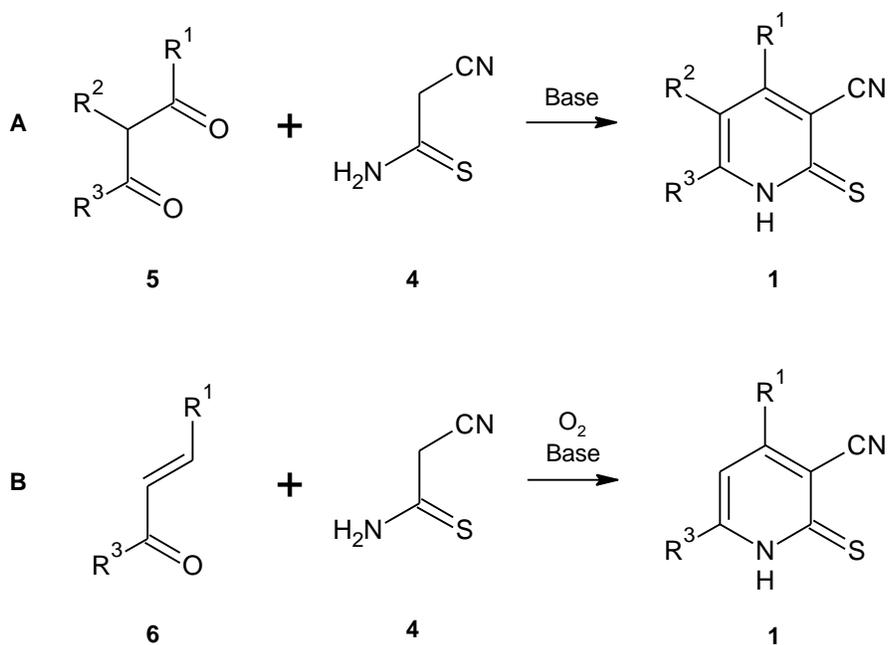
En la Figura 20 se muestran dos métodos con esta estrategia sintética. El Método A trata de una isomerización de Thorpe de 2-alciltio-3-cianopiridinas sustituidas (**2**).<sup>36</sup> La formación del enlace C(2)-C(3) del anillo de 5 miembros en un sistema fusionado es un método muy recurrido en la síntesis de indoles, benzofuranos y benzotiofenos; al usar la materia prima con nitrilo, como en este caso, se obtienen los derivados fusionados 3-amino.<sup>43</sup> En el Método B se parte de 2-cloro-3-cianopiridinas (**3**) y derivados de ácido tioglicólico, donde primero ocurre una sustitución nucleofílica, seguida de la formación del anillo en medio básico.<sup>36</sup>



**Figura 20.** Métodos para obtener Tieno[2,3-*b*]piridinas formando el anillo de tiofeno como último paso.<sup>36</sup>

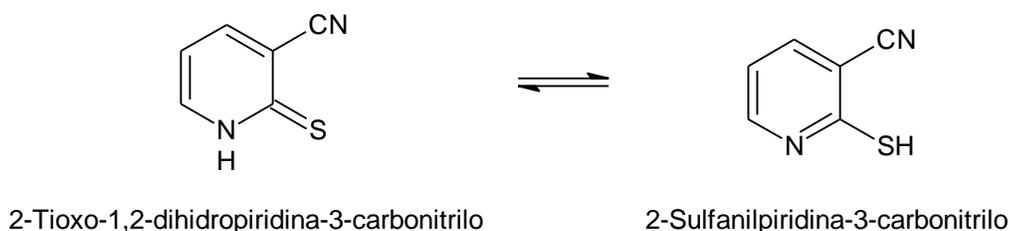
La ventaja del Método A es que las materias primas de tipo 2-tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**1**) son fácilmente accesibles y se pueden obtener con una variedad de sustituyentes. Lo que la ha convertido en una materia prima ampliamente usada en la química farmacéutica para la obtención de núcleos de interés biológico.<sup>40,41</sup>

La manera más común de preparar este tipo de compuestos (**1**) es a través de una síntesis tipo Guareschi-Thorpe (Figura 21,A) usando 2-cianotioacetamida (**4**) y un compuesto 1,3-dicarbonílico (**5**) apropiadamente sustituido.<sup>44</sup> Otra manera de obtener estos compuestos (**1**) es con materias primas en estados de oxidación menores con una dehidrogenación *in situ* con aire o con oxígeno agregado (Figura 21,B). Por ejemplo en lugar de usar un compuesto 1,3-dicarbonílico se puede usar una cetona o aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (**6**).<sup>44</sup>



**Figura 21.** Síntesis de compuestos de tipo 2-Tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo.

Es interesante destacar los dos posibles tautómeros que se obtienen del producto de estas reacciones (Figura 22). Por un lado, tenemos la tiona o 2-tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo, y por el otro, el tiol 2-sulfanilpiridina-3-carbonitrilo. No existe un consenso en la literatura sobre cuál es el tautómero favorecido,<sup>45-48</sup> por lo que por uniformidad en este texto me referiré y mostraré a la tiona.



**Figura 22.** Equilibrio tautomérico tiol-tiona presente en el 2-Tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de gran prevalencia a nivel mundial y se estima que dentro de pocos años la tasa de morbilidad y mortalidad incrementa drásticamente, respecto a las estadísticas actuales. Debido a esto, el cáncer es considerado como un problema de salud pública global.

A pesar de existir una extensa gama de compuestos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, por lo general estos compuestos ocasionan efectos adversos significativos y tienen poca selectividad. Además, en años recientes se han documentado casos de pacientes en los cuales los tratamientos convencionales no son eficaces.

Debido a lo anterior, resulta imperante la investigación de nuevas moléculas con potencial anticancerígeno, las cuales sean más eficaces y seguras. En ese sentido, la búsqueda de moléculas ha sido abordada por diversas vías; recientemente, se ha observado que los fármacos contra un blanco específico presentan una menor incidencia de efectos adversos y mejores perfiles farmacológicos.

Dentro de los blancos específicos en la problemática del cáncer, los factores de transcripción han demostrado ser de relevancia debido a la gran desregulación que presentan en distintos tipos de cáncer y la especificidad que se ganaría al tenerlos como blanco, lo que disminuiría los efectos adversos. Por tales razones, durante años recientes los centros de investigación y las industrias han destinado presupuestos importantes para la investigación en el campo de dichas proteínas. Dentro de los diversos factores de transcripción, el factor de transcripción Forkhead Box M1 (FOXO1) se ha visualizado como un blanco potencial para la búsqueda de nuevas moléculas anticancerígenas, por lo que el diseño de nuevos inhibidores de esta proteína podría aportar información relevante que sería de provecho para tratar la problemática del cáncer.

En el presente trabajo se plantea la síntesis de 19 tiano[2,3-*b*]piridinas derivadas del compuesto FDI-6, un inhibidor reportado de la FOXO1, para evaluar su potencial actividad inhibitoria contra dicha enzima, así como su potencial actividad anticancerígena. Con ello se pretende expandir el espacio químico explorado por nuestro grupo de investigación en lo que respecta a este nuevo núcleo para este blanco en particular. Por otra parte, se pretende contribuir con moléculas que podrían aportar información valiosa en el campo de los inhibidores de factores de transcripción.



#### **4. HIPÓTESIS**

Debido a que en estudios previos se demostró que la presencia de un halógeno en la posición 4 de la fenilacetamida de derivados de FDI-6, es esencial para la actividad inhibitoria del factor de transcripción FOXM1. Se espera que agregar un sustituyente (-CH<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -CF<sub>3</sub>) en la posición 2 del fenilo de la carboxamida, en combinación con un halógeno en la posición 4, favorezca la inhibición de estos nuevos derivados sobre la expresión de este Factor de Transcripción, blanco biológico de interés anticancerígeno.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad anticancerígena de 19 tieno[2,3-*b*]piridinas derivadas del compuesto FDI-6, un inhibidor reportado de la FOXM1.

### 5.2. Objetivos particulares

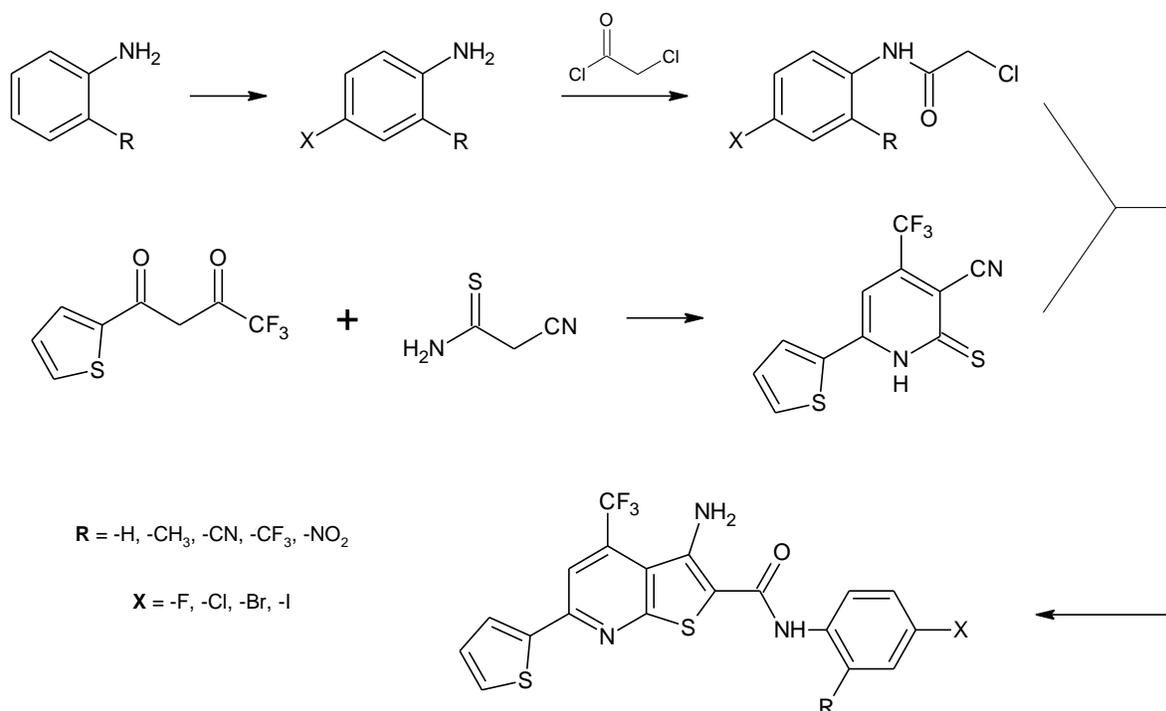
- a) Sintetizar **FDI-6** y 19 nuevos derivados de este compuesto teniendo el núcleo de tieno[2,3-*b*]piridina, por una metodología sintética práctica y accesible, donde la materia prima variable es la anilina adecuadamente sustituida con un halógeno en la posición 4 (-F, -Cl, -Br, -I) y sustituyentes con diferente densidad electrónica en la posición 2 (-CH<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -CF<sub>3</sub>), con el propósito de hacer una correlación estructura actividad biológica.
- b) Comprobar la estructura de los intermediarios de síntesis, así como de los compuestos finales mediante las técnicas espectroscópicas de IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, EM; y en el caso de los compuestos finales también de espectros de RMN 2D.
- c) Evaluar el porcentaje relativo de expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos sintetizados a través del ensayo de Western Blot en una línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231).
- d) Determinar la Cl<sub>50</sub> a través del ensayo de MTT en línea celular MDA-MB-231 para los compuestos que mejor actividad presentaron en el Western Blot.
- e) Estandarizar el ensayo de desplazamiento térmico celular (CETSA, por sus siglas en inglés) para la FOXM1 y evaluar con este los compuestos que mejor actividad presentaron el Western Blot.
- f) Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados sobre la FOXM1, con el fin de encontrar una relación entre las interacciones observadas con la enzima, y la actividad presentada.



## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente sección se encuentra dividida en tres partes principales: parte química, ensayos biológicos y estudios *in silico*. Todos los procedimientos detallados pueden ser encontrados en los anexos.

### 6.1. Parte química



Esquema 1. Ruta de síntesis general.

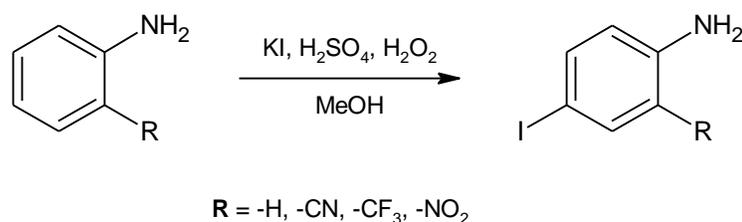
De manera general, para la síntesis se siguió un método convergente en el que el segundo anillo formado es el de tiofeno. La síntesis se realizó por la reacción de condensación entre la 2-tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo con las 2-cloroacetamidas adecuadamente sustituidas (Esquema 1). A continuación, se describe de manera dividida el procedimiento seguido para la síntesis de las anilinas materias primas y la formación de las 2-cloroacetamidas de las mismas; por otro lado, la síntesis de la 2-tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo; y por último, de la reacción de condensación entre los dos intermediarios para obtener los compuestos finales.

#### 6.1.1. Síntesis de las anilinas adecuadamente sustituidas

En la mayoría de los casos se disponía de la anilina 2-sustituida-4-halogenada ya preparada, por lo que este primer paso no fue necesario. Para aquellas no disponibles en nuestro

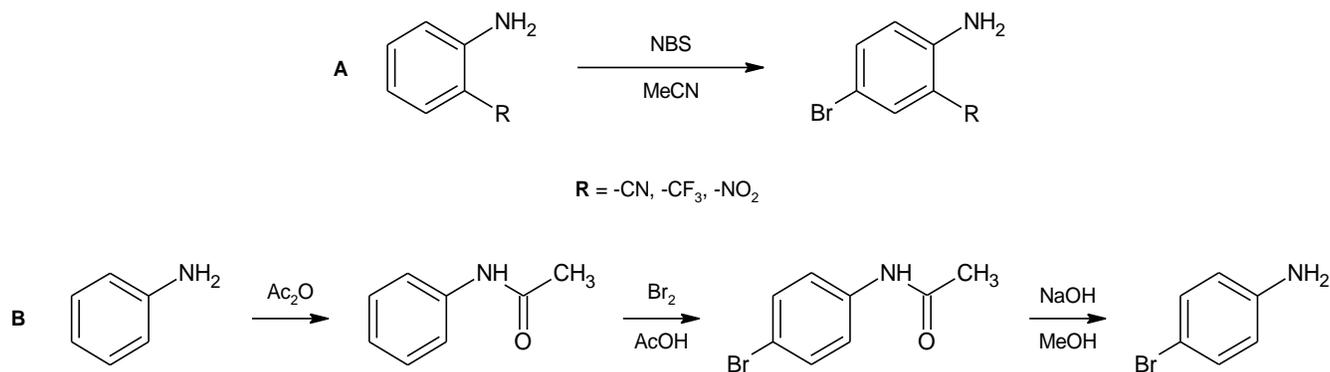
inventario, la síntesis partió de la anilina adecuadamente sustituida en posición *orto*; de acuerdo con el halógeno que se necesitaba introducir, se siguieron diferentes metodologías.

Para el caso de las yodaciones, el método usado consistió en generar el yodonio *in situ* a partir de KI creando condiciones oxidantes con una mezcla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol, siguiendo un método previamente reportado.<sup>49</sup>



**Esquema 2.** Yodación de la anilina y sus derivados.

Por otro lado, para llevar a cabo las bromaciones se siguieron dos métodos. En el caso de las materias primas con un grupo electroatractor ya presente en el anillo se siguió un método previamente reportado en el que se usa NBS como fuente de bromo, ya sea usando acetonitrilo o ácido acético como disolvente (Esquema 3,A).<sup>50</sup> Para el caso de anilina, que se encuentra más activada, fue necesario acetilar la amina, y posteriormente bromar de manera tradicional usando Br<sub>2</sub> en ácido acético, para posteriormente desproteger la amina (Esquema 3,B).

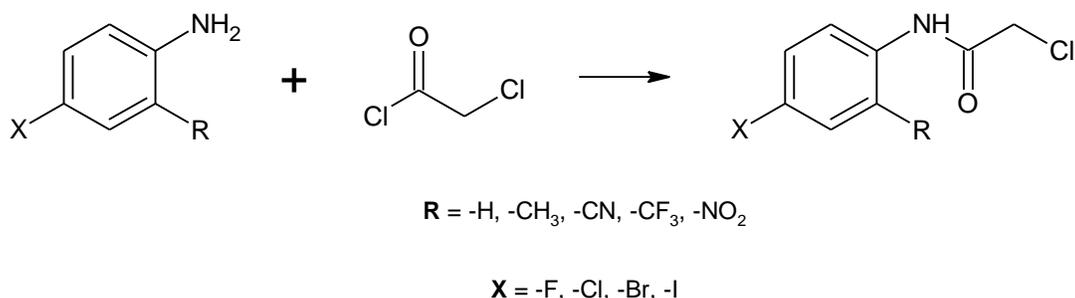


**Esquema 3.** Bromación de Anilina y sus derivados.

### 6.1.2. Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas

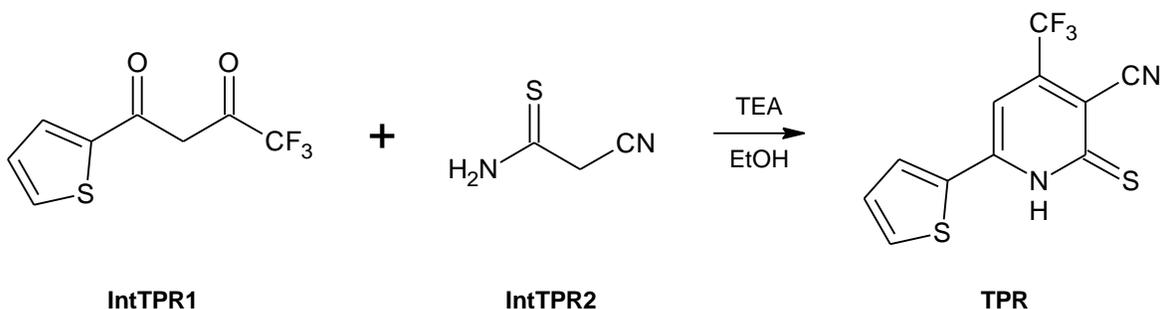
Una vez teniendo todas las anilinas adecuadamente sustituidas, se procedió a la formación de las 2-cloro-*N*-fenilacetamidas usando cloruro de cloroacetilo (Esquema 4), variando las condiciones requeridas para cada anilina. Algunas se pudieron obtener de manera directa,

mientras que para otras fue necesario agregar catálisis ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o trietilamina como base en cantidades equimolares.



Esquema 4. Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas

### 6.1.3. Síntesis de 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)



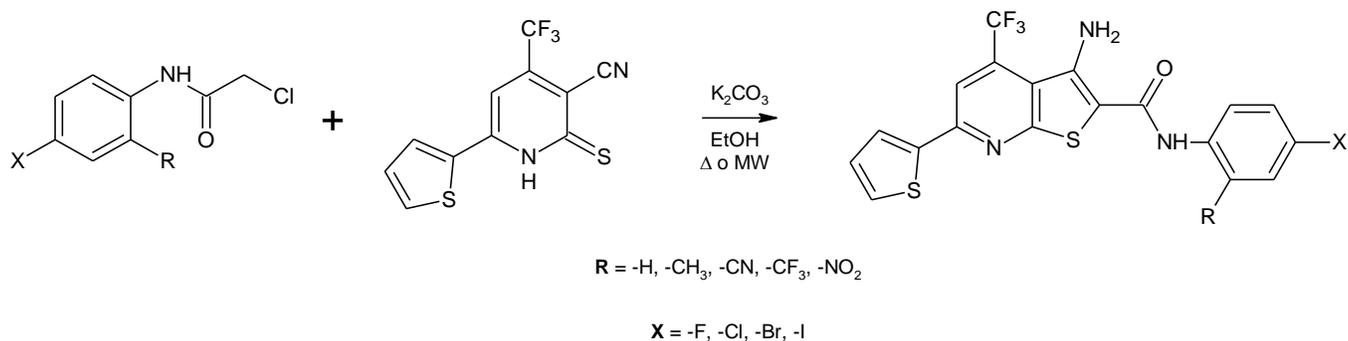
Esquema 5. Síntesis del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)

Por otro lado, se sintetizó el 6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR) a partir de la 2-cianotioacetamida (IntTPR2) y de la 4,4,4-trifluoro-1-(tiofen-2-il)-1,3-butanodiona (IntTPR1) (Esquema 5), ambas disponibles comercialmente. La reacción se llevó a cabo en etanol con trietilamina como base, donde el producto precipitó una vez terminada la reacción, el cual se empleó de inmediato en el siguiente paso.<sup>51</sup>

### 6.1.4. Síntesis del anillo de Tieno[2,3-*b*]piridina

Finalmente, para la síntesis de los compuestos objetivo (Esquema 6), las 2-cloro-*N*-(4-halofenil)acetamidas se hicieron reaccionar con TPR en EtOH utilizando carbonato de potasio como base a reflujo por calentamiento convencional, o usando un reactor de microondas Initiator+ Biotage como fuente de calentamiento a una potencia de entre 10 y 20 W para mantener una temperatura de 90 °C.<sup>34</sup> Los compuestos se caracterizaron por punto de fusión,

infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y espectrometría de masas (EM).



**Esquema 6.** Síntesis del anillo de Tieno[2,3-*b*]piridina.

## 6.2. Ensayos biológicos

En esta sección se describen los procedimientos de los ensayos de actividad biológica llevados a cabo para la evaluación de los compuestos sintetizados. Se comenzó con el ensayo de Western Blot en donde se determinaron los niveles de expresión de la proteína FOXM1, y posteriormente, se determinó la  $\text{CI}_{50}$  de a los compuestos que mejores resultados presentaron en una línea celular cancerígena de cáncer de mama MDA-MB-231. De manera adicional se comenzó con la estandarización de un nuevo ensayo para la FOXM1 conocido como CETSA, para evaluar si los ligandos son capaces de interactuar con el blanco dentro del sistema celular completo.

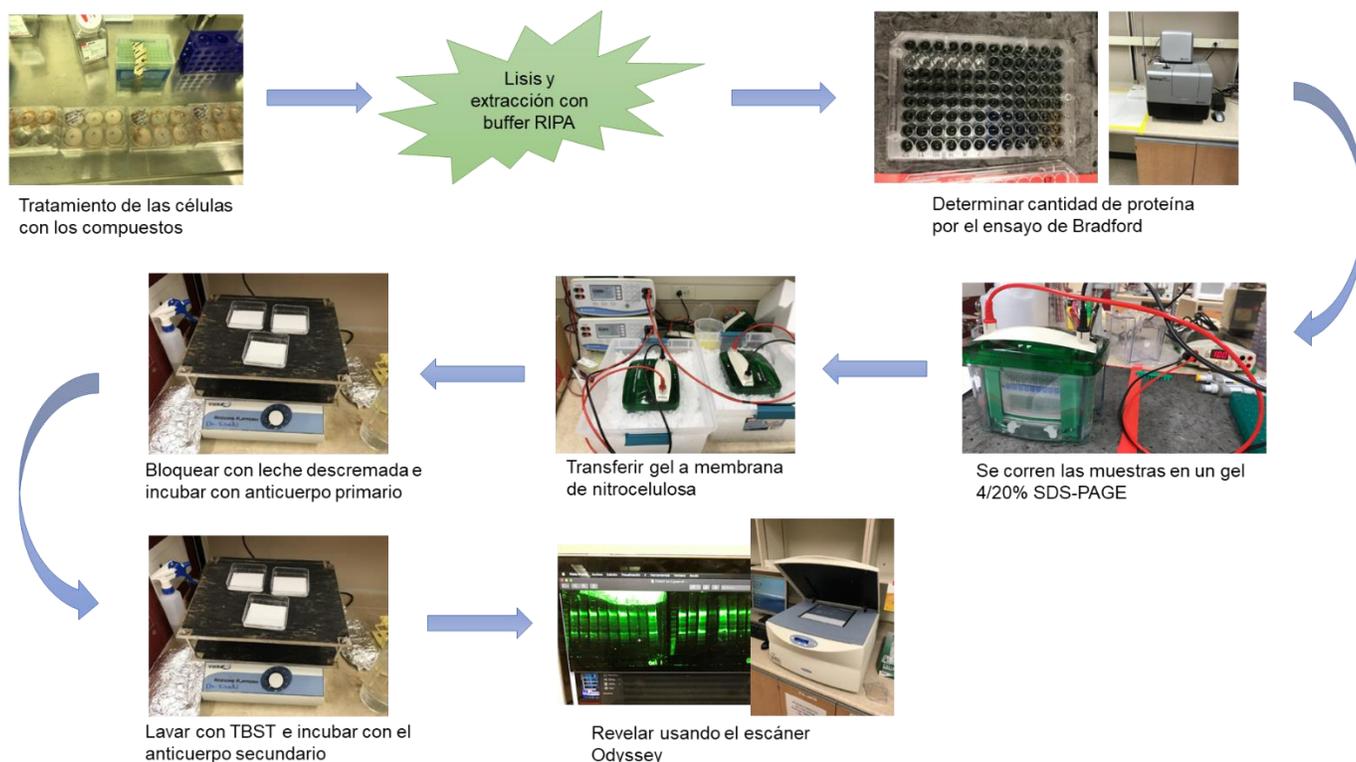
### 6.2.1. Cultivo celular

Para los ensayos mostrados a continuación se usaron células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C.

### 6.2.2. Expresión de FOXM1 (Western Blot)

Después de tratar las células con los compuestos sintetizados por 24 horas a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , las células se tripsinizaron; la proteína FOXM1 se aisló con el buffer de lisis y extracción RIPA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de proteína en el sobrenadante se determinaron usando el ensayo de Bradford. Posteriormente, se cargaron 40  $\mu\text{g}$ /carril en un gel 4/20% SDS-PAGE. Después de completar la corrida, la proteína fue

transferida del gel a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con una solución al 10% de leche descremada en buffer TBST por una hora, y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario para FOXM1 a 4°C toda la noche. Después, esta se lavó tres veces con TBST por periodos de 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario Li-Cor a temperatura ambiente por una hora. Se volvió a lavar tres veces con TBST por periodos de 5 min. El revelado de la membrana se llevó a cabo por un método de detección dependiente de radiación infrarroja (Li-Cor Odyssey). El control de carga empleado fue la  $\beta$ -actina y con esta se normalizaron los datos (Figura 23).



**Figura 23.** Procedimiento para el Western Blot.

### 6.2.3. Ensayo de MTT

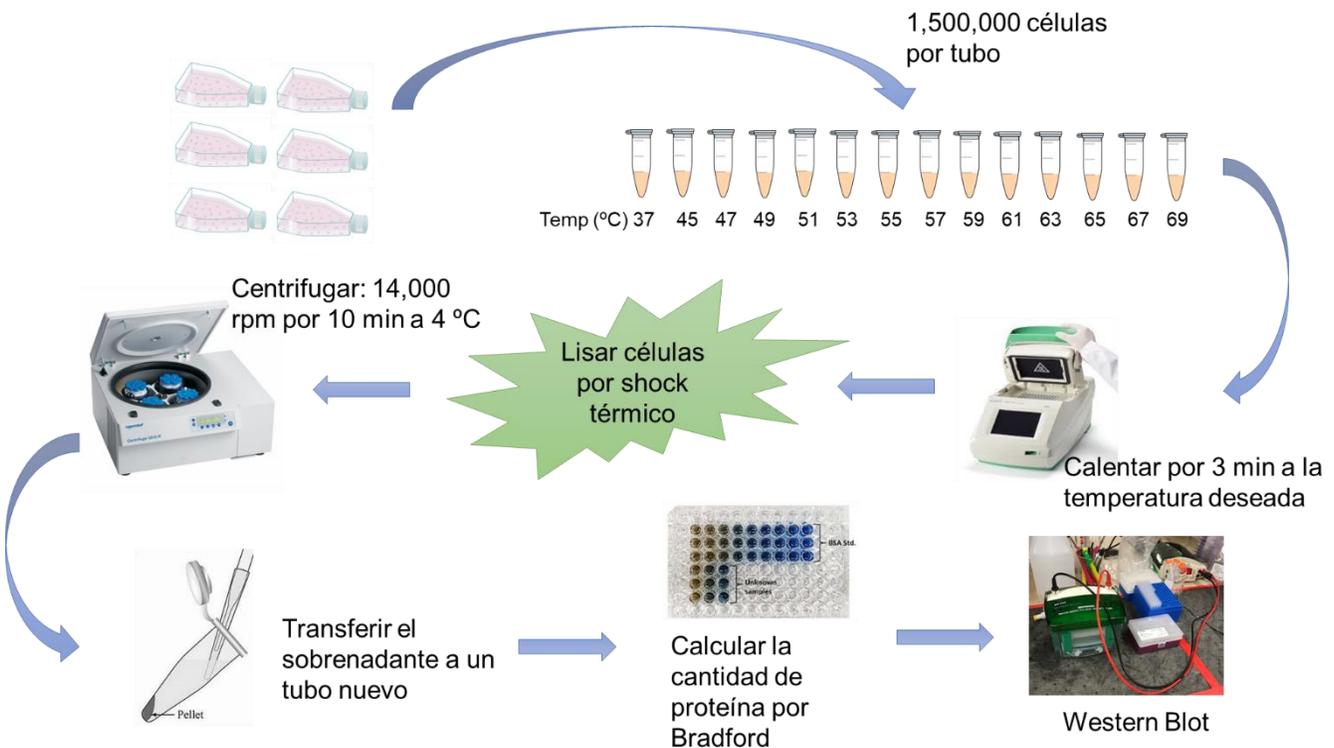
Se sembraron células de la línea MDA-MB-231 en placas de 96 pozos con una densidad aproximada de 4000/células por pozo, para posteriormente agregar a diferentes concentraciones los compuestos sintetizados e incubar por 72 horas. Una vez completado el tiempo, se agregaron 30  $\mu$ L de una solución de MTT (3 mg/mL) y se continuó la incubación por 3 horas. Los cristales precipitados se disolvieron usando DMSO, y la absorbancia de la solución resultante fue medida a 570 nm usando un lector de microplacas. Los datos obtenidos fueron

analizados usando GraphPad Prism. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en tres diferentes pasajes celulares.

### 6.2.4. CETSA

Para construir la curva de desnaturalización se despegaron las células cultivadas en cajas T-75 a 90% de confluencia con raspado, se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en DPBS con inhibidor de proteasas. Se tomaron 14 alícuotas de la suspensión celular anterior y se calentaron por 3 minutos a 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 y 69 °C, respectivamente. Después, las células se lisaron por shock térmico. Se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas solubles y se conservaron a -80°C para posteriormente ser analizadas por Western Blot. Después se cargó 30 µL/carril de cada muestra en un gel 4/20% SDS-PAGE y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para realizar y analizar el Western Blot (Figura 24).

Una vez encontrado el rango de temperatura en el que la FOXM1 se desnaturaliza se repitió el mismo procedimiento por triplicado, pero usando únicamente las temperaturas de 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52 °C



**Figura 24.** Procedimiento ensayo CETSA.

Una vez obtenida la curva, las células se trataron con 40  $\mu$ L de una solución 10 mM en DMSO de FDI-6, incubando por 3 horas, previo a todo el proceso descrito previamente; para comprobar si este interactúa y por lo tanto estabiliza a FOXM1 en células intactas.

### 6.3. Estudios *in silico*

En esta sección se describe el procedimiento llevado a cabo para el acoplamiento molecular desde la preparación de la proteína y los ligandos, hasta la ejecución del ensayo y el tratamiento dado a los resultados.

#### 6.3.1. Preparación de la proteína

La estructura cristalizada del DUA de FOXM1 se obtuvo del Protein Data Bank (PDB\_ID: 3G73) con una resolución de 2.21 Å.<sup>25</sup> Se removieron la cadena A, la cadena de ADN y todas las moléculas de agua usando el módulo Protein Preparation Wizard de Maestro.<sup>52</sup> Se completó la estructura agregando las cadenas laterales faltantes y asignando la protonación correcta para todos los residuos a pH 7.0 usando PROPKA.

Se llevó a cabo una dinámica molecular usando GROMACS 4.5.6. El complejo se solató con el modelo de agua TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 points) en una celda unitaria cúbica en condiciones periódicas, neutralizando las cargas del sistema con iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a una concentración total 0.15 M. La energía total del sistema se minimizó usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN; posteriormente, para equilibrar el sistema se mantuvo la temperatura a 300 K usando el termostato Berendsen. Se hizo un paso adicional de equilibrio del sistema usando un ensamble isotérmico-isobárico a 1 bar usando el baróstato Parrinello-Rahman. Se llevó a cabo la simulación de 50 ns usando una condición de límites periódicos. Usando la utilidad gmx clúster de GROMACS, se obtuvieron 30 estructuras con diferentes conformaciones generadas a lo largo de la dinámica.

El compuesto líder, FDI-6, se evaluó mediante acoplamiento molecular con estas 30 conformaciones obtenidas, con el fin de encontrar con cuál se obtiene la pose más cercana a la previamente reportada.<sup>32</sup> Una vez encontrada la más similar, esta se usó en estudios posteriores.

### 6.3.1.1. Autodock Vina

Utilizando AutoDockTools 1.5.6,<sup>53</sup> a las estructuras se les asignaron cargas Gasteiger-Marsilli y los hidrógenos no polares se fusionaron a su carbono adyacente. Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT.

### **6.3.2. Preparación de los ligandos**

Los compuestos se construyeron y minimizaron usando el método semiempírico PM6 en Spartan 10.<sup>54</sup>

#### 6.3.2.1. Autodock Vina

Usando el programa AutoDockTools 1.5.6, se identificó en cada molécula los enlaces rotables (raíz y ramas torsionales), se asignaron cargas atómicas Gasteiger-Marsilli, y se fusionaron los hidrógenos no polares a su carbono adyacente. Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT.

### **6.3.3. Acoplamiento molecular**

El acoplamiento molecular se llevó a cabo usando dos diferentes programas, Autodock Vina y Glide, para comparar los resultados. A continuación, se describe la metodología con cada uno de ellos.

#### 6.3.3.1. Autodock Vina

En el programa Autodock Vina,<sup>55</sup> se usó una malla de prisma rectangular de 22 x 22 x 24 Å centrada en las coordenadas 11.56, 0.0, 31.784, con una exhaustividad de 40. Este programa hace la optimización global con Búsqueda Local Iterativa y el criterio *Metropolis*, mientras que la optimización local la hace con el método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno.

#### 6.3.3.2. Glide

Para el caso de Glide de Maestro,<sup>52</sup> se construyeron las cajas de búsqueda utilizando un prisma rectangular seleccionando el ligando en el módulo *Receptor Grid Preparation* centrado en las coordenadas 11.56, 0.0, 31.784. Para realizar el acoplamiento molecular se utilizó el modo *Flexible* con la precisión XP (*Extra Precision*) bajo condiciones estándar. Se seleccionaron los modos de interacción con menor energía de unión y el menor valor en el estado de penalización del software.

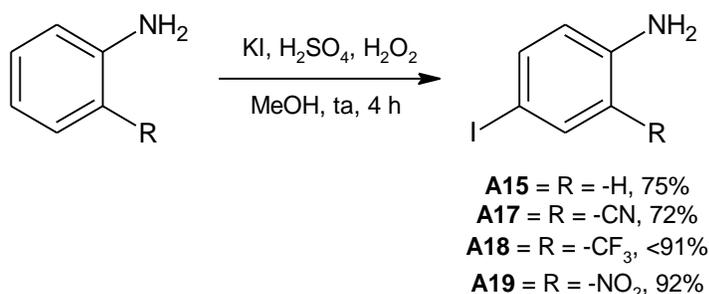
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Parte Química

#### 7.1.1. Obtención de las anilinas adecuadamente sustituidas

##### 7.1.1.1. Yodaciones

Las 4-yodoanilinas se obtuvieron por un procedimiento previamente descrito en la literatura, que consistió en el uso de condiciones fuertemente oxidantes generadas con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno para la obtención del electrófilo *in situ*, a partir de yoduro de potasio.<sup>56</sup>



**Esquema 7.** Reacción de yodación de la Anilina y sus derivados.

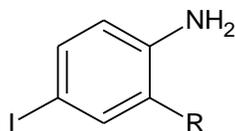
Durante las reacciones se observó el desprendimiento de un gas rosa/café, posiblemente yodo molecular sublimándose, que hacía que la cantidad de anilina materia prima no se terminara, por lo que fue necesario agregar más yoduro de potasio. Para contrarrestar esta pérdida de yodo se probó dividir el equivalente de yoduro de potasio en dos porciones para agregar una al iniciar la reacción, y otra, dos horas después. De esta manera, dos horas más tarde de la segunda adición, al monitorizar la reacción por CCF se observó que ya no hubo presencia de materia prima.

El trabajo de la reacción se hizo con una extracción con cloroformo y una solución de bisulfito de sodio. El propósito del bisulfito fue reducir el yodo y extraerlo en la fase acuosa, junto con los sobrantes de peróxido de hidrógeno. La mayoría de los productos se filtraron a través de alúmina para retirar impurezas posiblemente producto de la oxidación de la amina; y posteriormente, cada producto se trabajó de acuerdo con la proporción de impurezas existentes en el crudo de reacción, producto de la yodación en posición *meta* respecto al sustituyente R o posibles diyodaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la Tabla 2 se pueden observar los rendimientos de los compuestos obtenidos, presentando mejor rendimiento cuando R es un sustituyente electroattractor, debido posiblemente a que al efecto orientador *para* de la amina, se suma el efecto orientador *meta* en la misma posición, del sustituyente electroattractor. Además, en todos los casos los productos de diiodaciones eran poco probables debido al efecto generado en las otras posiciones por la electronegatividad del yodo. Los productos se caracterizaron por RMN de  $^1\text{H}$  e IR con el fin de comprobar la sustitución en el anillo, además se comparó su Pf con los previamente reportados en la literatura, coincidiendo adecuadamente.



**Tabla 2.** Rendimiento, constantes físicas y espectroscópicas de los productos obtenidos en las reacciones de yodación

Clave	R	Rendimiento, constantes físicas y espectroscópicas*
A15	-H	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> 75%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 62.3–62.6 °C (Reportado: 62–64 °C)<sup>57</sup></li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.40 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 6.47 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).</li> <li>• <b>IR</b> (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3403 y 3297 (ν<sub>N-H</sub>), 3060 (ν<sub>Ar-H</sub>), 670 y 583 (ν<sub>C-I</sub>).</li> </ul>
A19	-CF <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> &lt;91%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> No determinado</li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.69 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (ddd, <i>J</i> = 8.5, 2.1, 0.8 Hz, 1H), 6.53 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).</li> </ul>
A17	-CN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> 72%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 83.1–84.5 °C (Reportado: 85–86 °C)<sup>58</sup></li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.68 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.62 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.24 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).</li> <li>• <b>IR</b> (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3454 y 3355 (ν<sub>N-H</sub>), 3055 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2222 (ν<sub>C≡N</sub>), 819 y 495 (ν<sub>C-I</sub>).</li> </ul>
A18	-NO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> 92%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 120.7–122.2 °C (Reportado: 121–122 °C)<sup>59</sup></li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.42 (s, 1H), 7.56 (ddd, <i>J</i> = 8.8, 2.1, 0.7 Hz, 1H), 6.61 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 5.66 (s ancho, 2H, Int D<sub>2</sub>O)</li> <li>• <b>IR</b> (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3491 y 3378 (ν<sub>N-H</sub>), 3061 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1490 (ν<sub>C-NO<sub>2</sub></sub>), 618 y 517 (ν<sub>C-I</sub>).</li> </ul>

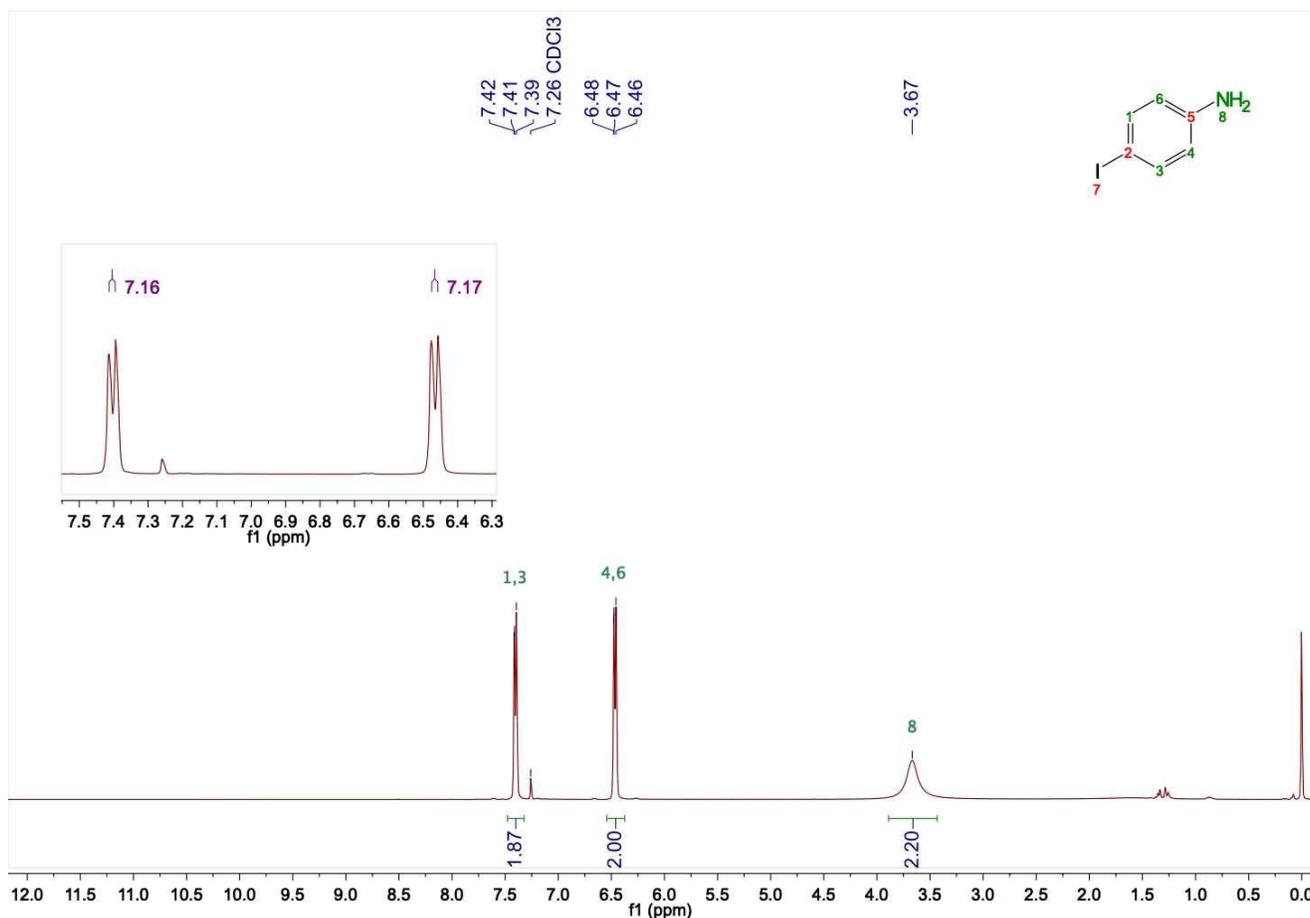
\*Los espectros pueden ser consultados en el Anexo III

A manera de ejemplo, se muestran y analizan los espectros obtenidos para la 4-yodoanilina (A15).

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 25) observamos en 7.41 y 6.47 ppm dos señales dobles integrando para 2H cada una y con constante de acoplamiento *orto*, correspondientes a los

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hidrógenos del anillo de benceno, siendo la señal doble en campo más bajo la correspondiente a los protones más cercanos al yodo y la otra a los presentes en la posición *orto* a la amina. Estas señales confirman la sustitución *para* a la amina en el anillo, adicionalmente, en 3.67 ppm observamos los hidrógenos unidos al nitrógeno de la amina.



**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) de la 4-Yodoanilina (A15).

En el espectro de infrarrojo (Figura 26) se observaron en  $3403$  y  $3297\text{ cm}^{-1}$  las señales características de la vibración N-H para amina primaria, en  $3060\text{ cm}^{-1}$  las correspondientes a la vibración C-H de aromático y finalmente en  $670$  y  $583\text{ cm}^{-1}$  las indicativas de un enlace C-I.

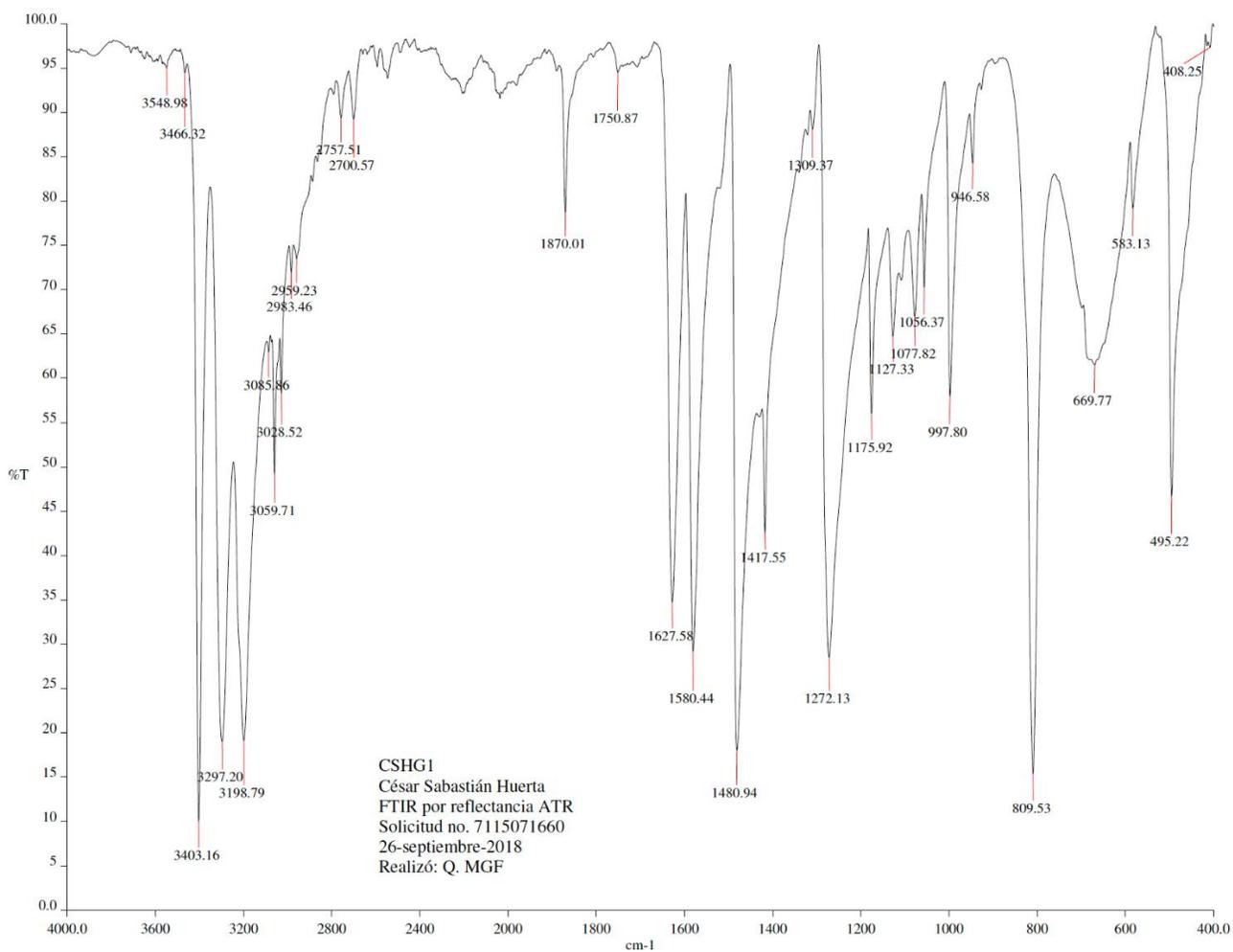
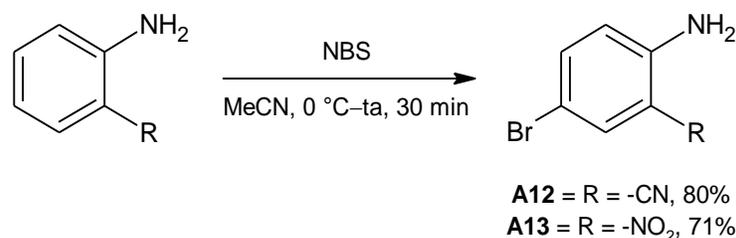


Figura 26. Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) de la 4-Yodoanilina (A15).

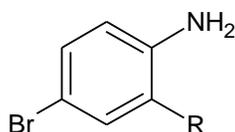
#### 7.1.1.2. Bromaciones

Las 4-bromoanilinas se obtuvieron mediante un procedimiento previamente descrito en la literatura que consistió en el uso de *N*-bromosuccinimida (NBS) como fuente de bromo y acetonitrilo como disolvente (Esquema 8).<sup>50</sup> Esta metodología posee la ventaja de tener un trabajo de reacción simple, condiciones tolerantes a una gran variedad de grupos funcionales, buena regio y quimioselectividad, y los productos pueden ser aislados por extracción.



**Esquema 8.** Síntesis de las 4-bromoanilinas sustituidas (**A12-A13**).

En la Tabla 3 se pueden observar los rendimientos de las anilinas sintetizadas, siendo bueno para ambos productos obtenidos por esta vía. Los compuestos se caracterizaron por RMN de <sup>1</sup>H, IR y EM con el fin de comprobar la sustitución en el anillo (Tabla 3).



**Tabla 3.** Rendimiento, y constantes físicas y espectroscópicas de los productos obtenidos en las reacciones de bromación con NBS

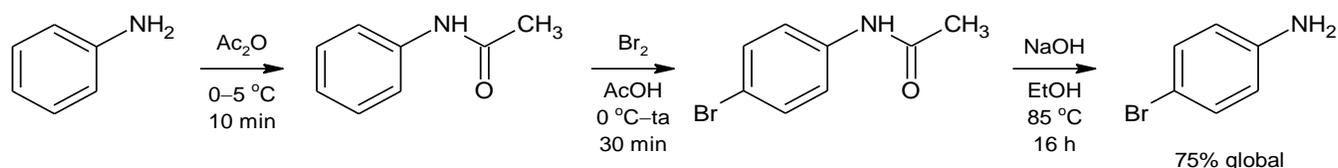
Clave	R	Rendimiento, y constantes físicas y espectroscópicas*
A12	-CN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> 80%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 91.9–93.1 °C (Reportado: 92–94 °C)<sup>60</sup></li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.59 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.74 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 6.25 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).</li> <li>• <b>IR</b> (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3467 y 3370 (ν<sub>N-H</sub>), 3075 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2218 (ν<sub>C=N</sub>).</li> <li>• <b>EM</b> (IE, [M<sup>+</sup>], <i>m/z</i>): 196 (Teórico: 196)</li> </ul>
A13	-NO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento:</b> 71%</li> <li>• <b>Punto de fusión:</b> 107.2–108.1 °C (Reportado: 109–110 °C)<sup>61</sup></li> <li>• <b>RMN <sup>1</sup>H</b> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.06 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H), 7.56 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O), 7.52 (dd, <i>J</i> = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H)</li> <li>• <b>IR</b> (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3471 y 3345 (ν<sub>N-H</sub>), 3094 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1496 y 1336 (ν<sub>C-NO2</sub>).</li> <li>• <b>EM</b> (IE, [M<sup>+</sup>], <i>m/z</i>): 216 (Teórico: 216)</li> </ul>

\*Los espectros pueden ser consultados en el Anexo III

Al igual que en las yodaciones, esta reacción está favorecida por la orientación generada por el grupo electroattractor, pero sobre todo por el grupo electrodonador, la amina. Además, los

productos de dibromación son poco probables, ya que una vez teniendo el bromo en el anillo, este desactiva las otras posiciones posibles, las cuales requerirían entonces una mayor temperatura para reaccionar.

Por otro lado, esta metodología también se intentó para obtener la 4-bromoanilina, pero debido a que esta está demasiado activada al no tener grupos electroattractores, se obtuvo una mezcla de productos difíciles de trabajar, por lo que se procedió por otro camino (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de la 4-Bromoanilina (A10).

Primero, se acetiló la anilina, lo que la protege de oxidaciones por el medio y además reduce el poder electrodonador del grupo amino al anillo. Una vez protegida la amina, se bromó en condiciones clásicas usando  $\text{Br}_2$  en ácido acético. El ácido acético se coordina con el bromo molecular generando que uno de los dos átomos adquiera una carga parcial positiva y sea susceptible a ser atacado por el anillo. La reacción procedió adecuadamente obteniendo un solo producto en poco tiempo.

Una vez obtenido el producto halogenado, se procedió a desproteger la amina en condiciones básicas, lo que también resultó adecuadamente. Al ser un producto ampliamente reportado en la literatura y ser un procedimiento usado en prácticas de laboratorio, únicamente se caracterizó por punto de fusión, que además está muy alejado de los correspondientes para la materia prima o de cualquiera de los intermediarios posibles (Pf acetanilida = 114.3–116.9 °C, *N*-(4-bromofenil)acetamida = 167.3–168.1 °C), lo que descarta el aislamiento de estos (Tabla 4).

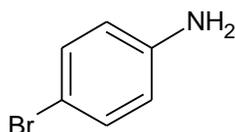


Tabla 4. Rendimiento y constantes físicas de la obtención de la 4-Bromoanilina

Clave	Rendimiento y constantes físicas
A10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendimiento de los 3 pasos: 75%</li> <li>• Punto de fusión: 59.9–63.2 °C (Reportado: 59–61 °C)<sup>62</sup></li> </ul>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A manera de ejemplo se muestran y analizan los espectros obtenidos para el 2-amino-5-bromobenzonitrilo (**A12**).

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27) observamos en 7.59, 7.42 y 6.74 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos. En 7.59 ppm está una señal doble con constante de acoplamiento *meta* correspondiente al señalado con el número 3. En 7.42 ppm es un doble de dobles con acoplamientos *orto* y *meta*, por lo que corresponde al señalado con el número 1. Y finalmente, la de 6.74 ppm es una señal doble con acoplamiento *orto*, que corresponde al hidrógeno 6. Los hidrógenos unidos al nitrógeno de la amina se observan en 6.25 ppm. Las señales entre 2.5 y 3.5 ppm son debidas al disolvente.

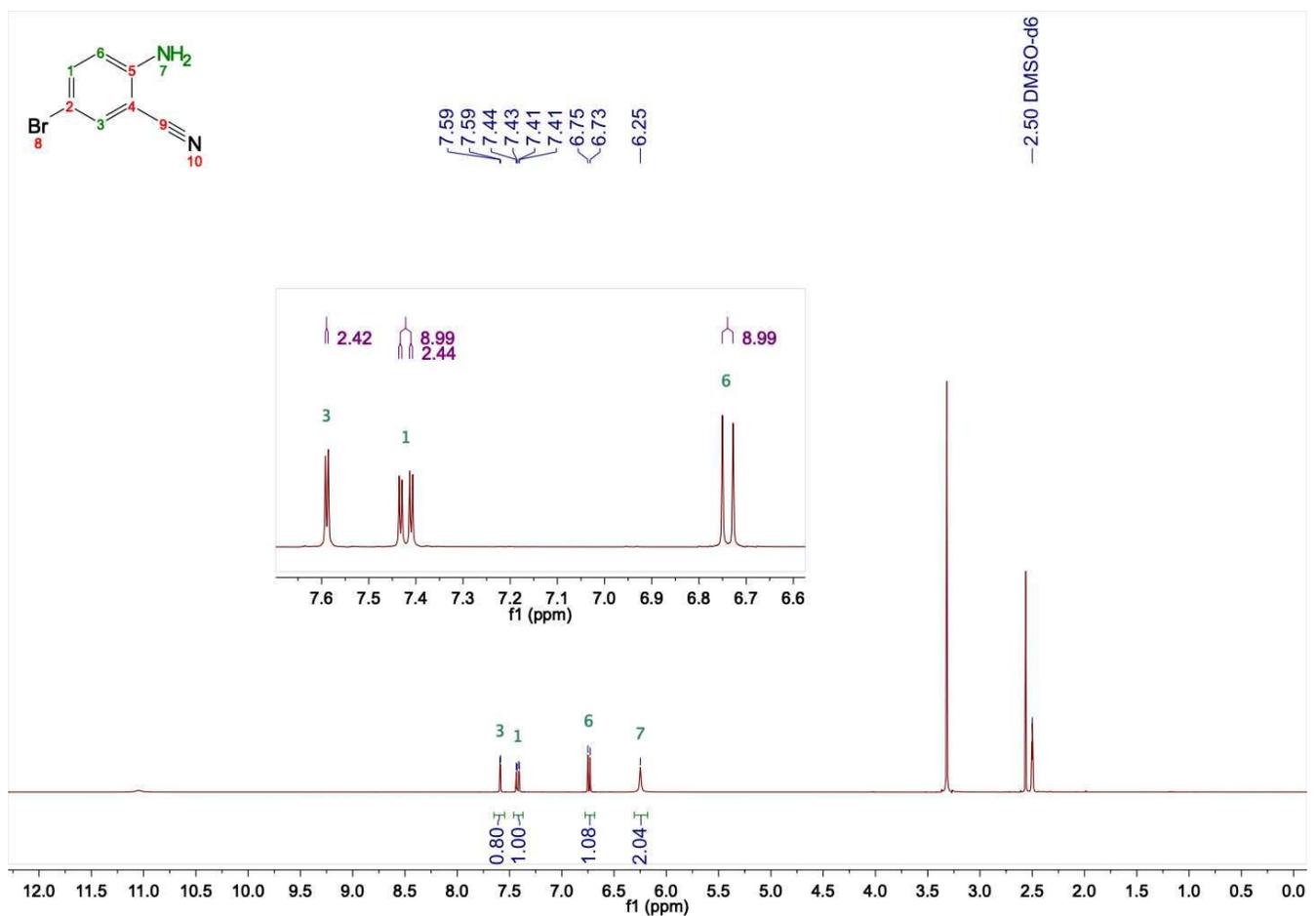


Figura 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (**A12**).

En el espectro de infrarrojo (Figura 28) se observan en 3467 y 3370  $\text{cm}^{-1}$  las señales características de la vibración N-H para amina primaria, en 3075  $\text{cm}^{-1}$  las correspondientes a la

vibración C-H de aromático, en 2218  $\text{cm}^{-1}$  las indicativas del enlace triple C-N del nitrilo y finalmente el enlace aromático C-Br se observa en 635  $\text{cm}^{-1}$ .

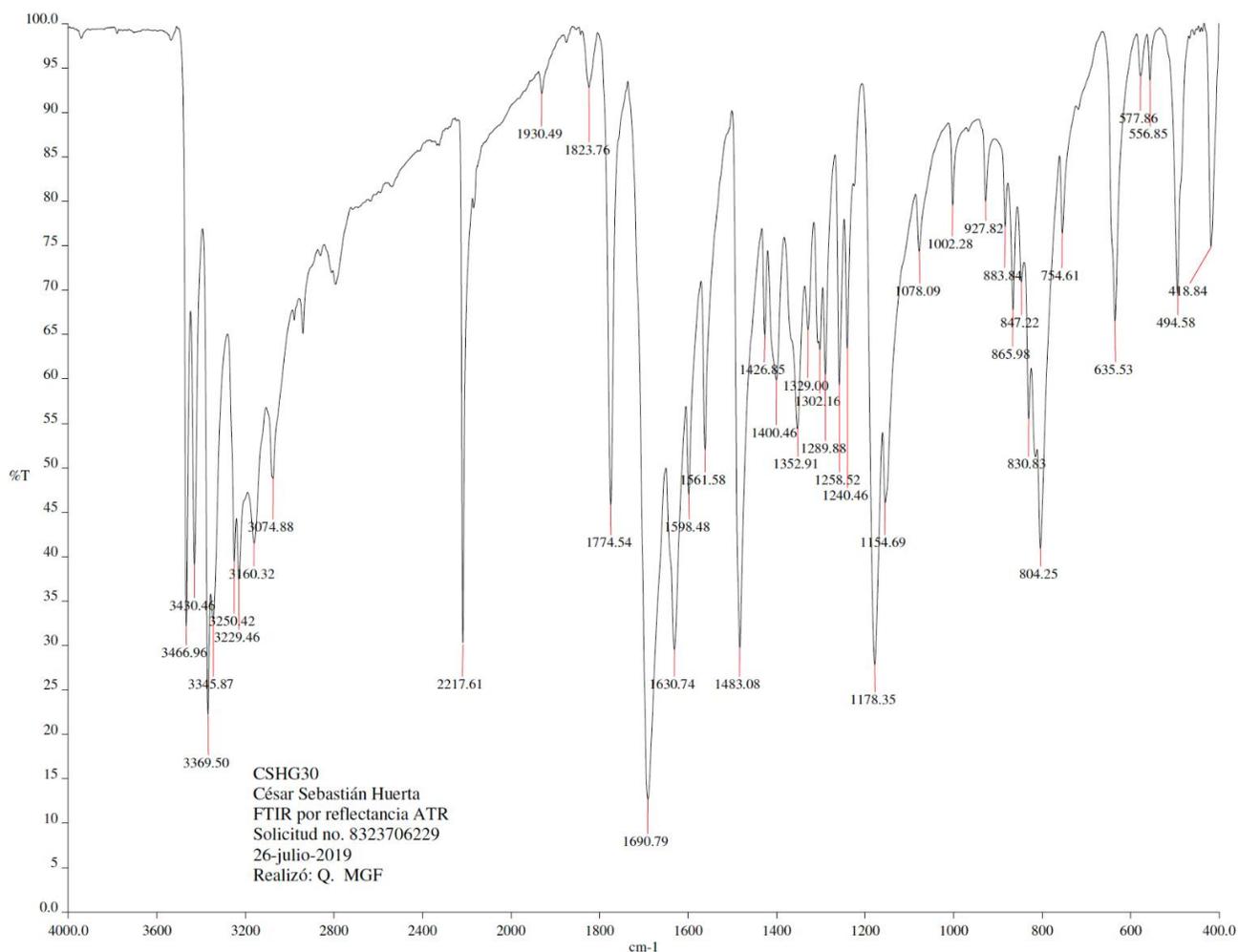


Figura 28. Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) del 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12).

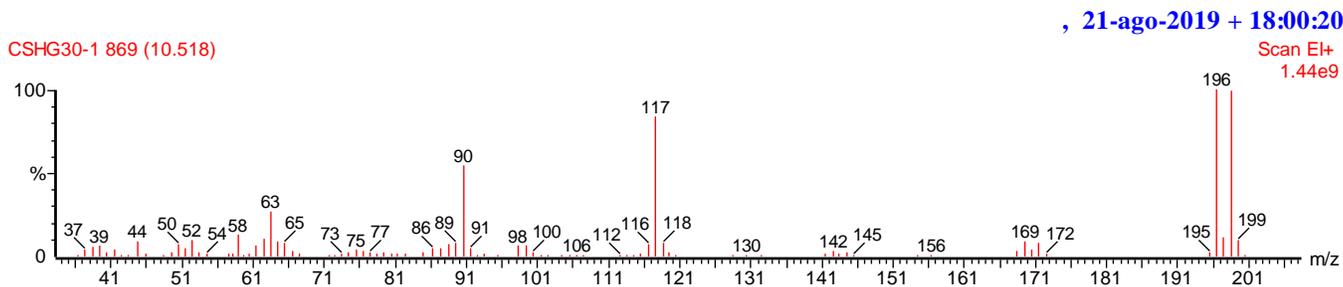


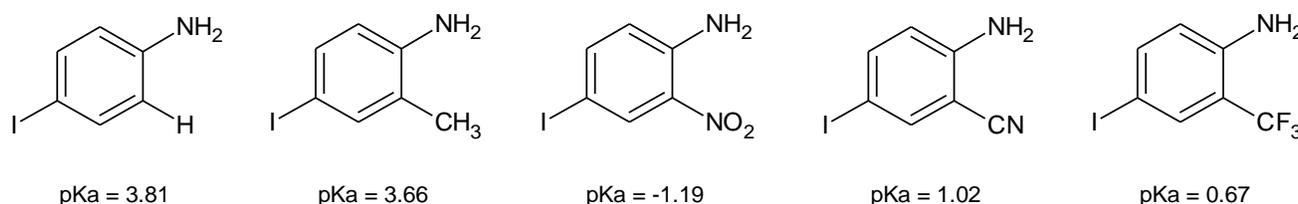
Figura 29. Espectro de masas por CGEM/IE [ $M^{+}$ ] (Esperada: 197) de la 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12) .

En el espectro de masas (Figura 29) se observan en unidades de  $m/z$  señales en 196 y 198 debido a los isótopos del bromo en intensidad 1:1 y por ello el peso molecular promedio de 197

g/mol. En 117 observamos la señal correspondiente a la pérdida del bromo, que además se confirma por la pérdida de las señales de la isotopía de ese núcleo. Finalmente, la pérdida del nitrilo se observa en la señal de 91 *m/z*.

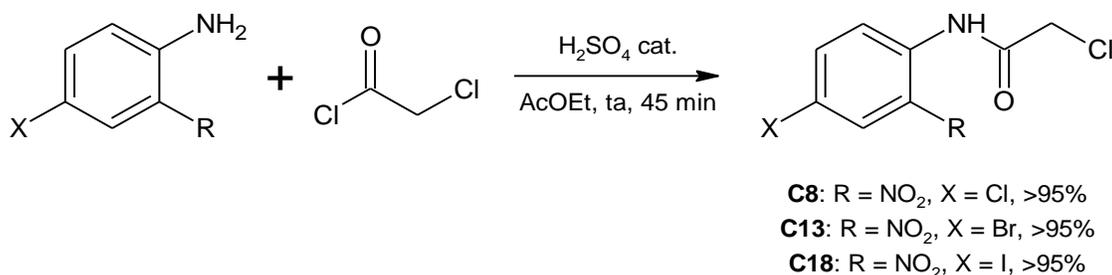
### 7.1.2. Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas (CFDI-6, C1–C19)

Las 2-cloro-*N*-fenilacetamidas (CFDI-6, C1–C19) se obtuvieron a partir de las anilinas adecuadamente sustituidas y cloruro de cloroacetilo con rendimientos cuantitativos en todos los casos, en tres diferentes condiciones. Existe una relación entre los sustituyentes que reaccionaron en cada condición, que a su vez podemos relacionar con el pKa de las anilinas (Esquema 10). Cada una de las condiciones usadas favoreció que las materias primas se terminaran en todos los casos en tiempos cortos y como consecuencia, que se obtuvieran los productos sin necesidad de usar técnicas de purificación elaboradas.



**Esquema 10.** pKa predicho para las 4-Yodoanilinas con los diferentes sustituyentes usados. Predicción con módulo de pKa del programa ChemSketch de ACD labs.

- **Condiciones de catálisis ácida**

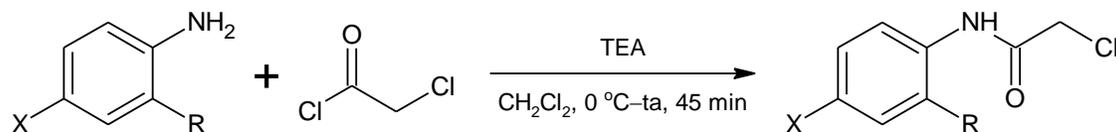


**Esquema 11.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas en condiciones de catálisis ácida.

Las anilinas con grupo nitro son las que procedieron con este método que, como vemos en el pKa ejemplo del Esquema 11, son las anilinas menos básicas y por lo tanto menos nucleofílicas por tener el par de electrones de la amina comprometido en resonancia con el grupo electroattractor en *orto*. Para este caso, la reacción se llevó a cabo usando catálisis ácida,

siendo la función del ácido protonar el oxígeno del carbonilo, lo que vuelve al carbono de este más electrofílico; en otras palabras, más susceptible al ataque de la anilina.

• **Condiciones básicas**



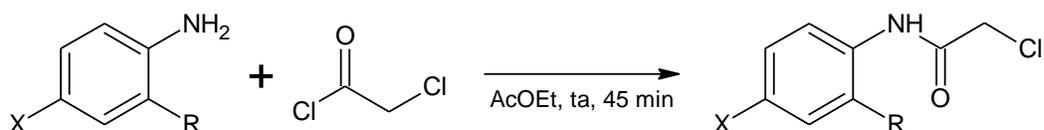
**CFDI-6:** R = H, X = F, >95%  
**C5:** R = H, X = Cl, >95%  
**C10:** R = H, X = Br, >95%  
**C15:** R = H, X = I, >95%  
**C16:** R = CH<sub>3</sub>, X = I, >95%

**Esquema 12.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas en condiciones básicas.

Las anilinas que se pudieron transformar por este método son las que no tienen sustituyente R o que este sustituyente es metilo. En el Esquema 12 vemos que estos casos son aquellos en los que la anilina tiene un pKa más alto, por lo tanto, es más básica y más nucleofílica; esto debido a la ausencia de un grupo en posición *orto* que comprometa el par de electrones del nitrógeno de la amina.

Si bien esto resultó de utilidad para que reaccionara con mayor facilidad con el carbono de la cloroacetamida, también reaccionó con más facilidad con el ácido liberado de esta primera reacción, y las anilinas protonadas no son nucleofílicas. Por lo tanto, en esta estrategia la función de la base es neutralizar el ácido liberado en la reacción, para que este no protone a la anilina restándole reactividad.

• **Condiciones neutras**



**C1:** R = CH<sub>3</sub>, X = F, >95%      **C9:** R = CF<sub>3</sub>, X = Cl, >95%  
**C2:** R = CN, X = F, >95%      **C11:** R = CH<sub>3</sub>, X = Br, >95%  
**C3:** R = NO<sub>2</sub>, X = F, >95%      **C12:** R = CN, X = Br, >95%  
**C4:** R = CF<sub>3</sub>, X = F, >95%      **C14:** R = CF<sub>3</sub>, X = Br, >95%  
**C6:** R = CH<sub>3</sub>, X = Cl, >95%      **C17:** R = CN, X = I, >95%  
**C7:** R = CN, X = Cl, >95%      **C19:** R = CF<sub>3</sub>, X = I, >95%

**Esquema 13.** Síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas bajo condiciones neutras.

Para el resto de las anilinas fue posible llevar a cabo la reacción sin agregar nada más al medio de reacción que la anilina y el cloruro de cloroacetilo, debido a que las anilinas usadas en este método tienen un pKa intermedio (Esquema 13). Por un lado, tienen la suficiente nucleofilia para atacar al carbono del cloruro de ácido y llevar a cabo la sustitución, y por otro lado tampoco son tan básicas como para reaccionar de inmediato con el ácido liberado.

Para las tres estrategias al monitorizar la reacción por CCF, la materia prima se dejaba de observar en poco tiempo, se hacía una extracción para retirar el exceso de ácido, trazas de la anilina protonada y los restos de cloruro de cloroacetilo hidrolizado en la fase acuosa; mientras que el producto se obtenía puro de la fracción orgánica.

Para el caso de las acetamidas que fueron sintetizadas en el L-122, estas fueron caracterizadas por punto de fusión, IR, RMN de  $^1\text{H}$  y EM; mientras que aquellas que se hicieron en la estancia en la Universidad de Alberta se caracterizaron por punto de fusión, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Todos los espectros pueden ser consultados en el Anexo III, mientras que en el Anexo I se encuentra la descripción de las señales. A manera de ejemplo, se muestran los espectros correspondientes a la 2-cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (**C15**).

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 30) se observaron en 7.66 y 7.34 ppm dos señales dobles con constante de acoplamiento *orto*, cada una integrando para 2H, que corresponden a los hidrógenos del anillo de benceno. En 8.20 ppm se observó una señal simple ancha que correspondió al hidrógeno unido al nitrógeno de la amida. Finalmente, en 4.18 ppm se observó una señal simple que integró para 2H correspondiente al metileno.

En el espectro de infrarrojo (Figura 31) podemos observar como señales características en  $3258\text{ cm}^{-1}$  y  $3184\text{ cm}^{-1}$  la vibración del enlace CON-H, en  $3071\text{ cm}^{-1}$  la Ar-H, en  $2946\text{ cm}^{-1}$  la C-H, en  $1674\text{ cm}^{-1}$  la C=O, en  $769\text{ cm}^{-1}$  la C-Cl y en  $499\text{ cm}^{-1}$  la C-I.

En la espectrometría de masas por impacto electrónico (Figura 32) se observa el ion molecular  $[\text{M}^+]$  a la  $m/z$  esperada de 295, mientras que en 297 se observa el  $[\text{M}+2]$  con un 30% de abundancia, correspondiente al aporte del  $^{37}\text{Cl}$ . En  $m/z$  de 218 se observa la pérdida del cloroacetilo y finalmente en  $m/z$  91 se observa la pérdida del yodo, por mencionar las pérdidas más características.

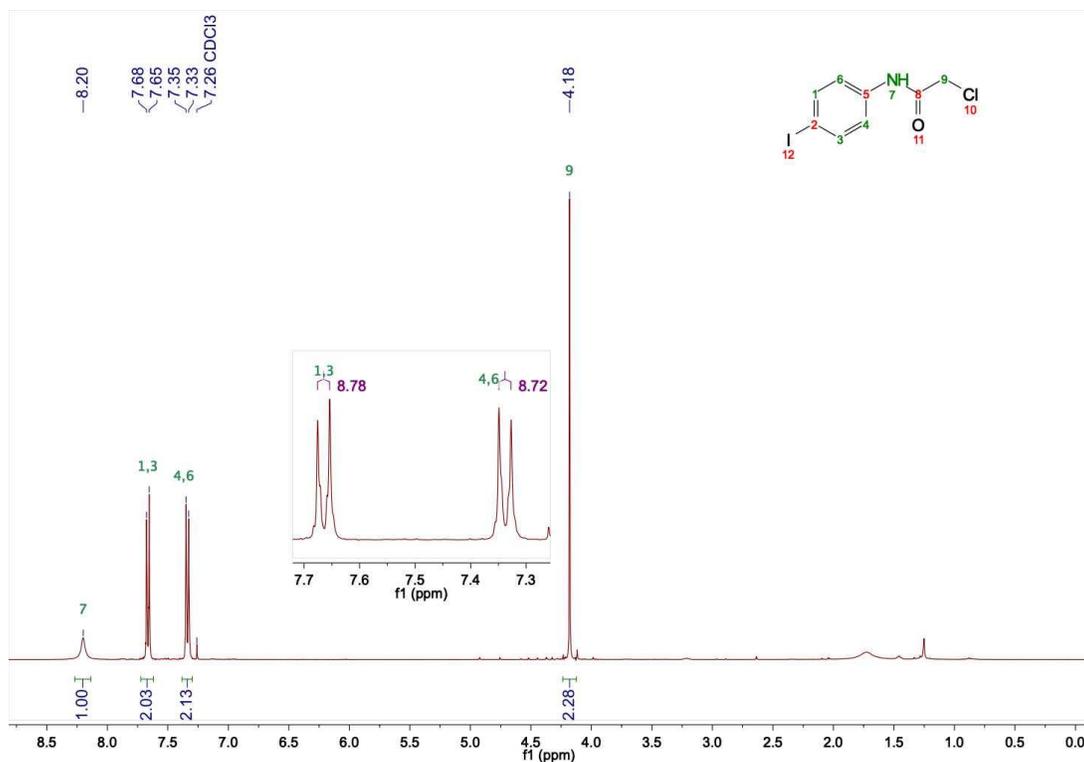


Figura 30. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) de la 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (C15).

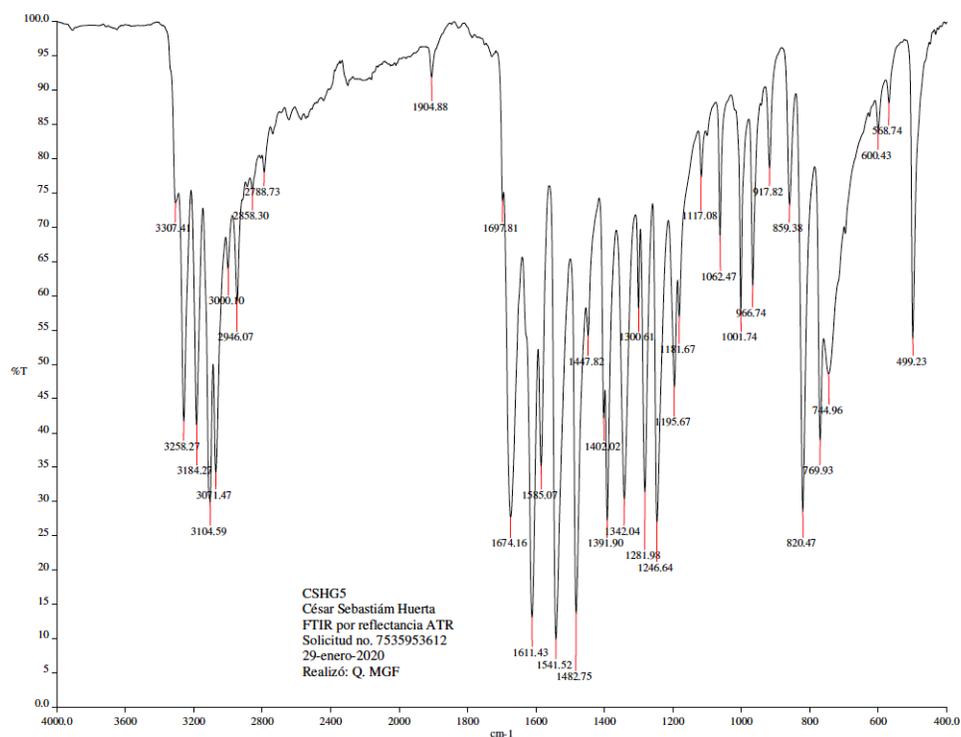


Figura 31. Espectro de IR por reflectancia ATR ( $\text{cm}^{-1}$ ) de la 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (C15).

RAFAEL CASTILLO

CSHG5 1147 (12.604) Cm (1145:1148)

, 03-abr-2019 + 12:27:39

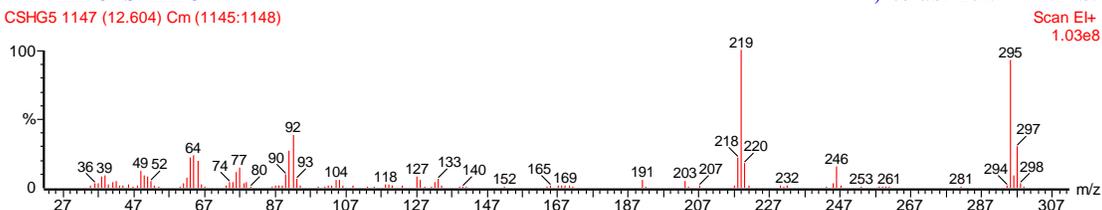
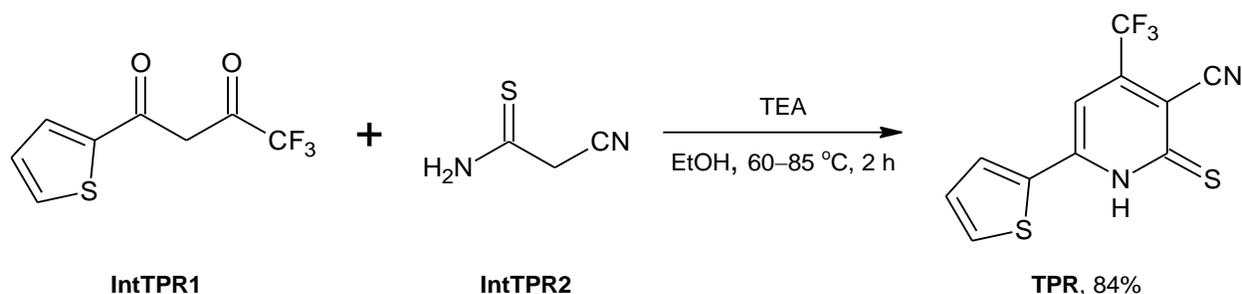


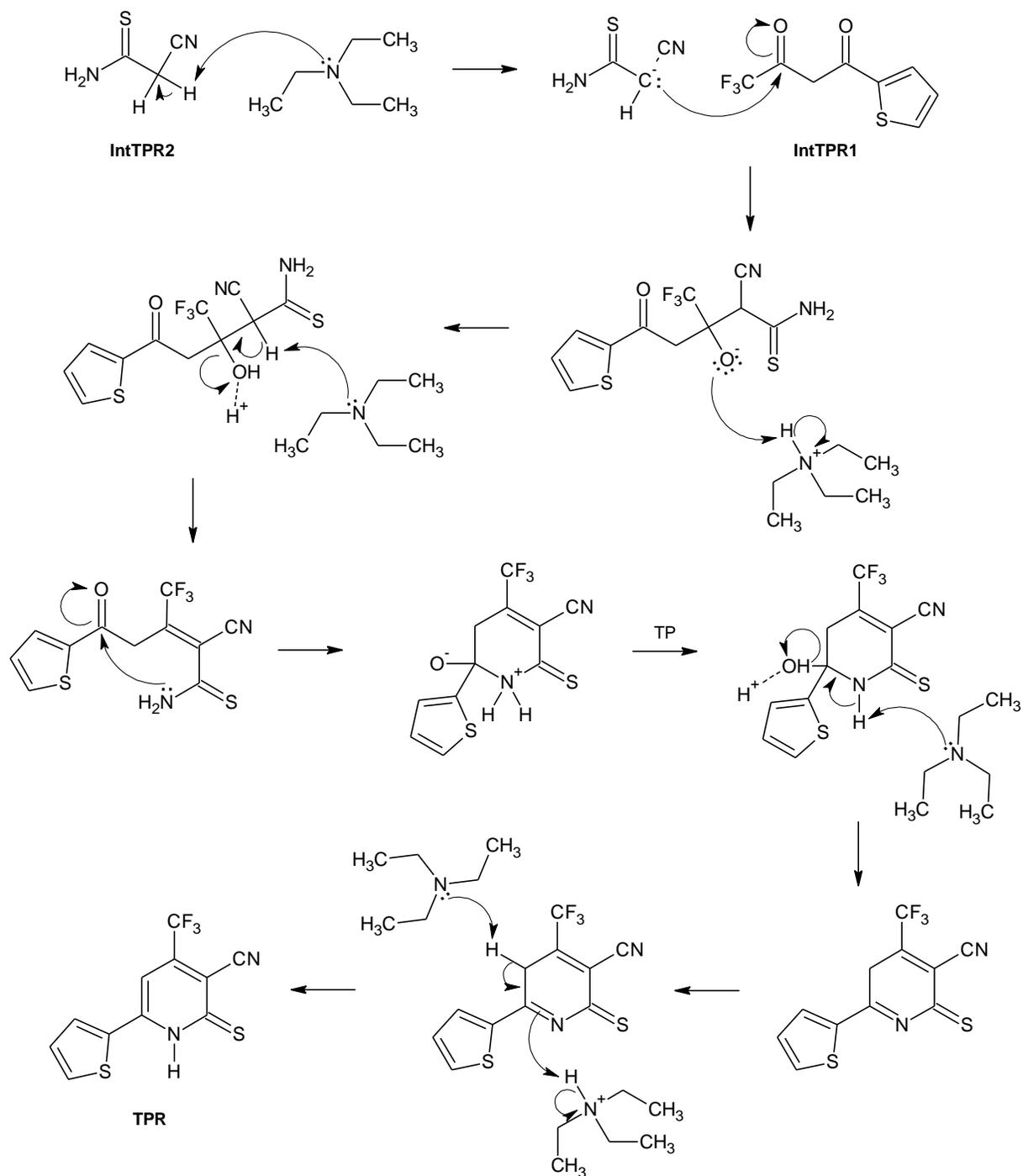
Figura 32. Espectro de masas por CGEM/IE [M<sup>+</sup>] (Esperada: 295) de la 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (**C15**).

### 7.1.3. Síntesis del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**)



Esquema 14. Síntesis del 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**).

Se hizo una síntesis de tipo Guareschi-Thorpe<sup>44</sup> para obtener **TPR** a partir de la 4,4,4-trifluoro-1-(tiofen-2-il)-1,3-butanodiona (**IntTPR1**) y la 2-cianotioacetamida (**IntTPR2**) (Esquema 14). Se propone que esta síntesis transcurre a través del mecanismo mostrado en el Esquema 15; el cual comienza de manera análoga a una condensación aldólica con la desprotonación del carbono alfa al nitrilo de **IntTPR2**, que una vez siendo anión, ataca al carbonilo más activado de la butanodiona, el vecino al trifluorometilo, para posteriormente deshidratarse formando un doble enlace. El nitrógeno de la tioamida ataca el carbonilo restante, lo que lleva a la formación del ciclo de seis miembros. De la misma manera, ocurre una deshidratación en la que se forma el último doble enlace necesario, llegando a **TPR**.

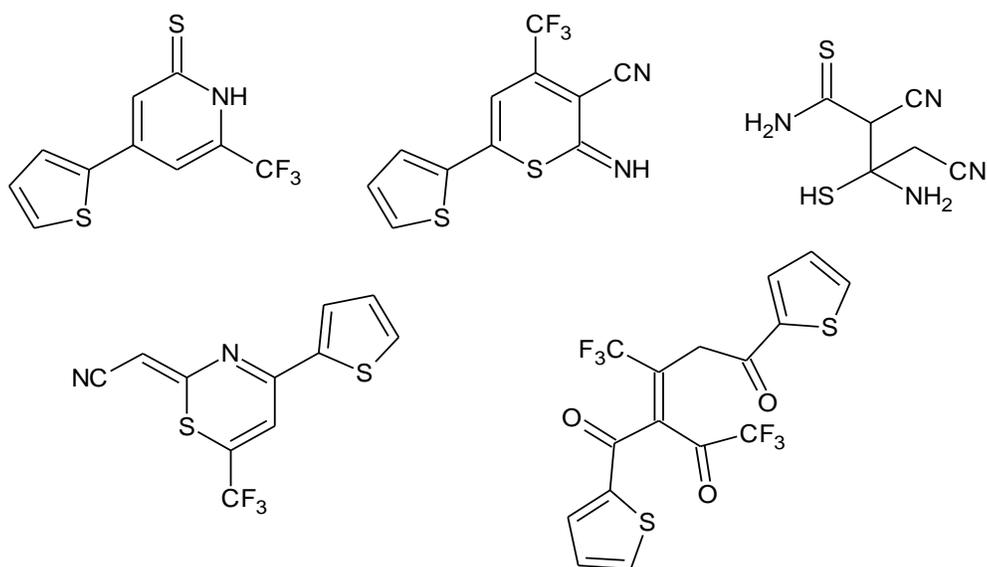


Esquema 15. Mecanismo de formación del compuesto TPR.

La evidencia reportada tanto experimental como de estudios computacionales revela que, mientras exista una base en el medio capaz de desprotonar el metileno activo de (IntTPR2), siempre se obtendrá mayoritariamente el producto de dicho carbono con el carbonilo con mayor carga parcial positiva del compuesto 1,3-dicarbonílico (IntTPR1).<sup>45</sup> Sin embargo, por la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

naturaleza de ambas materias primas, hay más de un producto posible en esta reacción. Ambas tienen hidrógenos ácidos susceptibles a reaccionar con la trietilamina, y una vez formado el respectivo anión, pueden tomar como nucleófilo a una materia prima igual a ellas o a la otra, ambas teniendo centros electrofílicos. Se proponen algunos de los posibles productos secundarios en el Esquema 16, aclarando que ninguno de estos fue aislado y confirmado, pero resultan una buena explicación del rendimiento obtenido a pesar de que las materias primas ya no se observarían en CCF.



**Esquema 16.** Posibles subproductos de la reacción de obtención de TPR.

La ventaja de esta reacción es que el producto de interés resulta ser muy insoluble dentro de la mezcla de reacción, por lo que una vez que se observa la desaparición de las materias primas en CCF y la reacción llega a temperatura ambiente, aquel precipita. La separación de este sólido por filtración al vacío da un producto crudo con 84% de rendimiento, cuyo análisis por CCF indica la presencia de dos manchas. Al tratar de aislar los compuestos por recristalización o cromatografía en columna la cantidad y proporción de manchas se mantenía. Esto demuestra la presencia de los dos tautómeros de TPR en el producto de reacción que se pudieron observar en la CCF.

Se decidió entonces analizar el producto crudo de reacción por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 33 y 34). En estos espectros se pueden observar las señales correspondientes al producto esperado. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa en 7.90, 7.70 y 7.15 ppm tres señales dobles de dobles, correspondientes al anillo de tiazolotiofeno, en 7.29 ppm una señal simple del hidrógeno de la

piridina indicado con (1) y en 8.97 ppm el hidrógeno unido a azufre. Por otro lado, en el de  $^{13}\text{C}$  se observan las señales necesarias en la zona de aromáticos, destacando la del carbono del trifluorometilo (122.3 ppm) y el carbono que lo sostiene en la piridina (139.1 ppm) por los acoplamientos C-F observados.

Además, en los espectros se pueden observar las señales de la trietilamina en cantidades equivalentes al producto. Al observar esto mismo, fue evidente que la función de la trietilamina es estabilizar el compuesto en uno de los dos tautómeros posibles, convirtiéndose al quitar la misma en una mezcla muy difícil de manejar y purificar. Con esta información se decidió que el producto podía permanecer de esta manera y ser usado tal cual en la siguiente reacción.

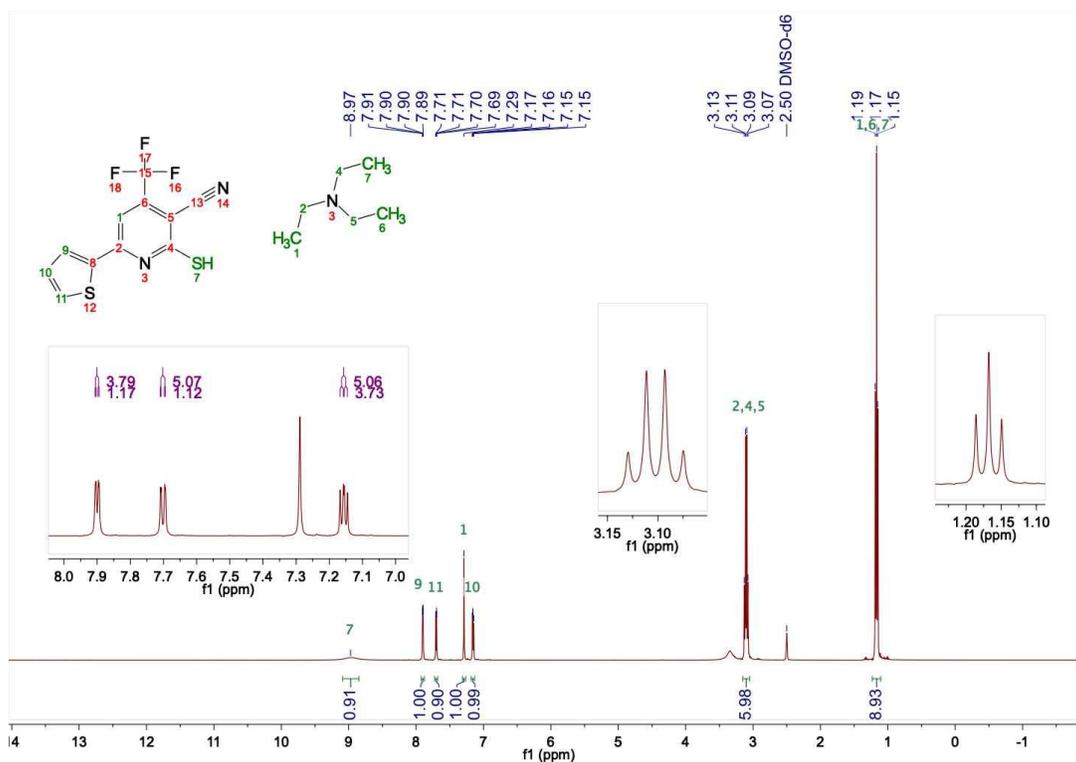
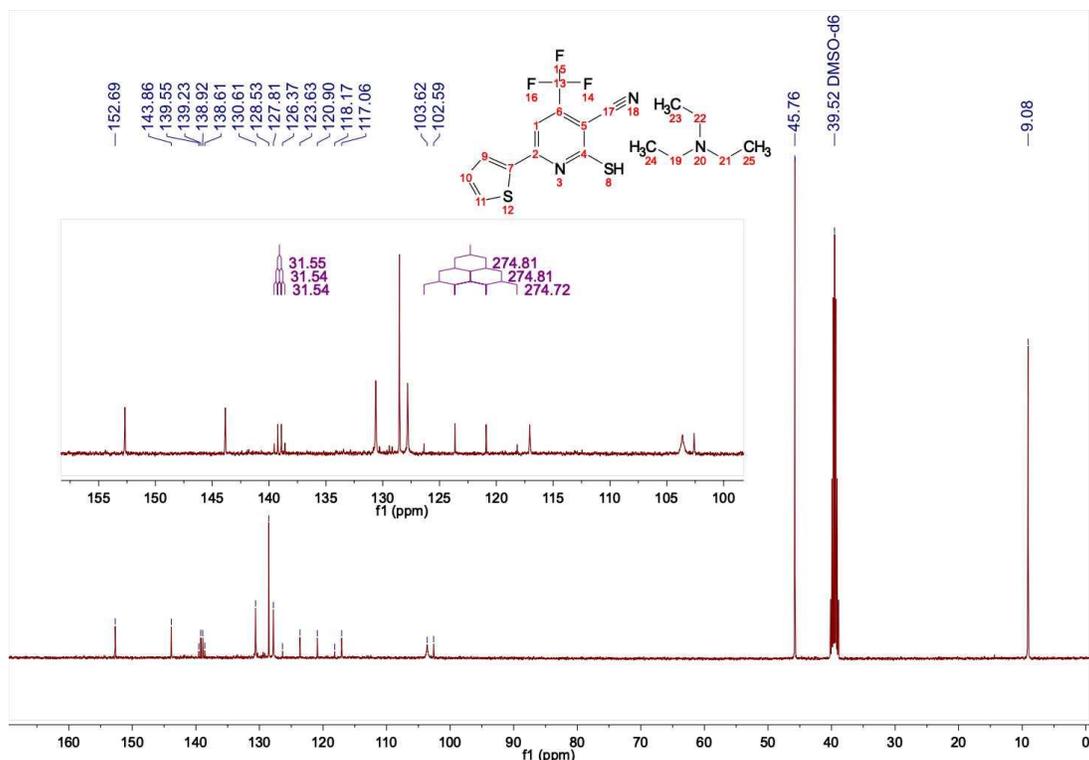
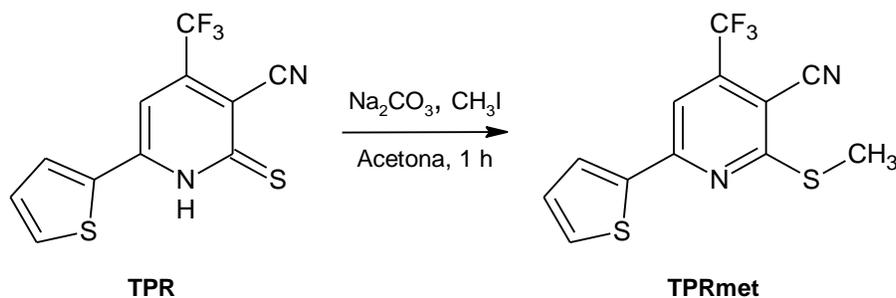


Figura 33. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del 2-Mercapto-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)niconitrilo (TPR).



**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del 2-Mercapto-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)niconitrilo (TPR).

Para poder tener un espectro que confirmara la identidad de este producto libre de la trietilamina, se decidió obtener uno de sus dos tautómeros metilando la tiona en medio básico (Esquema 17). Esto nos permitió obtener el 2-(metilsulfanil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)piridina-3-carbonitrilo (TPRmet) cuyos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en las Figuras 35 y 36, confirmando la identidad del producto obtenido. En estos espectros se mantienen las señales descritas para el tiofeno y la piridina, pero aparece en 2.69 ppm en  $^1\text{H}$  y en 13.2 ppm en  $^{13}\text{C}$ , la señal correspondiente al metilo unido a azufre.



**Esquema 17.** Metilación de TPR.

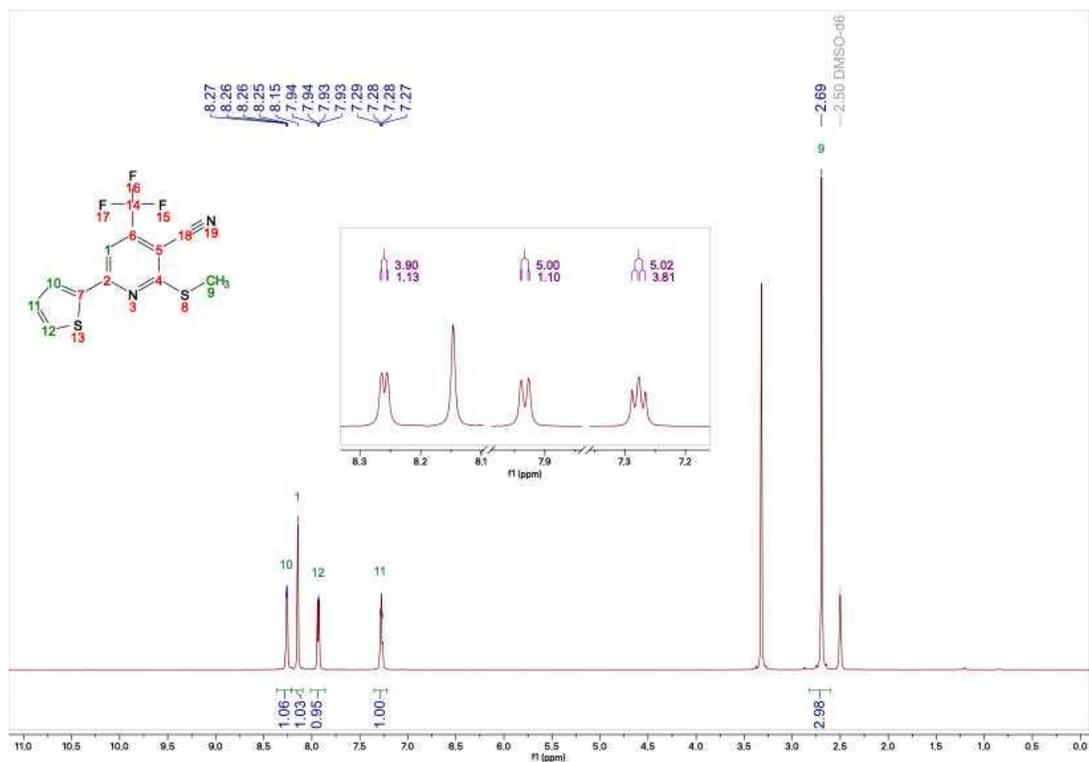


Figura 35. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del 2-(Metilsulfanil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)piridina-3-carbonitrilo (TPRmet).

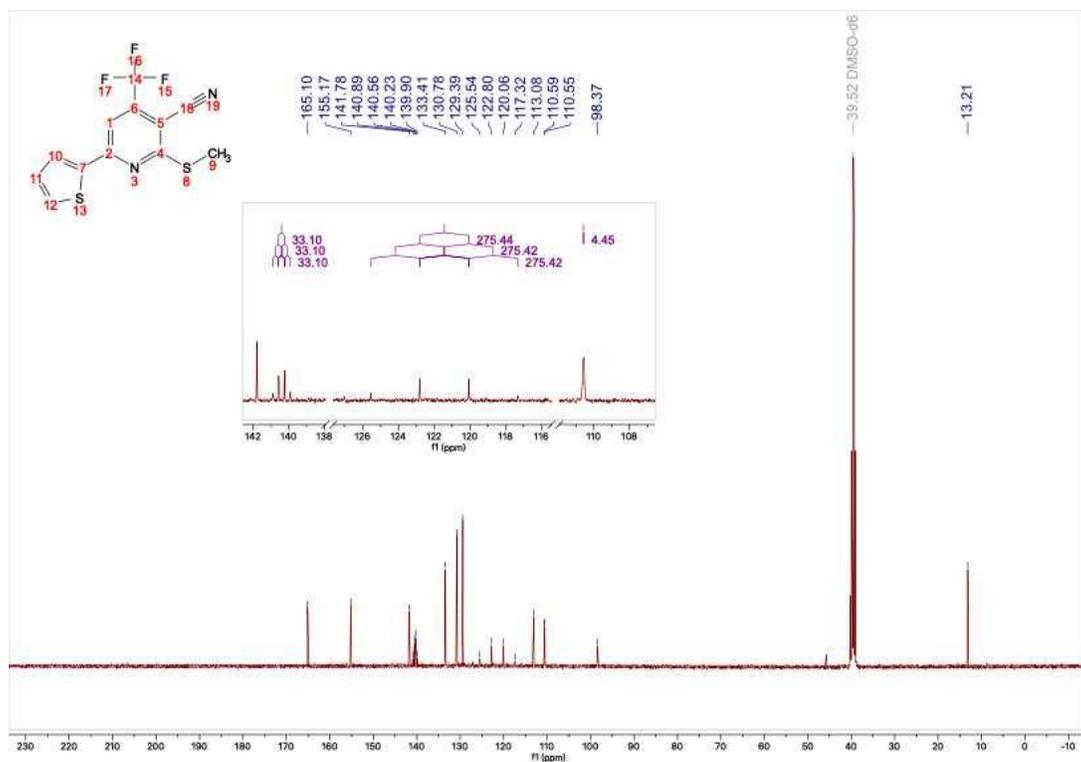
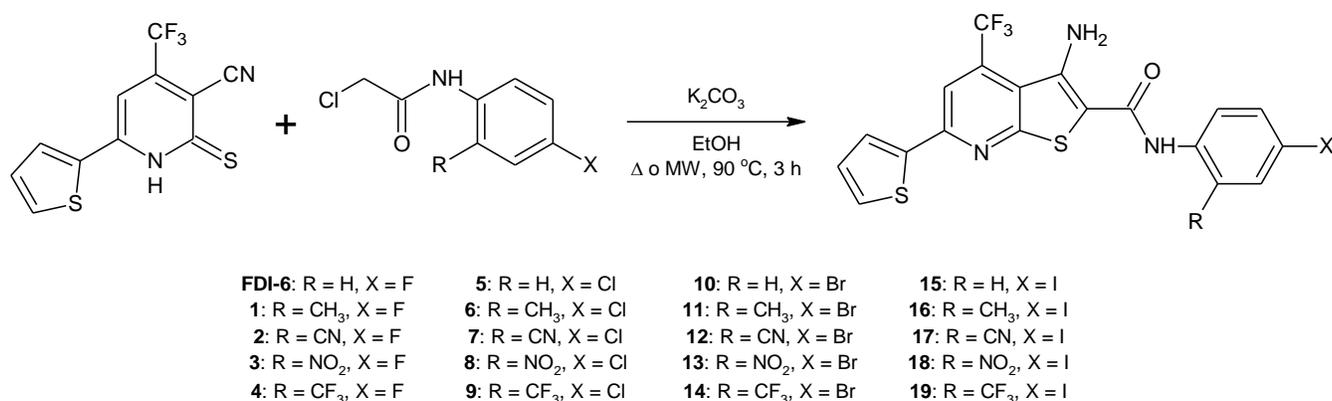


Figura 36. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del 2-(Metilsulfanil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)piridina-3-carbonitrilo (TPRmet).

**7.1.4. Síntesis de los derivados de FDI-6**

Los formación de los compuestos tipo 3-amino-*N*-fenil-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**FDI-6**, **1–19**) se llevó a cabo a partir de las 2-cloro-*N*-fenilacetamidas (**CFDI-6**, **C1–C19**) y del intermediario **TPR** previamente sintetizados, en medio básico (Esquema 18).



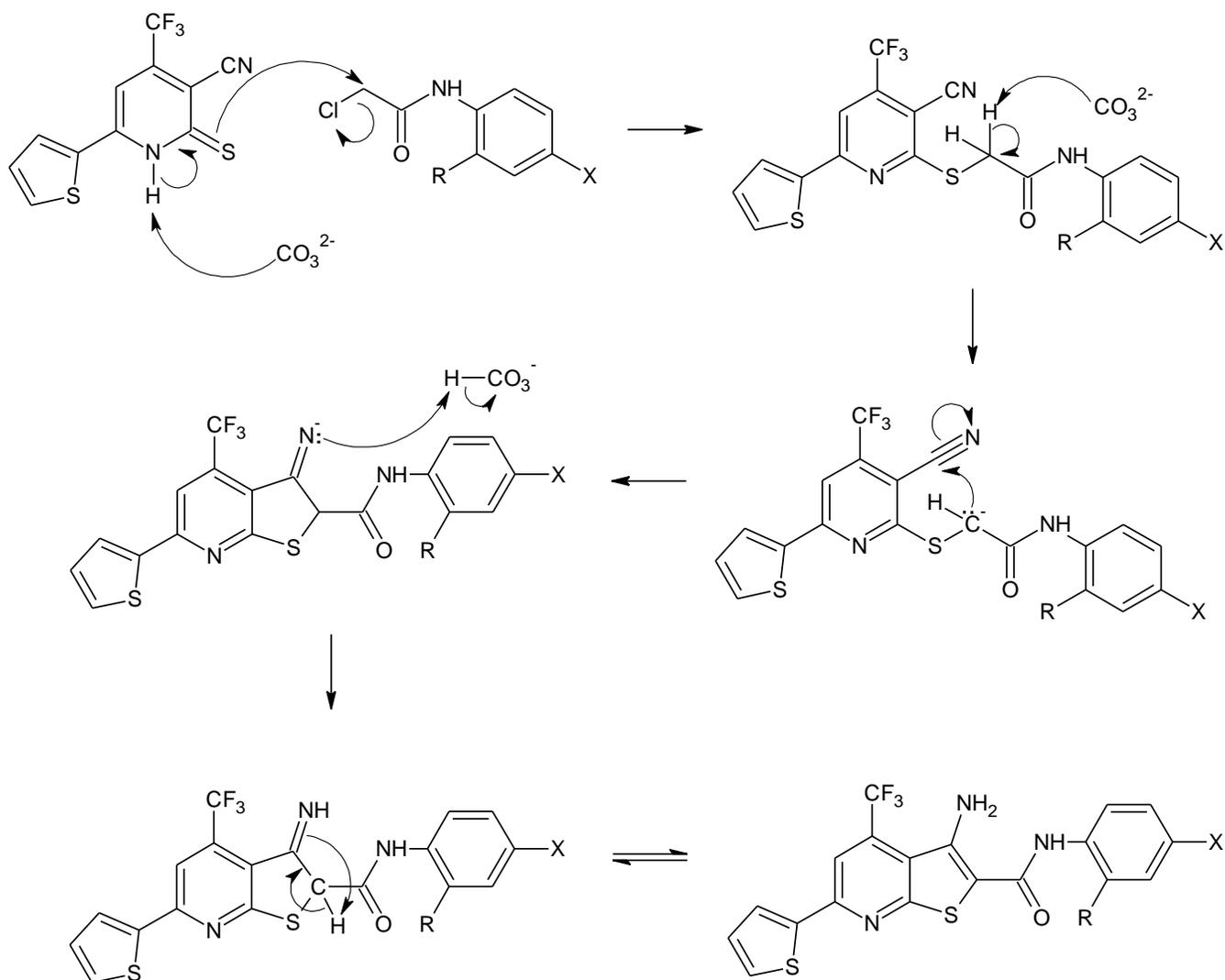
**Esquema 18.** Síntesis de los derivados de FDI-6.

Al ser el único producto posible, y debido a la obtención de un heterociclo aromático estable, estas reacciones siempre procedieron con buenos rendimientos, precipitando el producto en la reacción, lo que hacía que el tratamiento de estas fuera sencillo y que prácticamente en todos los casos una recristalización fuera suficiente para obtener un sólido puro.

Los compuestos sintetizados en el L-122 fueron obtenidos por calentamiento convencional, mientras que en la Universidad de Alberta se prepararon por calentamiento en microondas. No se observa una diferencia entre los métodos, al requerir la reacción prácticamente el mismo tiempo para la conversión total de las materias primas, además el rendimiento y el tratamiento fueron los mismos con ambos métodos.

El mecanismo para esta transformación se encuentra ya reportado (Esquema 19).<sup>35,36</sup> Este comienza por una reacción S<sub>N</sub>2 entre la tiona de la piridina y el metileno de las 2-cloroacetamidas, favorecida por el medio básico, para formar la 2-alkiltio-3-cianopiridina. Como se mencionó en los antecedentes, es necesario que este metileno tenga un grupo electroattractor en posición α, lo cual resulta determinante en el siguiente paso en el que la formación del anión y el ataque de este al nitrilo dependen de la acidez del protón en dicho

carbono. Una vez formado el anillo, la imina tautomeriza para dar la aromaticidad del tiofeno, generando un producto muy estable.

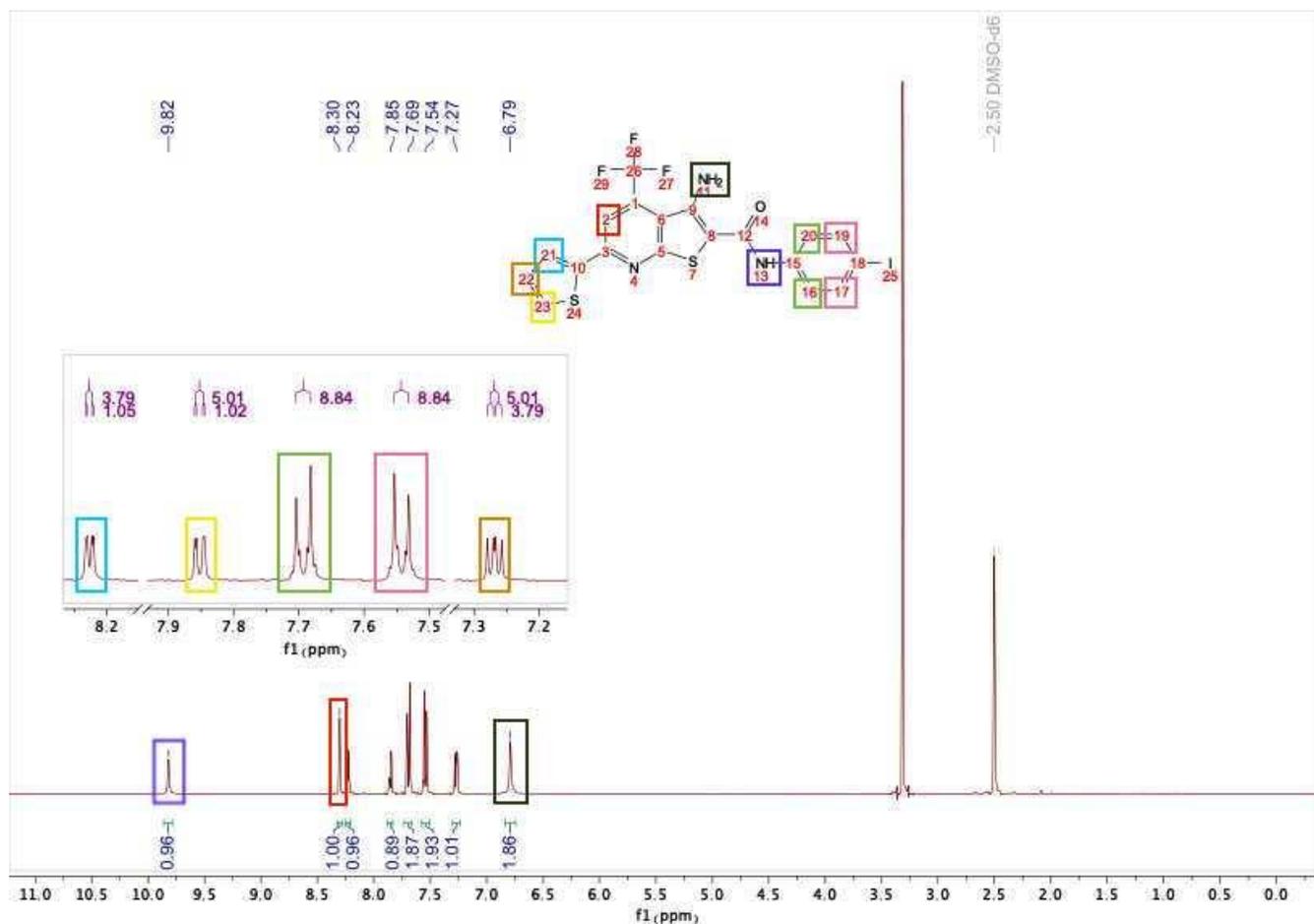


Esquema19. Mecanismo de formación de las Tieno[2,3-*b*]piridinas.

Los compuestos sintetizados en el L-122 se caracterizaron por punto de fusión, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR y EMAR; mientras que los preparados en la Universidad de Alberta por punto de fusión, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y EM. Se puede consultar el punto de fusión, así como las constantes espectroscópicas determinadas para los compuestos finales en el Anexo I, así como los espectros pueden ser consultados en el Anexo III. A manera de ejemplo se muestran y analizan los espectros correspondientes a la 3-amino-*N*-(4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 37) observamos en 9.82 ppm la señal del protón unido al nitrógeno de la amida. En 8.30 ppm está la señal simple de la piridina, mientras que en 8.23, 7.85 y 7.27 ppm se encuentran las señales del anillo de tiofeno, tal cual se observaban en el intermediario **TPR**. En 7.69 y 7.54 ppm se ven las señales dobles con acoplamiento de tipo *orto*, correspondientes a los hidrógenos del fenilo, cada uno integrando para 2H.

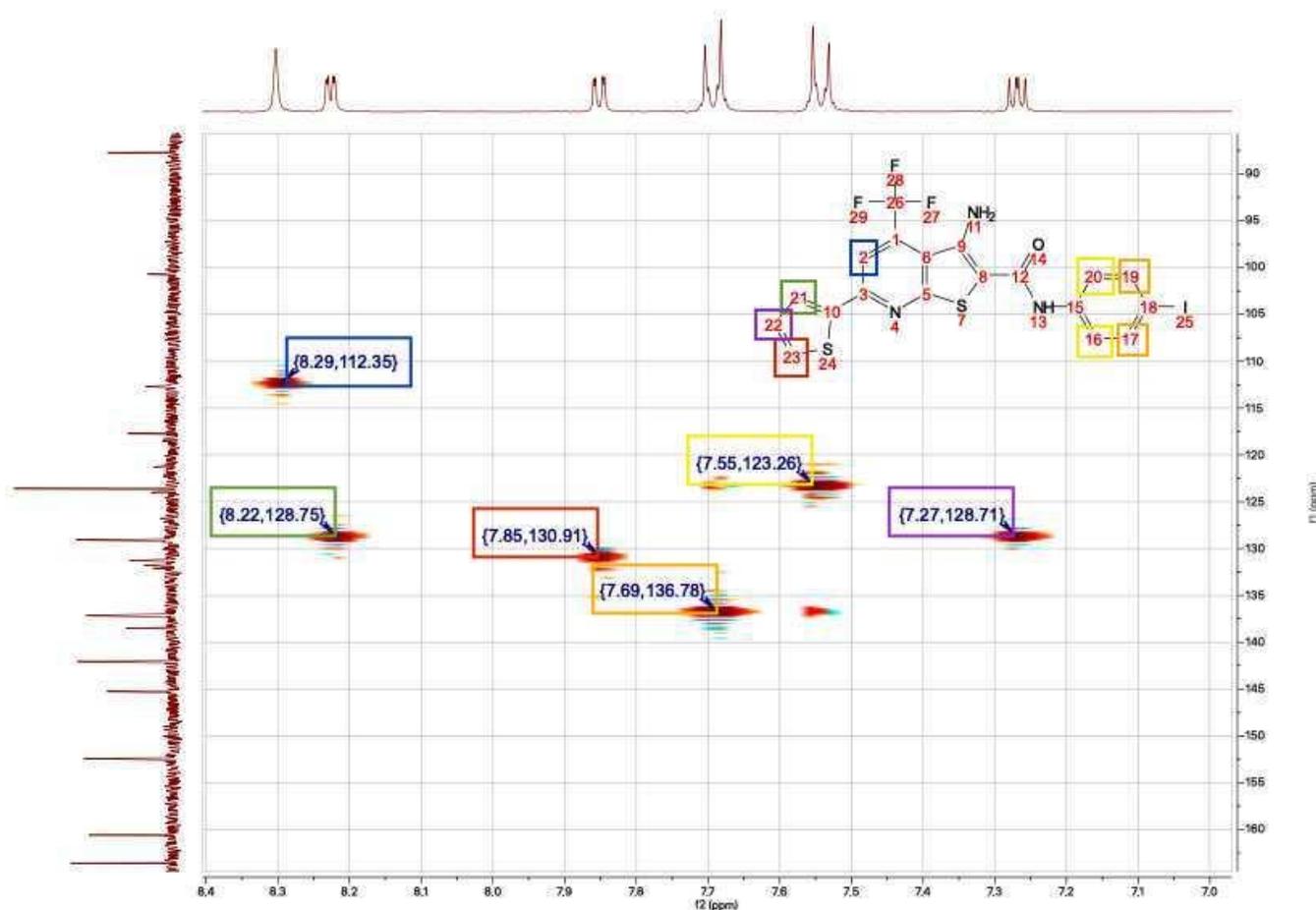


**Figura 37.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-N-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

En la RMN de  $^{13}\text{C}$  observamos los 18 carbonos químicamente diferentes correspondientes al producto esperado en la zona de aromáticos (Figura 40), destacando la del carbono del trifluorometilo (122.6 ppm) y el carbono que lo sostiene en la piridina (131.9 ppm) por los acoplamientos C-F observados de  $J = 274.63$  Hz y  $J = 33.66$  Hz, respectivamente, que coinciden con los valores reportados en la literatura.

Para asignar el resto de las señales del espectro de  $^{13}\text{C}$  se recurrió a espectros 2D. Los espectros HSQC y HMBC resultan de gran utilidad para poder asignar a qué carbono en la molécula pertenece cada señal observada en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , haciendo uso de las asignaciones llevadas a cabo en el espectro de  $^1\text{H}$ . Lo más conveniente resulta empezar con el espectro de HSQC.

El espectro de HSQC (Figura 38) permite observar la correlación entre las señales de un espectro de  $^1\text{H}$  con los átomos de carbono de un espectro de  $^{13}\text{C}$ . Como se puede analizar en la Figura 37, se tiene un total de 6 señales en el espectro, lo que corresponde con la cantidad de carbonos químicamente diferentes presentes en la molécula con hidrógeno unido a ellos.

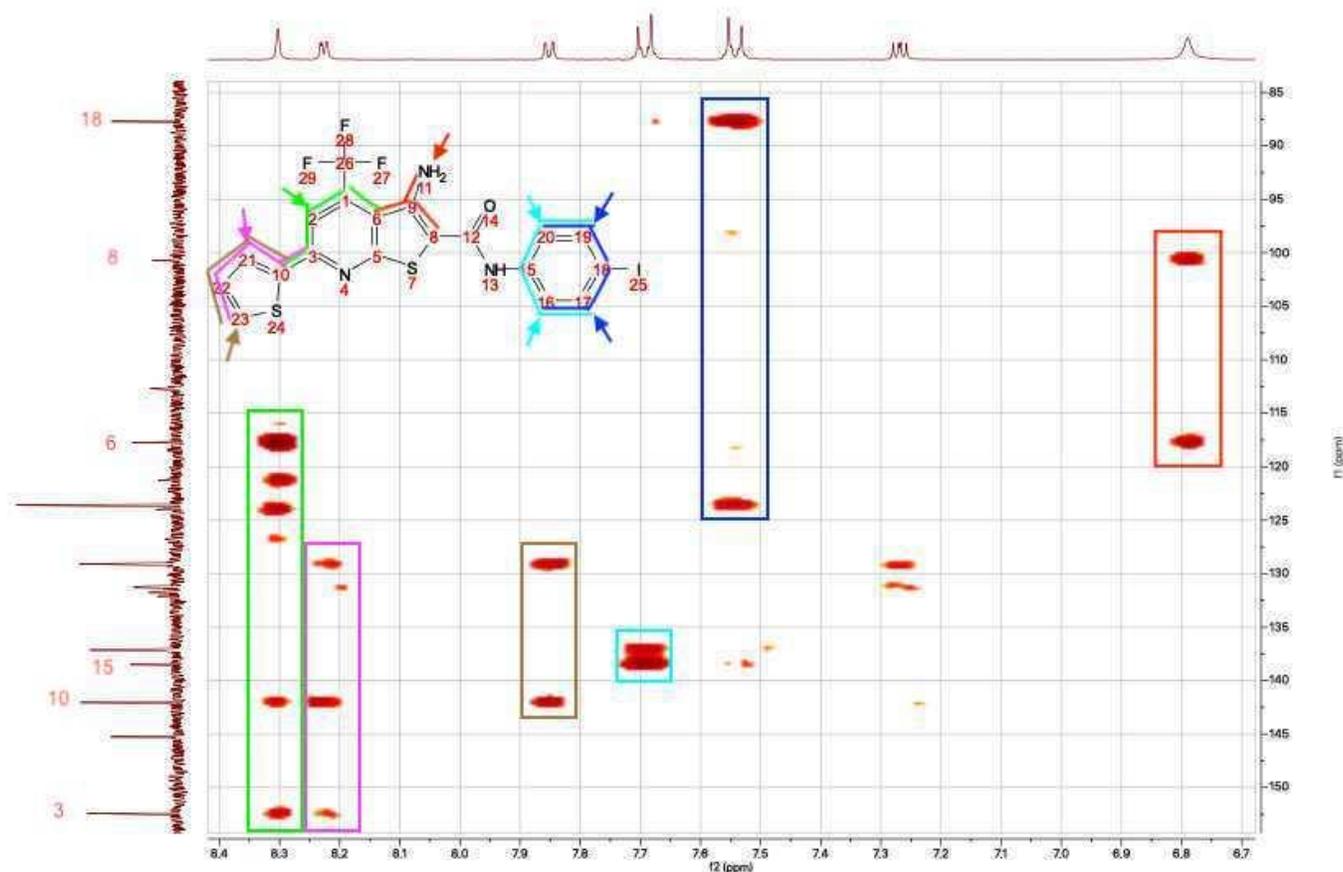


**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm). Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm). Experimento HSQC de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (15).

Para asignar las señales del espectro de  $^{13}\text{C}$  faltantes se utilizó el espectro de HMBC (Figura 39) el cual permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se encuentran

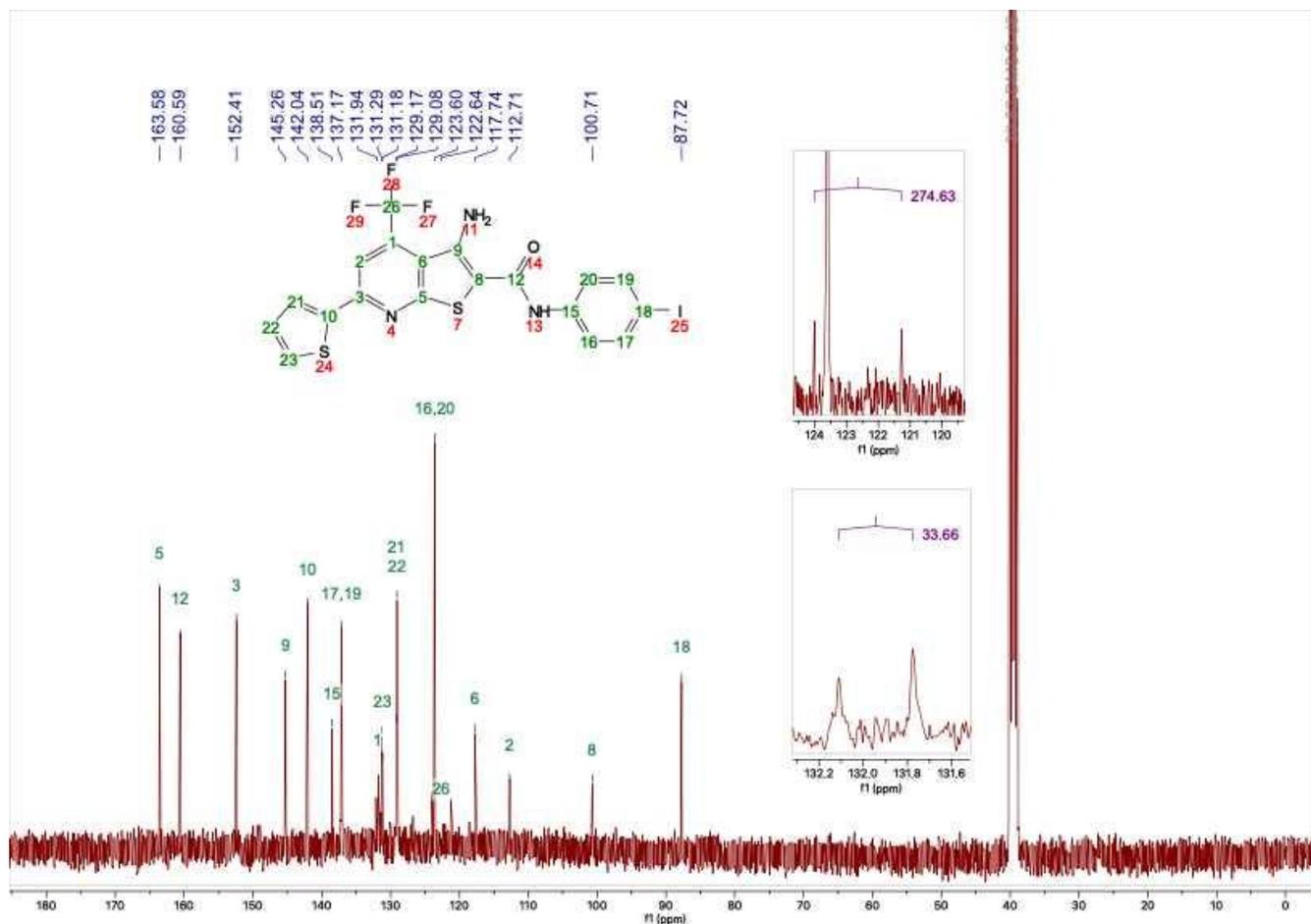
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a dos, tres, y hasta cuatro enlaces de distancia. En la Figura 38 se observa con una flecha de color el átomo al que pertenece esa señal tomando como referencia el  $^1\text{H}$ , mientras que los cuadros que encierran las señales, así como las líneas en la estructura, todas del mismo color, indican las relaciones con el espectro de  $^{13}\text{C}$ . Los números sobre las señales de  $^{13}\text{C}$  indican los carbonos que fue posible asignar con este experimento.



**Figura 39.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm). Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm). Experimento HMBC de la 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

Las señales restantes se asignaron por descarte tomando en cuenta su ambiente electrónico, así como valores previamente reportados, para tomar una decisión correcta. En la Figura 40 se observa el espectro de  $^{13}\text{C}$  con todas las señales asignadas a la molécula.



**Figura 40.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm) de la 3-Amino-6-(tiefen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

En el espectro de IR (Figura 41) como señales características se observan en  $3497$  y  $3313\text{ cm}^{-1}$  las de la vibración N-H de amina primaria, en  $3411\text{ cm}^{-1}$  la del enlace N-H de la amida, en el intervalo entre  $3101$ – $3050\text{ cm}^{-1}$  las de C-H aromático. Para los halógenos en la molécula observamos en  $1236\text{ cm}^{-1}$  la C-F y en  $586\text{ cm}^{-1}$  la C-I. Finalmente el carbonilo de la amida se puede señalar en  $1647\text{ cm}^{-1}$ .

Por último, el espectro de masas de alta resolución (EMAR) (Figura 42) se llevó a cabo por la técnica de *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), la cual es una técnica de baja energía que genera muy poca ionización. Observamos por lo tanto únicamente en  $545.9388$  el  $[\text{M}+\text{H}]^+$  que corresponde a la  $m/z$  esperada de la molécula protonada de  $545.9419$ . Además, observamos en  $m/z$   $326.9887$  el ión correspondiente a la ruptura del enlace amida.

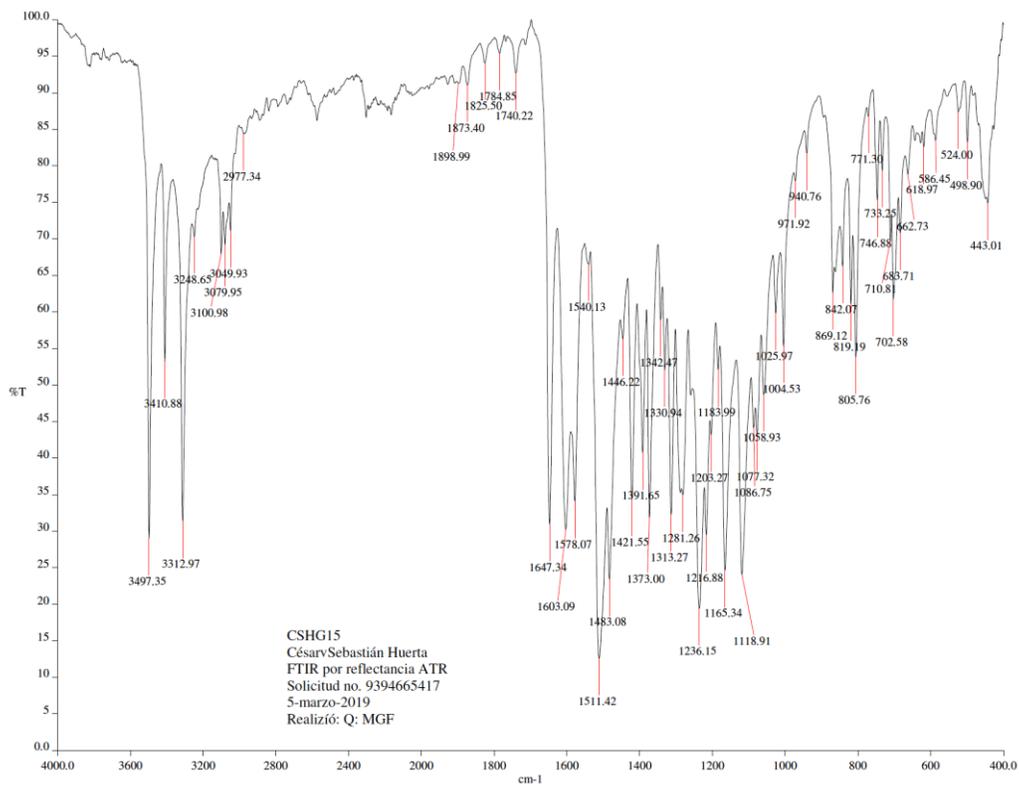


Figura 41. Espectro de IR (FTIR por reflectancia ATR) de la 3-Amino-*N*-(4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

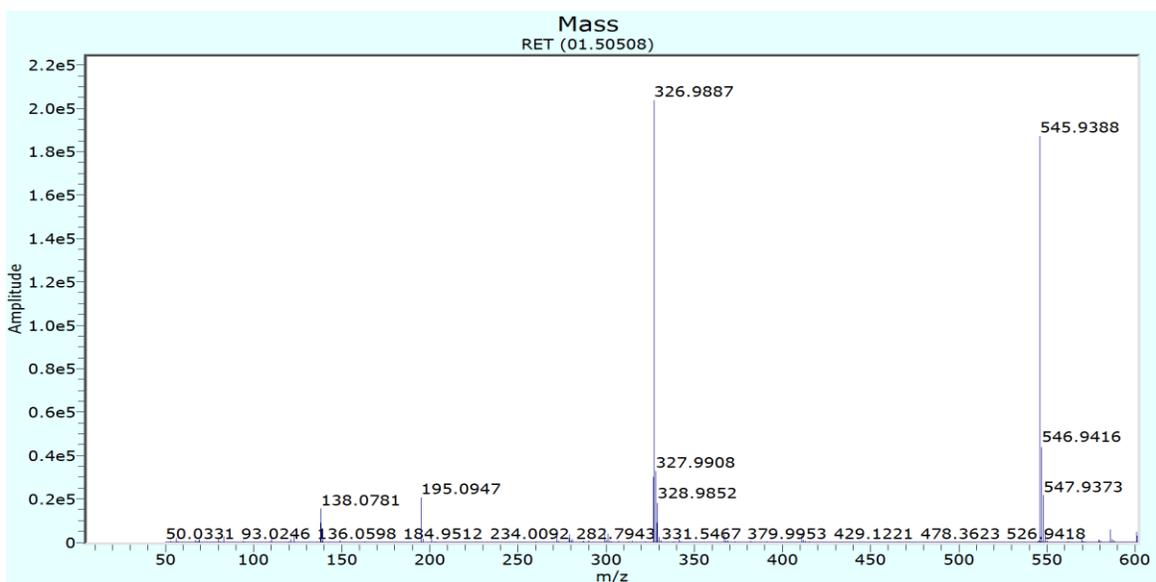


Figura 42. EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z*) de la 3-Amino-*N*-(4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**).

## 7.2. Ensayos biológicos

### 7.2.1. Ensayo de Western Blot

El gen *foxm1* es sujeto a autorregulación positiva debido a que la misma FOXM1 *in vivo* ocupa y transcribe el promotor de *foxm1*. De manera consecuente, la sobreexpresión de FOXM1 exógena se promueve por mRNA de *foxm1* endógeno y la expresión de la proteína. Entonces, la FOXM1 activa su propia expresión en un ciclo de retroalimentación autorregulatoria positivo. Esta autorregulación positiva de FOXM1 significa que un pequeño inicio en la expresión de *foxm1* resultará en un tremendo incremento de los niveles de FOXM1. Por lo tanto, una vez inducida por una señal disparadora, los niveles de expresión de FOXM1 se volverán abundantes. Por esta misma razón, la expresión de *foxm1* es altamente controlada por un vasto número de reguladores, presumiblemente para limitar el súbito resultado de la retroalimentación positiva a condiciones celulares apropiadas, donde un nivel alto de FOXM1 es deseado y no dañino.<sup>24,63</sup>

Tomando en cuenta que la FOXM1 modula su propia actividad transcripcional, se determinó el efecto que los compuestos sintetizados causan en la expresión de esta proteína a través de un análisis por Western Blot. Este ensayo se llevó a cabo considerando que una disminución dependiente del tratamiento en el nivel de proteína de FOXM1 puede ser debido, al menos en parte, a la disociación del complejo FOXM1-ADN causado por el compuesto, lo que sería un indicativo de inhibición transcripcional. Las células de cáncer de mama triple negativo, como las MDA-MB-231, resultan un buen modelo para estudiar a la FOXM1 debido a la demostrada sobreexpresión de la proteína en esta línea.<sup>64</sup>

Se muestran los resultados de este ensayo en la Gráfica 2. En trabajos previos del grupo del Dr. Velázquez ya se había demostrado la equivalencia de actividad entre los derivados 4-halógenados, viendo la importancia de la interacción del halógeno en esa posición con la Arg297 en estudios de acoplamiento molecular.<sup>34</sup> Esto se demostró en estos resultados obteniendo una actividad equivalente entre estos compuestos, todas significativamente diferentes al control negativo (DMSO): **FDI-6, 5, 10 y 15**.

Analizando cada grupo de compuestos con el mismo halógeno, se observa en todos los casos que el derivado no sustituido (**FDI-6, 5, 10 y 15**) y el derivado con sustituyente nitrilo (**2, 7, 12 y 17**) fueron los que presentaron la mejor actividad, siendo únicamente **7 y 17** significativamente

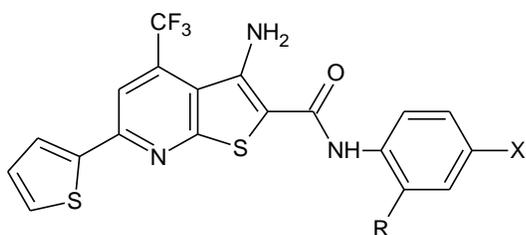
diferentes al control negativo (DMSO) y no presentando diferencia significativa con el control positivo (**FDI-6**). Los compuestos con sustituyente metilo (**1**, **11** y **16**), nitro (**3**, **8**, **13** y **18**) y trifluorometilo (**4**, **9**, **14** y **19**) en todos los casos muestran de muy baja a nula inhibición de la expresión de la FOXM1.

La comparación dentro de los grupos con el mismo R y variando el halógeno, no presenta diferencias significativas, lo que confirma que el tipo de halógeno no modifica la actividad.

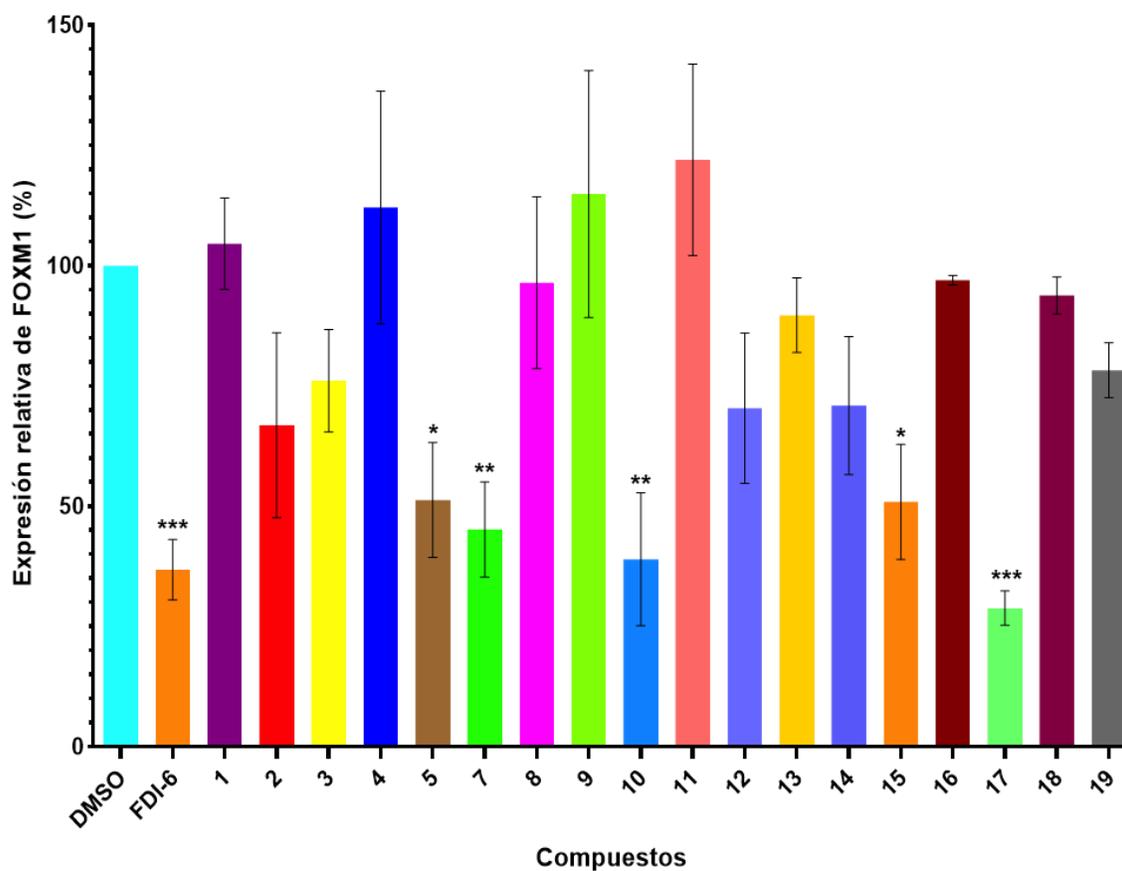
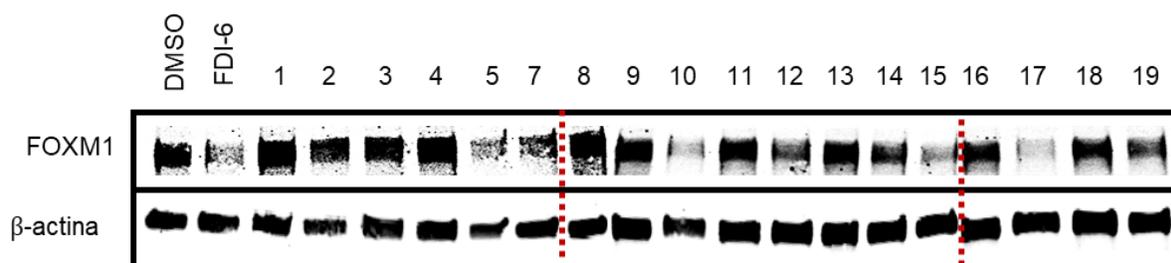
Resulta evidente de estos resultados que, variar la sustitución del anillo definitivamente generó un efecto en la actividad biológica, siendo consistentes los resultados con el patrón de sustitución. Este efecto posiblemente no se debe a una afectación de la densidad electrónica en el anillo pues hay diferencias de actividad significativas entre sustituyentes de tipo electroattractor, siendo uno de este tipo el que genera la mejor actividad y otros las actividades más bajas.

En cuanto a tamaño, los sustituyentes trifluorometilo y metilo se consideran isósteros, coincidiendo en su baja actividad; sin embargo, el nitro y el nitrilo no se encuentran tan alejados de tamaño, y la actividad del nitrilo difiere significativamente.

A partir de estos resultados se seleccionaron los compuestos **7** y **17** para ser estudiados en los ensayos posteriores, así como también se seleccionó el compuesto **1** con el fin de demostrar si la inhibición o falta de inhibición de la FOXM1 observada en el Western Blot se correlaciona con los resultados de los otros análisis.



- |                                       |  |   |  |
|---------------------------------------|--|---|--|
| <b>FDI-6:</b> R = H, X = F            | <b>5:</b> R = H, X = Cl                | <b>10:</b> R = H, X = Br                | <b>15:</b> R = H, X = I                |
| <b>1:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = F | <b>6:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Cl | <b>11:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Br | <b>16:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = I |
| <b>2:</b> R = CN, X = F               | <b>7:</b> R = CN, X = Cl               | <b>12:</b> R = CN, X = Br               | <b>17:</b> R = CN, X = I               |
| <b>3:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = F | <b>8:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Cl | <b>13:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Br | <b>18:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = I |
| <b>4:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = F | <b>9:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Cl | <b>14:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Br | <b>19:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = I |

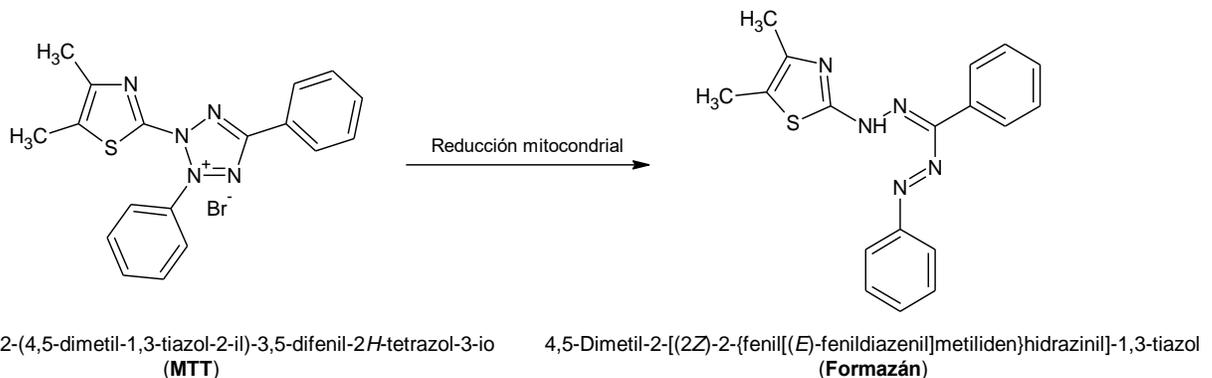


**Gráfica 2.** Expresión relativa de FOXM1 determinada por el ensayo de Western Blot respecto a células no tratadas (DMSO). Los datos fueron normalizados con base a la expresión de  $\beta$ -actina. Diferencia significativa respecto al control negativo (DMSO) indicada por: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . La línea roja punteada indica diferentes membranas.

### 7.2.2. Ensayo de MTT

La viabilidad celular se define frecuentemente como el número de células sanas en una muestra,<sup>65</sup> una propiedad estrechamente relacionada al desarrollo de nuevos fármacos. La viabilidad celular y actividad metabólica puede ser determinada al medir el contenido de NADH y NADPH, ya que estos nucleótidos de piridina son formados en diversas rutas de actividad metabólica. Medir directamente estos agentes reductores es posible, pero los niveles absolutos no son un indicador óptimo de la actividad metabólica, ya que su tasa de regeneración es más importante. La tasa de regeneración puede ser evaluada por la reducción selectiva de ciertos compuestos, como las sales de tetrazolio (MTT, MTS, XTT, o WST).<sup>66</sup>

El ensayo de MTT ha sido ampliamente utilizado en la evaluación del efecto citotóxico de una terapia, este depende de la reducción celular de sales de tetrazolio (MTT) a sus correspondientes cristales de formazán (Esquema 21).<sup>67</sup>



Esquema 19. Reacción de reducción del MTT a formazán.

Debido a sus grupos laterales lipofílicos y la carga neta positiva, el MTT es capaz de atravesar las membranas celulares y es reducido dentro de células viables por enzimas como oxidoreductasas, deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas presentes en la mitocondria y en el plasma celular, usando NADH, NADPH, succinato o piruvatos como donadores electrónicos.<sup>68</sup>

Las sales de tetrazolio en solución son incoloras o muy poco coloridas lo que cambia a una solución fuertemente colorida cuando se forma el producto de formazán. La generación de cristales de formazán en forma de agujas destruye la integridad celular y por lo tanto lleva a la muerte celular. El metabolismo se interrumpe y por lo tanto la reacción de MTT a formazán

también se detiene de manera rápida. Debido a la muerte celular asociada con el alto de la reacción, este tipo de ensayo se le conoce como determinación de punto final.<sup>68</sup>

Dentro de las ventajas del ensayo de MTT se incluyen facilidad y rapidez de ejecución, reproducibilidad de los resultados y relación clínica observada entre las pruebas *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, algunas de las desventajas es que una baja en la concentración del medio de cultivo de D-glucosa, NADH, NADPH puede estar acompañada por un decremento en la producción de MTT-formazán. En células que están entrando a apoptosis, puede haber reducción de MTT en etapas tempranas, ya que la mitocondria permanece intacta, y efectos de los fármacos también pueden resultar en cambios en la actividad de la mitocondria que pueden influenciar los resultados.<sup>67</sup>

A pesar de que diferentes ensayos están demostrando tener otras ventajas con menos pasos, por ejemplo, que no hay necesidad de disolver, etc. MTT se considera un ensayo muy robusto y es metabolizado por el mayor tipo de células, mientras que las nuevas alternativas no son siempre apropiadas.<sup>65</sup>

El valor de concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) indica la concentración de un inhibidor a la que la respuesta biológica es reducida a la mitad,<sup>69</sup> en este caso, la concentración a la que el 50% de las células son viables. Por lo tanto, valores de  $CI_{50}$  mayores hacen referencia a inhibidores menos efectivos que aquellos que presentan valores de  $CI_{50}$  menores.

Haciendo uso del ensayo de MTT se calculó la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) del compuesto líder, **FDI-6**, y de los dos nuevos compuestos con mejor porcentaje de inhibición de la expresión de la FOXM1, **7** y **17**, así como uno de los menos activos, el compuesto **1** (Gráfica 2). Los porcentajes de viabilidad celular se graficaron en relación con la concentración a la que fueron obtenidos y se hizo un ajuste de estos puntos usando un método de regresión no lineal para obtener las  $CI_{50}$  (Gráfica 3).

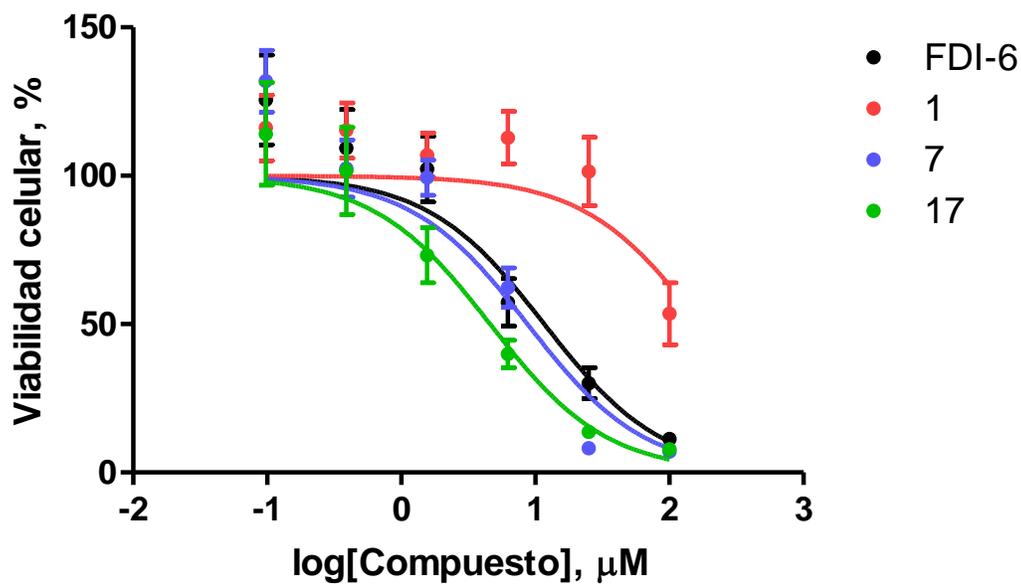
Los resultados (Tabla 5) muestran una correlación con los porcentajes de inhibición determinados en el Western Blot. Por un lado, el compuesto **1**, con un valor de inhibición de la FOXM1 muy bajo, es el compuesto con la  $CI_{50}$  más alta comparado con el compuesto líder **FDI-6**. Por otro lado, los compuestos **7** y **17**, de manera similar al Western Blot, fueron equiparables a la actividad de **FDI-6**. Estos resultados indican que existe una relación entre la expresión de la proteína y la viabilidad celular, lo que podría indicarnos que efectivamente el mecanismo por

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el que estos compuestos ejercen su acción es a través de esta enzima; sin embargo, esto se debe de comprobar con otros estudios.

Tabla 5.  $CI_{50}$  determinada por el ensayo de MTT

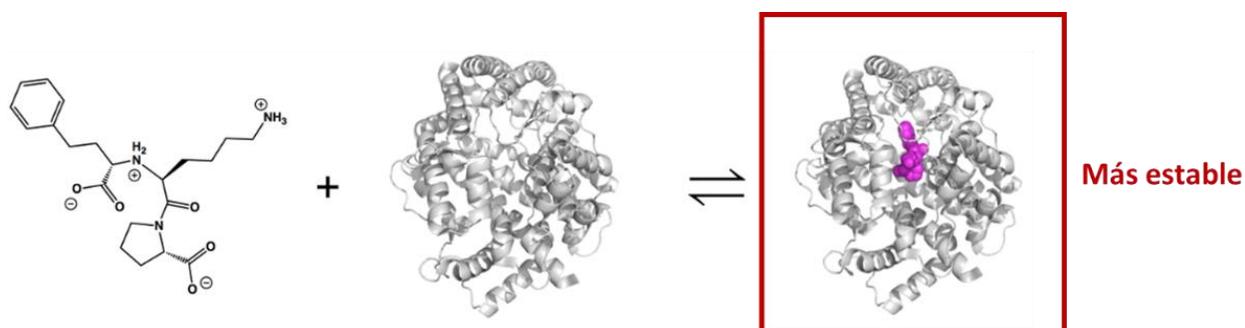
	FDI-6	1	7	17
$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	11.67 $\pm$ 1.36	171.5 $\pm$ 1.49	8.75 $\pm$ 1.27	4.61 $\pm$ 1.34



Gráfica 3. Regresión no lineal para determinar la  $CI_{50}$ .

### 7.2.3. Ensayo CETSA

El ensayo CETSA fue desarrollado para monitorizar y cuantificar la medida en la que un compuesto de interés alcanza y se une directamente a la proteína blanco dentro de la célula de interés.<sup>70</sup> Este ensayo está basado en el principio biofísico bajo el que la estabilidad termodinámica de las proteínas aumenta una vez que estas se unen a un ligando (Figura 43).<sup>71</sup> Una vez que la proteína alcanza su temperatura de desnaturalización, esta forma agregados que precipitan evitando que sea detectada en el sobrenadante de las muestras. La cantidad de proteína se cuantifica a través de Western Blot permitiéndonos obtener una curva de desnaturalización en función de la temperatura. Si el ligando está llegando y está interaccionando con la proteína de interés dentro de la célula, esperaríamos que la temperatura de desnaturalización de esta aumentara y por lo tanto observaríamos un desplazamiento de la curva de desnaturalización.



**Figura 43.** Principio biofísico de estabilización térmica inducida por el ligando.

Este ensayo no se encuentra reportado para la proteína FOXM1, por lo que, lo primero que se tuvo que hacer fue determinar la curva de desnaturalización de la proteína sin ligando en el medio. Después de hacer un barrido de temperaturas de 45 a 69 °C se determinó que la temperatura de desnaturalización de FOXM1 se encuentra alrededor de los 46–48 °C (Gráfica 4). Una vez determinado ese valor se decidió construir la curva en un intervalo de 44–52 °C donde observamos que la proteína efectivamente sigue un comportamiento de desnaturalización dependiente de la temperatura (Gráfica 5).

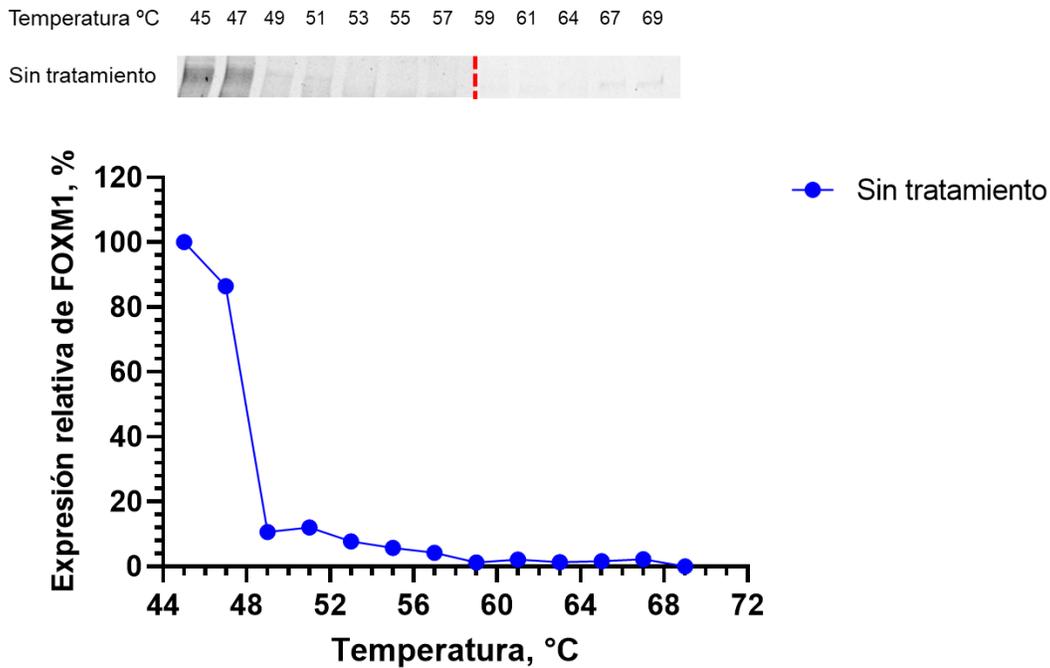
Una vez construida la curva de desnaturalización de la FOXM1, el siguiente paso consistió en encontrar las condiciones de tratamiento bajo las cuales el compuesto de interés interacciona con la enzima lo suficiente para permitir su estabilización termodinámica, pero sin empezar a mostrar un efecto de inhibición. Para lograr observar esto es necesario probar muchas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

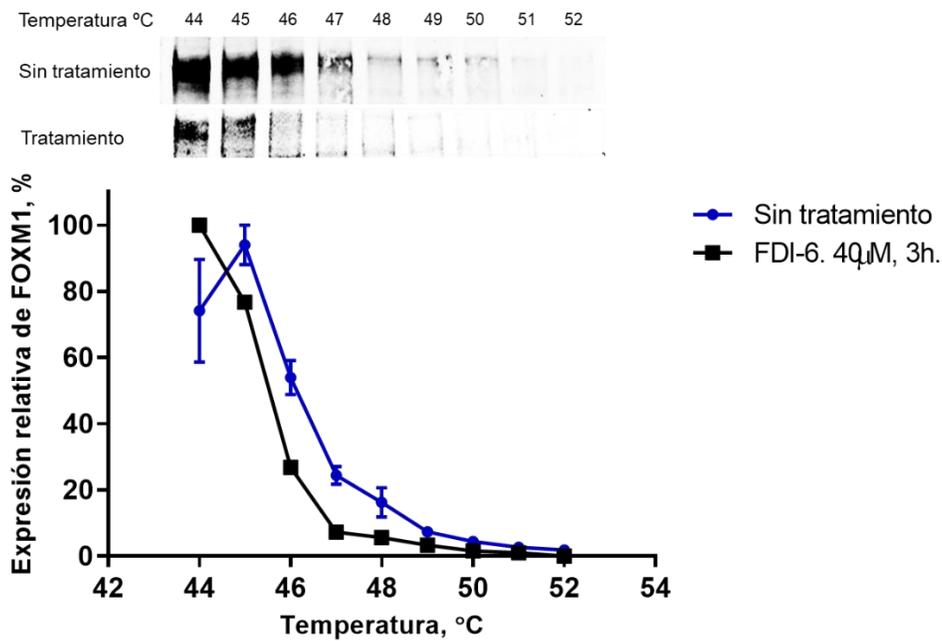
condiciones variando el tiempo de incubación con el ligando, la concentración de ligando, el método de raspado, etc.

Lamentablemente por falta de tiempo solo se pudo probar una condición usando el inhibidor reportado **FDI-6** a 40  $\mu\text{M}$  durante 3 horas y en esta no se observó un desplazamiento respecto a la curva sin tratamiento (Gráfica 5), por lo que será necesario continuar probando condiciones.

Sin embargo, el haber determinado las condiciones adecuadas para observar la desnaturalización de FOXM1 dentro de las células MDA-MB-231 es un gran logro que le permitirá al grupo de investigación del Dr. Velázquez en la Universidad de Alberta evaluar la unión de diferentes compuestos al blanco de interés dentro de un sistema celular completo.



**Gráfica 4.** Estudio del comportamiento de FOXM1 en un intervalo amplio de temperatura. La línea roja punteada indica diferentes membranas.



Gráfica 5. Expresión relativa de FOXM1 a diferentes temperaturas.

**7.3. Estudios *in silico***

**7.3.1. Acoplamiento molecular**

Se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento en dos diferentes programas para tratar de encontrar una relación entre la actividad observada por los compuestos y la manera en la que estos interactúan con el sitio de unión propuesto en la FOXM1, esperando observar, por ejemplo, mejores interacciones ligando-proteína con los compuestos **FDI-6**, **7** y **17** que con el compuesto **1**, el menos activo. Los resultados de energía de unión de ambos programas se observan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Energía de unión para cada ligando en Autodock Vina y Glide

Ligando	Autodock Vina	Glide
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)
FDI-6	-6.1	-3.314
1	-6.2	-3.711
2	-6.3	-3.501
3	-6.3	-3.624
4	-6.2	-3.661
5	-6.1	-3.525
6	-6.1	-3.455
7	-6.1	-3.742
8	-5.9	-3.52
9	-6	-3.885
10	-6.1	-2.791
11	-6.2	-3.507
12	-6.1	-3.768
13	-6.2	-3.213
14	-6	-3.736
15	-6.1	-2.958
16	-6.1	-3.604
17	-6.1	-3.777
18	-6.2	-3.609

19

-5.9

-3.758

En la Tabla 6 no vemos una diferencia de energía que se considere significativamente diferente a otra dentro de los resultados de ninguno de los dos programas, lo que inferiría que todos presentan la misma energía de unión con la proteína, lo cual sabemos que no es real por la actividad biológica observada.

Al no observar diferencia en las energías reportadas, se procedió a analizar las conformaciones obtenidas. En los resultados del módulo Glide de Maestro Schrödinger (Figura 44 y 46) se observó que prácticamente todos los compuestos adoptaron la misma conformación en la zona del tiofeno, de la tienopiridina y de la amida; viendo en las interacciones que el carbonilo de la amida siempre interacciona con la Arg286. Además, la orientación del tiofeno parece irrelevante al no mostrar una interacción clara con algún aminoácido del sitio y por la similitud de las energías de unión observadas.

Por otro lado, el anillo de benceno se orienta en diferentes direcciones para algunos compuestos, quedando los nitrilos siempre expuestos al solvente, mientras que con la mayoría de los otros sustituyentes estos se orientan hacia adentro del sitio. Podríamos considerar que esta diferencia en los nitrilos pueda ser una explicación de su actividad, sin embargo, otros sustituyentes que presentaron muy baja actividad como los metilos o grupos nitro, también adoptaron esta conformación, por lo que no parece ser una explicación de la actividad biológica determinada.

Para el caso de los resultados en Autodock Vina (Figura 45 y 47) se detectó mayor variación en las conformaciones adoptadas, pero tampoco se encuentra una relación con la actividad biológica determinada. Varios de los compuestos se acomodaron bajo la misma conformación de Glide, interaccionando el carbonilo de la amida con la Arg286. Pero muchos otros se desplazaron a otra posición dentro del sitio en donde el carbonilo de la amida interacciona con la Arg297 y es ahora el nitrógeno de la piridina el que interacciona con la Arg286, estando el compuesto invertido respecto a la conformación previamente discutida.

Los sustituyentes R, al igual que en Glide, se encontraron en algunos casos orientados adentro del sitio y en otros expuestos al solvente. Se podría suponer que este desplazamiento en el sitio pueda ser clave para explicar la actividad, pero, así como en las diferencias divisadas en Glide,

dentro de estas conformaciones hay tanto compuestos que no fueron nada activos como otros de los más activos, lo que no nos permite obtener una relación entre el acoplamiento molecular y la actividad.

La falta de relación entre los resultados de los programas usados, y entre cada uno de los programas y la actividad biológica, podría deberse a alguna interacción de los compuestos con el sitio de unión que no podemos observar en el estudio de acoplamiento molecular, por lo que este modelo no es apropiado. Por otro lado, existe la posibilidad de que estemos proponiendo un sitio de unión incorrecto y que las moléculas estén ejerciendo su actividad a través de otro sitio de la enzima en el que también se evita su unión a ADN, quizá evitando la formación del dímero, o actuando directamente sobre el ADN.

Sería conveniente estudiar otros modelos que nos permitan obtener más información, como una dinámica molecular que nos permitiría ver el tiempo de residencia de los compuestos en el sitio, u otros como QSAR-3D o CoMFA.

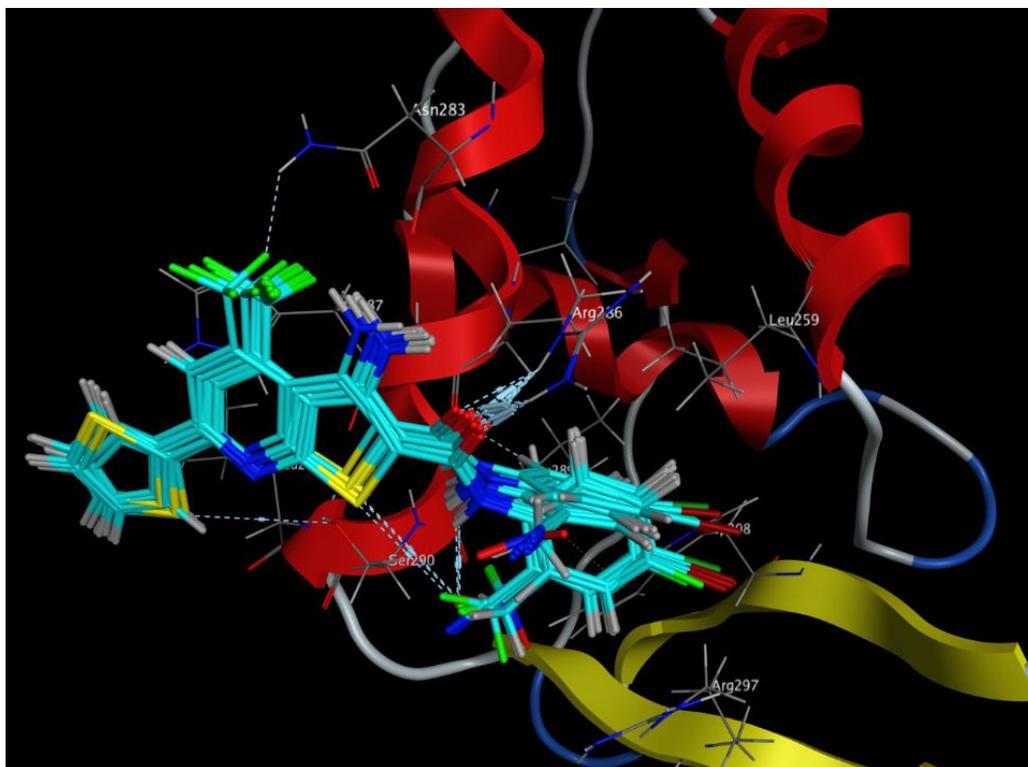


Figura 44. Conformaciones superpuestas de los 20 compuestos obtenidas de *docking* en Glide.

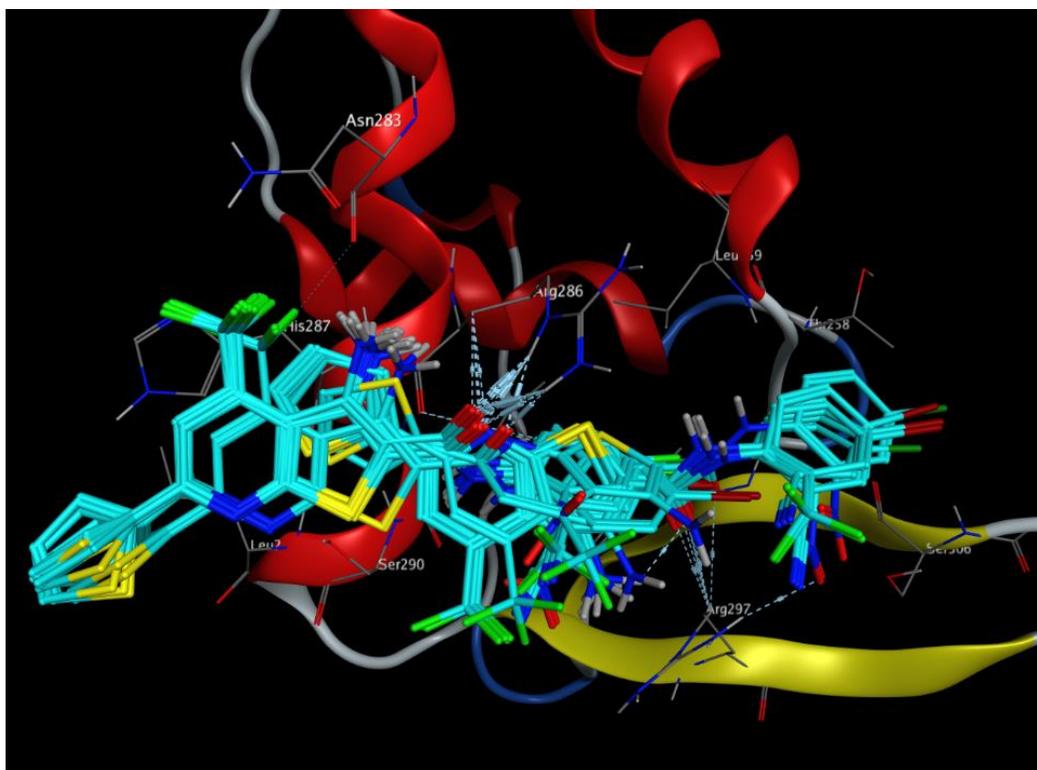


Figura 45. Conformaciones superpuestas de los 20 compuestos obtenidas de *docking* en Vina.

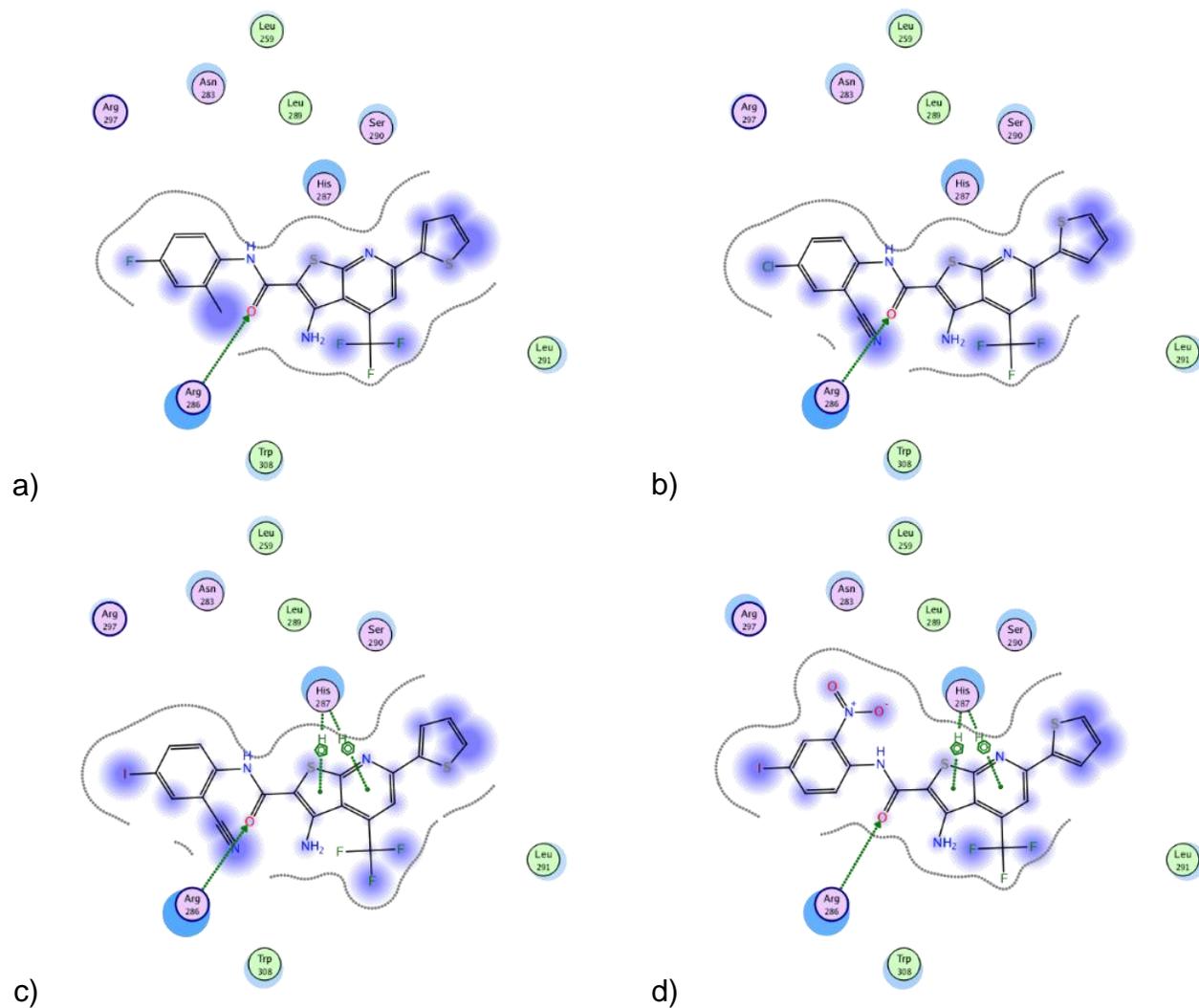


Figura 46. Diagramas de interacciones de algunos de los resultados obtenidos en Glide. a) 1, b) 7, c) 17, d) 18.

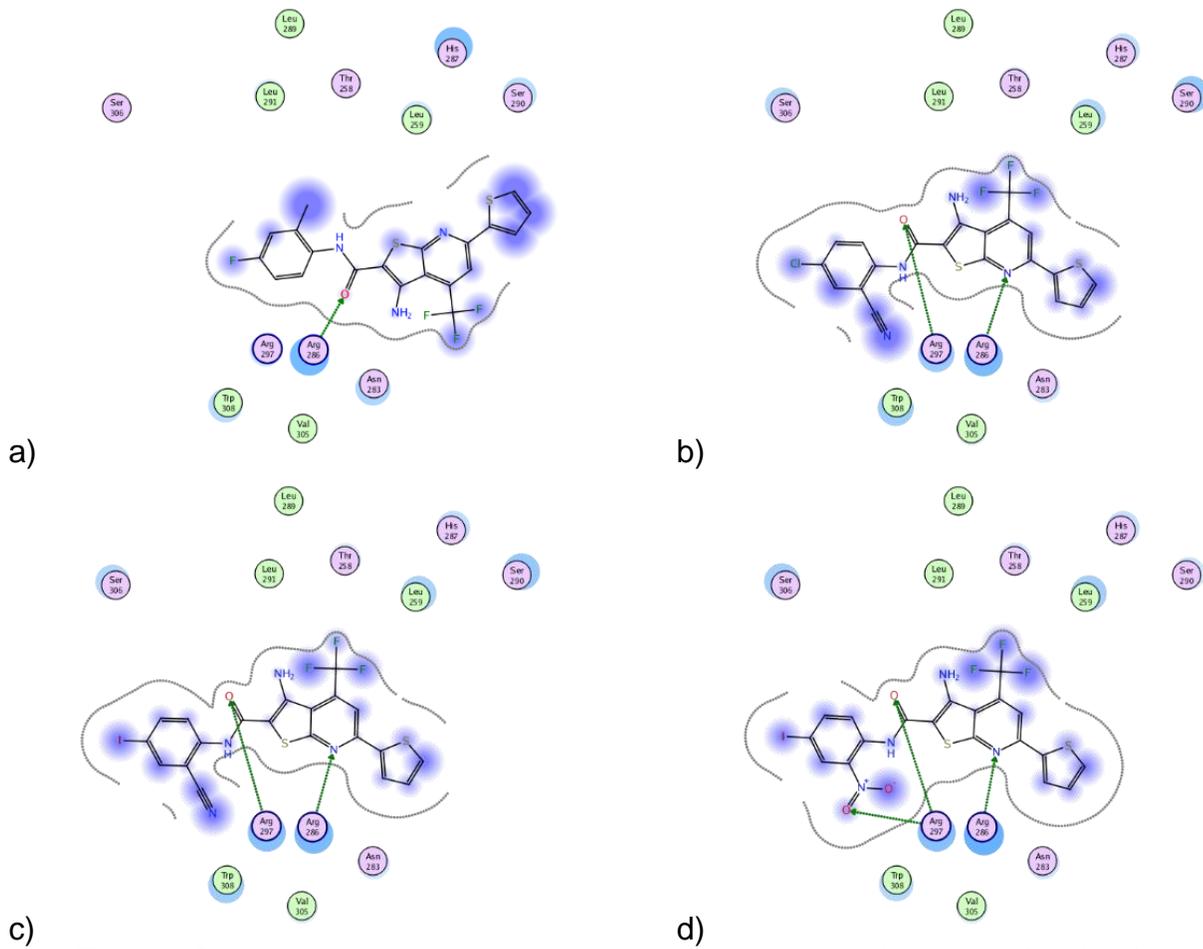


Figura 47. Diagramas de interacciones de algunos de los resultados obtenidos en Vina. a) 1, b) 7, c) 17, d) 18.



## 8. CONCLUSIONES

- Se implementó la metodología de síntesis de los intermediarios de tipo 2-cloro-*N*-fenilacetamida (**CFDI-6, C1–C19**) y 2-tioxo-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**).
- Los 19 compuestos, diseñados como inhibidores de la FOXM1, de tipo 3-amino-*N*-fenil-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**FDI-6, 1–19**) con sustituyentes en posición 2 y 4 del fenilo de la carboxamida, se sintetizaron exitosamente por un método convergente a partir de los intermediarios preparados.
- Se observó una disminución considerable en la expresión de FOXM1 para el caso de los compuestos nuevos con sustituyente nitrilo en posición 2 del fenilo de la carboxamida, destacando **7** y **17**.
- Existe una relación entre la inhibición en la expresión de FOXM1 y la viabilidad celular determinada por el ensayo de MTT para los compuestos **7** y **17**, lo que sugiere que el mecanismo de acción de los compuestos puede ser por inhibición de este FT.
- Se encontró el rango de temperaturas en las que la FOXM1 se desnaturaliza y se construyó la curva sin tratamiento necesaria para el ensayo de desplazamiento térmico celular. Una vez optimizadas las condiciones de tratamiento, este ensayo promete ser útil para determinar la interacción de los compuestos a la proteína blanco en un sistema celular completo.
- Los estudios de acoplamiento molecular no resultaron ser un modelo apropiado para explicar la actividad biológica observada.



## 9. PERSPECTIVAS

- Terminar la evaluación de **FDI-6** en el ensayo de CETSA y, en caso de que los resultados indiquen un desplazamiento, evaluar los compuestos **7** y **17**.
- Evaluar los compuestos **1**, **7** y **17** con el ensayo *Electromobility Shift Assay* (EMSA) llevado a cabo con el DUA de la FOXM1 y el sitio de unión de ADN.
- Evaluar la capacidad de los compuestos de convertirse a su análogo radioactivo y de funcionar como radiomarcadores en estudios PET.
- Llevar a cabo un ensayo de dinámica molecular entre uno de los compuestos activos y uno de los inactivos con la FOXM1 para comprobar si existe diferencia en el tiempo de residencia en el sitio, o en alguna interacción que pudiera explicar su actividad biológica.
- Evaluar los compuestos **1**, **7** y **17** en una línea celular sana.



**10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (2) World Health Organization. Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (consultado Nov 24, 2019).
- (3) American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures, 4ª Edición. American Cancer Society: Atlanta 2018.
- (4) Gutiérrez-Delgado, C.; Armas-Texta, D.; Reynoso-Noverón, N.; Meneses-García, A.; Mohar-Betancourt, A. Estimating the Indirect Costs Associated with the Expected Number of Cancer Cases in Mexico by 2020. *Salud Publica Mex.* **2016**, *58* (2), 228–236. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7792>.
- (5) Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2ª Edición; Elsevier Science: Amsterdam, Países Bajos, 2015.
- (6) National Cancer Institute. What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (consultado May 12, 2019).
- (7) *Cancer Medicine*, 5ª Edición; Bast, R., Kuff, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Hollad, J., Frei, E., Eds.; B.C. Decker Inc.: Ontario, Canadá, 2000.
- (8) Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (9), 2097–2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>.
- (9) National Cancer Institute. Treatment for Cancer <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment> (consultado Dic 23, 2019).
- (10) Patrick, G. L. *An Introduction To Medicinal Chemistry*, 6ª Edición; Oxford University Press: Oxford, Reino Unido, 2017.
- (11) National Cancer Institute. Types of Cancer Treatment <https://www.cancer.gov/about->

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- cancer/treatment/types (consultado Dic 23, 2019).
- (12) National Cancer Institute. Targeted Therapy for Cancer <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies> (consultado Dic 25, 2019).
- (13) Sawyers, C. Targeted Cancer Therapy. *Nature* **2004**, 432 (7015), 294–297. <https://doi.org/10.1038/nature03095>.
- (14) Ross, J. S. Targeted Therapies for Cancer. In *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*; Elsevier: Oxford, United Kingdom, 2010; pp 532–547. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374934-5.00042-8>.
- (15) Redell, M. S.; Tweardy, D. J. Targeting Transcription Factors in Cancer: Challenges and Evolving Strategies. *Drug Discov. Today Technol.* **2006**, 3 (3), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2006.09.010>.
- (16) Hagenbuchner, J.; Ausserlechner, M. J. Targeting Transcription Factors by Small Compounds—Current Strategies and Future Implications. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, 107, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.006>.
- (17) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 6ª Edición; Garland Science, Taylor & Francis: New York, EUA, 2015.
- (18) Karp, G. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*, 6ª Edición; John Wiley & Sons, Inc: EUA, 2010.
- (19) Nature education. Transcription factor <https://www.nature.com/scitable/definition/transcription-factor-167/> (consultado Ene 1, 2020).
- (20) Papavassiliou, K. A.; Papavassiliou, A. G. Transcription Factor Drug Targets. *J. Cell. Biochem.* **2016**, 117 (12), 2693–2696. <https://doi.org/10.1002/jcb.25605>.
- (21) Koehler, A. N. A Complex Task? Direct Modulation of Transcription Factors with Small Molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14 (3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.022>.
- (22) National Human Genome Research Institute (NHGRI). Cromatina <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cromatina> (consultado May 21, 2020).

- (23) Koo, C.-Y.; Muir, K. W.; Lam, E. W. F. FOXM1: From Cancer Initiation to Progression and Treatment. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2012**, *1819* (1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.09.004>.
- (24) Wierstra, I. The Transcription Factor FOXM1 (Forkhead Box M1). In *Advances in Cancer Research*; 2013, Elsevier, 2013; Vol. 118, pp 97–398. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407173-5.00004-2>.
- (25) Littler, D. R.; Alvarez-Fernandez, M.; Stein, A.; Hibbert, R. G.; Heidebrecht, T.; Aloy, P.; Medema, R. H.; Perrakis, A. Structure of the FoxM1 DNA-Recognition Domain Bound to a Promoter Sequence. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (13), 4527–4538. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq194>.
- (26) Halasi, M.; Gartel, A. L. Targeting FOXM1 in Cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85* (5), 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.013>.
- (27) Wang, Z.; Ahmad, A.; Li, Y.; Banerjee, S.; Kong, D.; Sarkar, F. H. Forkhead Box M1 Transcription Factor: A Novel Target for Cancer Therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36* (2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.11.006>.
- (28) Wierstra, I. FOXM1 (Forkhead Box M1) in Tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2013; Vol. 119, pp 191–419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407190-2.00016-2>.
- (29) Gormally, M. V.; Dexheimer, T. S.; Marsico, G.; Sanders, D. A.; Lowe, C.; Matak-Vinković, D.; Michael, S.; Jadhav, A.; Rai, G.; Maloney, D. J.; et al. Suppression of the FOXM1 Transcriptional Programme via Novel Small Molecule Inhibition. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 5165. <https://doi.org/10.1038/ncomms6165>.
- (30) Bhat, U. G.; Halasi, M.; Gartel, A. L. Thiazole Antibiotics Target FoxM1 and Induce Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS One* **2009**, *4* (5), e5592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005592>.
- (31) O'Regan, R. M.; Nahta, R. Targeting Forkhead Box M1 Transcription Factor in Breast Cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *154* (May), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.05.019>.
- (32) Tabatabaei-Dakhili, S. A.; Aguayo-Ortiz, R.; Domínguez, L.; Velázquez-Martínez, C. A.

- Untying the Knot of Transcription Factor Druggability: Molecular Modeling Study of FOXM1 Inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2018**, *80*, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2018.01.009>.
- (33) Hegde, N. S.; Sanders, D. A.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. The Transcription Factor FOXM1 Is a Cellular Target of the Natural Product Thiostrepton. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (9), 725–731. <https://doi.org/10.1038/nchem.1114>.
- (34) Tabatabaei Dakhili, S. A.; Pérez, D. J.; Gopal, K.; Tabatabaei Dakhili, S. Y.; Ussher, J. R.; Velázquez-Martínez, C. A. A Structure-Activity Relationship Study of Forkhead Domain Inhibitors (FDI): The Importance of Halogen Binding Interactions. *Bioorg. Chem.* **2019**, *93* (August), 103269. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103269>.
- (35) Litvinov, V. P.; Dotsenko, V. V.; Krivokolysko, S. G. Thienopyridines: Synthesis, Properties, and Biological Activity. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, *54* (4), 864–904. <https://doi.org/10.1007/s11172-005-0333-1>.
- (36) Litvinov, V. P.; Dotsenko, V. V.; Krivokolysko, S. G. The Chemistry of Thienopyridines. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; 2007; Vol. 93, pp 117–178. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(06\)93003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(06)93003-7).
- (37) Becker, M. R.; Ewing, W. R.; Davis, R. S.; Pauls, H. W.; Ly, C.; Li, A.; Mason, H. J.; Choi-Sledeski, Y. M.; Spada, A. P.; Chu, V.; et al. Synthesis, SAR and in Vivo Activity of Novel Thienopyridine Sulfonamide Pyrrolidinones as Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (18), 2753–2758. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00466-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00466-7).
- (38) Eurtivong, C.; Reynisdóttir, I.; Kuczma, S.; Furkert, D. P.; Brimble, M. A.; Reynisson, J. Identification of Anticancer Agents Based on the Thieno[2,3-b]Pyridine and 1H-Pyrazole Molecular Scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (16), 3521–3526. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.061>.
- (39) van Rensburg, M.; Leung, E.; Haverkate, N. A.; Eurtivong, C.; Pilkington, L. I.; Reynisson, J.; Barker, D. Synthesis and Antiproliferative Activity of 2-Chlorophenyl Carboxamide Thienopyridines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.009>.
- (40) Eurtivong, C.; Semenov, V.; Semenova, M.; Konyushkin, L.; Atamanenko, O.; Reynisson,

- J.; Kiselyov, A. 3-Amino-Thieno[2,3-b]Pyridines as Microtubule-Destabilising Agents: Molecular Modelling and Biological Evaluation in the Sea Urchin Embryo and Human Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (2), 658–664. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.041>.
- (41) Huynh, T.; Valant, C.; Crosby, I. T.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A.; Capuano, B. Probing Structural Requirements of Positive Allosteric Modulators of the M<sub>4</sub> Muscarinic Receptor. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (20), 8196–8200. <https://doi.org/10.1021/jm401032k>.
- (42) Barker, J. M. The Thienopyridines. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; 1977; Vol. 21, pp 65–118. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60730-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60730-8).
- (43) Katritzky, A. R.; Ramsden, C. A.; Joule, J. A.; Zhdankin, V. V. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, 3<sup>a</sup> Edición.; Elsevier: EUA, 2010.
- (44) Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*, 5<sup>a</sup> Edición.; Wiley: Reino Unido, 2010.
- (45) Salem, M. E.; Ahmed, A. A.; Darweesh, A. F.; Kühn, O.; Elwahy, A. H. M. Synthesis and DFT Calculations of 2-Thioxo-1,2-Dihydropyridine-3-Carbonitrile as Versatile Precursors for Novel Pharmacophoric Hybrid Molecules. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1176*, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.031>.
- (46) Buryi, D. S.; Dotsenko, V. V.; Aksenov, N. A.; Aksenova, I. V.; Krivokolysko, S. G.; Dyadyuchenko, L. V. Synthesis and Properties of 4,6-Dimethyl-5-Pentyl-2-Thioxo-1,2-Dihydropyridine-3-Carbonitrile and 3-Amino-4,6-Dimethyl-5-Pentylthieno[2,3-b]Pyridines. *Russ. J. Gen. Chem.* **2019**, *89* (8), 1575–1585. <https://doi.org/10.1134/S1070363219080061>.
- (47) Abdel-Fattah, A. M.; Shaif, L. M.; Attaby, F. A. Synthesis of Heterocycles via 2-Thioxo-1,2-Dihydropyridine-3-Carbonitrile Derivative. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *183* (10), 2443–2456. <https://doi.org/10.1080/10426500801963905>.
- (48) Abdel-Fattah, A. M.; Elneairy, M. A. A.; Gouda, M. N.; Attaby, F. A. Synthesis, Characterization, and Reactions of Pyridine-3-Carbonitrile Derivatives. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **2008**, *183* (7), 1592–1614. <https://doi.org/10.1080/10426500701693552>.
- (49) Iskra, J.; Stavber, S.; Zupan, M. Nonmetal-Catalyzed Iodination of Arenes with Iodide and

- Hydrogen Peroxide. *Synthesis (Stuttg)*. **2004**, 2004 (11), 1869–1873. <https://doi.org/10.1055/s-2004-829136>.
- (50) Zysman-Colman, E.; Arias, K.; Siegel, J. S. Synthesis of Arylbromides from Arenes and N-Bromosuccinimide (NBS) in Acetonitrile — A Convenient Method for Aromatic Bromination. *Can. J. Chem.* **2009**, 87 (2), 440–447. <https://doi.org/10.1139/V08-176>.
- (51) Wang, N.-Y.; Zuo, W.-Q.; Xu, Y.; Gao, C.; Zeng, X.-X.; Zhang, L.-D.; You, X.-Y.; Peng, C.-T.; Shen, Y.; Yang, S.-Y.; et al. Discovery and Structure–Activity Relationships Study of Novel Thieno[2,3-b]Pyridine Analogues as Hepatitis C Virus Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (6), 1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.075>.
- (52) Maestro | Schrödinger <https://www.schrodinger.com/maestro> (consultado Abr 24, 2020).
- (53) Sanner, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 1999, pp 57–61.
- (54) Spartan Software <http://ww2.wavefun.com/products/spartan.html> (consultado Abr 24, 2020).
- (55) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, 31 (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (56) Ganguly, N.; Barik, S.; Dutta, S. Ecofriendly Iodination of Activated Aromatics and Coumarins Using Potassium Iodide and Ammonium Peroxodisulfate. *Synthesis (Stuttg)*. **2010**, 2010 (09), 1467–1472. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1218698>.
- (57) Takasaki, M.; Motoyama, Y.; Higashi, K.; Yoon, S.-H.; Mochida, I.; Nagashima, H. Chemoselective Hydrogenation of Nitroarenes with Carbon Nanofiber-Supported Platinum and Palladium Nanoparticles. *Org. Lett.* **2008**, 10 (8), 1601–1604. <https://doi.org/10.1021/ol800277a>.
- (58) Rosowsky, A.; Chen, H. A Novel Method of Synthesis of 2,4-Diamino-6-Arylmethylquinazolines Using Palladium(0)-Catalyzed Organozinc Chemistry. *J. Org. Chem.* **2001**, 66 (22), 7522–7526. <https://doi.org/10.1021/jo010536i>.
- (59) Chrétien, J.-M.; Zammattio, F.; Le Grogne, E.; Paris, M.; Cahingt, B.; Montavon, G.;

- Quintard, J.-P. Polymer-Supported Organotin Reagents for Regioselective Halogenation of Aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (7), 2870–2873. <https://doi.org/10.1021/jo0480141>.
- (60) Taylor, E. C.; Borrer, A. L. The Reaction of Nitriles with O-Aminonitriles: A Convenient Synthesis of Fused 4-Aminopyrimidines 1a,B. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (12), 4967–4974. <https://doi.org/10.1021/jo01070a046>.
- (61) Heppolette, R. L.; Miller, J. The S N Mechanism in Aromatic Compounds. V. Halogen Substituents 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (17), 4265–4268. <https://doi.org/10.1021/ja01113a033>.
- (62) Yasuhara, A.; Kasano, A.; Sakamoto, T. Convenient Reduction of Nitrobenzenes to Anilines Using Electrochemically Generated Nickel. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (7), 2301–2303. <https://doi.org/10.1021/jo981935p>.
- (63) Gartel, A. L. Targeting FOXM1 Auto-Regulation in Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16* (2), 185–186. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.987566>.
- (64) Tan, Y.; Wang, Q.; Xie, Y.; Qiao, X.; Zhang, S.; Wang, Y.; Yang, Y.; Zhang, B. Identification of FOXM1 as a Specific Marker for Triple-negative Breast Cancer. *Int. J. Oncol.* **2018**, *54* (1), 87–97. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4598>.
- (65) Stoddart, M. J. Cell Viability Assays: Introduction. In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*; Stoddart, M. J., Ed.; Springer Science, Suiza, 2011; pp 1–8. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_9).
- (66) Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*; Gilbert, D. F., Friedrich, O., Eds.; Springer Science: Erlangen, Alemania, 2017; pp 1–18.
- (67) Winikoff, S. E.; Zeh, H. J.; DeMarco, R.; Lotze, M. T. Cytolytic Assays. In *Measuring Immunity*; Lotze, M. T., Thomson, A., Eds.; Elsevier Academic Press: Pennsylvania, EUA, 2004; pp 343–349.
- (68) Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*; Gilbert, D. F., Friedrich, O., Eds.; Springer Science: Erlangen, Alemania, 2017; pp 1–18.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (69) W. Caldwell, G.; Yan, Z.; Lang, W.; A. Masucci, J. The IC50 Concept Revisited. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (11), 1282–1290. <https://doi.org/10.2174/156802612800672844>.
- (70) Jafari, R.; Almqvist, H.; Axelsson, H.; Ignatushchenko, M.; Lundbäck, T.; Nordlund, P.; Molina, D. M. The Cellular Thermal Shift Assay for Evaluating Drug Target Interactions in Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (9), 2100–2122. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.138>.
- (71) Molina, D. M.; Jafari, R.; Ignatushchenko, M.; Seki, T.; Larsson, E. A.; Dan, C.; Sreekumar, L.; Cao, Y.; Nordlund, P. Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* (80-. ). **2013**, *341* (6141), 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1233606>.
- (72) Xu, J.; Gao, Y.; Li, Z.; Liu, J.; Guo, T.; Zhang, L.; Wang, H.; Zhang, Z.; Guo, K. Chlorotropylium Promoted Conversions of Oximes to Amides and Nitriles. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (3), 311–315. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901537>.
- (73) Morisset, E.; Chardon, A.; Rouden, J.; Blanchet, J. Phenylsilane and Silicon Tetraacetate: Versatile Promoters for Amide Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (3), 388–392. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901660>.

## 11. ANEXO I-SECCIÓN QUÍMICA EXPERIMENTAL

### 11.1. Instrumentación y materiales

- Para llevar a cabo las reacciones, los reactivos usados fueron adquiridos en su mayoría de Sigma-Aldrich, mientras que los disolventes grado químicamente puro de Química Alvi y los grado reactivo analítico de J. T. Baker.
- El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius A210P o bien en una balanza granataria Scientech SL600.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante, se emplearon parrillas automáticas IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura, modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- Para la evaporación de los disolventes se utilizó el rotaevaporador Büchi R-215, provisto de un baño de agua Büchi B-490, acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand MD 4C y un enfriador Thermo IP20 o el rotaevaporador IKA RV 10, provisto de un baño de agua IKA HB 10, acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand MD 4C NT+AK+IK y un enfriador Brinkman IC-30.
- Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Büchi B-540, utilizando capilares de vidrio, y no están corregidos.
- Las reacciones en microondas realizadas en la Universidad de Alberta se llevaron a cabo en un reactor de microondas Biotage Initiator+.
- Las separaciones en columna realizadas en la Universidad de Alberta se llevaron a cabo en el CombiFlash NextGen 100.
- Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM:  
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en espectrómetros Varian modelo VNMRS o MR de 9.4 T equipados con una sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia ( $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ ) ( $^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$ ) o una sonda de Detección Indirecta de dos canales de radiofrecuencia ( $^1\text{H}$ ) ( $^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$ ), respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm, las constantes de acoplamiento  $J$  se reportan en Hertz. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetilsulfóxido, cloroformo y agua de Cambridge

Isotope Laboratories. La simbología empleada es: s=señal simple, d=señal doble, m= señal múltiple, dd= señal doble de dobles.

Los espectros de masas se realizaron en:

La espectrometría de masas se realizó para el caso de la técnica de APCI en un equipo Perkin Elmer AxION® 2 TOF acoplado a un módulo AxION® DSA mediante la técnica de ionización APCI, con temperatura de corona de 280 °C y 3  $\mu$ A usando como gas secante N<sub>2</sub> a 4 L/min en una ventana espectral de 50-3000 u. En lo que respecta a la técnica IE, se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 680 con columna de 30 m y fase DB5 acoplado a un espectrómetro de masas Perkin Elmer Clarus SQ 8 C con 200 °C y 70 eV en la cámara de ionización, con una ventana espectral de 33-500 u.

Los espectros de infrarrojo se determinaron usando un Espectrómetro FT-IR Spectrum 400 Perkin Elmer con un accesorio universal de ATR Perkin Elmer, resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

- Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas en la Universidad de Alberta pertenecen a la Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas:

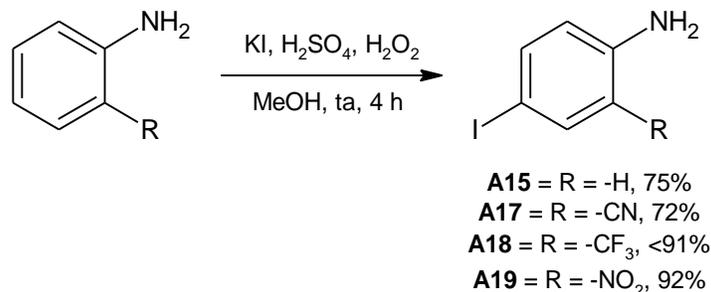
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en un espectrómetro Bruker 600 MHz. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetil sulfóxido de Cambridge Isotope Laboratories y cloroformo de Sigma-Aldrich. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm. Las constantes de acoplamiento *J* se reportan en Hertz. La simbología empleada es: s=señal simple, d=señal doble, t=señal triple, c=señal cuádruple, m=señal múltiple, dd=señal doble de dobles.

Los espectros de masas se hicieron en un sistema Agilent 1260 Infinity HPLC acoplado a masas con modo de ionización ESI y cuadrupolo sencillo como detector de masas.

- Las cromatografías en capa fina (CCF) para seguir el curso de las reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck GF-254. La visualización de los compuestos se realizó con una lámpara UV UVGL-25 Mineralight.
- Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck con una distribución de tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm.

## 11.2. Técnicas para la síntesis de los compuestos

### 11.2.1. Procedimiento general para la síntesis de las 4-Yodoanilinas (A15, A17-A19)



En un matraz bola de 250 mL se agregó MeOH (concentración del disolvente respecto a la anilina, 0.15 M) y una barra de agitación magnética. Bajo agitación vigorosa se adicionaron los reactivos y la materia prima en el orden en el que se mencionan, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5 equiv), KI (0.5 equiv), la anilina correspondiente (1 g, 1 equiv) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución al 30% en agua (2 equiv). La reacción se mantuvo en agitación vigorosa a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Después de 2 horas de reacción, se agregó el KI restante (0.5 equiv) y se mantuvo otras dos horas en agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Una vez pasado el tiempo, la reacción se monitorizó por CCF usando el sistema apropiado comparándolo con la materia prima anilina correspondiente (Se puede usar la muestra directamente tomada de la reacción) (Tener cuidado ya que el producto esperado suele tener un R<sub>f</sub> muy parecido a la materia prima), si aún se observaba presencia de materia prima era necesario agregar más KI hasta observar el consumo total de la misma.

Una vez terminada la reacción, esta se vertió en 50 mL de CHCl<sub>3</sub> y se extrajo usando 50 mL de una solución 1 M de NaHSO<sub>3</sub>. La fase acuosa resultante se lavó con CHCl<sub>3</sub> (2 x 20 mL). El agua presente en la fase orgánica fue retirada usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente fue eliminado por destilación a presión reducida.

De ser necesario, el producto crudo se purificó por cromatografía en columna usando CHCl<sub>3</sub> como fase móvil.

- **4-Yodoanilina (A15)**

Producto obtenido como un sólido gris.

**Rendimiento = 75%**

**Pf = 62.3–62.6 °C**

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3403 y 3297 (**v<sub>N-H</sub>**), 3060 (**v<sub>Ar-H</sub>**), 670 y 583 (**v<sub>C-I</sub>**).

- **2-Amino-5-yodobenzonitrilo (A17)**

Producto obtenido como un sólido gris claro.

**Rendimiento = 72%**

**Pf = 83.1–84.5 °C**

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.68 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.24 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3454 y 3355 (**v<sub>N-H</sub>**), 3055 (**v<sub>Ar-H</sub>**), 2222 (**v<sub>C=N</sub>**), 819 y 495 (**v<sub>C-I</sub>**).

- **2-Nitro-4-yodoanilina (A18)**

Producto obtenido como un sólido naranja.

**Rendimiento = 92%**

**Pf = 120.7–122.2 °C**

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.42 (s, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.8, 2.1, 0.7 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.66 (s ancho, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3491 y 3378 (**v<sub>N-H</sub>**), 3061 (**v<sub>Ar-H</sub>**), 1490 (**v<sub>C-NO2</sub>**), 618 y 517 (**v<sub>C-I</sub>**).

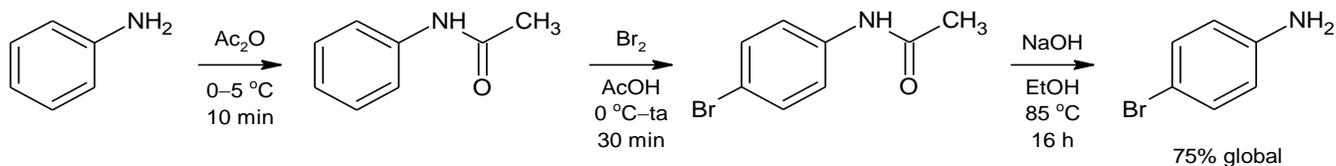
- **2-(Trifluorometil)-4-yodoanilina (A19)**

El producto es un líquido ámbar que da una sola mancha en la CCF. No se hace más purificación.

**Rendimiento = 91% crudo**

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 7.69 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (ddd, *J* = 8.5, 2.1, 0.8 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

### 11.2.2. 4-Bromoanilina (A10)



A un matraz bola de 100 mL con agitador magnético se vertió una solución de anilina (1 g, 10.738 mmol, 1 equiv) en AcOEt (20 mL), el cual se colocó en un baño de hielo y se inició la agitación. Posteriormente, se adicionó anhídrido acético (1.2 equiv). Transcurridos 10 minutos se realizó una CCF en un sistema Hex/AcOEt 90:10 en donde no se observaba la presencia de materia prima en la mezcla de reacción.

La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación con ayuda de AcOEt y se agregó agua para hacer una extracción. Se colectó el AcOEt, se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por destilación a presión reducida, el sólido obtenido se secó por succión a vacío.

El producto obtenido de la primera reacción (905 mg, 6.700 mmol, 1 equiv) se transfirió a un matraz bola de 100 mL donde se le adicionó AcOH (10 mL), un agitador magnético y se colocó en un baño de hielo, se inició la agitación. Por otro lado, se preparó una solución de Br<sub>2</sub> (0.343 mL, 6.700 mmol, 1 equiv) en AcOH (3 mL) la cual se transfirió a un embudo de adición que se colocó en el matraz bola. La solución se adicionó a la mezcla de reacción por goteo en un periodo de 15 minutos siempre manteniéndola en el baño de hielo, una vez acabada la adición se retiró del baño de hielo y se dejó agitar por 15 minutos más. Pasado este tiempo se observó la formación de un sólido amarillo.

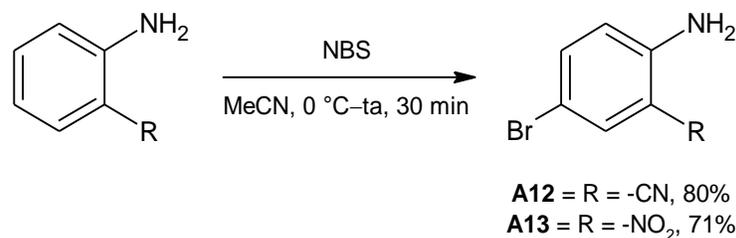
La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo para después separar el sólido obtenido por filtración a vacío obteniéndose un sólido blanco al cual se le realizó una CCF en un sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 descartando así la presencia materia prima o de impurezas.

Todo el producto obtenido se depositó en un matraz bola de 50 mL junto con MeOH (25 mL), al cual se le adicionó NaOH (536 mg, 13.4 mmol, 2 equiv) disueltos en la menor cantidad de agua, al matraz le fue adaptado un condensador y atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se sumergió en un baño de aceite a 60 °C y se inició la agitación. Transcurridas 2 horas la reacción

se monitorizó mediante CCF en un sistema CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5 con una gota de NH<sub>4</sub>OH, pero la reacción mostró muy poco avance. Se retiró el disolvente a presión reducida y se agregó EtOH (10 mL) y la temperatura se elevó a 85 °C; después de 12 horas bajo estas condiciones se realizó CCF con el mismo sistema de elución y la placa mostraba un avance del 60 % aproximadamente. Se adicionó más NaOH (804 mg, 20.1 mmol, 3 equiv) y después de 2 horas a 85 °C, al realizar nuevamente CCF se comprobó el término de la reacción. La mezcla se vertió en agua con hielo y el sólido formado se colectó por filtración al vacío y se dejó secando con succión al vacío toda la noche. Se obtiene un sólido amarillo. El rendimiento global es del 75%.

- **Pf acetanilida** = 114.3–116.9 °C (Pf reportado = 113.4–114.6 °C)<sup>72</sup>
- **Pf N-(4-bromofenil)acetamida** = 167.3–168.1 °C (Pf reportado = 147–148 °C)<sup>73</sup>
- **Pf 4-bromoanilina** = 59.9–63.2 °C (Pf reportado = 59–61 °C)<sup>62</sup>

### 11.2.3. Procedimiento general para la síntesis de las 4-bromoanilinas (A12–A13)



En un matraz bola de 150 mL con agitador magnético se preparó una solución de la anilina apropiada (1 g, 1 equiv) en acetonitrilo (1 mmol/mL). El matraz se introdujo a un baño de hielo. Por otro lado, se preparó una solución de *N*-bromosuccinimida (1 equiv) en acetonitrilo (1 mmol/mL) y se transfirió a un embudo de adición con igualador de presión. El embudo de adición con la solución se acopló al matraz de reacción y se adicionó la solución a la reacción lentamente por goteo. Una vez acabada la adición se dejó subir la temperatura a la del ambiente y se mantuvo en agitación por 30 minutos. La reacción se monitorizó por CCF hasta observar la desaparición de la materia prima.

La mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo el producto usando acetato de etilo (2 x 20 mL). El acetato de etilo colectado se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró por destilación a presión reducida.

El producto obtenido se disolvió en  $\text{CHCl}_3$  y se filtró por una columna de alúmina. El filtrado obtenido se concentró por destilación a presión reducida. El producto obtenido se recrystalizó por par de disolventes  $\text{CHCl}_3$ :hexano obteniendo

- **2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12)**

Producto obtenido como un sólido amarillo con 80% de rendimiento.

**Pf:** 91.9–93.1 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 7.59 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J = 9.0, 2.4$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.25 (s, 2H, Int  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3467 y 3370 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 3075 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2218 ( $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ), 636 ( $\nu_{\text{C-Br}}$ ).

**EM** (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 196 (Teórico: 196).

- **4-Bromo-2-nitroanilina (A13)**

Producto obtenido como un sólido naranja con 71% de rendimiento.

**Pf** = 107.2–108.1 °C

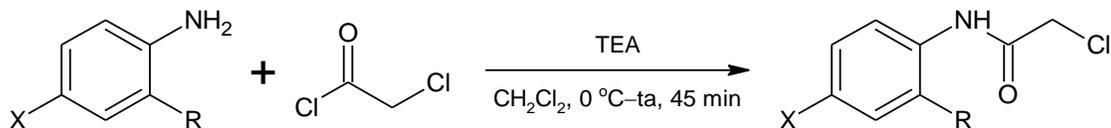
**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 8.06 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.56 (s, 2H, Int  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.52 (dd,  $J = 9.1, 2.4$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3471 y 3345 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 3093.68 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 1496 y 1336 ( $\nu_{\text{C-NO}_2}$ ), 629 ( $\nu_{\text{C-Br}}$ ).

**EM** (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 216 (Teórico: 216).

### 11.2.4. Procedimiento general para la síntesis de las 2-Cloro-*N*-fenilacetamidas (CFDI-6, C1–C20)

- **MÉTODO A: Básico**



**CFDI-6:** R = H, X = F, >95%

**C5:** R = H, X = Cl, >95%

**C10:** R = H, X = Br, >95%

**C15:** R = H, X = I, >95%

**C16:** R = CH<sub>3</sub>, X = I, >95%

En un matraz bola de 50 mL con agitador magnético se adicionó la anilina correspondiente (1 g, 1 equiv) junto con TEA (1.1 equiv) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (concentración del disolvente respecto a anilina, 0.8 M); el matraz bola que contenía la mezcla de reacción se colocó en un baño de hielo y se inició la agitación. Posteriormente se adicionó cloruro de cloroacetilo (1.1 equiv) observando el desprendimiento de gases correspondiente al HCl formado en la reacción. Después de 45 minutos se monitorizó la reacción mediante CCF en un sistema de elución Hex/AcOEt 90:10 con una gota de NH<sub>4</sub>OH (2x); la marca correspondiente a la anilina oxidada presentó una coloración marrón mientras que la marca correspondiente al producto no.

Posteriormente, el disolvente de la mezcla de reacción se concentró por destilación a presión reducida. El residuo se disolvió en 100 mL de AcOEt y se transfirió a un embudo de separación donde se hizo una extracción usando 60 mL de agua. La fase orgánica se colectó, se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por destilación a presión reducida para obtener el producto como un sólido. Los productos se secaron a vacío por un periodo de 12 horas.

- **2-Cloro-*N*-(4-fluorofenil)acetamida (CFDI-6)**

Se obtuvo un sólido plateado con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 132.2–133.0 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.33 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 7.60 (dd, *J* = 9.1, 5.0 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.24 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3274 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3102 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2951 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1666 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 1211 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ), 747 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ).

**EM** (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 197 (Teórico: 197).

- **2-Cloro-N-(4-clorofenil)acetamida (C5)**

Se obtuvo un sólido verde con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 168.6–171.6 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 10.42 (s, 1H, Int  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.62 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 4.25 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3263 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3084 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2954–2858 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1667 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 736 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ).

- **N-(4-Bromofenil)-2-cloroacetamida (C10)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 182.8–184.1 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 10.41 (s, 1H, Int  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.58–7.50 (m, 4H), 4.25 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3263 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3079 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2954 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1667 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 735 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ).

**EM** (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 247 (Teórico: 247).

- **2-Cloro-N-(4-yodofenil)acetamida (C15)**

Se obtuvo un sólido amarillo con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 192.4–194.8 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm): 8.20 (s, 1H, Int  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.66 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 4.18 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3258 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3071 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2946 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1674 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 820 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ), 745 y 499 ( $\nu_{\text{C-I}}$ ).

**EM** (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 295 (Teórico: 295).

• **2-Cloro-N-(2-metil-4-yodofenil)acetamida (C16)**

Se obtuvo un sólido amarillo con rendimiento cuantitativo.

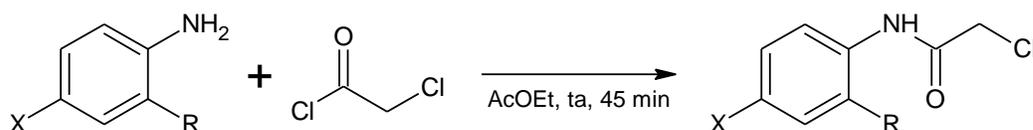
**Pf:** 158.6–159.8 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 9.55 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 7.62 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.30 (s, 2H), 2.17 (s, 3H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3251 (ν<sub>CON-H</sub>), 3040 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2952–2862 (ν<sub>C-H</sub>), 1667 (ν<sub>NHC=O</sub>), 813 (ν<sub>C-Cl</sub>), 686 y 534 (ν<sub>C-I</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 309 (Teórico: 309).

• **MÉTODO B: Neutro**



- |   |  |
|---|--|
| <b>C1:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = F, >95%  | <b>C9:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Cl, >95%  |
| <b>C2:</b> R = CN, X = F, >95%                | <b>C11:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Br, >95% |
| <b>C3:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = F, >95%  | <b>C12:</b> R = CN, X = Br, >95%               |
| <b>C4:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = F, >95%  | <b>C14:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Br, >95% |
| <b>C6:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Cl, >95% | <b>C17:</b> R = CN, X = I, >95%                |
| <b>C7:</b> R = CN, X = Cl, >95%               | <b>C19:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = I, >95%  |

A un matraz bola de 50 mL con agitador magnético se adicionó la anilina (1 g, 1 equiv), AcOEt (concentración del disolvente respecto a la anilina, 0.8 M) y se inició la agitación. Posteriormente se adicionó cloruro de cloroacetilo (1.1 equiv) observando el desprendimiento de gases correspondientes al HCl formado en la reacción. Después de 45 minutos se monitorizó la reacción mediante CCF en un sistema de elución Hex/AcOEt 90:10 con una gota de NH<sub>4</sub>OH (2x); la marca correspondiente a la anilina se oxidó presentando una coloración marrón mientras que la marca correspondiente al producto no lo hizo así.

Posteriormente, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación con ayuda de más AcOEt (20 mL) y se hizo una extracción usando 30 mL de agua. La fase orgánica se colectó, se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por destilación a presión reducida para obtener el producto como un sólido. Los productos se secaron a vacío por un periodo de 12 horas.

- **2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-metilfenil)acetamida (C1)**

Se obtuvo un sólido beige con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 121–123 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.12 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 7.74 (m, 1H), 6.93 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.29 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 164.1, 160.4 (d, *J* = 245.3 Hz), 132.5 (d, *J* = 8.13 Hz), 130.6 (d, *J* = 2.98 Hz), 124.9 (d, *J* = 8.63 Hz), 117.3 (d, *J* = 22.52 Hz), 113.6 (d, *J* = 22.40 Hz), 43.2, 17.8.

- ***N*-(2-Ciano-4-fluorofenil)-2-cloroacetamida (C2)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 103–105 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.80 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 8.35 (dd, *J* = 9.1, 4.8 Hz, 1H), 7.36 (dt, *J* = 8.3, 1.1, 0.3 Hz, 1H), 7.34 (tdd, *J* = 7.5, 7.4, 3.0, 0.6 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 164.5, 158.7 (d, *J* = 248.8 Hz), 123.6 (d, *J* = 8.1 Hz), 121.9 (d, *J* = 22.3 Hz), 119.0 (d, *J* = 25.6 Hz), 114.8 (d, *J* = 2.8 Hz), 104.5 (d, *J* = 9.1 Hz).

- **2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)acetamida (C3)**

Se obtuvo un sólido naranja con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 94.2–95.2 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.63 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 7.96 (dd, *J* = 8.5, 2.9 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J* = 9.1, 5.2 Hz, 1H), 7.67 (ddd, *J* = 9.0, 7.8, 3.0 Hz, 1H), 4.35 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3323 (ν<sub>CON-H</sub>), 3092 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2965 (ν<sub>C-H</sub>), 1684 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1508 (ν<sub>Ar-NO<sub>2</sub></sub>), 1248 (ν<sub>C-F</sub>), 676 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 232 (Teórico: 232).

- **2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)acetamida (C4)**

Se obtuvo un sólido beige con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 89–92 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.64 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 8.16 (dd, *J* = 9.1, 4.9 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.4, 3.0 Hz, 1H), 7.30 (m, 1H), 4.23 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 164.5, 159.4 (d, *J* = 247.83 Hz), 126.8 (d, *J* = 7.8), 123.0 (dd, *J* = 273.3, 2.4 Hz), 123.0 (dd, *J* = 31.1, 7.5 Hz), 120.0 (d, *J* = 22.0 Hz), 113.9 (dq, *J* = 26.3, 5.4, 5.4, 5.4 Hz), 42.9.

- **2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)acetamida (C6)**

Se obtuvo un sólido gris con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 110–111 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.19 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 7.84 (dt, *J* = 9.3, 3.8, 2.0 Hz, 1H), 7.20 (m, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 163.9, 133.4, 130.9, 130.9, 130.5, 127.1, 123.7, 43.3, 17.5.

- ***N*-(2-Ciano-4-clorofenil)-2-cloroacetamida (C7)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 122.9–124.7 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 10.56 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.04 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.38 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3336 (ν<sub>CON-H</sub>), 3066 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2961 (ν<sub>C-H</sub>), 2229 (ν<sub>C≡N</sub>), 1699 (ν<sub>NHC=O</sub>), 834 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 228 (Teórico: 228).

- **2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)acetamida (C9)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 80–81 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.73 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 8.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 164.4, 133.1, 133.0, 130.9, 126.6 (q, *J* = 5.5 Hz), 125.3, 123.2 (d, *J* = 273.7 Hz), 122.0 (d, *J* = 30.9 Hz), 43.0.

- ***N*-(4-Bromo-2-metilfenil)-2-cloroacetamida (C11)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 130–132 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 8.19 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 7.82 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.36 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 163.9, 134.0, 133.4, 131.0, 130.1, 123.8, 118.7, 43.3, 17.5.

- ***N*-(4-Bromo-2-cianofenil)-2-cloroacetamida (C12)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 114.0–116.2 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.55 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.15 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3332 (ν<sub>CON-H</sub>), 3064 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2959 (ν<sub>C-H</sub>), 2228 (ν<sub>C≡N</sub>), 1695 (ν<sub>NHC=O</sub>), 822 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 272 (Teórico: 272).

- ***N*-(4-Bromo-2-(trifluorometil)fenil)-2-cloroacetamida (C14)**

Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 92.3–94.0 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.97 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 7.94 (q, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3260 (ν<sub>CON-H</sub>), 3036 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2960 (ν<sub>C-H</sub>), 1678 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1308 (ν<sub>C-F</sub>), 660 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 315 (Teórico: 315).

- **2-Cloro-N-(2-ciano-4-yodofenil)acetamida (C17)**

Se obtuvo un sólido gris con rendimiento cuantitativo.

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 10.51 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3321 (ν<sub>CON-H</sub>), 3057 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2955 (ν<sub>C-H</sub>), 2225 (ν<sub>C≡N</sub>), 1692 (ν<sub>NHC=O</sub>), 841 (ν<sub>C-Cl</sub>), 490 (ν<sub>C-I</sub>).

- **2-Cloro-N-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)acetamida (C19)**

Se obtuvo un sólido beige con rendimiento cuantitativo.

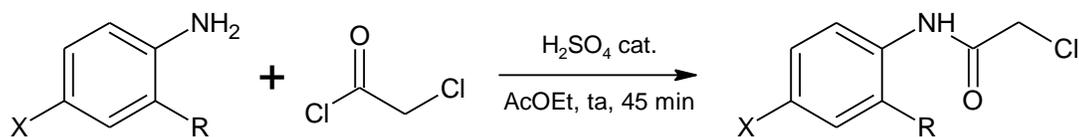
**Pf:** 128.5–129.2 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 9.93 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.07 – 8.04 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3364 (ν<sub>CON-H</sub>), 3031 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2957 (ν<sub>C-H</sub>), 1677 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1306 (ν<sub>C-F</sub>), 655 (ν<sub>C-Cl</sub>), 521 y 469 (ν<sub>C-I</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 363 (Teórico: 363).

- **MÉTODO C: Ácido**



**C8:** R = NO<sub>2</sub>, X = Cl, >95%

**C13:** R = NO<sub>2</sub>, X = Br, >95%

**C18:** R = NO<sub>2</sub>, X = I, >95%

En un matraz bola de 50 mL con agitador magnético se adicionó la anilina (1g, 1 equiv) y AcOEt (concentración del disolvente respecto a la anilina, 0.8 M); se inició la agitación. Posteriormente se adicionó cloruro de cloroacetilo (1.1 equiv) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 equiv). Después de 45 minutos se monitorizó la reacción mediante CCF en un sistema de elución Hex/AcOEt 90:10 con una gota de NH<sub>4</sub>OH (2x); la marca correspondiente a la anilina se oxidó presentando una coloración marrón mientras que la marca correspondiente al producto no lo hizo así.

Posteriormente, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación con ayuda de más AcOEt (20 mL) y se hizo una extracción usando 30 mL de agua. La fase orgánica se colectó, se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por destilación a presión reducida para obtener el producto como un sólido. Los productos se secaron a vacío por un periodo de 12 horas.

- **2-Cloro-N-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (C8)**

Se obtuvo un sólido naranja con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 140.6–141.5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.71 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.12 (dd, *J* = 2.3, 0.5 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.8, 0.6 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3325 (ν<sub>CON-H</sub>), 3093 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2966 (ν<sub>C-H</sub>), 1686 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1493 y 1341 (ν<sub>C-NO<sub>2</sub></sub>), 751 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 248 (Teórico: 248).

- **N-(4-Bromo-2-nitrofenil)-2-cloroacetamida (C13)**

Se obtuvo un sólido naranja con rendimiento cuantitativo.

**Pf:** 132.2–134.4 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.70 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H).

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3330 (ν<sub>CON-H</sub>), 3089 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2965 (ν<sub>C-H</sub>), 1684 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1488 y 1336 (ν<sub>Ar-NO<sub>2</sub></sub>), 663 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EM** (IE, [M<sup>+</sup>], *m/z*): 292 (Teórico: 292).

- **N-(2-Nitro-4-yodofenil)-2-cloroacetamida (C18)**

Se obtuvo un sólido naranja con rendimiento cuantitativo.

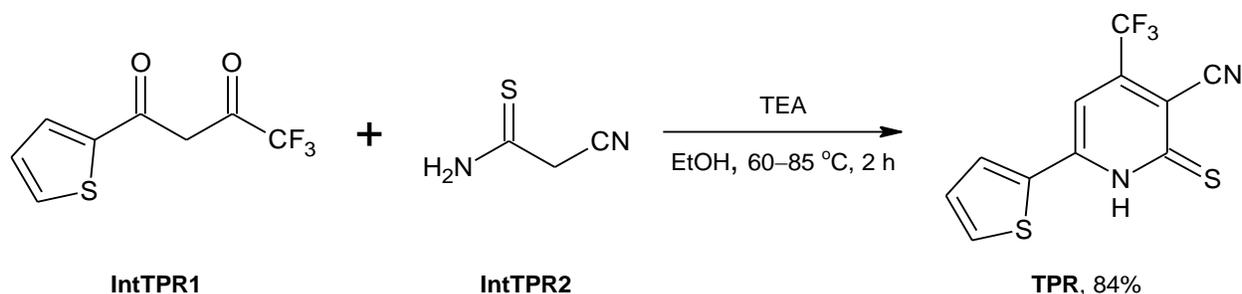
**Pf:** 124.1–124.9 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm): 11.29 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.55 (m, 2H), 7.95 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H)

IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3288 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3105 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2950 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1682 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 1491 ( $\nu_{\text{C-NO}_2}$ ), 717 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ).

EM (IE,  $[\text{M}^+]$ ,  $m/z$ ): 340 (Teórico: 340).

### 11.2.5. Procedimiento general para la síntesis de 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)



En un matraz bola de 50 mL con agitador magnético se disolvió 4,4,4-trifluoro-1-(tiofen-2-il)butano-1,3-diona (**IntTPR1**) (2 g, 9.002 mmol, 1 equiv) y trietilamina (1.995 mL, 14.313 mmol, 1.59 equiv) en EtOH (10 mL). El matraz bola se sumergió en un baño de aceite que se encontraba a 60 °C y se inició la agitación. Después de 5 minutos se añadió 2-cianotioacetamida (**IntTPR2**) (901 mg, 9.002 mmol, 1 equiv) a la mezcla de reacción y se elevó la temperatura de reacción hasta 85 °C. Una vez pasadas dos horas la reacción se monitorizó por CCF en un sistema de elución  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  80:20 comparando la mezcla de reacción con ambas materias primas. Al no observar la presencia de materia prima en la mezcla de reacción, la reacción se retiró del calentamiento, con lo que se observó la formación de un sólido amarillo.

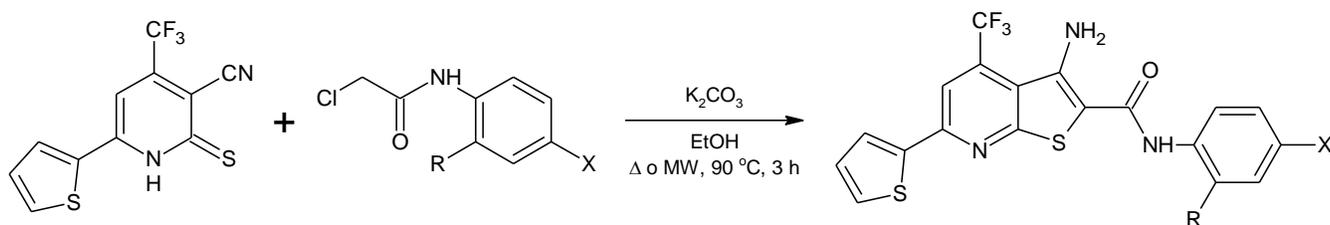
El sólido precipitado se separó por filtración a vacío y se lavó utilizando agua fría, posteriormente el producto se dejó secar a vacío. Se obtuvo un sólido cristalino amarillo oscuro con 84% de rendimiento. En el rendimiento se considera a la trietilamina en proporción 1:1 con TPR.

**Pf:** 162.8–164.2 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 8.97 (s, 1H), 7.90 (dd,  $J = 3.8, 1.2$  Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J = 5.1, 1.1$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.16 (dd,  $J = 5.1, 3.7$  Hz, 1H), 3.10 (q, 6H), 1.17 (t, 9H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm)  $\delta$  153, 144, 139 (q,  $J = 31.5$  Hz), 131, 129, 122 (q,  $J = 274.8$  Hz), 118, 117, 104, 103, 46, 9.

### 11.2.6. Procedimiento general para la síntesis de 3-Amino-*N*-fenil-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (FDI-6, 1-19)



<b>FDI-6:</b> R = H, X = F	<b>5:</b> R = H, X = Cl	<b>10:</b> R = H, X = Br	<b>15:</b> R = H, X = I
<b>1:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = F	<b>6:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Cl	<b>11:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = Br	<b>16:</b> R = CH <sub>3</sub> , X = I
<b>2:</b> R = CN, X = F	<b>7:</b> R = CN, X = Cl	<b>12:</b> R = CN, X = Br	<b>17:</b> R = CN, X = I
<b>3:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = F	<b>8:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Cl	<b>13:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = Br	<b>18:</b> R = NO <sub>2</sub> , X = I
<b>4:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = F	<b>9:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Cl	<b>14:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = Br	<b>19:</b> R = CF <sub>3</sub> , X = I

#### • Método A

En un matraz bola de 100 mL con agitador magnético se disolvieron la 2-cloro-*N*-fenilacetamida correspondiente (1 equiv), 6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**) (1.2 equiv) (Considerar que **TPR** está en proporción 1:1 con la trietilamina) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 equiv) en EtOH (concentración de disolvente respecto a la acetamida, 0.5 M); se le adaptó un condensador al matraz y se sumergió en un baño de aceite a 95 °C, se inició la agitación. Una vez pasadas tres horas, la reacción se monitorizó por CCF en un sistema Hex/AcOEt 90:10, al no observar la presencia de materia prima en la placa, la reacción se retiró del calentamiento con lo cual se observó la formación de un sólido amarillo.

El sólido se vertió en agua con hielo, posteriormente se filtró a vacío y se lavó con abundante agua. Finalmente se dejó secar a vacío durante un periodo de 12 horas.

#### • 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (FDI-6)

Producto obtenido como un sólido amarillo de apariencia esponjosa y rendimiento >90%.

**Pf:** 241.8–242.9 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.79 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.29 (s, 1H), 8.21 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 9.1, 5.1 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.76 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.0, 161.0, 159.0 (d, *J* = 240.7 Hz), 152.7, 145.5, 142.5, 135.3, 132.3 (q, *J* = 33.4 Hz), 131.6, 129.5, 124.1, 123.1 (q, *J* = 274.3 Hz), 118.3, 115.5 (d, *J* = 22.2 Hz), 113.1, 101.3.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3494 y 3337 (ν<sub>N-H</sub>), 3414 (ν<sub>CON-H</sub>), 3098 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1217 (ν<sub>C-F</sub>), 1600 (ν<sub>NHC=O</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 438.0289 (Esperada: 438.4386).

- **3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (3)**

El producto se recrystalizó de Tolueno:DMF 4:1.

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 239.1–239.9 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.30 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.25 (s, 1H), 8.24 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 5.0, 1.0 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 8.7, 5.2 Hz, 1H), 7.69 (ddd, *J* = 9.0, 7.8, 3.0 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H), 6.80 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 163.6, 160.8, 158.0 (d, *J* = 246.4 Hz), 152.8, 148.2, 146.0, 143.2 (d, *J* = 8.7 Hz), 142.0, 132.2 (d, *J* = 33.7 Hz), 131.5, 129.3 (d, *J* = 27.1 Hz), 128.43, 128.40 (d, *J* = 8.2 Hz), 126.7, 125.3 (d, *J* = 274.1 Hz), 124.0, 121.3 (d, *J* = 22.1 Hz), 117.6, 112.9, 112.4, 112.3 (d, *J* = 27.9 Hz), 112.2.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3540 y 3351 (ν<sub>N-H</sub>), 3524 (ν<sub>CON-H</sub>), 3113 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1241 (ν<sub>C-F</sub>), 1648 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1505 (ν<sub>Ar-NO<sub>2</sub></sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 483.0170 (Esperada: 483.0209).

- **3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (5)**

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 237.1–237.8 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.86 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.30 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H), 6.79 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.1, 161.0, 153.9, 145.8, 142.5, 137.9, 132.4 (d, *J* = 33.5 Hz), 131.7, 129.6, 129.5, 128.9, 128.1, 123.5, 123.1 (d, *J* = 274.1 Hz), 118.2, 113.2, 101.0.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3508 y 3309 (ν<sub>N-H</sub>), 3394 (ν<sub>CON-H</sub>), 3073 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1236 (ν<sub>C-F</sub>), 1641 (ν<sub>NHC=O</sub>), 702 (ν<sub>C-Cl</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 453.9976 (Esperada: 454.0062).

- **3-Amino-*N*-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (7)**

El producto se recristalizó de Tolueno:DMF 4:1.

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 264.8–266.5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.24 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.32 (s, 1H), 8.24 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H) 6.84 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 163.9, 160.8, 152.8, 146.0, 142.0, 139.2, 133.9, 132.4, 132.0, 131.5, 130.2, 129.4, 129.2, 128.6, 122.6 (d, *J* = 274.3 Hz), 117.6, 115.8, 112.9, 111.2, 99.3.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3523 y 3332 (ν<sub>N-H</sub>), 3357 (ν<sub>CON-H</sub>), 3090 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2222 (ν<sub>C≡N</sub>), 1651 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1235 (ν<sub>C-F</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 478.9957 (Esperada: 479.0015).

- **3-Amino-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (8)**

El producto se recristalizó 2 veces de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 247.5–249.4 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.41 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.30 (s, 1H), 8.23 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 6.81 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 163.9, 160.7, 142.7, 142.1, 133.6, 131.4, 129.2, 129.1, 128.9, 128.2, 127.3, 124.4, 124.0, 112.7, 109.6.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3537 y 3326 (ν<sub>N-H</sub>), 3093 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1643 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1494 y 1340 (ν<sub>C-NO<sub>2</sub></sub>), 1376 y 748 (ν<sub>C-F</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 498.9859 (Esperada: 498.9913).

- **3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (10)**

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 241.0–242.1 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.85 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.29 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H), 6.79 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.1, 162.7, 161.0, 152.8, 145.6, 142.5, 138.6, 132.4 (d, *J* = 33.7 Hz), 131.7, 129.6, 123.9, 123.1 (d, *J* = 274.1 Hz), 118.2, 116.0, 113.2.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3503 y 3311 (ν<sub>N-H</sub>), 3402 (ν<sub>CON-H</sub>), 3076 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1236 (ν<sub>C-F</sub>), 1644 (ν<sub>NHC=O</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 497.9492 (Esperada: 497.9551)

- **3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (12)**

El producto se recrystalizó 2 veces de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 254.8–256.6 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 10.24 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.30 (s, 1H), 8.23 (dd,  $J = 3.7$ , 0.9 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J = 5.0$ , 1.1 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.27 (dd,  $J = 5.1$ , 3.8 Hz, 1H), 6.83 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 164.1, 160.8, 155.2, 152.5, 142.1, 141.6, 136.6, 135.0, 132.0 (d,  $J = 31.4$  Hz), 131.3, 131.0, 129.4, 129.2, 129.1, 128.4, 122.7 (d,  $J = 273.7$  Hz), 117.8, 116.0, 112.7, 111.1.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3530 y 3357 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 3377 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3102 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 2233 ( $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ), 1649 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 1294 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ).

**EMAR** (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) = 522.9440 (Esperada: 522.9504).

- **3-Amino-*N*-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (13)**

El producto se recristalizó 2 veces de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 253.0–253.6 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 10.40 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.32 (s, 1H), 8.25 (dd,  $J = 3.8$ , 1.1 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.95 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.87 (dd,  $J = 5.0$ , 1.1 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.28 (dd,  $J = 5.0$ , 3.8 Hz, 1H), 6.83 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 163.7, 160.8, 152.8, 142.9, 142.1, 136.7, 131.5, 129.4, 129.2, 127.5, 127.3, 122.6 (d,  $J = 274.1$  Hz), 117.6, 112.8.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3525 y 3332 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 3347 ( $\nu_{\text{CON-H}}$ ), 3092 ( $\nu_{\text{Ar-H}}$ ), 1649 ( $\nu_{\text{NHC=O}}$ ), 1476 y 1336 ( $\nu_{\text{C-F}}$ ).

**EMAR** (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) = 542.9348 (Esperada: 542.9408).

- **3-Amino-*N*-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (14)**

El producto se recristalizó de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 260.8–261.5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.74 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 8.23 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H), 6.72 (s, 2H, IntD<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.5, 160.6, 152.5, 145.2, 142.1, 136.1, 135.0, 133.3, 132.3, 131.9, 131.3, 129.3, 129.3, 129.2, 129.1, 122.6 (d, *J* = 274.5 Hz), 119.8, 117.8, 112.7, 109.5.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3521 y 3325 (ν<sub>N-H</sub>), 3441 (ν<sub>CON-H</sub>), 3071 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1647 (ν<sub>NHC=O</sub>), 1240 (ν<sub>C-F</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 565.9353 (Esperada: 565.9431).

- **3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-N-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (15)**

El producto se recristalizó de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 236.5–237.6 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.79 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.27 (s, 1H) 8.20 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.25 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 6.79 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 154.5, 151.5, 146.1, 144.2, 133.4, 132.1, 130.1, 129.4, 129.3, 128.1, 126.0, 125.4, 121.9, 119.0, 116.6, 112.8, 104.7.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3497 y 3313 (ν<sub>N-H</sub>), 3411 (ν<sub>CON-H</sub>), 3101–3050 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1236 (ν<sub>C-F</sub>), 1647 (ν<sub>NHC=O</sub>), 586–524 (ν<sub>C-I</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 545.9387 (Esperada: 545.9419).

- **3-Amino-N-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (16)**

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 276.5–277.4 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.53 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.23 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 3.8, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 5.0, 3.8 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O), 2.20 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 163.6, 160.6, 152.3, 144.9, 142.1, 138.7, 137.1, 136.1, 134.9, 132.0 (d, *J* = 33.6 Hz), 131.3, 129.2, 122.7 (d, *J* = 274.5 Hz), 118.0, 112.7, 112.7, 101.1, 91.5, 17.5.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3533 y 3349 (ν<sub>N-H</sub>), 3420 (ν<sub>CON-H</sub>), 3077 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2978 (ν<sub>C-H</sub>) 1125 (ν<sub>C-F</sub>), 1598 (ν<sub>NHC=O</sub>), 696 y 495 (ν<sub>C-I</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 559.9473 (Esperada: 559.9575)

- **3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (17)**

El producto se recristalizó de Tolueno:DMF 4:1

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 260.8–261.5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.22 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.29 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.26 (dd, *J* = 5.1, 3.7 Hz, 1H), 6.82 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.3, 160.8, 152.3, 142.2, 140.5, 131.9 (d, *J* = 33.3 Hz), 131.3, 129.1, 122.7 (q, *J* = 273.8 Hz), 118.6, 118.0, 116.1, 112.7, 110.9.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3528 y 3356 (ν<sub>N-H</sub>), 3099 (ν<sub>Ar-H</sub>), 2231 (ν<sub>C=N</sub>), 1122 (ν<sub>C-F</sub>), 1649 (ν<sub>NHC=O</sub>), 733 y 440 (ν<sub>C-I</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 570.9308 (Esperada: 570.9371).

- **3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (18)**

El producto se recristalizó de Tolueno:DMF 5:1

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 260.0–261.0 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.36 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.32 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.83 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 163.4, 160.8, 153.0, 146.2, 142.6, 142.0, 132.9, 131.6, 129.6, 129.2, 129.0, 128.3, 127.4, 125.4, 121.3, 117.6, 113.0.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3527 y 3322 (ν<sub>N-H</sub>), 3107 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1153 (ν<sub>C-F</sub>), 1475 (ν<sub>C-NO<sub>2</sub></sub>), 1645 (ν<sub>NHC=O</sub>), 747 y 440 (ν<sub>C-I</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 590.9197 (Esperada: 590.9264).

- **3-Amino-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (19)**

El producto se recrystalizó de Tolueno:DMF 5:1

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 260.8–261.5 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.73 (s, 1H, IntD<sub>2</sub>O), 8.27 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 3.78 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.26 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H, IntD<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.7, 160.7, 152.0, 144.0, 142.3, 141.6, 134.6 (d, *J* = 5.1 Hz), 132.3, 131.9 (d, *J* = 32.9 Hz), 131.1, 129.0, 127.6, 122.7 (q, *J* = 274.2 Hz), 118.2, 112.5 (d, *J* = 6.1 Hz), 78.3.

**IR** (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>): 3504 y 3337 (ν<sub>N-H</sub>), 3439 (ν<sub>CON-H</sub>), 3068 (ν<sub>Ar-H</sub>), 1300 (ν<sub>C-F</sub>), 1655 (ν<sub>NHC=O</sub>), 463 (ν<sub>C-I</sub>).

**EMAR** (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) = 613.9202 (Esperada: 613.9292).

- **Método B**

En un matraz de reacción de microondas de 5 mL con agitador magnético se añadieron la 2-cloro-*N*-fenilacetamida (1 equiv), 6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (**TPR**) (1.2 equiv) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 equiv) en EtOH (concentración de disolvente respecto a la acetamida, 0.5 M). El matraz se colocó en el microondas Initiator+ de Biotage y se llevó a cabo el programa de 3 horas de reacción, 90 °C, Nivel de absorción normal. El programa finalizó sin contratiempos teniendo un pico inicial de 190 W para luego estabilizarse

entre 10 y 20 W, la presión subió inicialmente a 3 bar para luego estabilizarse en 1 bar y, por otro lado, la temperatura subió a 98 °C para luego estabilizarse entre 89 y 91 °C.

Pasado el tiempo de reacción se observó un precipitado en el matraz por lo que se separó por filtración al vacío y se lavó con EtOH absoluto. Se dejó secar con succión a vacío durante un periodo de 12 horas.

- **3-Amino-N-(4-fluoro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (1)**

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 234–236 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 8.23 (s, 1H), 8.16 (dd, *J* = 3.6, 0.6 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.25 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 9.6, 2.7 Hz, 1H), 6.94 (td, *J* = 8.6, 3.2 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.0, 160.4, 150.2, 142.8, 130.2, 129.0, 127.9, 123.0 (d, *J* = 274.4 Hz), 115.8, 111.7, 18.8.

**EM** ([M-H]<sup>-</sup>, m/z): 450.0 (Esperada: 450.0).

- **3-Amino-N-(2-ciano-4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (2)**

Una vez terminada la reacción, la mezcla se vertió en un vaso con agua, se agitó y se separó el sólido por filtración al vacío. Se dejó secar en vacío por 12 horas. El sólido se disolvió en la menor cantidad posible de acetato de etilo para ser adsorbido en gel de sílice. Una vez empacado el sólido se transfirió a una jeringa de introducción de muestra del Combiflash. Se eluye la columna con un gradiente Hex:AcOEt diseñado por el equipo a partir de R<sub>f</sub>'s

70:30 = 0.655 imp, 0.517 int

80:20 = 0.413 imp, 0.293 int

Las fracciones con el compuesto de interés se colectaron, se concentró el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido se dejó secar a vacío por 12 horas.

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 234–236 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 10.17 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.30 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 3.8, 1.1 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 8.4, 3.0 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.65 (td, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 9.0, 5.1 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 6.83 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 164.5, 161.3, 159.6 (d, *J* = 245.3 Hz), 153.2, 146.3, 142.5, 137.2 (d, *J* = 3.1 Hz), 132.6 (q, *J* = 33.5 Hz), 130.1 (d, *J* = 8.8 Hz), 132.1, 129.7 (d, *J* = 26.6 Hz), 129.1, 125.8, 123.1 (d, *J* = 274.3 Hz), 121.7 (d, *J* = 22.4 Hz), 120.1 (d, *J* = 26.2 Hz), 118.1, 116.3 (d, *J* = 2.6 Hz), 113.2 (d, *J* = 6.3 Hz), 111.9 (d, *J* = 10.3 Hz), 99.9.

**EM** ([M-H]<sup>-</sup>, m/z): 461.0 (Esperada: 461.0).

- **3-Amino-*N*-(4-fluor-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (4)**

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 197–198 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 9.74 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 8.24 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.25 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H), 6.68 (s, 2H, Int D<sub>2</sub>O)

**RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 165.1, 160.7, 151.5, 143.0, 142.5, 131.7 (d, *J* = 32.0 Hz), 130.9, 129.2, 128.7, 126.3, 123.3 (d, *J* = 274.3 Hz), 122.9 (q, *J* = 274.1, 273.7 Hz), 119.6 (d, *J* = 22.8 Hz), 118.7, 113.5 (d, *J* = 23.1 Hz), 112.3.

**EM** ([M-H]<sup>-</sup>, m/z): 504.0 (Esperada: 504.0).

- **3-Amino-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (6)**

Producto obtenido como un sólido amarillo y rendimiento >90%.

**Pf:** 240–241 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm): 8.15 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 3.7, 1.1 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 6.91 (ddd, *J* = 8.6, 2.7, 1.3 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H, Int D<sub>2</sub>O), 2.21 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 164.8, 160.3, 149.5, 148.3, 143.2, 136.7, 132.8, 129.9 (q,  $J = 33.2$  Hz), 129.4, 128.8, 128.2, 127.0, 124.6, 124.1, 123.2 (d,  $J = 273.9$  Hz), 120.9, 120.7, 110.9 (d,  $J = 6.3$  Hz) 19.3.

**EM** ([M-H] $^-$ , m/z): 465.9 (Esperada: 466.0).

- **3-Amino-N-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (9)**

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** 222–223 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 8.51 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.08 (d,  $J = 3.8$ , 1H), 7.75 (dd,  $J = 5.0$ , 1.1 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.30 (dd,  $J = 8.5$ , 2.6 Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J = 5.0$ , 3.7 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H, Int D $_2$ O).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 166.2, 160.6, 150.6, 143.1, 137.2, 131.1, 130.2 (d,  $J = 32.2$  Hz), 129.6, 128.8, 127.3, 126.0, 125.5, 124.8, 123.7, 123.2 (d,  $J = 273.7$  Hz), 121.0, 120.4, 119.6, 111.0.

**EM** ([M-H] $^-$ , m/z): 519.9 (Esperada: 520.0).

- **3-Amino-N-(4-bromo-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (11)**

Producto obtenido como un sólido naranja y rendimiento >90%.

**Pf:** >255 °C

**RMN  $^1\text{H}$**  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 8.26 (s, 1H), 8.19 (d,  $J = 3.6$ , 1H), 7.82 (d,  $J = 5.0$ , Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.26 (dd,  $J = 5.0$ , 3.7 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm): 163.9, 160.5, 151.2, 142.7, 142.4, 136.1, 132.3, 131.4 (d,  $J = 33.9$  Hz), 130.7, 129.0, 128.5, 127.8, 122.8 (q,  $J = 273.9$  Hz), 118.7, 116.0, 112.2, 18.1.

**EM** ([M-H] $^-$ , m/z): 509.8 (Esperada: 510.0).



## **12. ANEXO II-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **12.1. Instrumentación y materiales**

- Para el cultivo celular se usó Medio RPMI Gibco 1640 con L-Glutamina y rojo de fenol sin HEPES suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina 1%.
- Para tripsinizar se usó Tripsina-EDTA Gibco con EDTA al 0.05% y rojo de fenol.
- Se usó DPBS como buffer fosfato salino.
- Para lisar las células se usó Buffer Pierce RIPA.
- Como inhibidor de proteasas se usó el cocktail Halt de inhibidores de proteasas.
- Para preparar la curva de calibración del ensayo de Bradford se usó albúmina de suero bovino.
- Como reactivo del ensayo de Bradford se usó el reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye.
- Como marcador de peso molecular se usó el Bluef Prestained Protein Ladder.
- Buffer de corrida: Para 1L de 5X: 15 g de Tris Base (UltraPure Tris), 72 g de glicina, 5 g de SDS, agua destilada hasta el volumen final. Para obtener el 1X: 200 mL de 5X en 800 mL de agua destilada.
- Buffer de transferencia: Para 1 L: 3.03 g de Tris Base (UltraPure Tris), 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, llevar a 1 L con agua destilada.
- Leche: 5 g de leche descremada en polvo Carnation en 100 mL de TBST.
- TBST: Para 1L: 1 mL de Tween-20, 100 mL de TBS 10X, llevar a 1 L con agua destilada.
- Las células fueron cultivadas en cajas Falcon de plástico T-75.
- Se usaron tubos Corning de 15 y 30 mL.
- Los geles SDS-PAGE usados fueron Bio-Rad Mini-Protean TGX Gels 4-15% de 10 pozos y 15  $\mu$ L de capacidad
- Papel Filtro: Extra Thick Western Blotting Filter Paper
- Membrana de nitrocelulosa: Bio-Rad Nitrocellulose Membranes 0.45  $\mu$ m
- Anticuerpo primario: 10  $\mu$ L de FOXM1 mouse monoclonal IgG en 10 mL de leche.
- Anticuerpo secundario: 5  $\mu$ L de IRDye 800CW Goat Anti-Mouse en 10 mL de TBST.
- Anticuerpo primario: 10  $\mu$ L de  $\beta$ -actin mouse monoclonal IgG en 10 mL de leche.
- Se midió la absorbancia en un lector de placas Synergy H1-Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek)

- Se usó el sistema Mini-PROTEAN 3 cell de Bio-Rad para correr los geles y hacer las transferencias.
- Se usó el escáner Odyssey LI-COR para revelar las membranas.

### **12.2. Procedimiento detallado del ensayo de Western Blot**

Se sacaron del refrigerador el medio RPMI y la tripsina-EDTA y se pusieron en el baño de agua del cuarto de cultivo a 36 °C. Se retiraron las células de la incubadora. Se revisaron las células en caja Falcon usando el microscopio, se verificó su confluencia y adherencia a la caja. Se retiró el medio RPMI que contenía la caja y se hizo un lavado agregando 10 mL de DPBS que se retiraron después de agitar suavemente. Se agregaron 2 mL de tripsina-EDTA y se regresó la caja por 5 minutos a la incubadora. Una vez pasado el tiempo se sacó de la incubadora, se golpeó suavemente la caja lateralmente y se agregaron 8 mL de RPMI, homogeneizando la solución generada. La solución se transfirió a un tubo Corning nuevo de 10 mL y se centrifugó por 5 min a 1250 rpm a 26 °C. Se observó la formación de un botón al fondo del tubo. Se retiró el medio con cuidado de no alterar el botón. El botón se resuspendió con 10 mL de medio RPMI. Se determinó la cantidad de células por mililitro usando el método de la cámara de Neubauer. Usando placas de 6 pozos se añadió la cantidad de solución de células necesaria para introducir 200,000 células en cada pozo. Cada pozo se llevó a un volumen final de 5 mL usando medio RPMI. Las células se incubaron por un periodo de entre 36 y 40 horas a 36 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se prepararon soluciones 10 mM de los compuestos a estudiar usando 1 mL de DMSO. Se revisaron las células usando el microscopio, se verificó su confluencia y adherencia a la placa. Se agregaron 20 µL de los compuestos de interés en cada uno de los pozos, dejando un pozo sin tratamiento, uno tratado con DMSO solo y un control positivo (**FDI-6**).

Las células se incubaron por un periodo de 24 horas a 36 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas, se revisaron las células usando el microscopio, tomando nota de la apariencia, presencia de compuesto cristalizado, etc. Se retiró el medio y se enjuagó cada pozo con 1 mL de DPBS. Se añadió a cada pozo 300 µL de buffer RIPA con 1% de buffer inhibidor de proteasas. Las placas se llevaron al cuarto frío (4 °C) donde se pusieron en el agitador por 45 min. Una vez pasado ese tiempo se sacaron las placas del cuarto frío y se transfirió el contenido de cada pozo a tubos Eppendorf de 1.6 mL. Los tubos se marcaron con la clave de la muestra y se

colocaron en un recipiente con hielo. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y 4 °C. Se separó el sobrenadante de cada tubo.

Se determinó la cantidad de proteína en cada muestra usando el ensayo de Bradford. Con la cantidad de proteína por muestra se determinó el volumen requerido para agregar 40 µg. En tubos eppendorf de 0.6 mL se prepararon las soluciones para correr en el gel agregando: los 40 µg de proteína, colorante de corrida con SDS y agua destilada hasta un volumen de 40 µL. Una vez preparadas las muestras se calentaron y agitaron por 6 minutos a 95 °C. Se prepararon los geles en la cámara y esta se llenó de buffer de corrida. Se colocó cada muestra en los pozos del gel considerando dejar en cada gel tres pozos para marcador de peso molecular (5 µL), muestra de DMSO (control negativo), muestra de **FDI-6** (control positivo). Se corrió el gel a 100 V hasta observar que el colorante de corrida llegó al final del gel.

Para la transferencia se pusieron a remojar los papeles filtro, las esponjas y la membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia. Se sacó el gel del casete, se despegaron los plásticos que lo contienen, se cortó la parte de abajo donde está el colorante de corrida y la parte de abajo con los pozos. Se preparó el casete de transferencia con la membrana de nitrocelulosa y papel filtro de cada lado. Una vez listo el casete se introdujo en la cámara, a la cual además se le agregó un bloque frío, y la cámara se puso en un recipiente con hielo.

La transferencia se corrió a 100 V durante 1 hora 20 minutos. Se desempacaron los casetes y se recuperó la membrana, lo demás se desechó. La membrana se colocó en una cajita de plástico donde se agregaron 10 mL de leche para bloquear por 45 min. La leche se desechó y se agregó el anticuerpo primario para FOXM1. Se dejó incubar toda la noche en el agitador del cuarto frío (4 °C). Se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBST durante 5 min. Se agregó el anticuerpo secundario y se dejó incubar por 45 min. Se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBST durante 5 min.

Se llevaron las membranas al escáner Odyssey LI-COR donde se revelaron usando una intensidad de 3.0 en el canal de 700 donde se observa el marcador de peso molecular y de 6.0 en el canal de 800 donde se observa FOXM1.

Se agregaron 10 mL de leche para bloquear por 45 minutos. La leche se desechó y se agregó el anticuerpo primario para β-actina. Se dejó incubar toda la noche en el agitador del cuarto frío (4 °C). Se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBST durante 5 min. Se agregó el anticuerpo

## ***ANEXO II-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA***

---

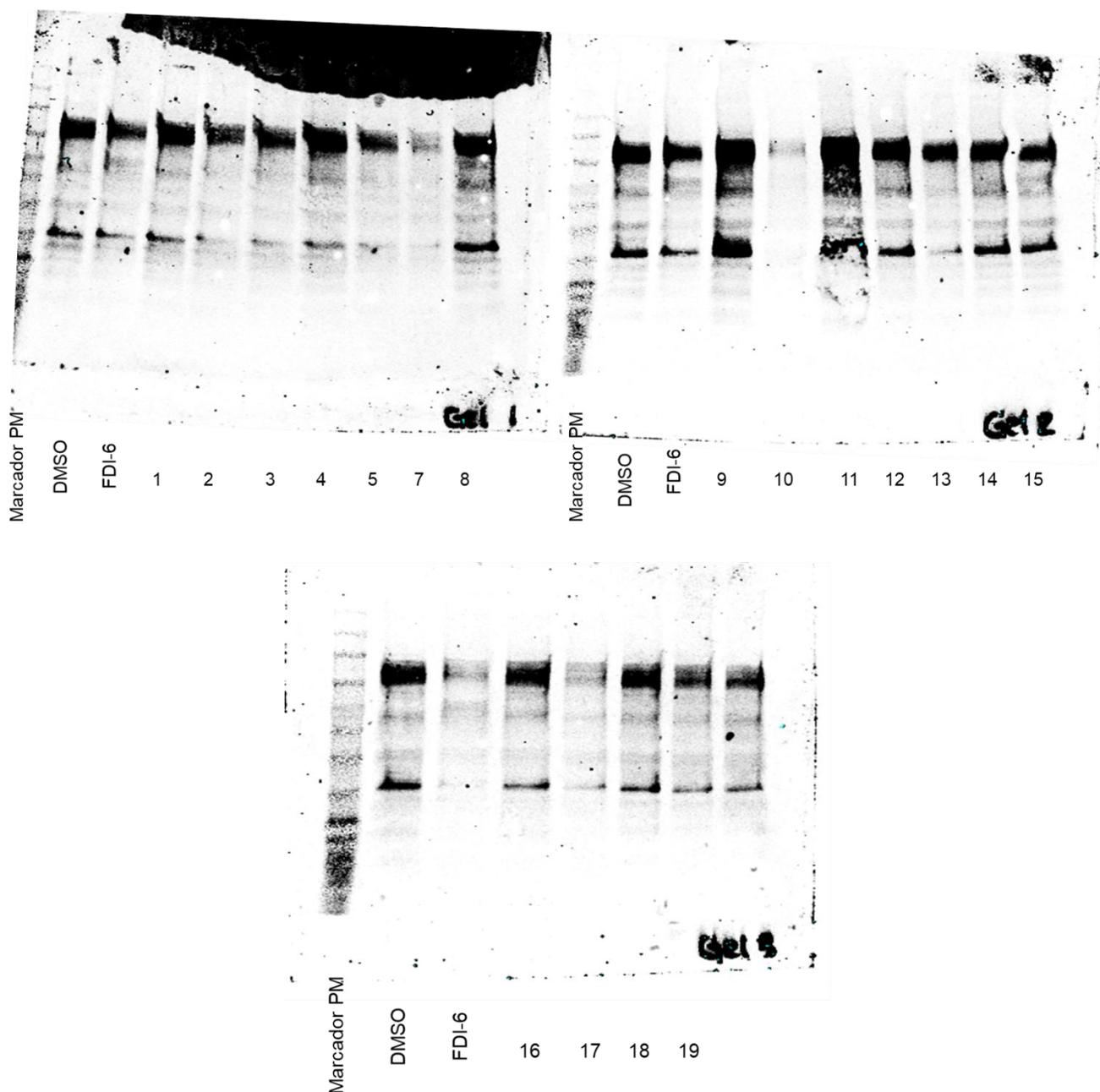
secundario y se dejó incubar por 45 min. Se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBST durante 5 min. Se llevaron las membranas al escáner Odyssey LI-COR donde se revelaron usando una intensidad de 3.0 en el canal de 700 donde se observa el marcador de peso molecular y de 6.0 en el canal de 800 donde se observa la  $\beta$ -actina.

Los resultados se procesan con el programa ImageJ y Prism 8.

12.3. Resultados de Western Blot de cada repetición

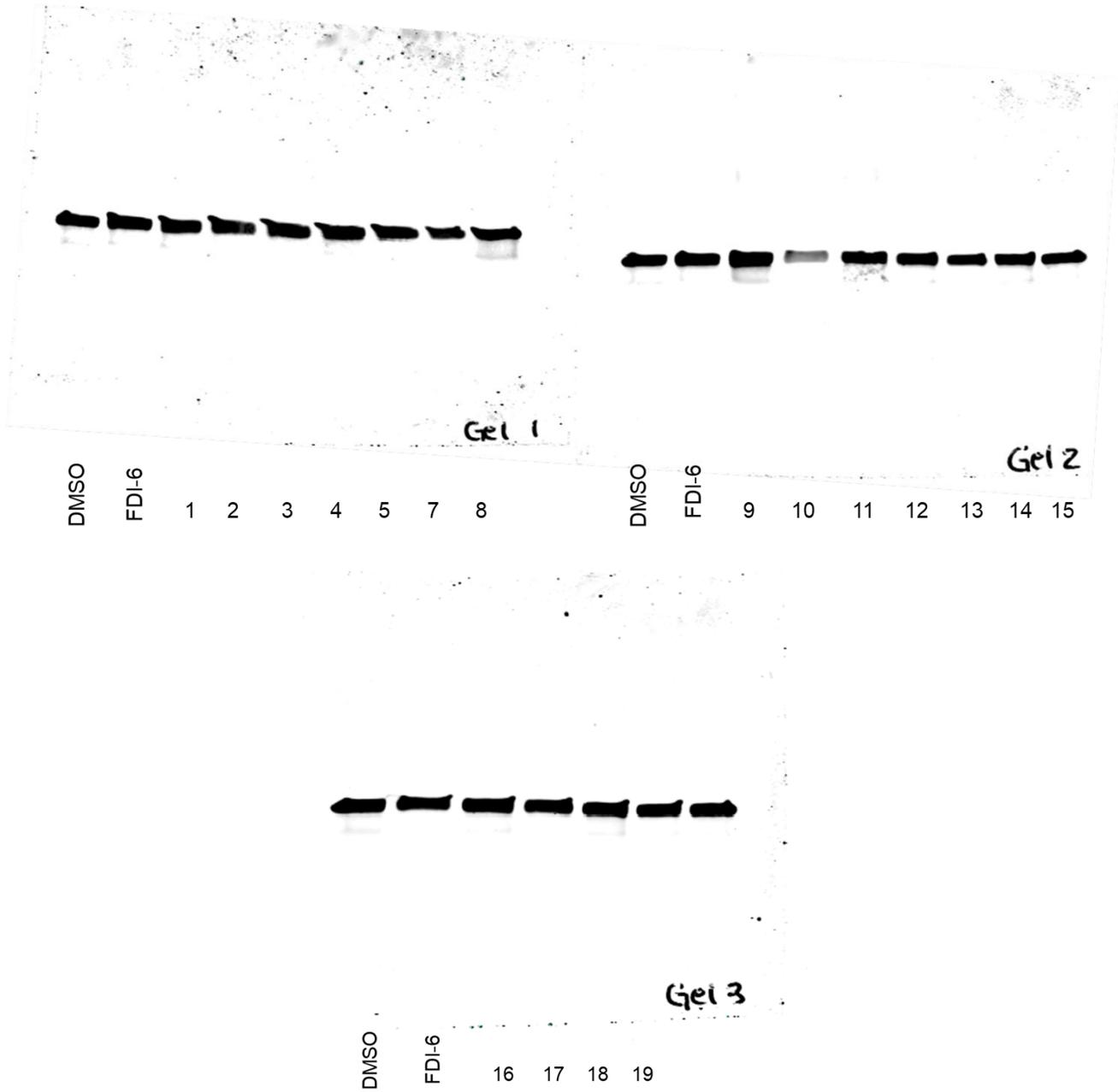
- 1ª repetición

FOXM1



**Figura 48.** 1a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos FDI-6, 1-19. Con anticuerpo para FOXM1.

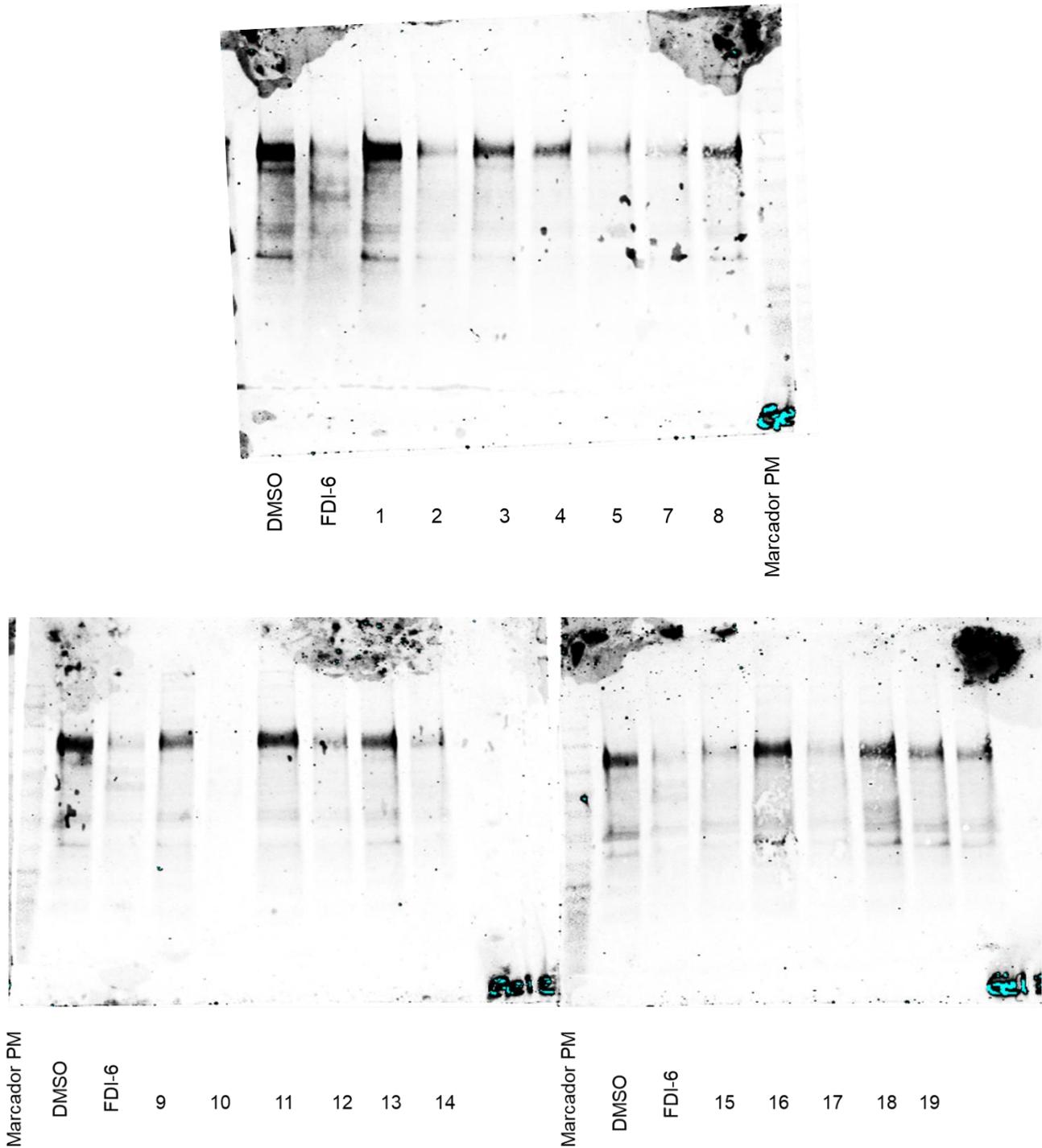
β-actina



**Figura 49.** 1a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos **FDI-6, 1-19**. Con anticuerpo para β-actina.

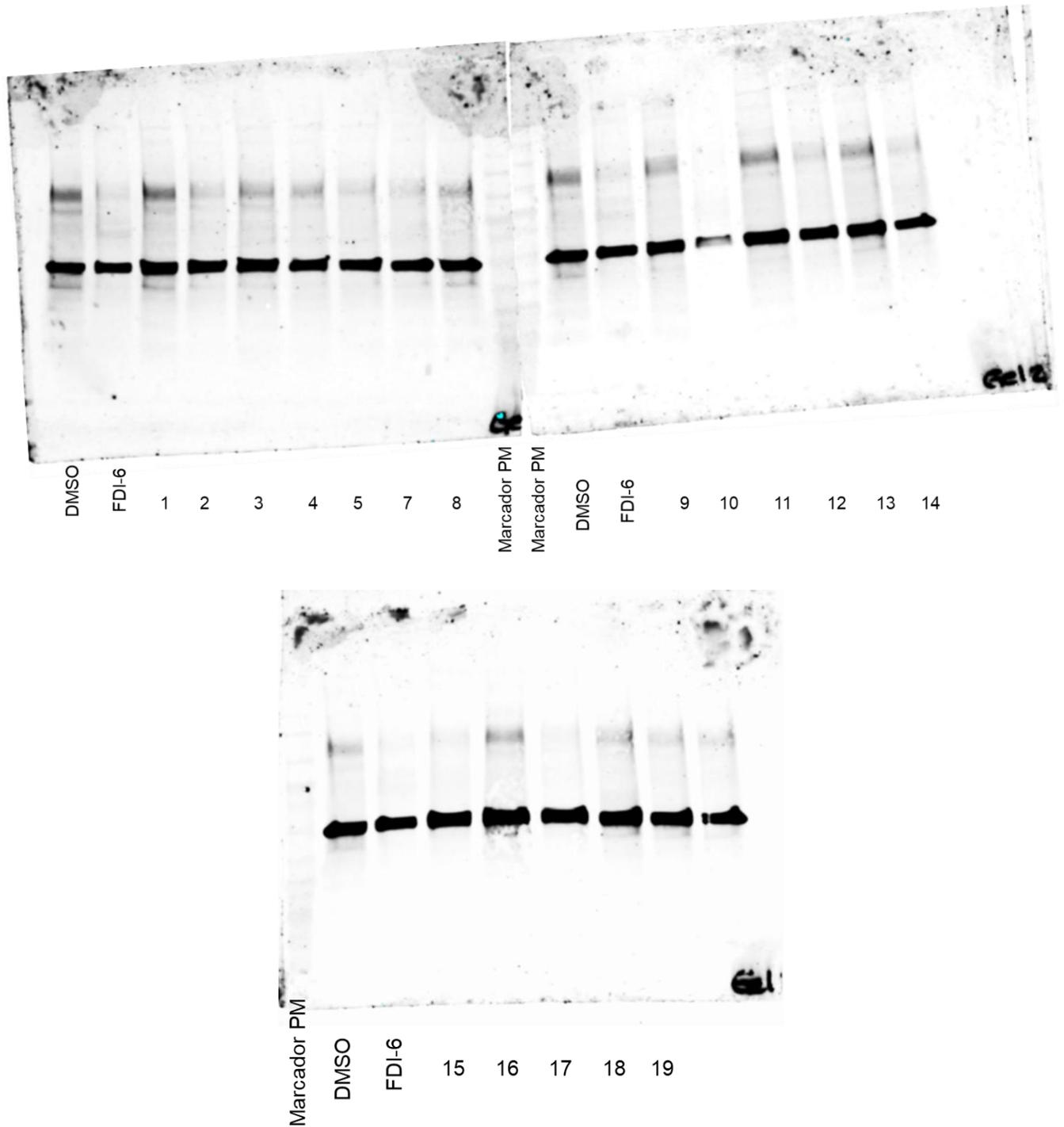
- 2ª repetición

FOXM1



**Figura 50.** 2a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos **FDI-6, 1-19**. Con anticuerpo para FOXM1.

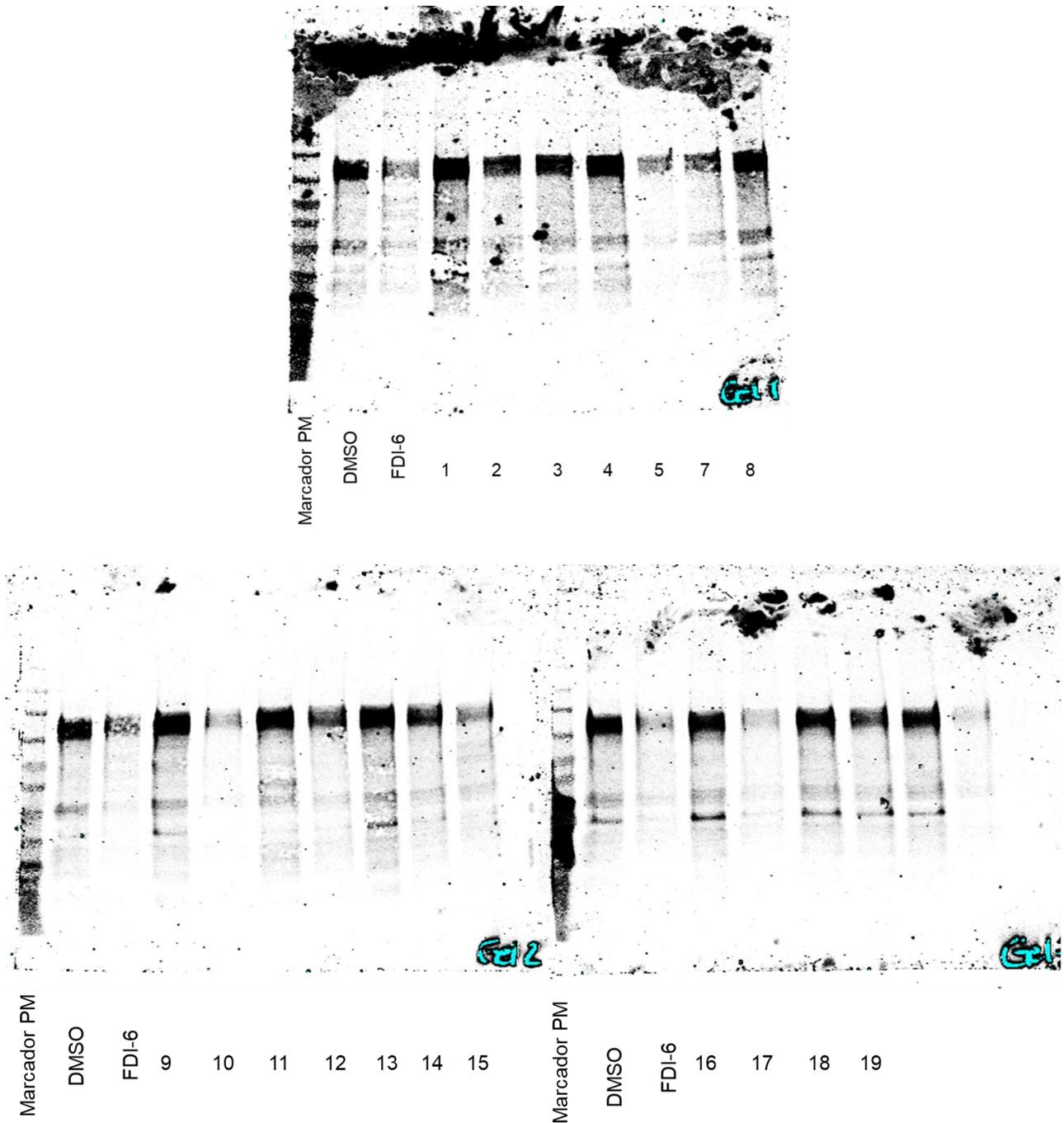
β-actina



**Figura 51.** 2a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos FDI-6, 1-19. Con anticuerpo para β-actina.

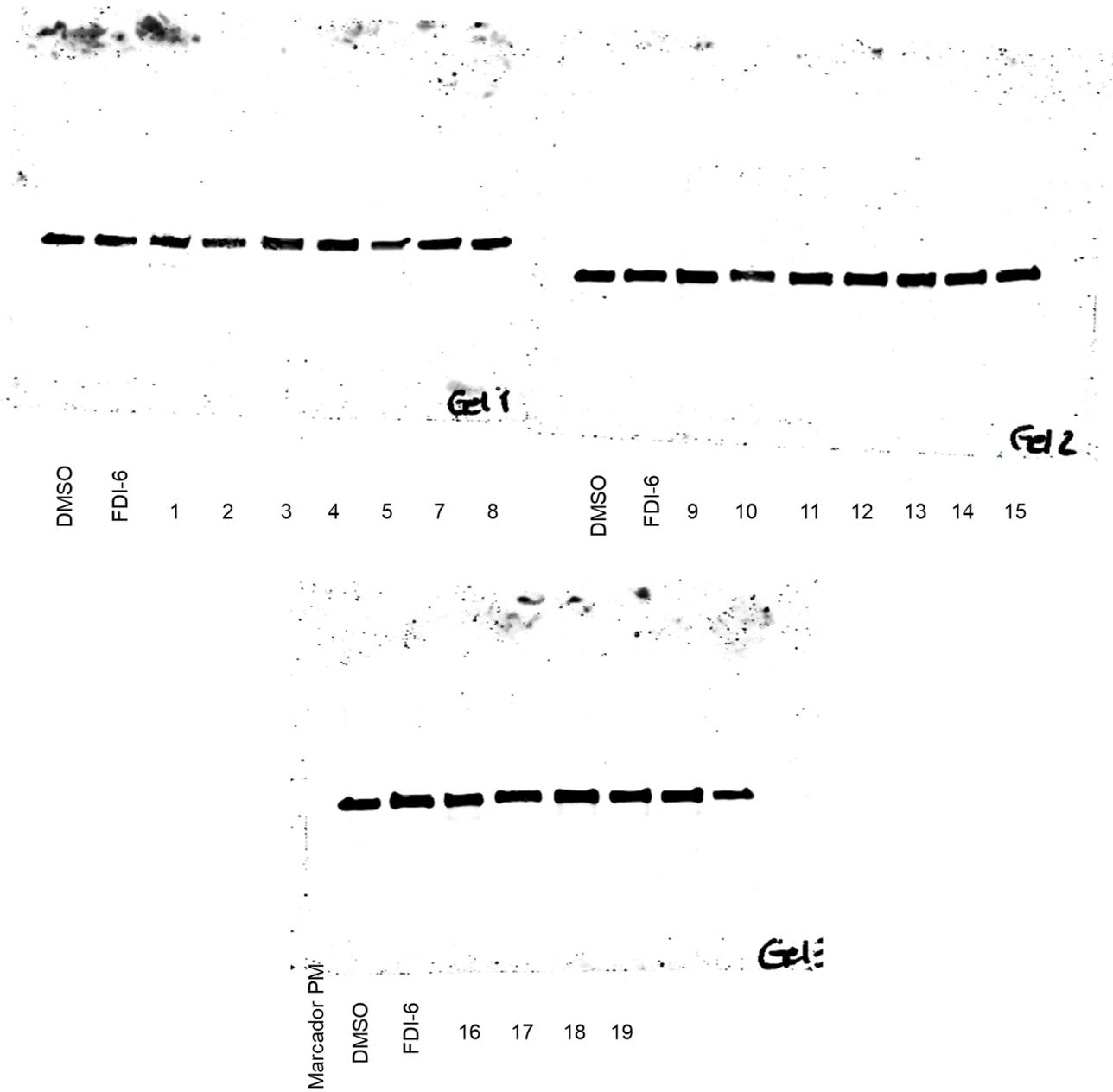
- 3ª repetición

FOXM1



**Figura 52.** 3a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos FDI-6, 1-19. Con anticuerpo para FOXM1.

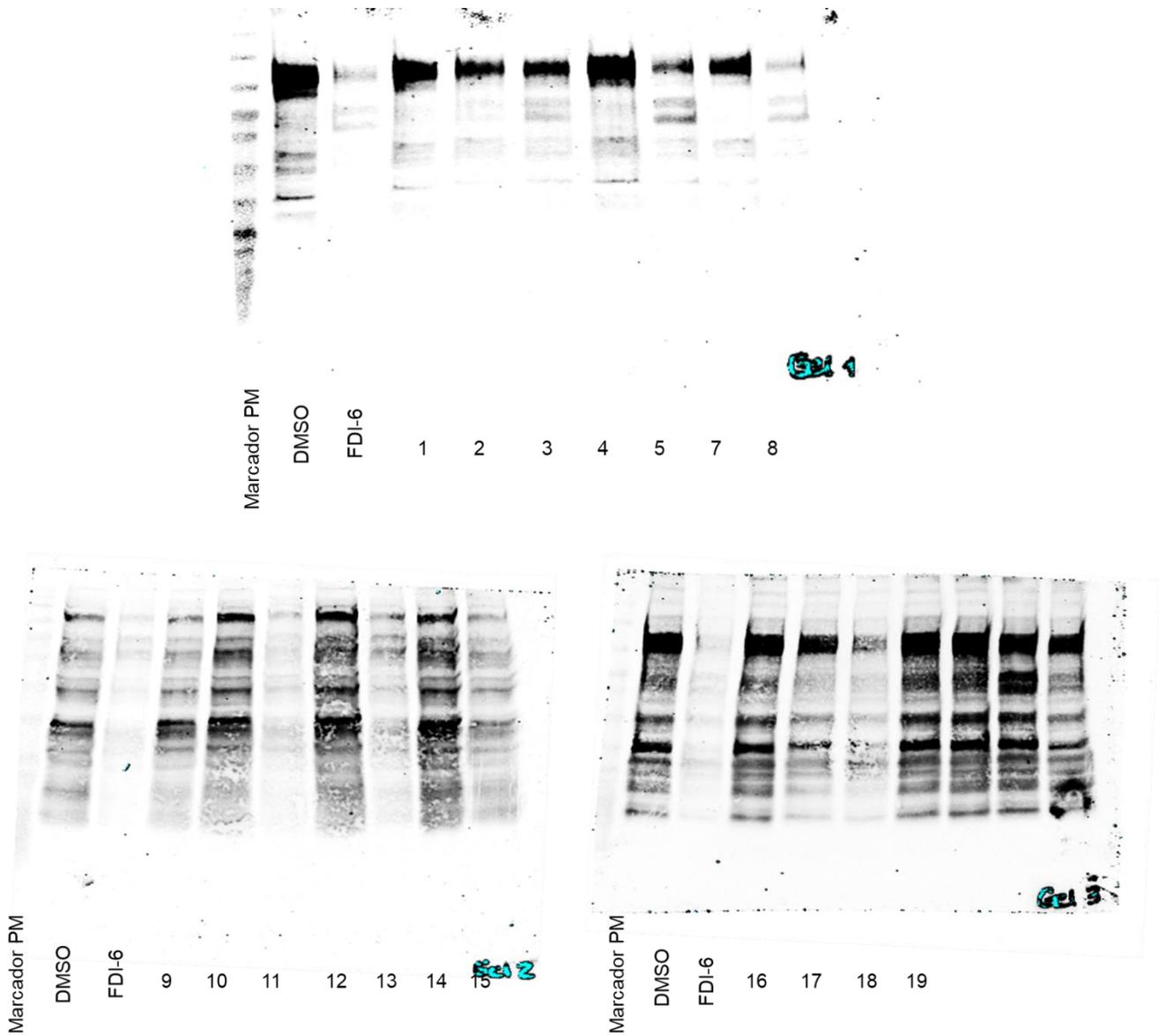
β-actina



**Figura 53.** 3a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos FDI-6, 1-19. Con anticuerpo para β-actina.

- 4ª repetición

FOXM1



**Figura 54.** 4a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos **FDI-6, 1-19**. Con anticuerpo para FOXM1.

β-actina

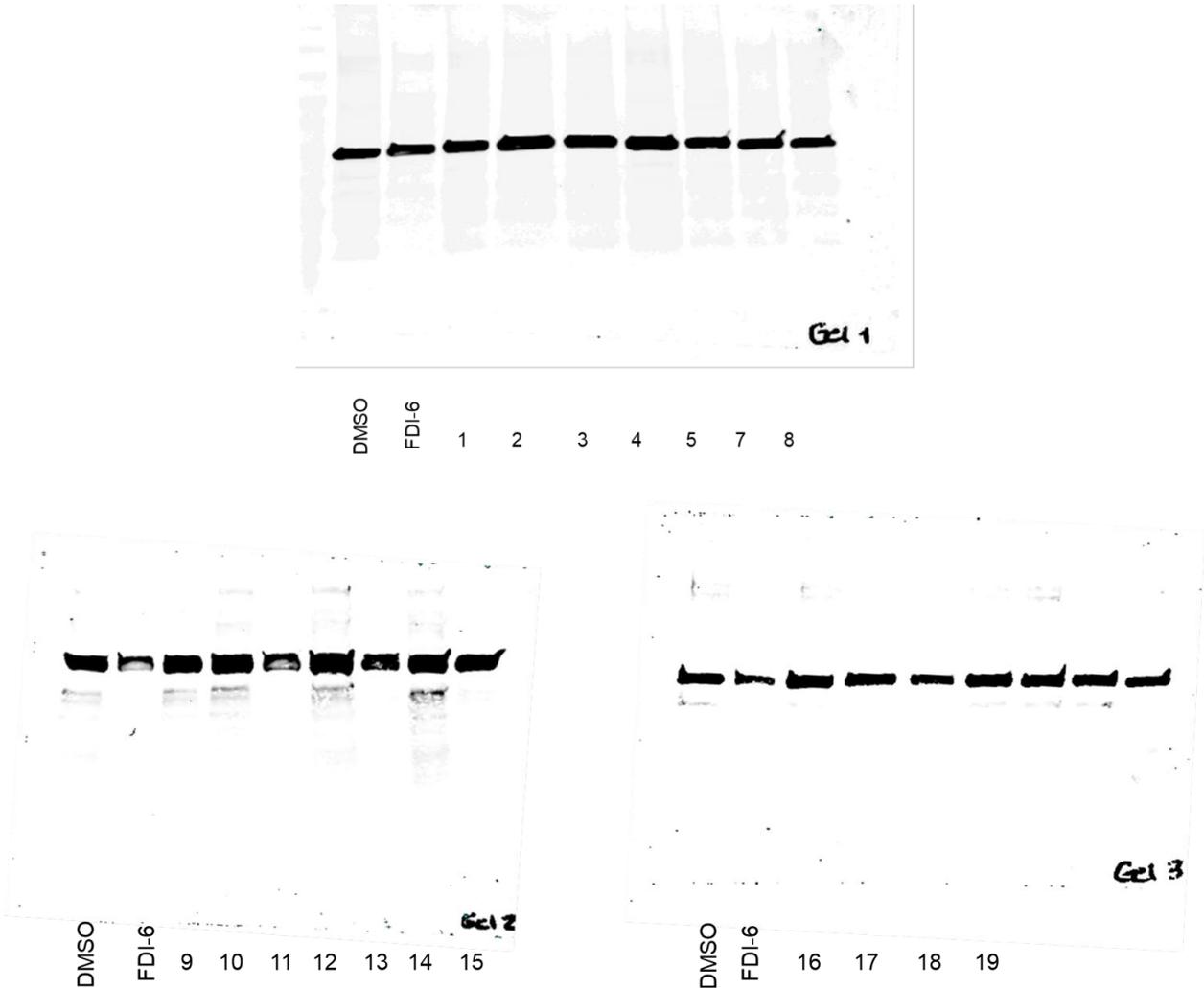


Figura 55. 4a repetición del Western Blot para medir la expresión de la FOXM1 después del tratamiento con los compuestos FDI-6, 1-19. Con anticuerpo para β-actina.

#### **12.4. Procedimiento detallado de los ensayos de viabilidad celular con MTT**

Se sembraron las células de la línea MDA-MB-231 en placas de 96 pozos (aproximadamente 2000 células/pozo) y se incubaron por 12 horas. Los compuestos **FDI-6**, **1**, **7** y **17** fueron agregados a diferentes concentraciones (100, 25, 6.25, 1.56, 0.39 y 0.098  $\mu$ M) y se incubaron por 72 horas. Se succionó el medio, se agregaron 30  $\mu$ L de una solución de MTT (3 mg/mL) y 120  $\mu$ L de medio fresco, y se continuó la incubación por 3 horas. Se succionó el medio nuevamente y los cristales precipitados fueron disueltos usando 100  $\mu$ L de DMSO en cada pozo. La absorbancia de la solución resultante en cada pozo fue medida a 570 nm. Los datos fueron analizados usando Prism 8. Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado biológico y técnico.

#### **12.5. Procedimiento detallado del ensayo CETSA**

Este procedimiento se hizo basándonos en el protocolo de ensayos CETSA previamente reportado.<sup>70</sup>

Se sacaron del refrigerador el medio RPMI y la tripsina-EDTA y se pusieron en el baño de agua del cuarto de cultivo a 36 °C. Se retiraron las células de la incubadora. Se revisaron las células en caja Falcon T75 usando el microscopio, se verificó su confluencia y adherencia a la caja. Se retiró el medio RPMI que contenía la caja y se hizo un lavado agregando 10 mL de DPBS que se retiraron después de agitar suavemente. Se agregaron 2 mL de tripsina-EDTA y se regresó la caja por 5 minutos a la incubadora. Una vez pasado el tiempo se sacó de la incubadora, se golpeó suavemente la caja lateralmente y se agregaron 8 mL de RPMI, homogeneizando la suspensión generada. La suspensión se transfirió a un tubo Corning nuevo de 15 mL. Se centrifugó por 5 min a 1250 rpm a 26 °C. Se observó la formación de un botón de células al fondo del tubo. Se retiró el medio con cuidado de no llevarse el botón. El botón se resuspendió con 7 mL de medio RPMI.

Se prepararon 6 cajas Falcon T75 nuevas y a cada una se le agregó 1 mL de la suspensión de células, completando a un volumen final de 10 mL en cada caja usando medio RPMI. Las cajas se incubaron hasta que en estas se observara un 80-90% de confluencia (aproximadamente después de 48 horas).

## **ANEXO II—DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

---

Se retiró el medio RPMI que contenía la caja y se hizo un lavado agregando 10 mL de DPBS que se retiraron después de agitar suavemente. Se agregaron 7 mL de DPBS. Usando una espátula de plástico (Scraper) las células se despegaron raspando la mayor zona posible. Usando una pipeta serológica se circuló el DPBS por toda la caja 3 veces y se homogenizó la solución hasta no ver cúmulos de células. Las suspensiones formadas en cada caja se juntaron en un tubo cónico de 50 mL. Se determinó la cantidad de células por mL en dicha suspensión usando la cámara de Neubauer.

Se determinó la cantidad de suspensión necesaria para tener 10 muestras de 1,500,000 células cada una = 15,000,000 células en total. El volumen de suspensión que no fuera necesario para llegar a ese número se retiró con una pipeta serológica y se desechó. La suspensión se centrifugó por 5 min a 1250 rpm a 26 °C. Se observó la formación de un botón de células al fondo del tubo.

Mientras se centrifugaba se etiquetaron 10 tubos eppendorf para PCR de 0.2 mL con las siguientes temperaturas: 37, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 °C. Se retiró el DPBS con cuidado de no llevarse el botón. Se resuspendió el botón usando 100 µL de DPBS y 1 µL de inhibidor de proteasas por muestra = 1000 µL de DPBS y 10 µL de inhibidor.

A cada uno de los tubos para PCR etiquetados se le agregaron 100 µL de la suspensión generada, homogeneizando entre cada toma de la suspensión. Los tubos se colocaron en un recipiente con hielo.

Las muestras se llevaron al termociclador y se configuró cada una de las temperaturas a usar por un periodo de 3 minutos e intervalos de 15 segundos entre cada muestra. En cada temperatura se introdujo la muestra correspondiente al equipo y una vez pasados los 3 minutos se retiró y se colocó en un recipiente con hielo seco, se repitió con cada muestra el procedimiento.

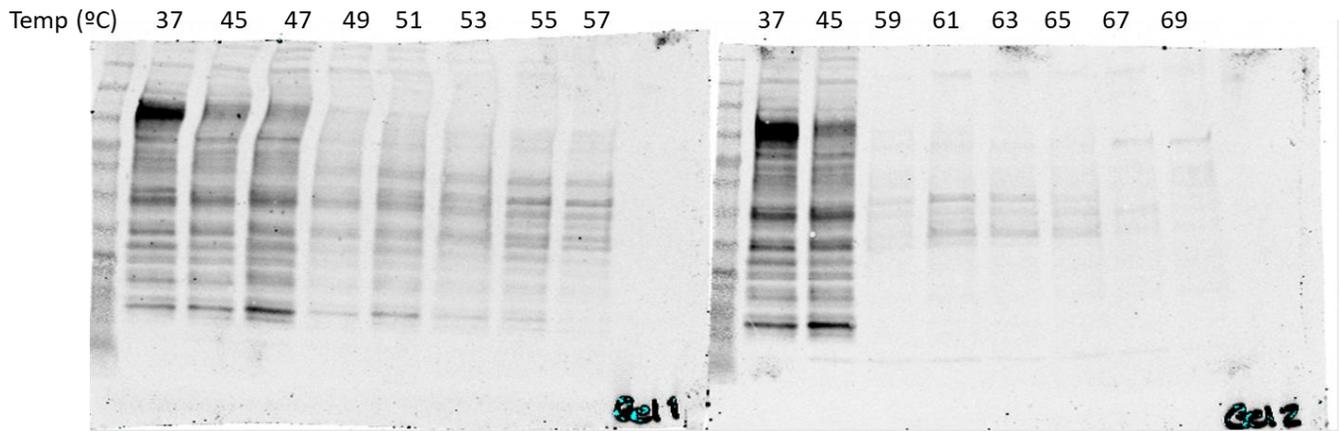
Una vez teniendo listas todas las muestras, las células se lisaron por shock térmico y se dejaron en el congelador a -78 °C toda la noche para ser usadas al día siguiente. Se descongelaron las muestras manteniéndolas en hielo. Se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y 4 °C. Se observó la formación de un botón en cada tubo, se retiraron 85 µL del sobrenadante cuidando NO tocar el botón ni las paredes del tubo. Se determinó la cantidad de proteína en las muestras de 37,

44 y 45 °C usando el ensayo de Bradford: con la cantidad de proteína determinada para la muestra de 44 °C se determinó el volumen necesario para tener 30 µg de proteína.

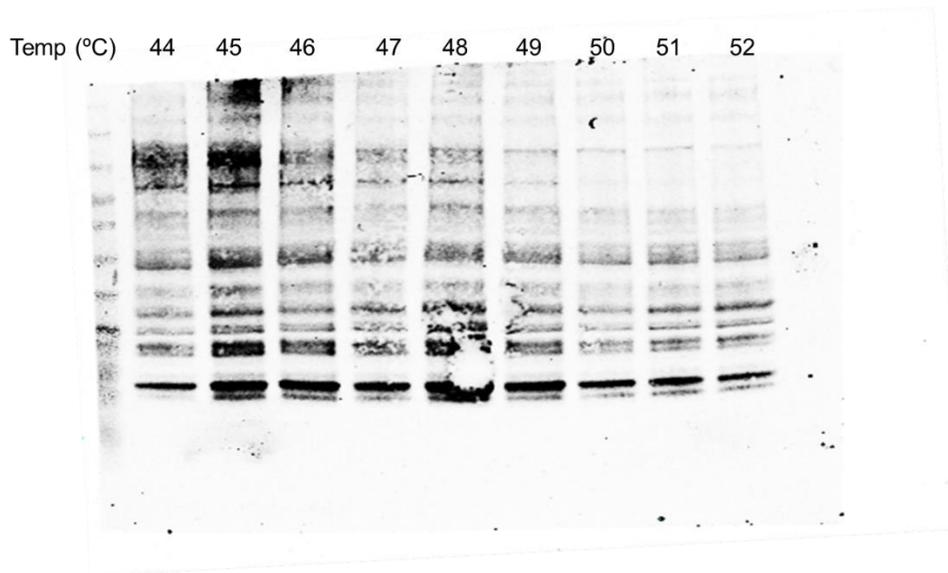
Se llevó a cabo un ensayo de Western Blot para todas las muestras siguiendo el procedimiento previamente descrito para esta técnica, cargando la cantidad de muestra determinada para la muestra de 44 °C.

Los resultados se procesaron con el programa ImageJ y Prism 8 tomando como 100% la muestra que mayor intensidad presentó.

**12.6. Resultados de CETSA de cada repetición**



**Figura 56.** Estudio de barrido de temperatura para observar el comportamiento de la FOXM1.



**Figura 57.** 1a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.

Temp (°C) 44 45 46 47 48 49 50 51 52

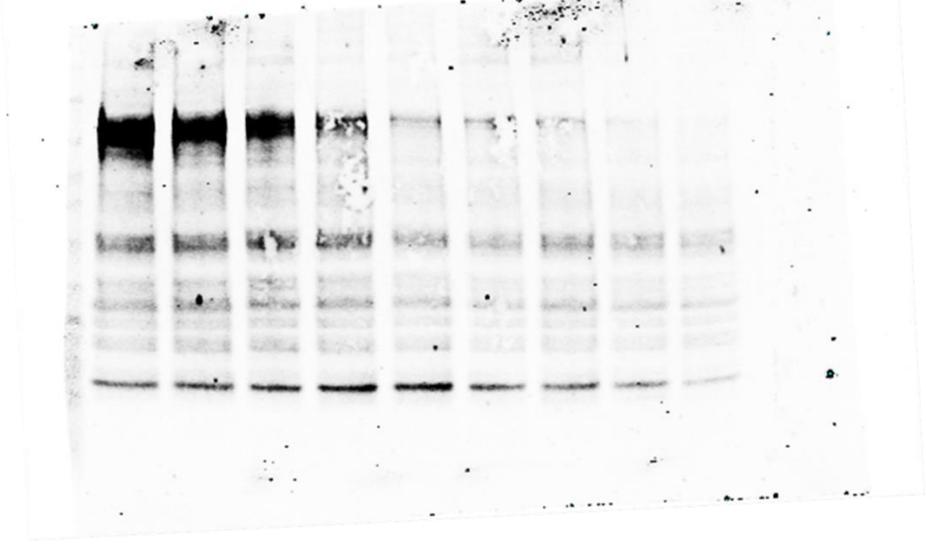


Figura 58. 2a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.

Temp (°C) 44 45 46 47 48 49 50 51 52

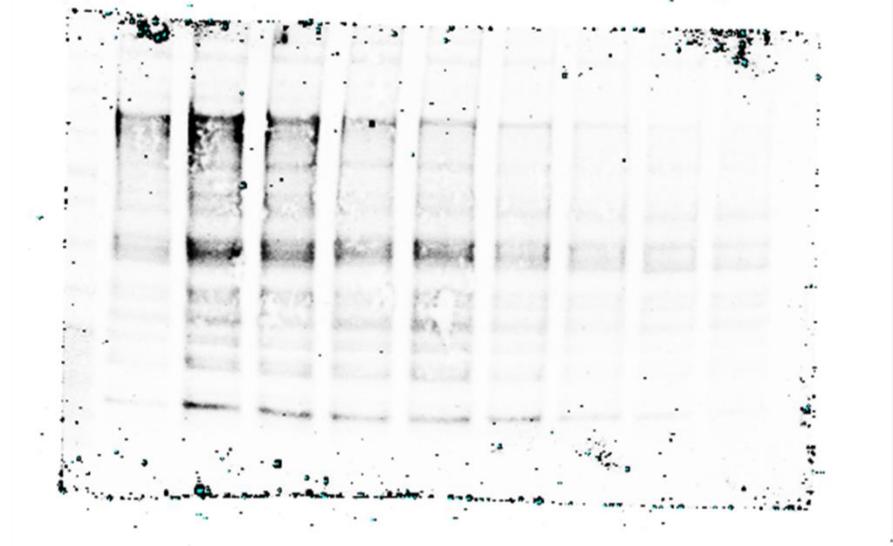
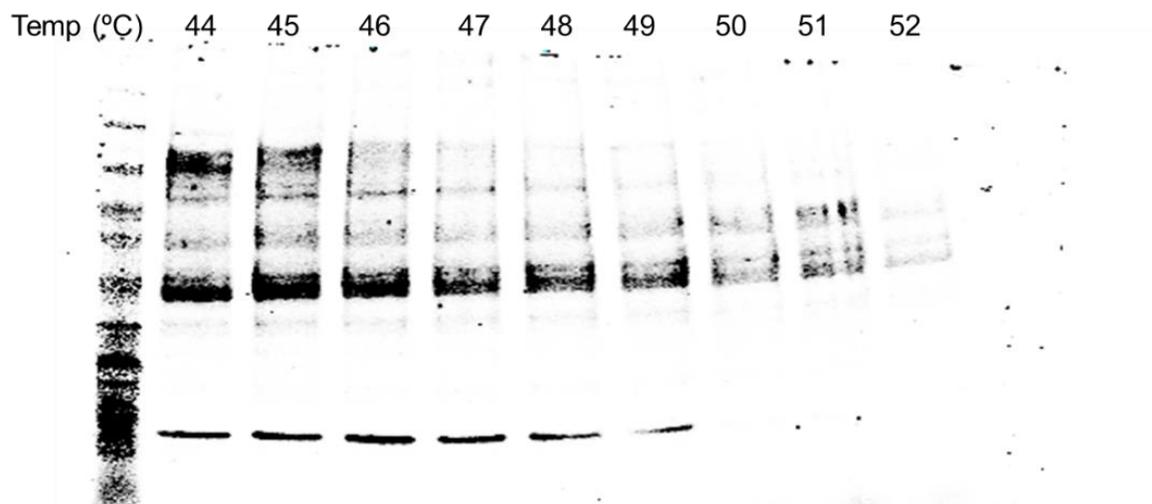
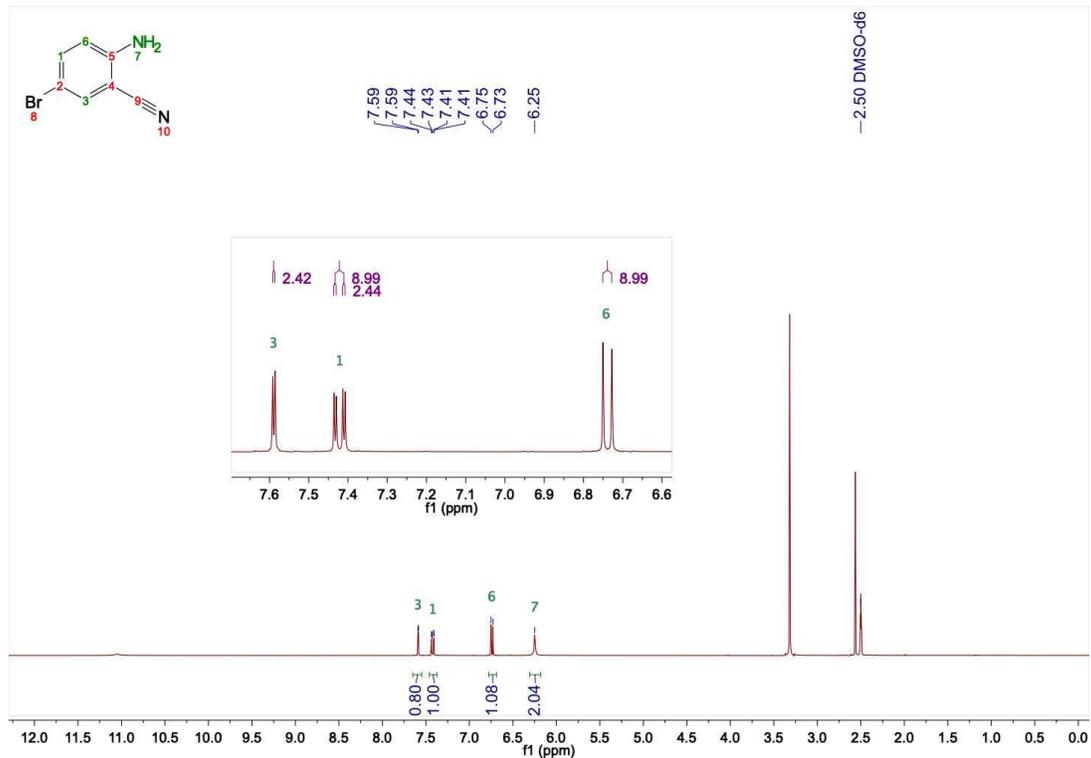
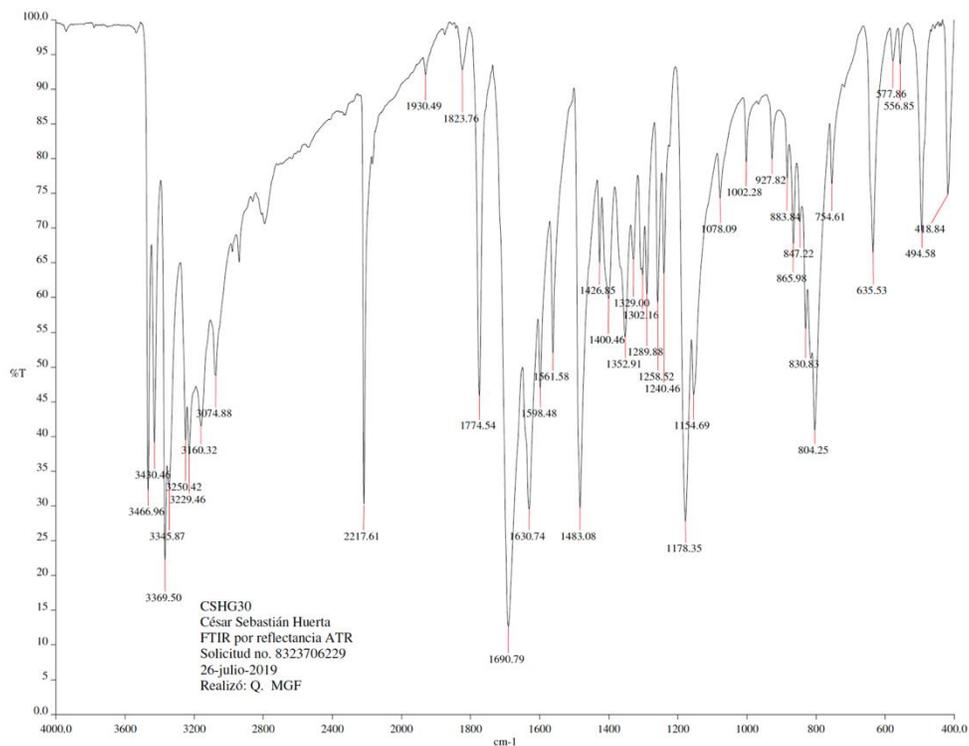


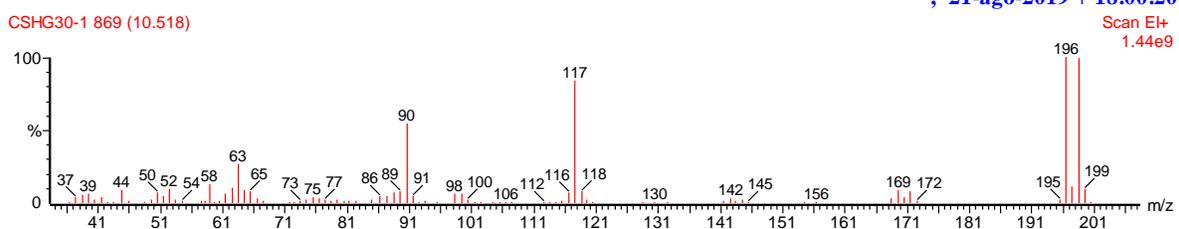
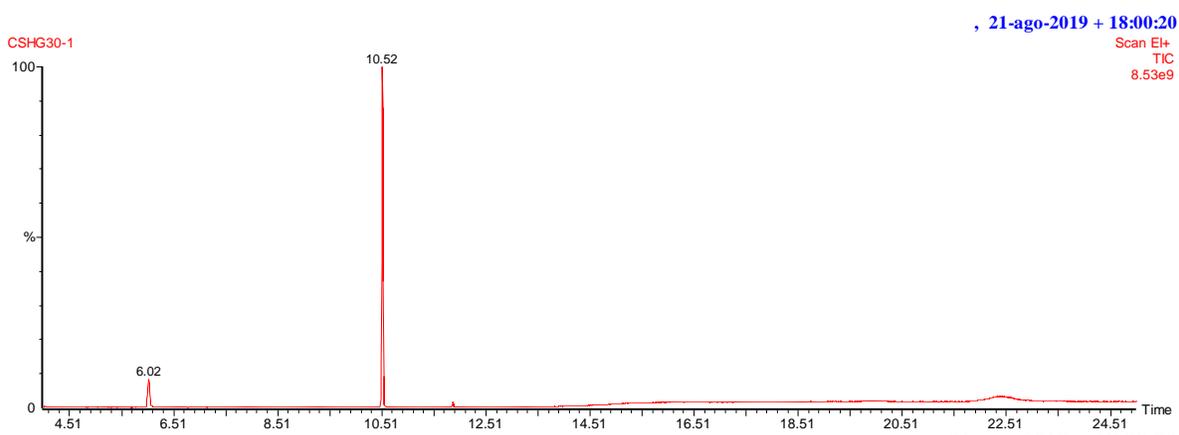
Figura 59. 3a repetición del ensayo CETSA sin tratamiento.



**Figura 60.** 1a prueba del ensayo CETSA con tratamiento de **FDI-6**. 40  $\mu$ M, 3h. de tratamiento.

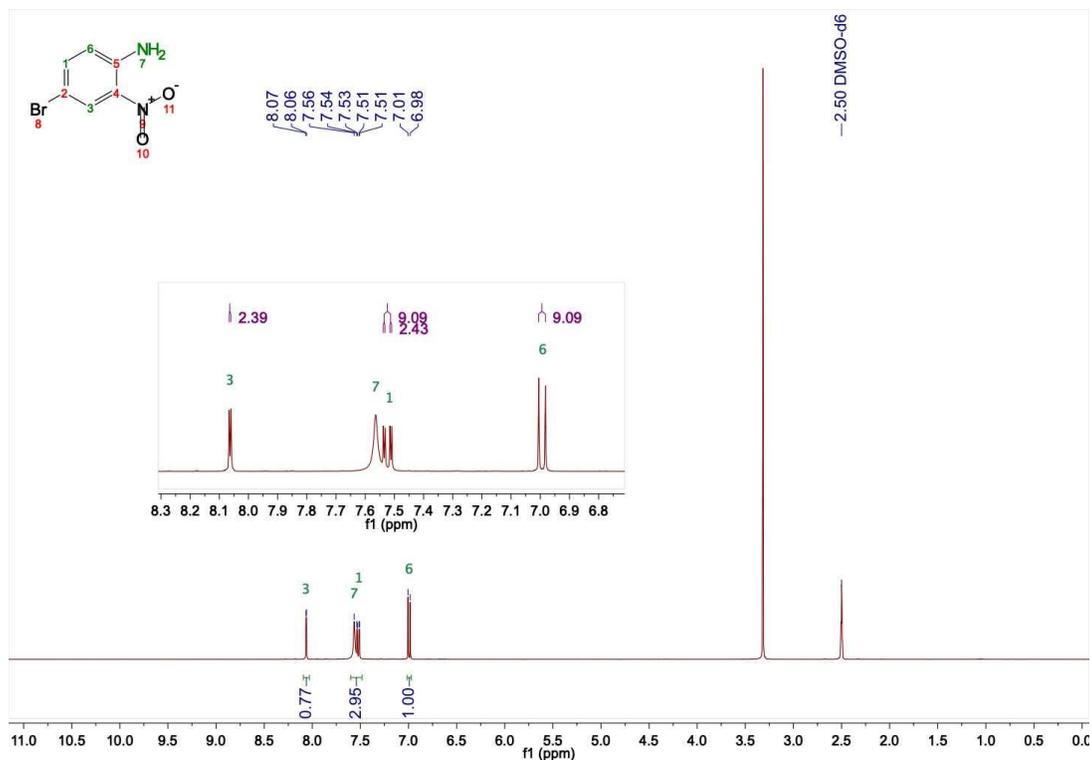
## 13. ANEXO III-ESPECTROS

13.1. 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12)Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12)Espectro 2. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12)

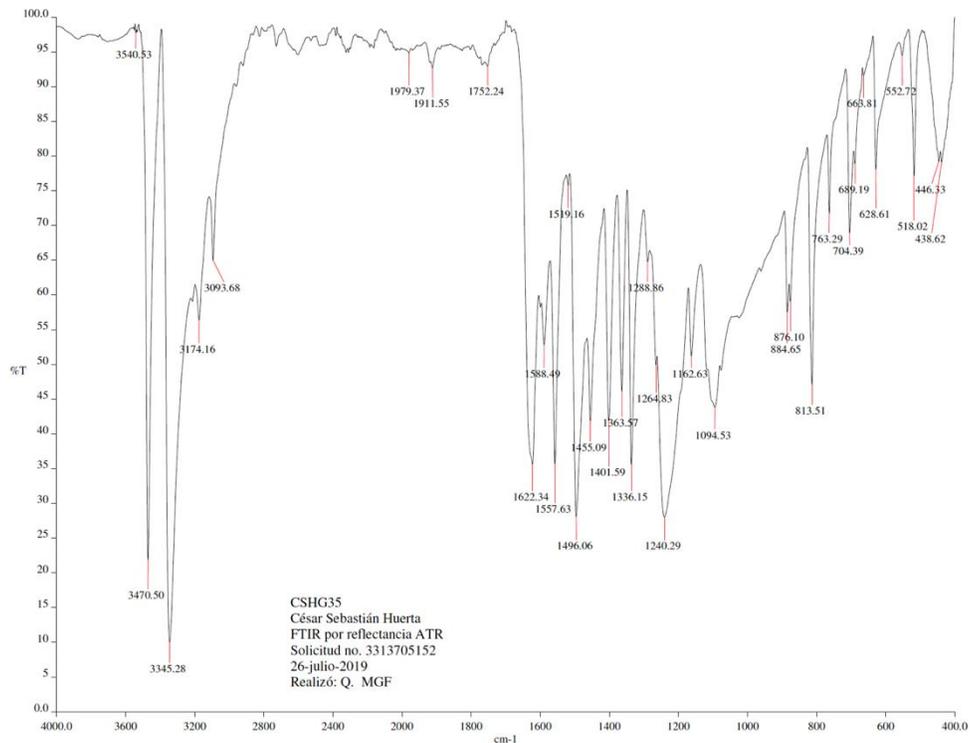


Espectro 3. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto 2-Amino-5-bromobenzonitrilo (A12)

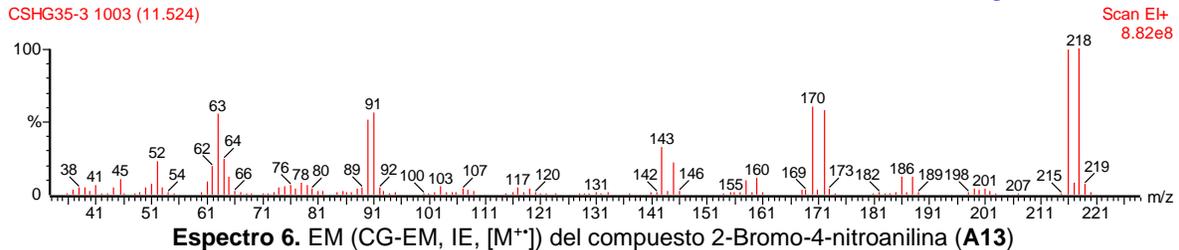
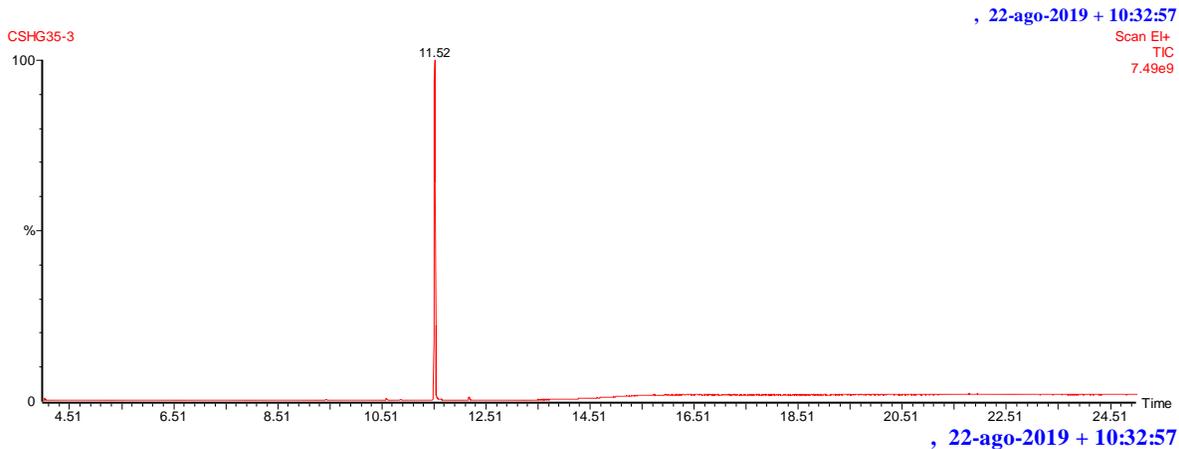
### 13.1. 2-Bromo-4-nitroanilina (A13)



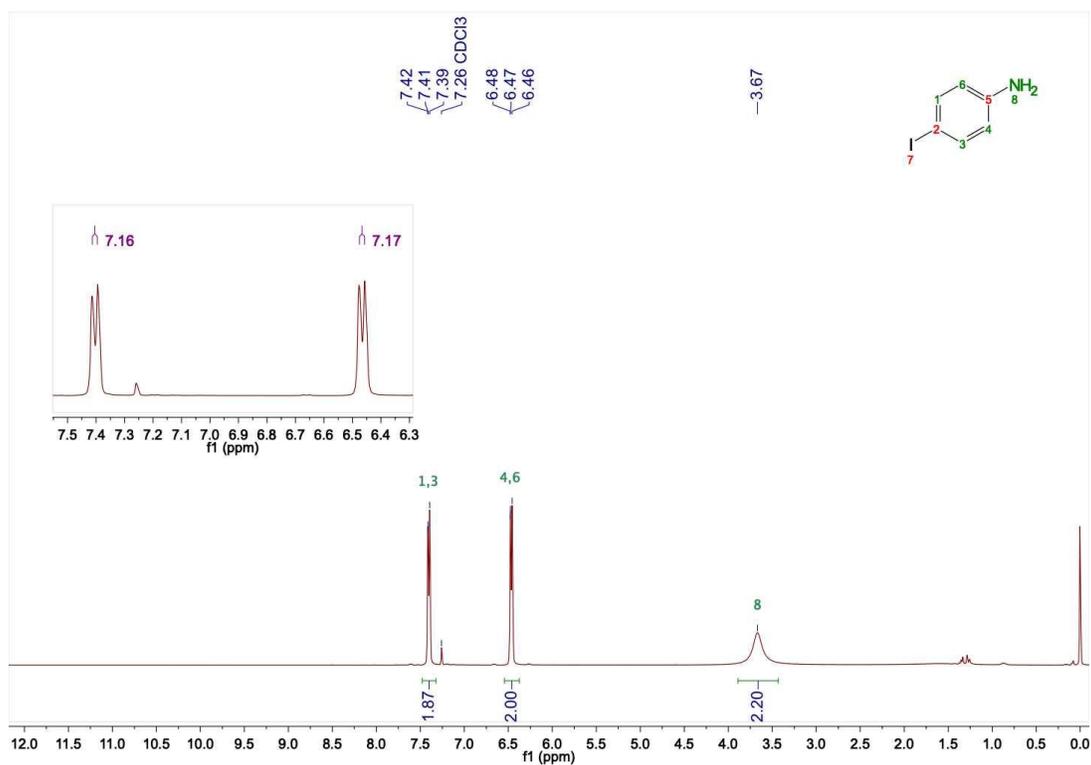
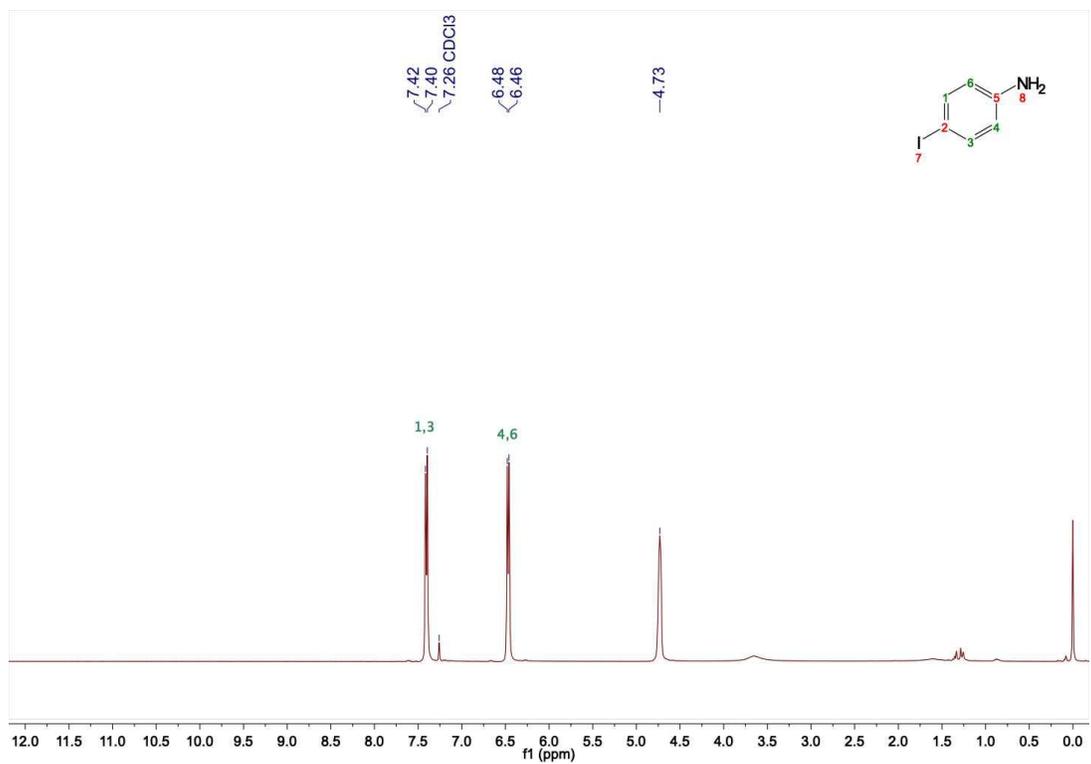
Espectro 4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Bromo-4-nitroanilina (A13)

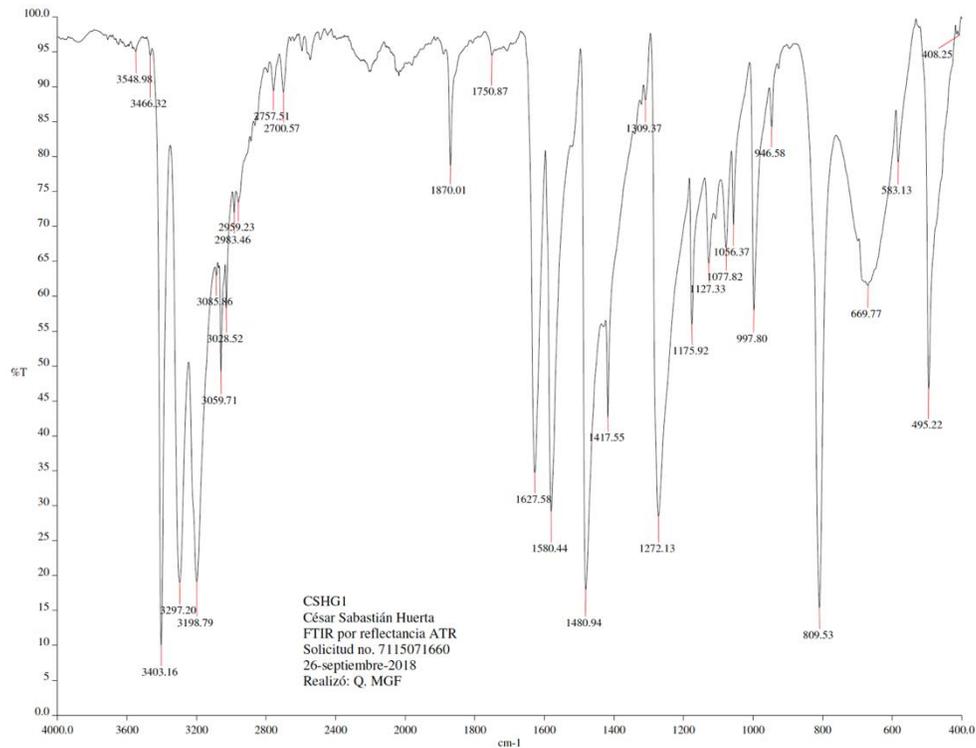


Espectro 5. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Bromo-4-nitroanilina (A13)

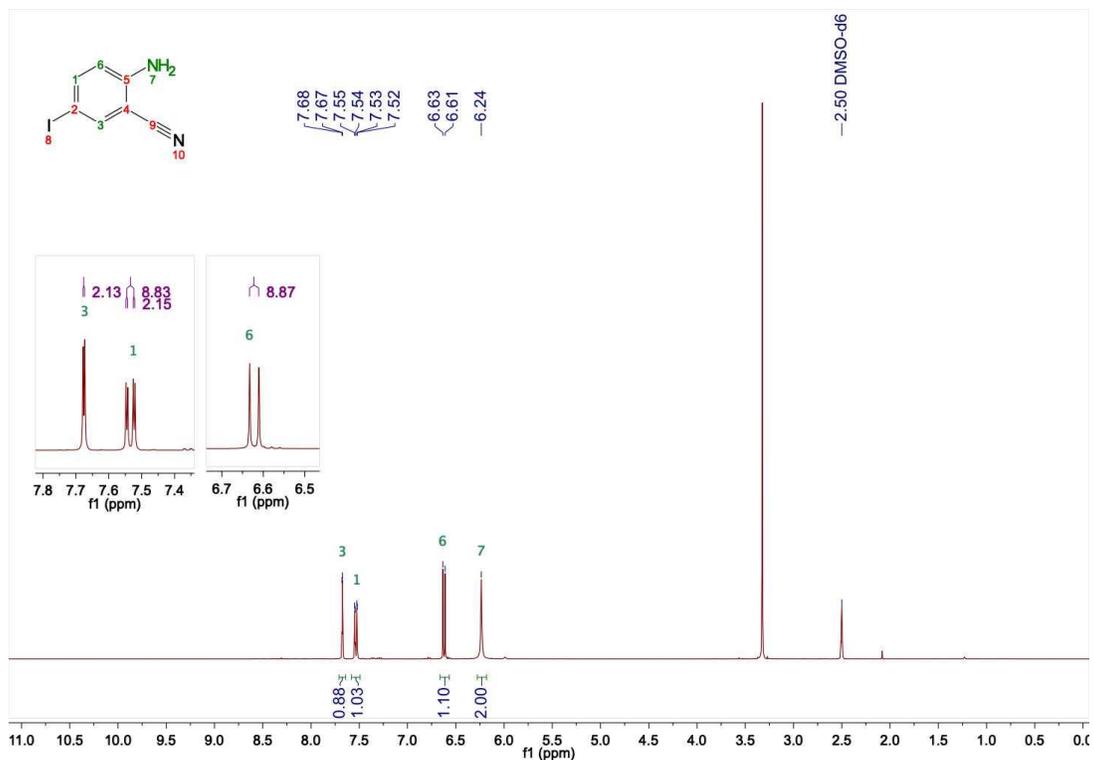


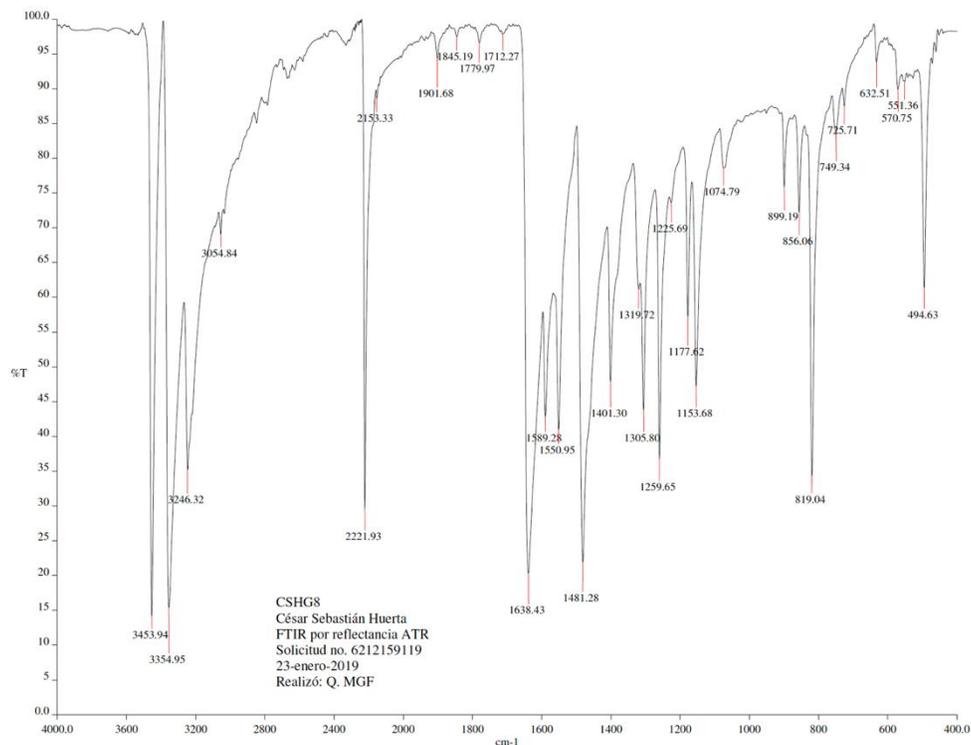
Espectro 6. EM (CG-EM, IE, [M<sup>++</sup>]) del compuesto 2-Bromo-4-nitroanilina (A13)

13.2. *p*-Iodoanilina (A15)Espectro 7. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto *p*-Iodoanilina (A15)Espectro 8. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto *p*-Iodoanilina (A15)

Espectro 9. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto *p*-Iodoanilina (A15)

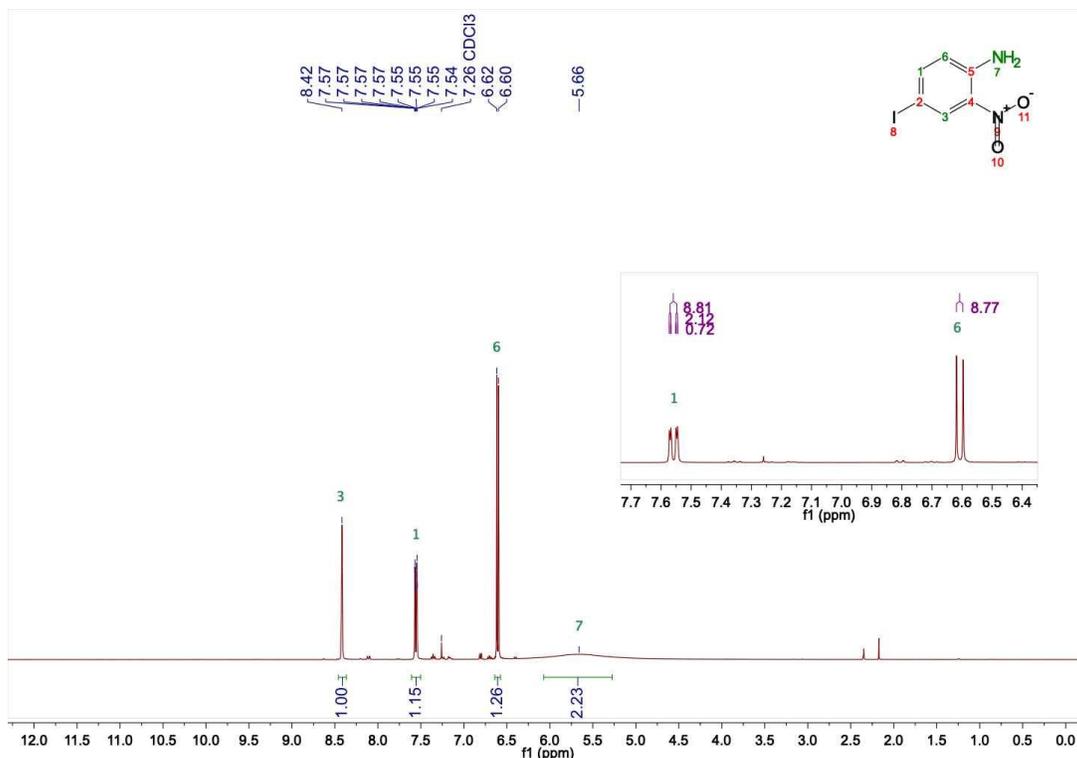
### 13.3. 2-Amino-5-yodobenzonitrilo (A17)

Espectro 10. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Amino-5-yodobenzonitrilo (A17)

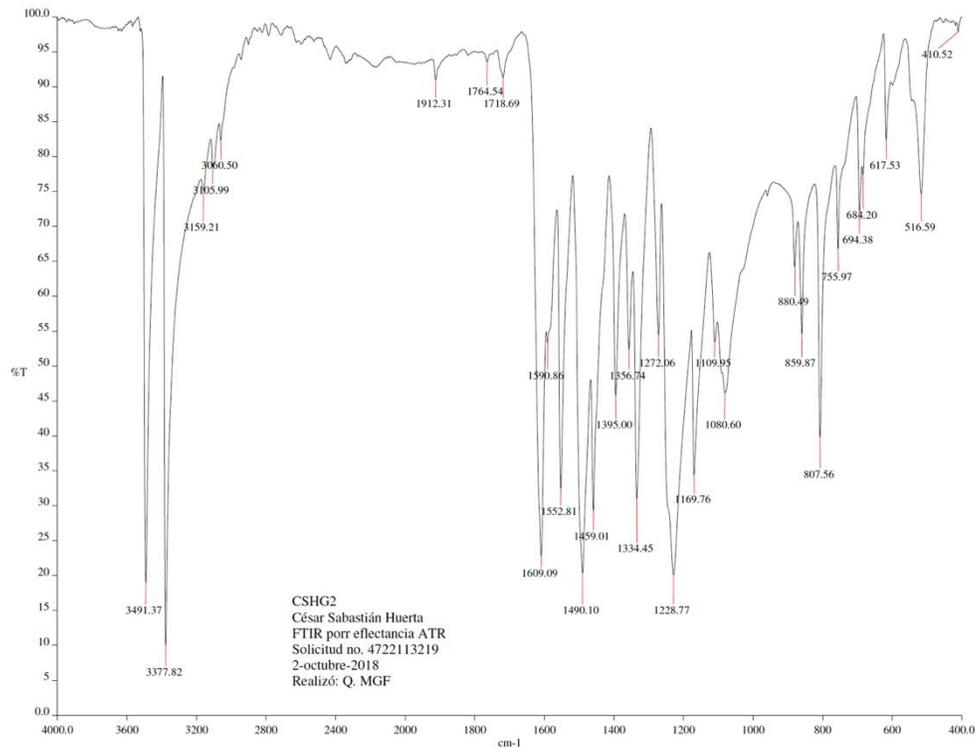


**Espectro 11.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Amino-5-yodobenzonitrilo (**A17**)

**13.1. 2-Nitro-4-yodoanilina (A18)**

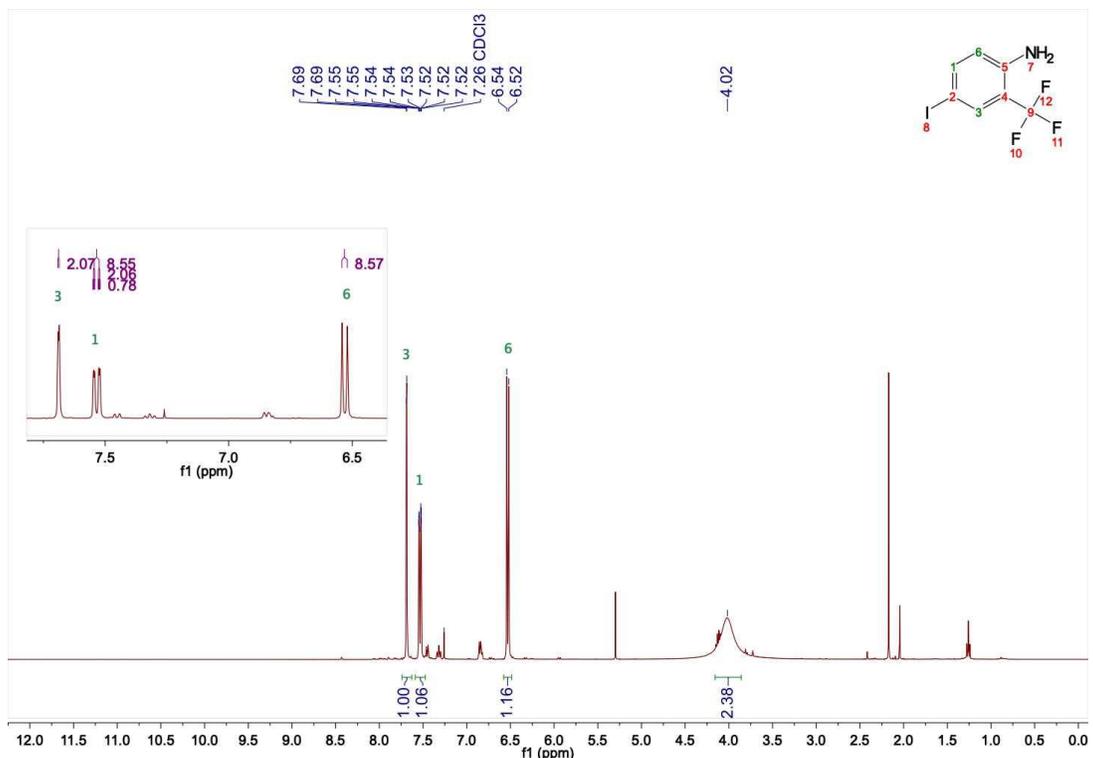


**Espectro 12.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Nitro-4-yodoanilina (**A18**)

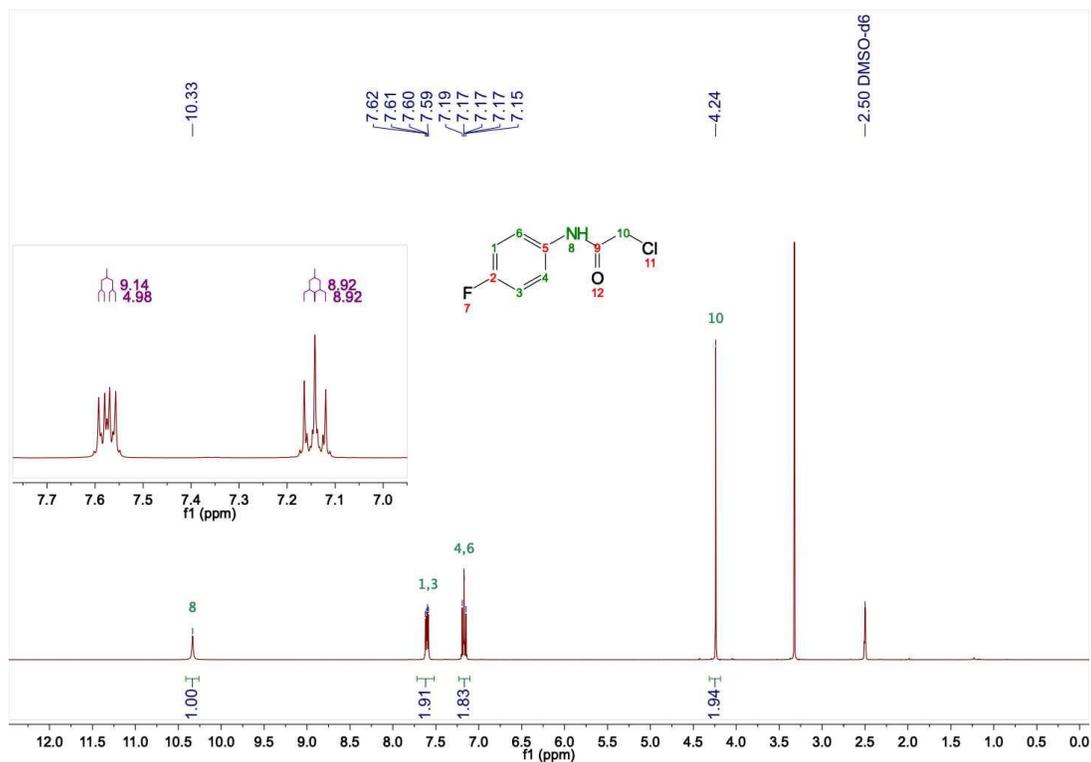
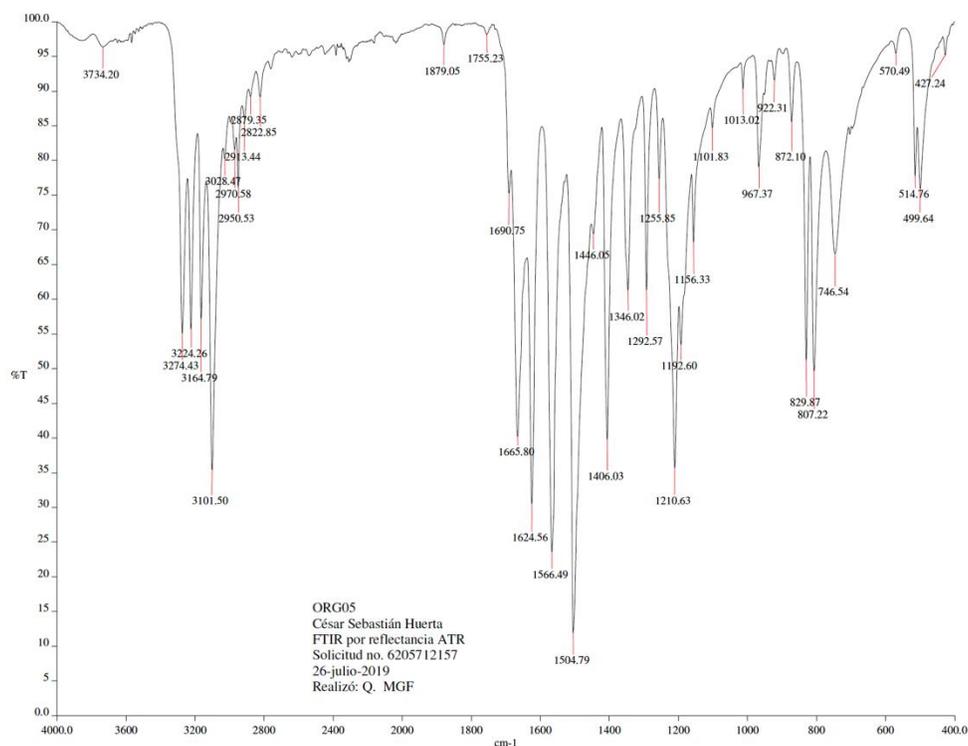


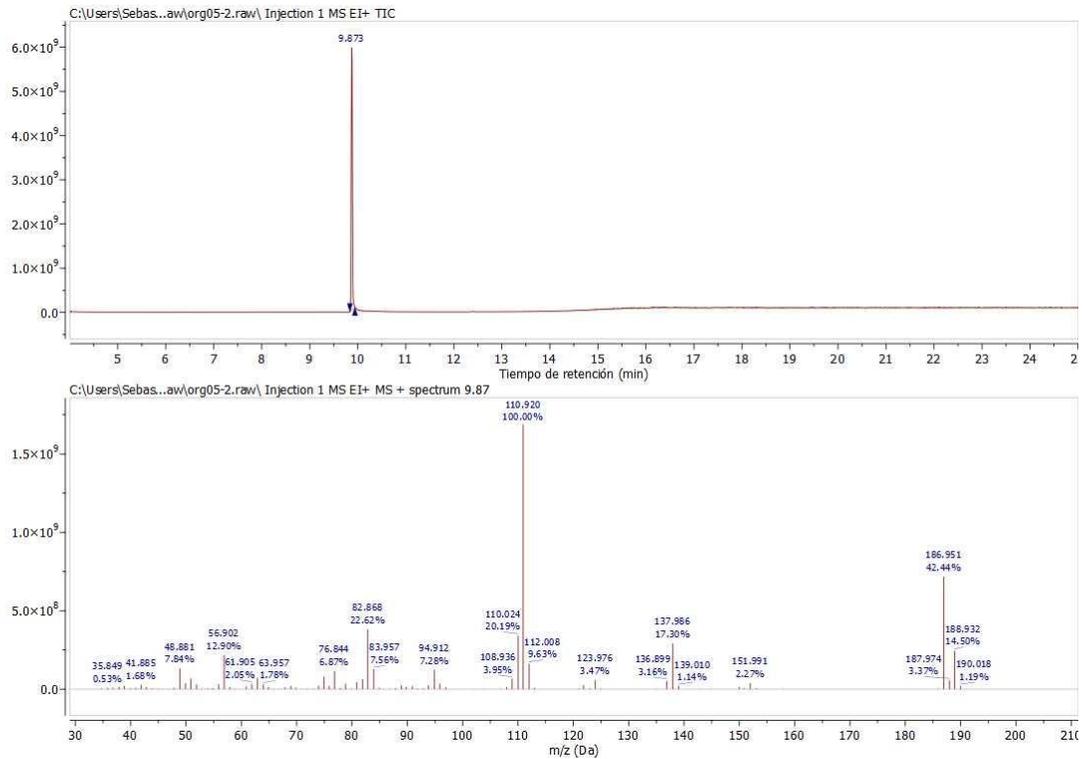
**Espectro 13.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Nitro-4-yodoanilina (A18)

### 13.2. 2-(Trifluorometil)-4-yodoanilina (A19)

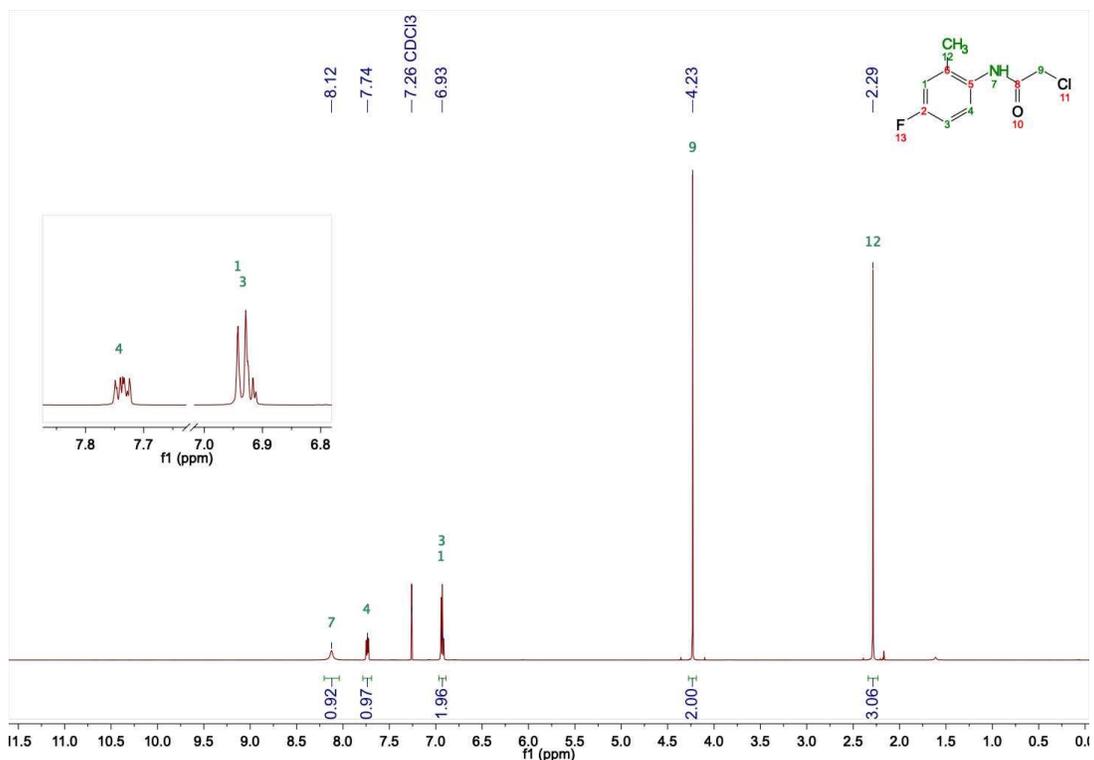


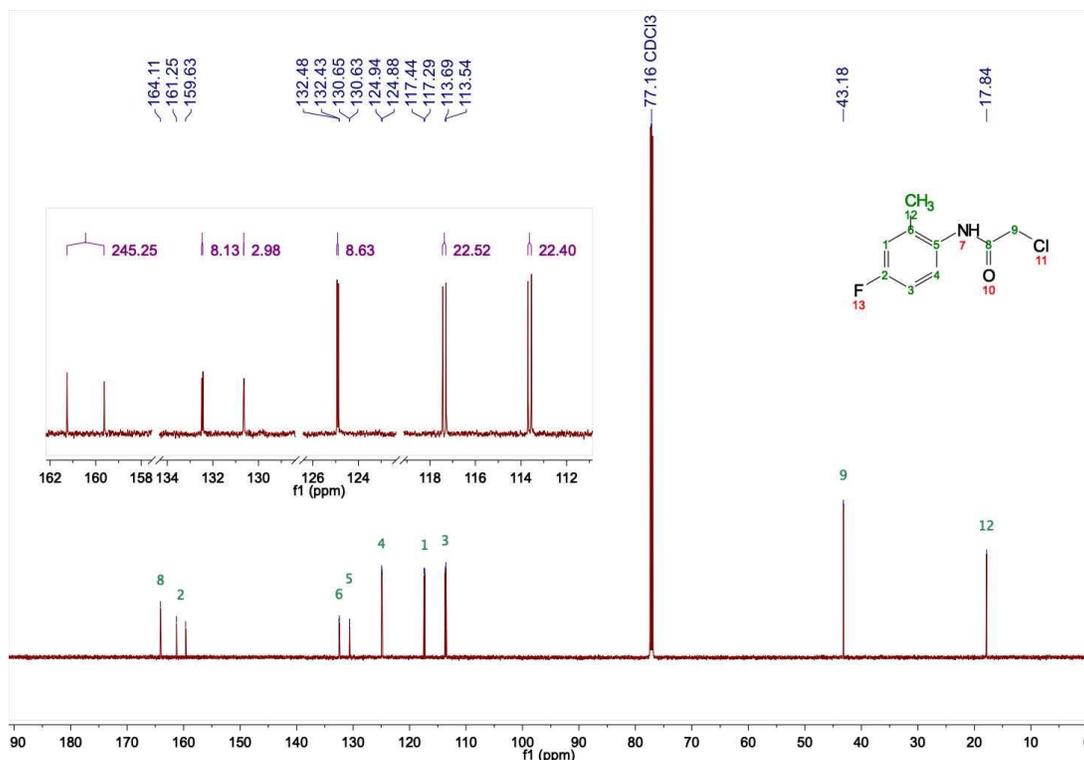
**Espectro 14.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-(Trifluorometil)-4-yodoanilina (A19)

13.3. 2-Cloro-N-(4-fluorofenil)acetamida (CFDI-6)Espectro 15. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-N-(4-fluorofenil)acetamida (CFDI-6)Espectro 16. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Cloro-N-(4-fluorofenil)acetamida (CFDI-6)

Espectro 17. EM (CG-EM, IE,  $[M^{+}]$ ) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluorofenil)acetamida (CFDI-6)

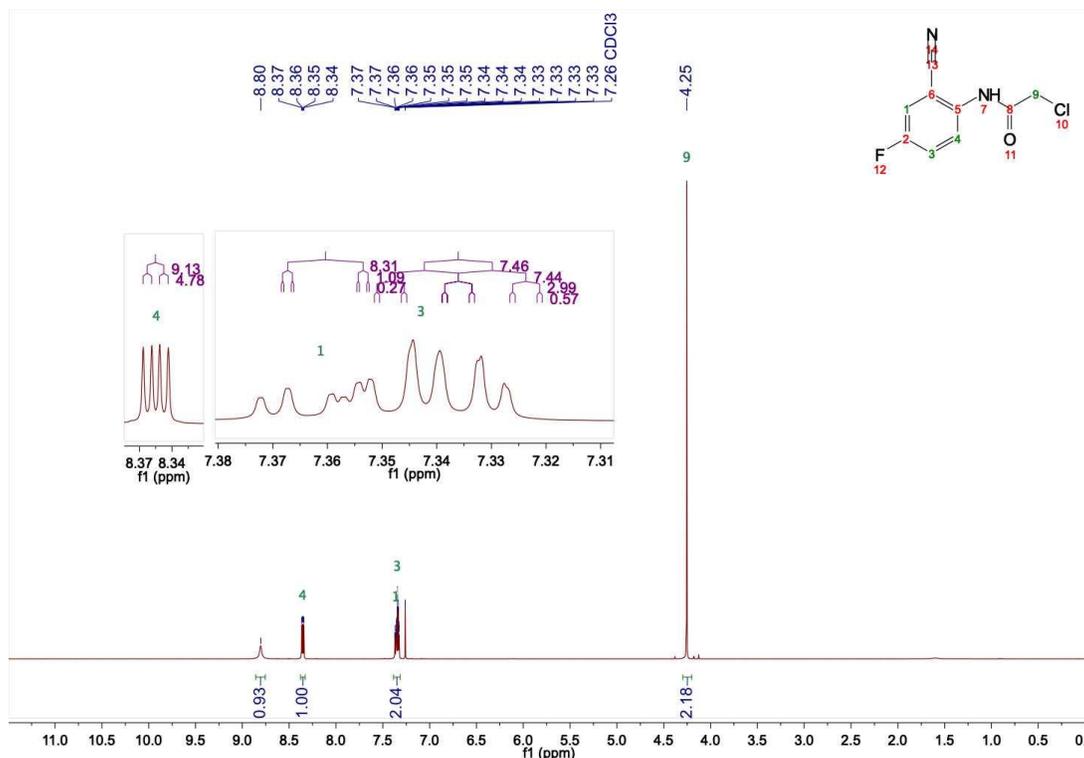
### 13.4. 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-metilfenil)acetamida (C1)

Espectro 18. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-metilfenil)acetamida (C1)

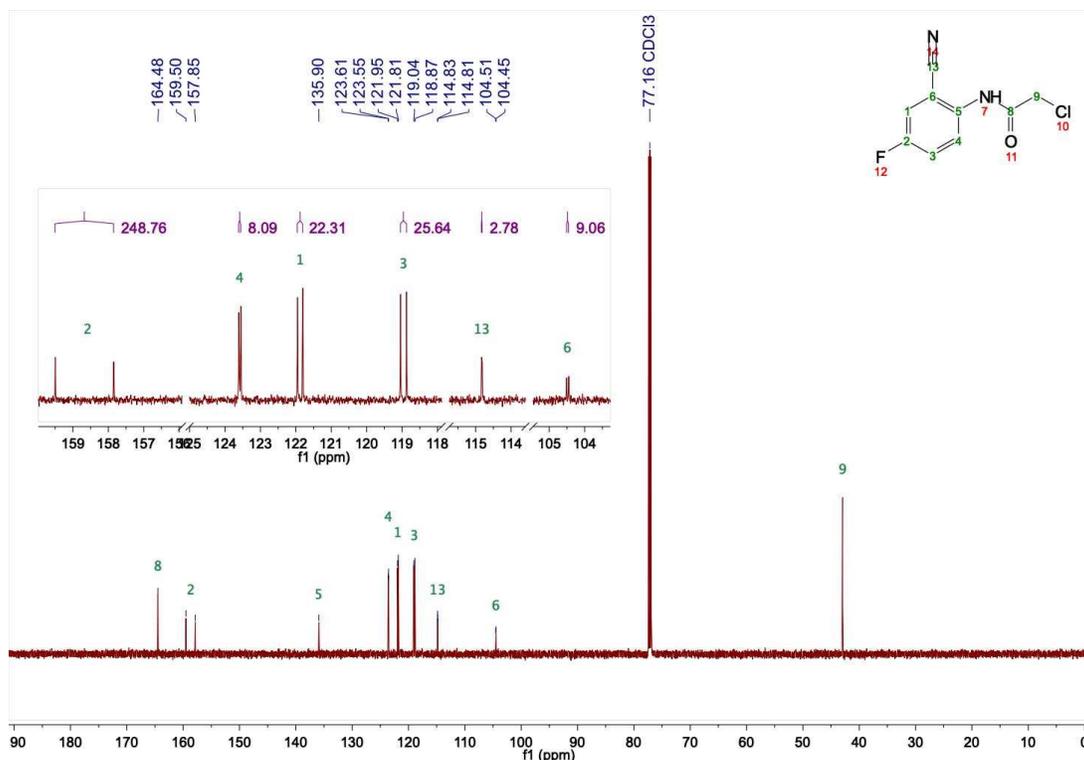


Espectro 19. RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-N-(4-fluoro-2-metilfenil)acetamida (C1)

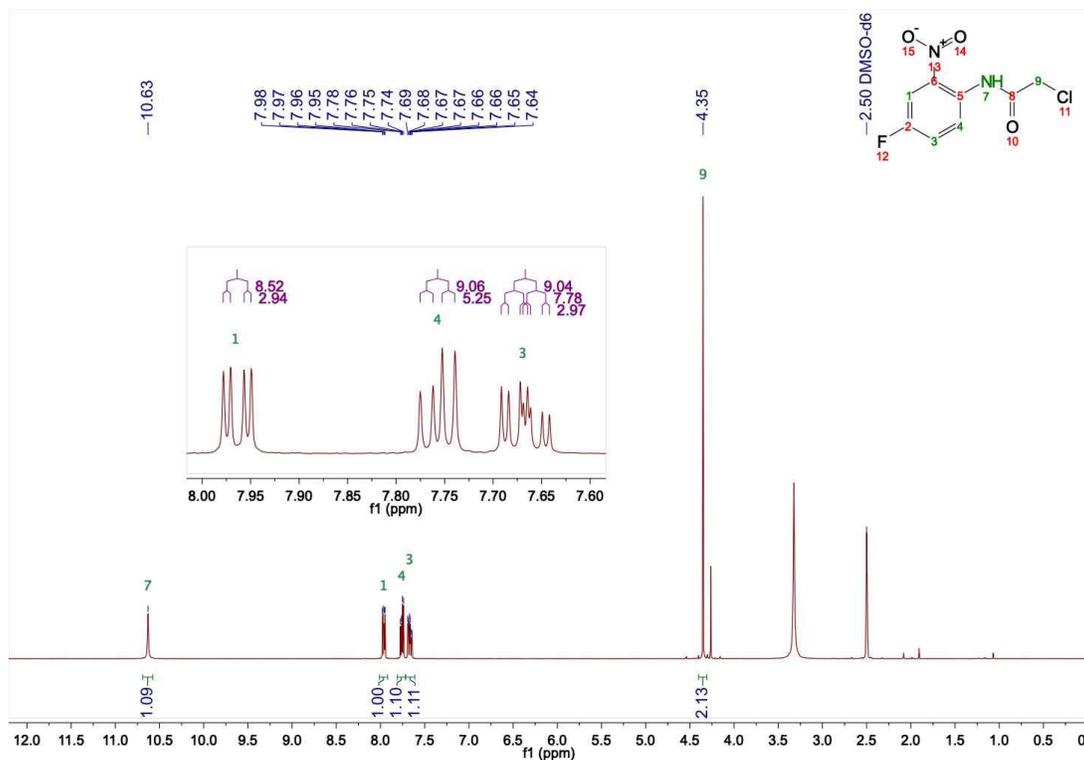
### 13.5. 2-Cloro-N-(2-ciano-4-fluorofenil)acetamida (C2)

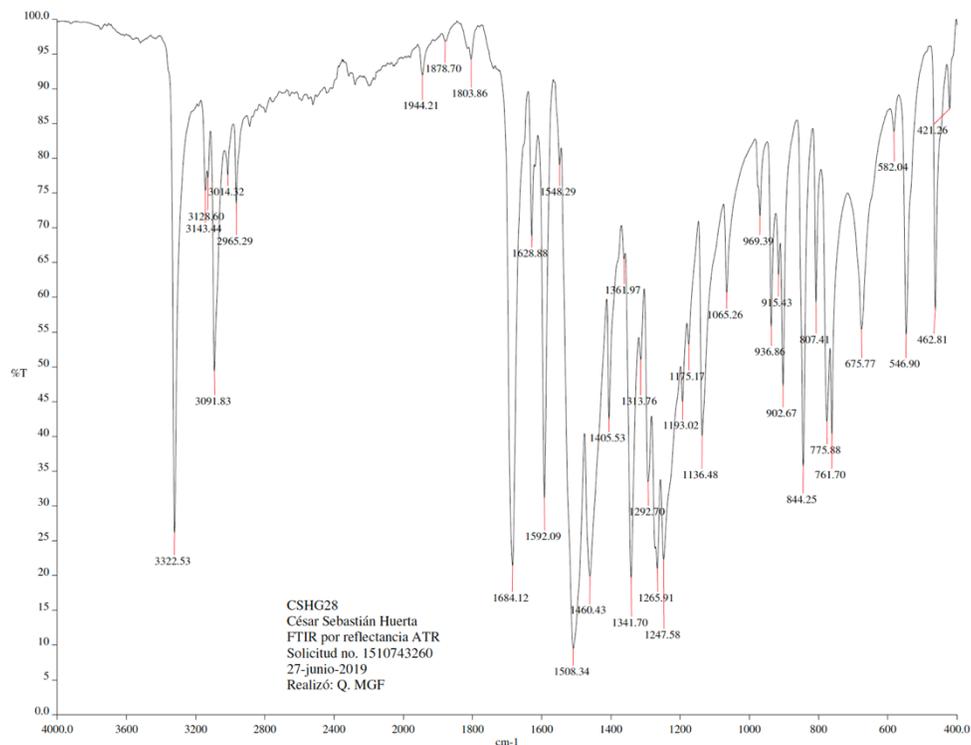


Espectro 20. RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-N-(2-ciano-4-fluorofenil)acetamida (C2)

Espectro 21. RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(2-ciano-4-fluorofenil)acetamida (C2)

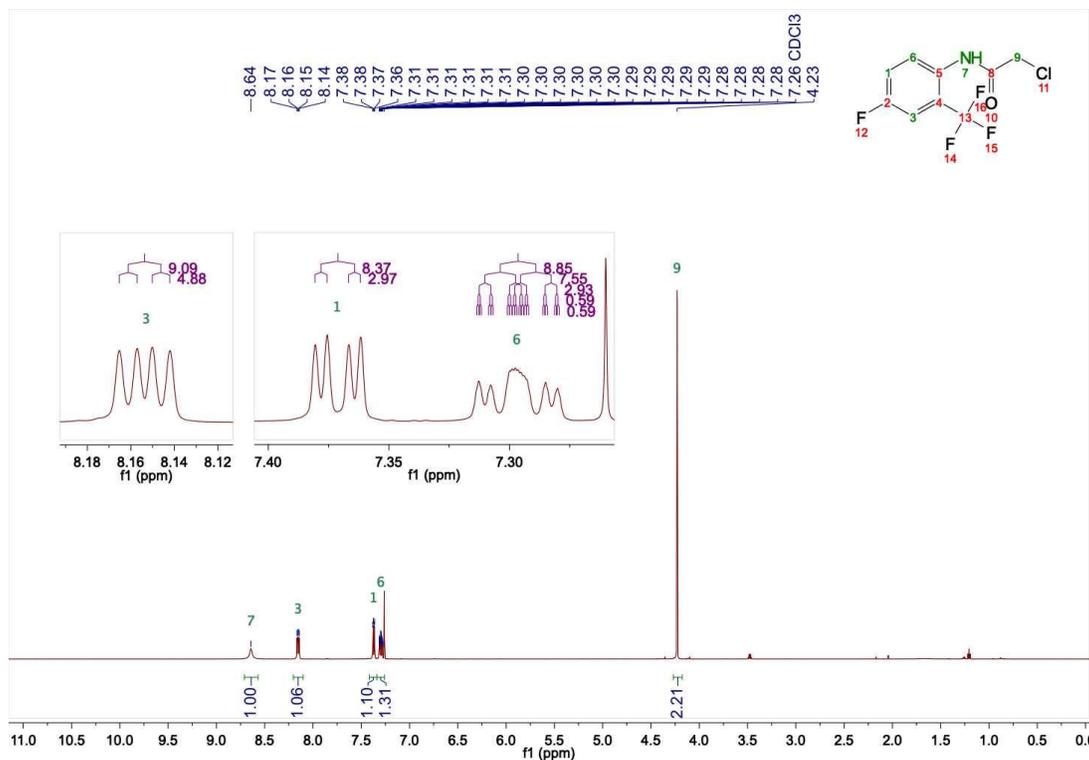
### 13.6. 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)acetamida (C3)

Espectro 22. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)acetamida (C3)

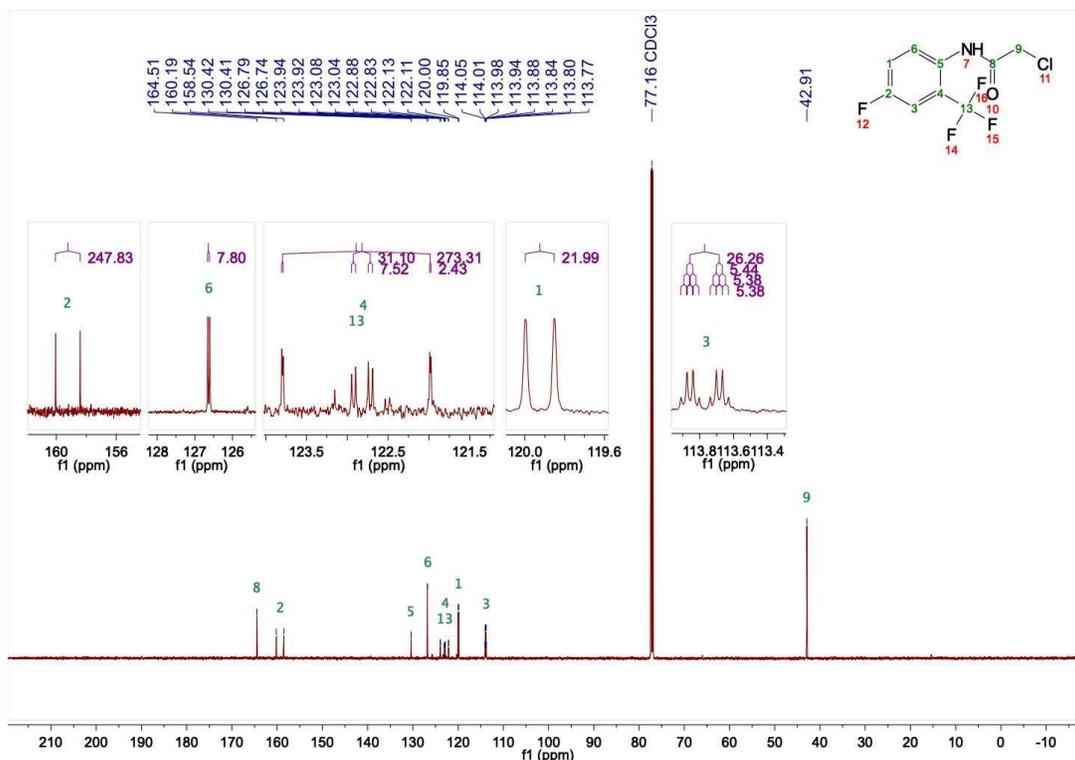


Espectro 23. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)acetamida (C3)

**13.7. 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)acetamida (C4)**

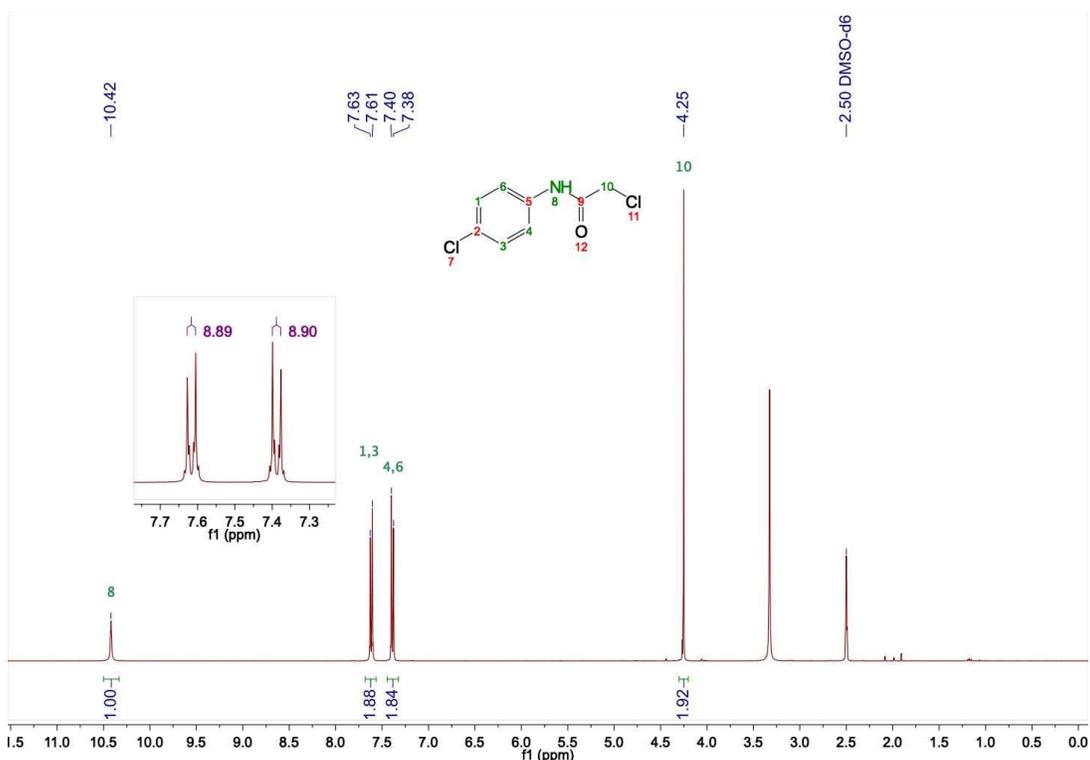


Espectro 24. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)acetamida (C4)

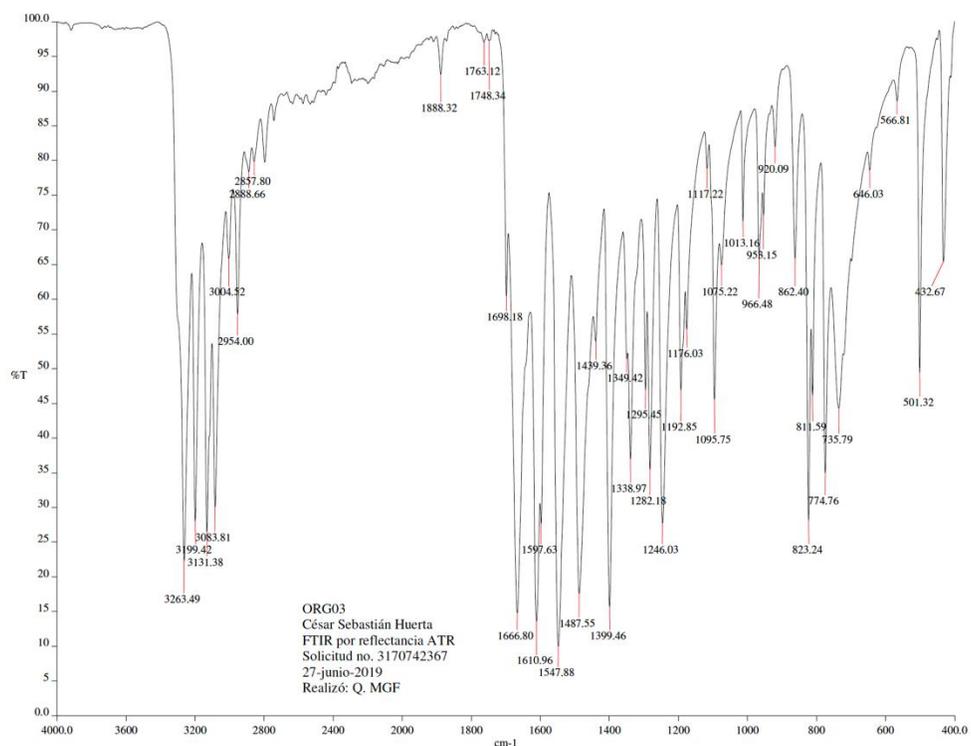


**Espectro 25.** RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)acetamida (C4)

### 13.8. 2-Cloro-*N*-(4-clorofenil)acetamida (C5)

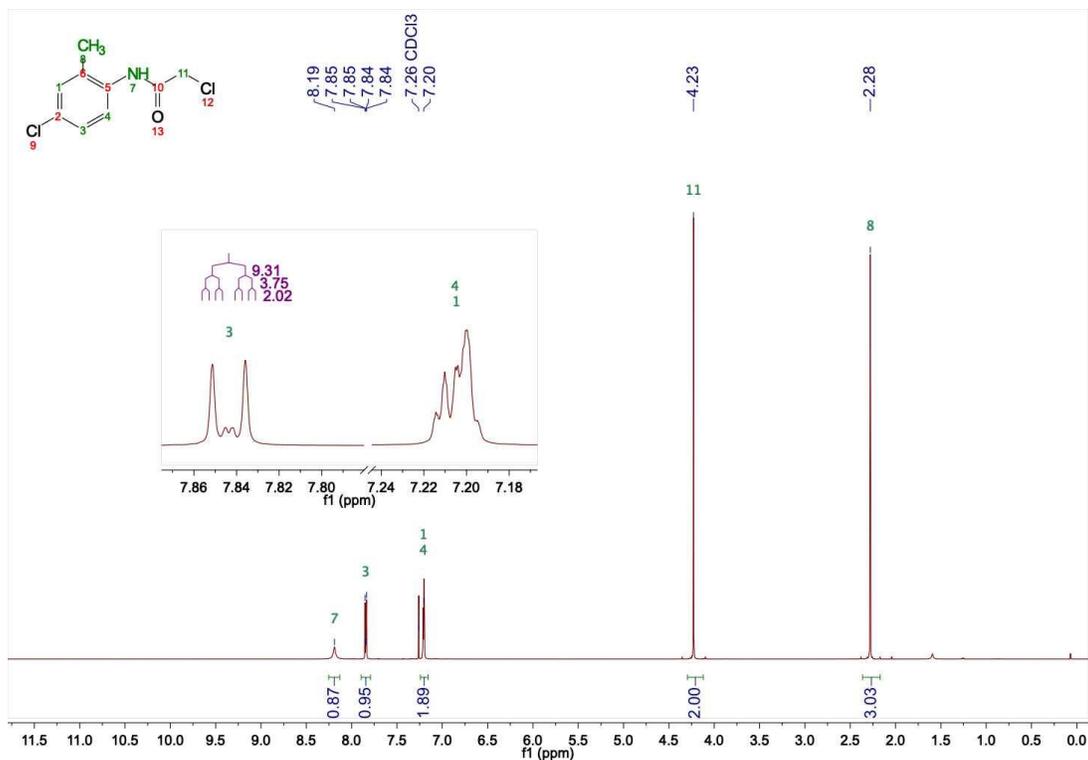


**Espectro 26.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-clorofenil)acetamida (C5)

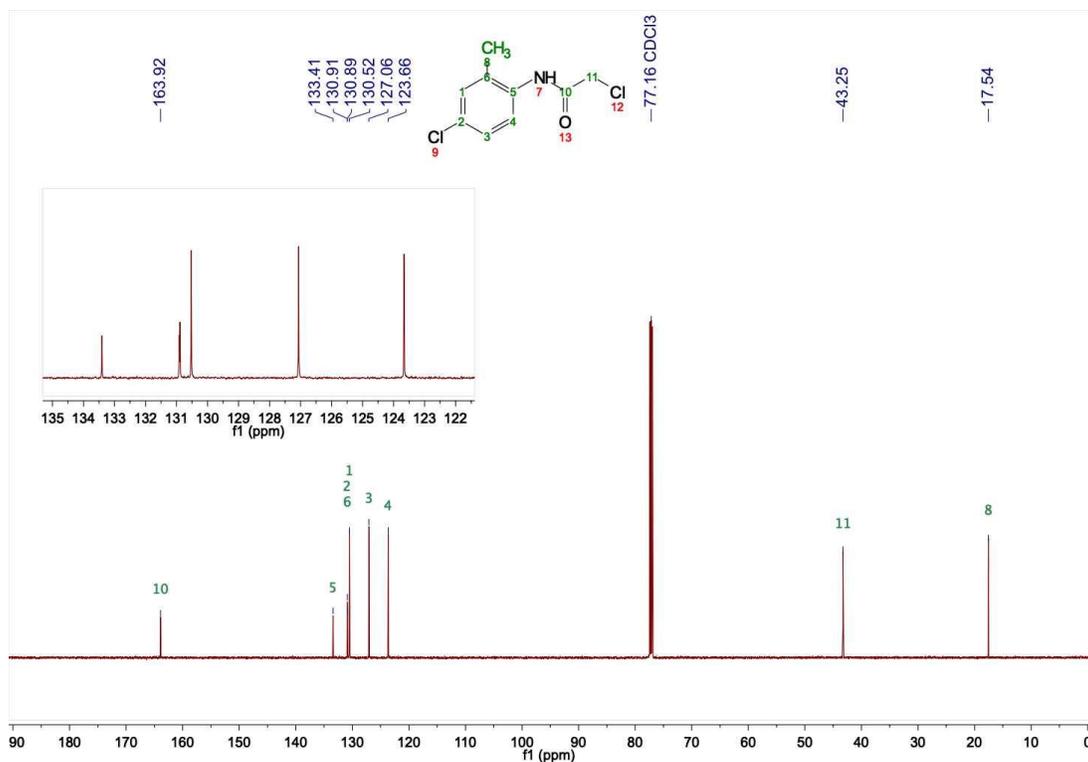


Espectro 27. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-clorofenil)acetamida (C5)

### 13.9. 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)acetamida (C6)

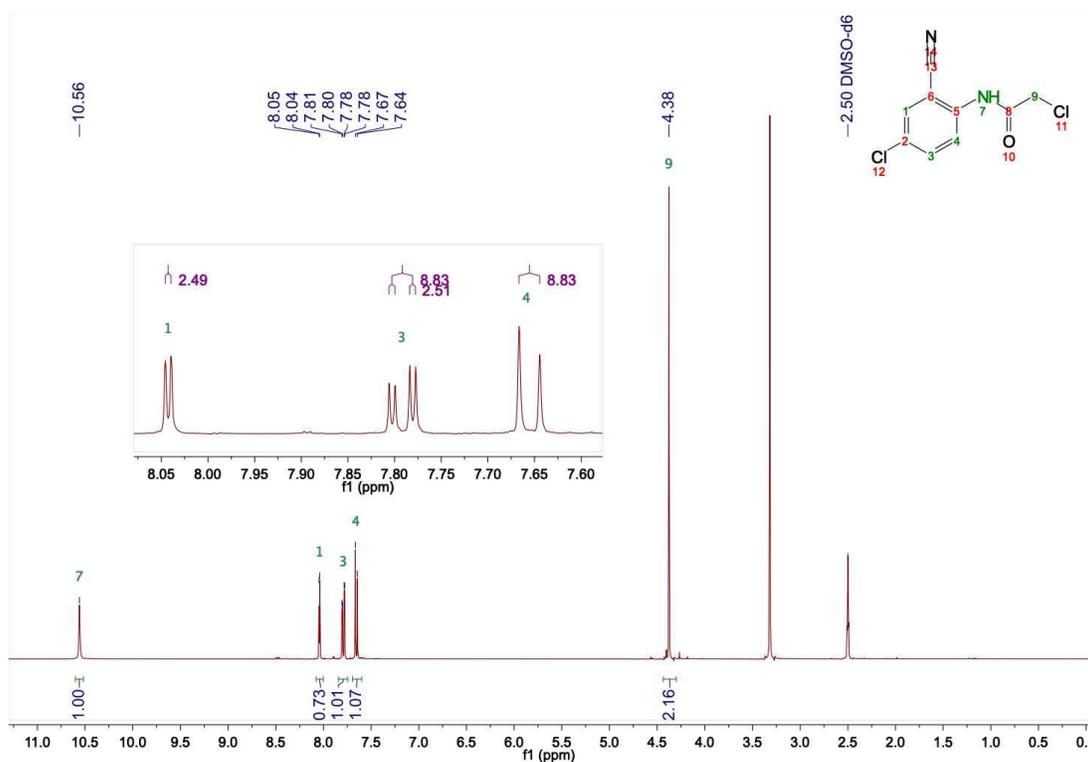


Espectro 28. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)acetamida (C6)

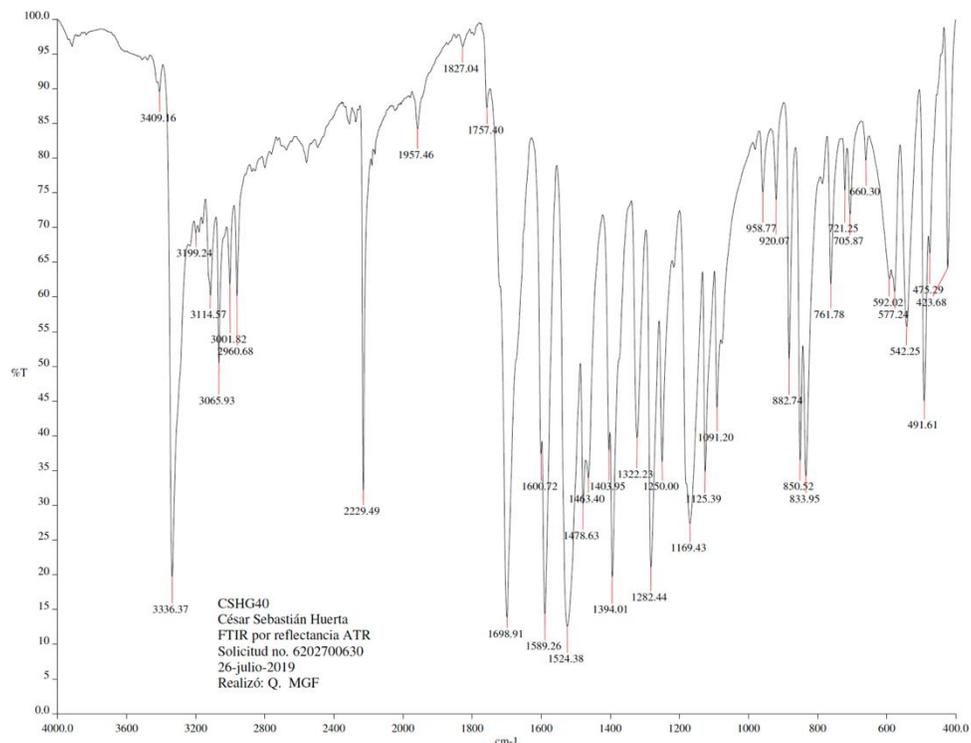


Espectro 29. RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)acetamida (C6)

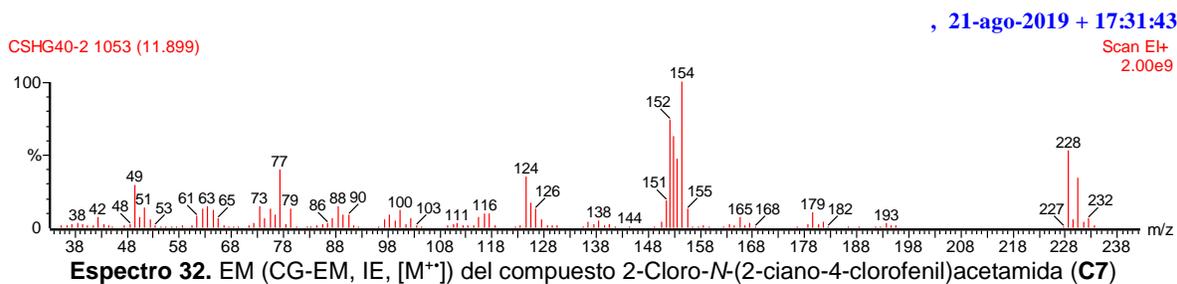
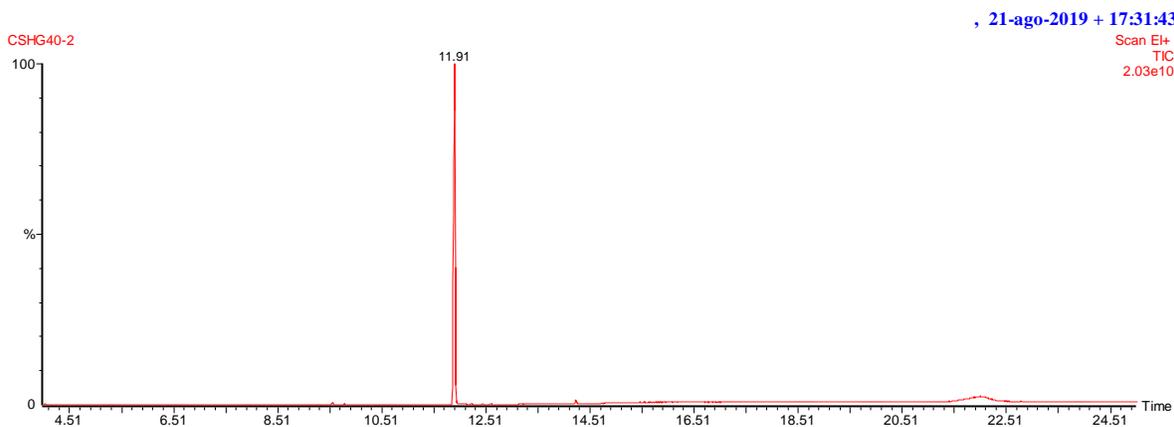
### 13.10. 2-Cloro-*N*-(2-ciano-4-clorofenil)acetamida (C7)



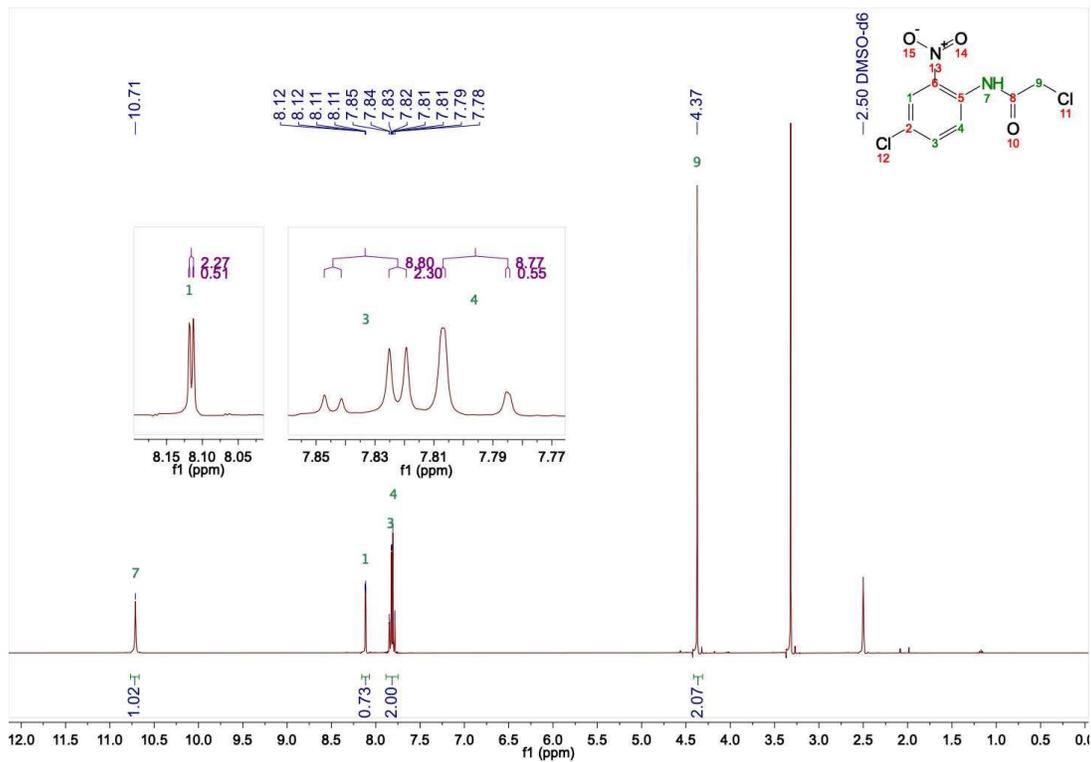
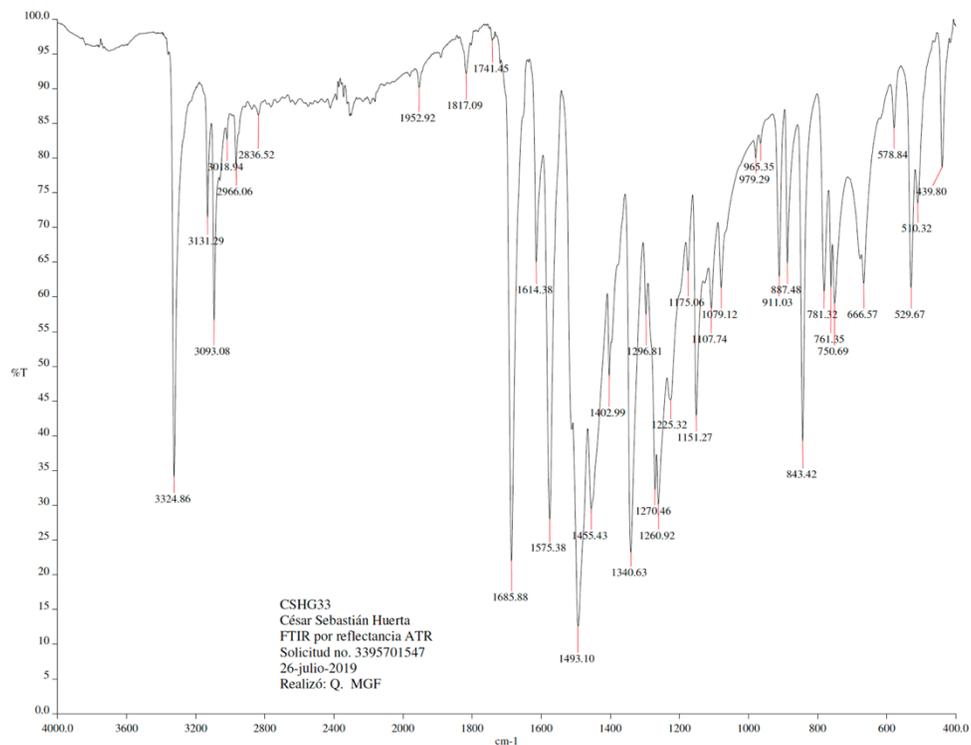
Espectro 30. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(2-ciano-4-clorofenil)acetamida (C7)



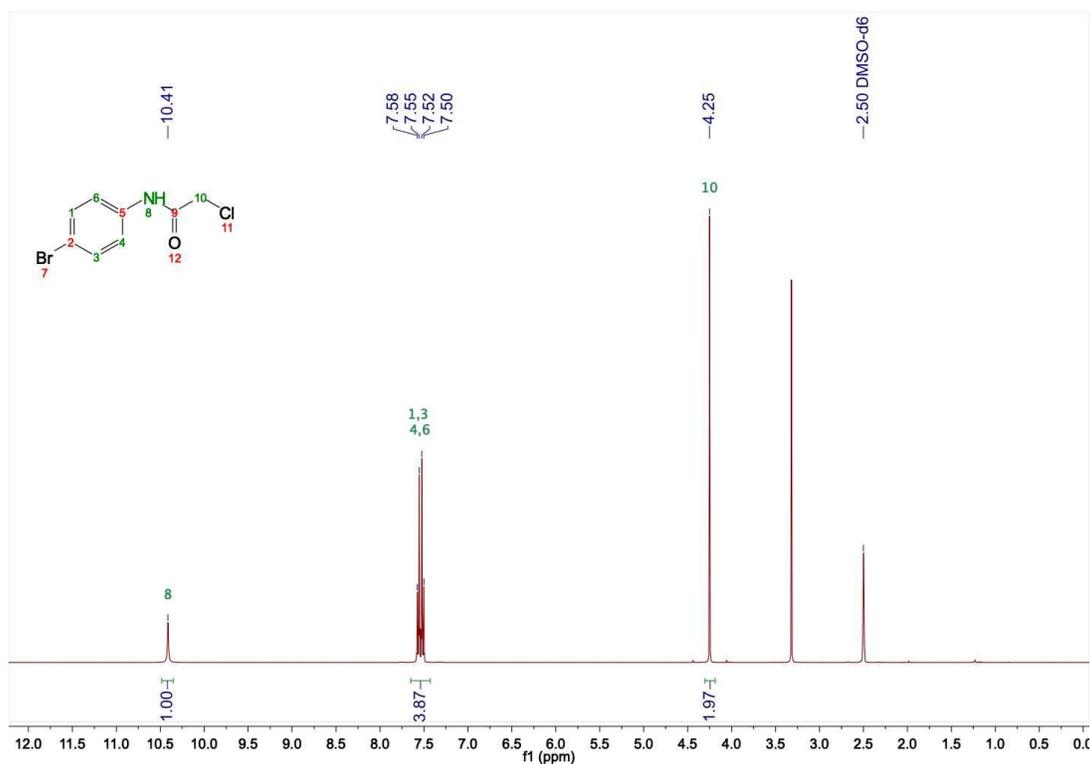
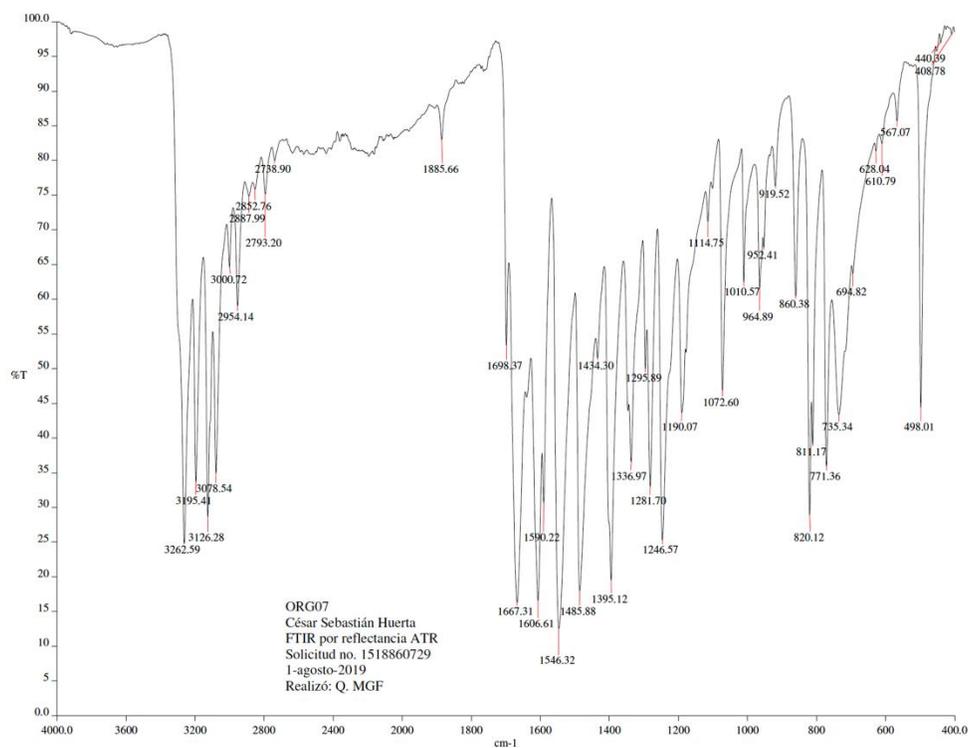
Espectro 31. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Cloro-N-(2-ciano-4-clorofenil)acetamida (C7)

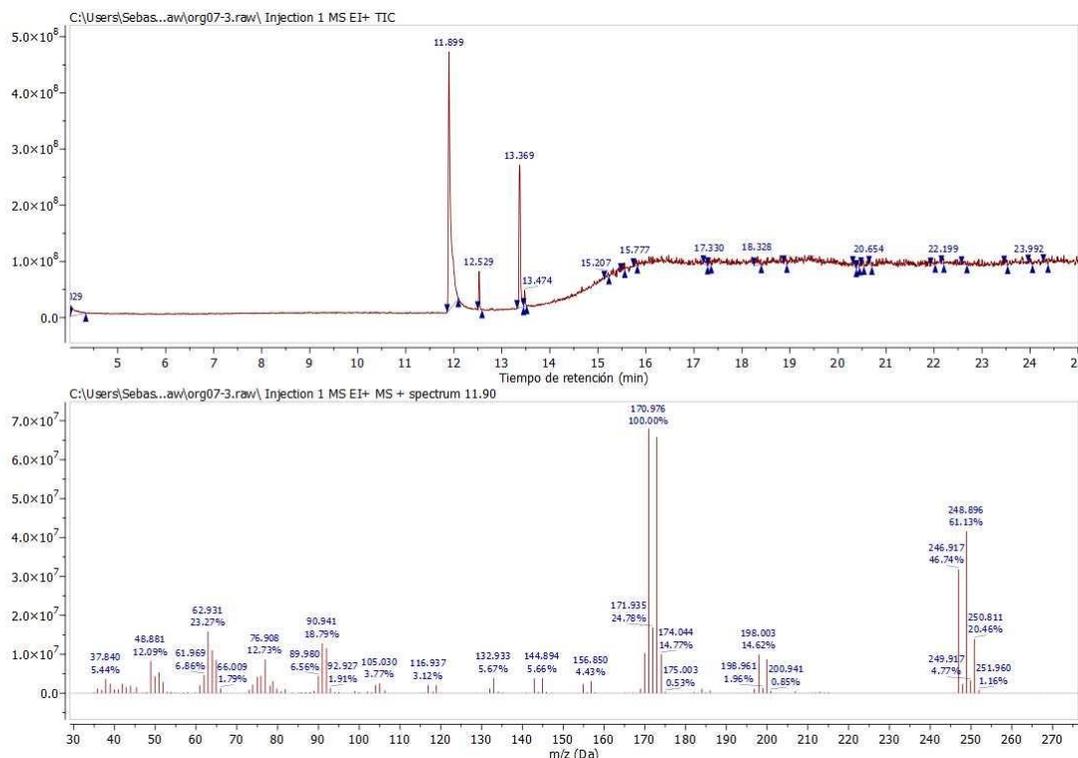


Espectro 32. EM (CG-EM, IE,  $[\text{M}^{+}]$ ) del compuesto 2-Cloro-N-(2-ciano-4-clorofenil)acetamida (C7)

13.11. 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (C8)Espectro 33. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (C8)Espectro 34. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)acetamida (C8)

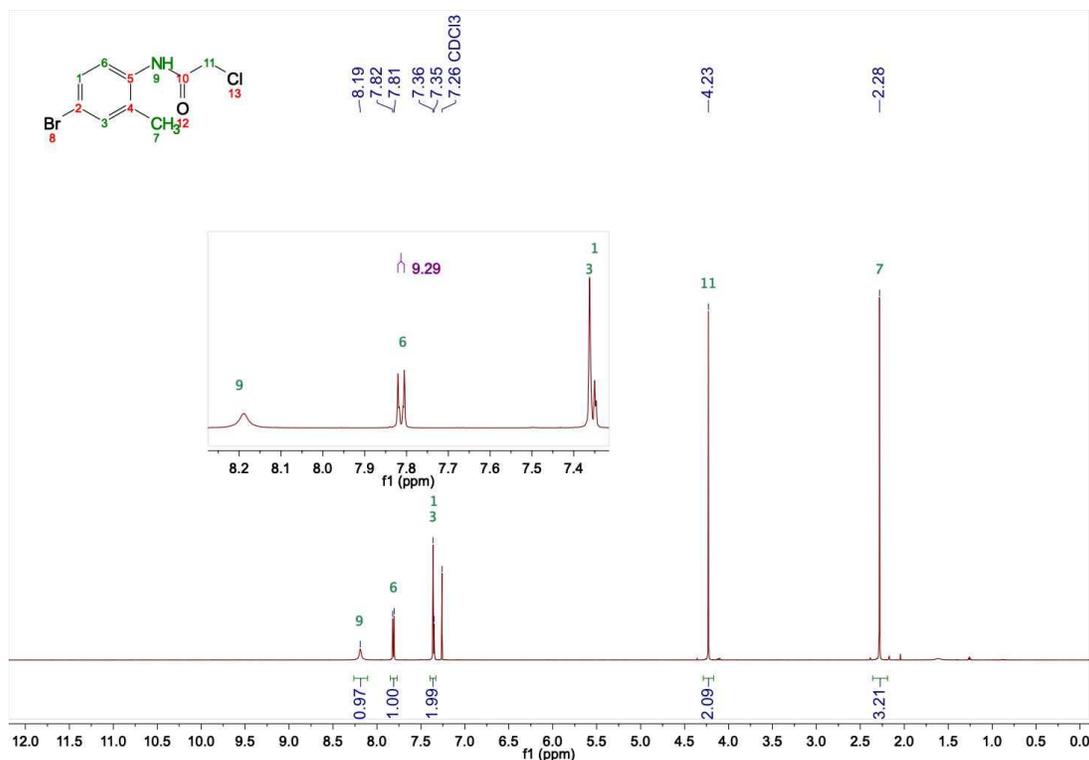


13.13. *N*-(4-Bromofenil)-2-cloroacetamida (C10)Espectro 37. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromofenil)-2-cloroacetamida (C10)Espectro 38. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-(4-Bromofenil)-2-cloroacetamida (C10)

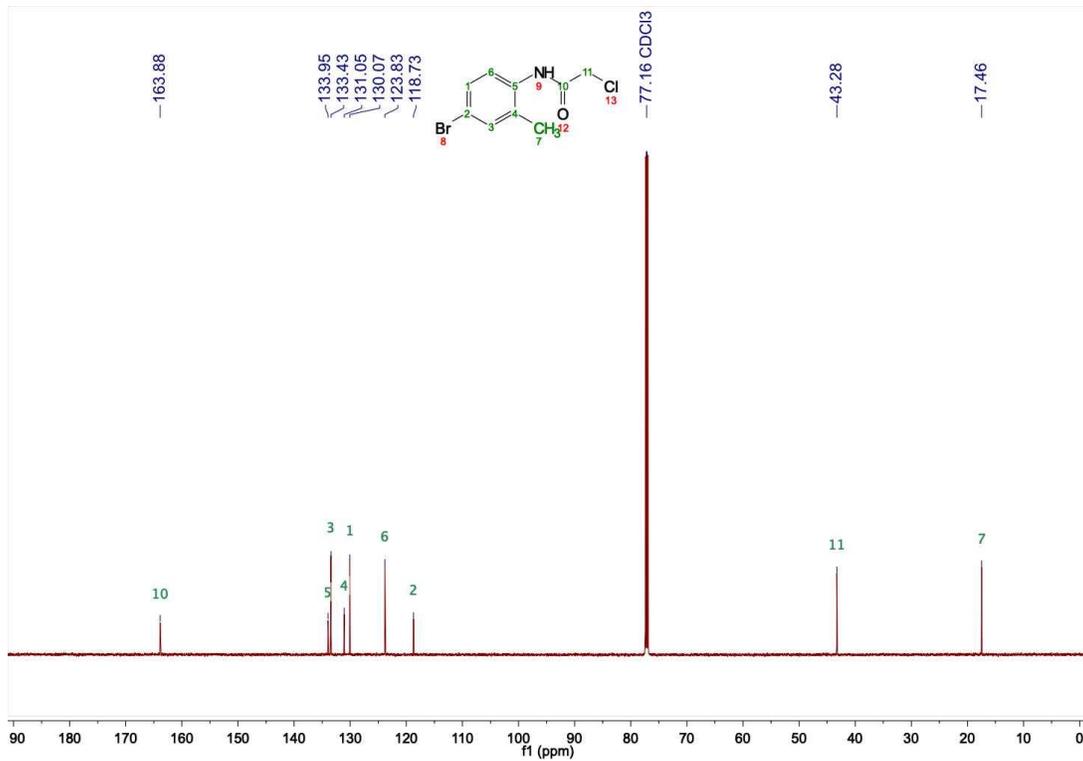


Espectro 39. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto *N*-(4-Bromofenil)-2-cloroacetamida (C10)

### 13.14. *N*-(4-Bromo-2-metilfenil)-2-cloroacetamida (C11)

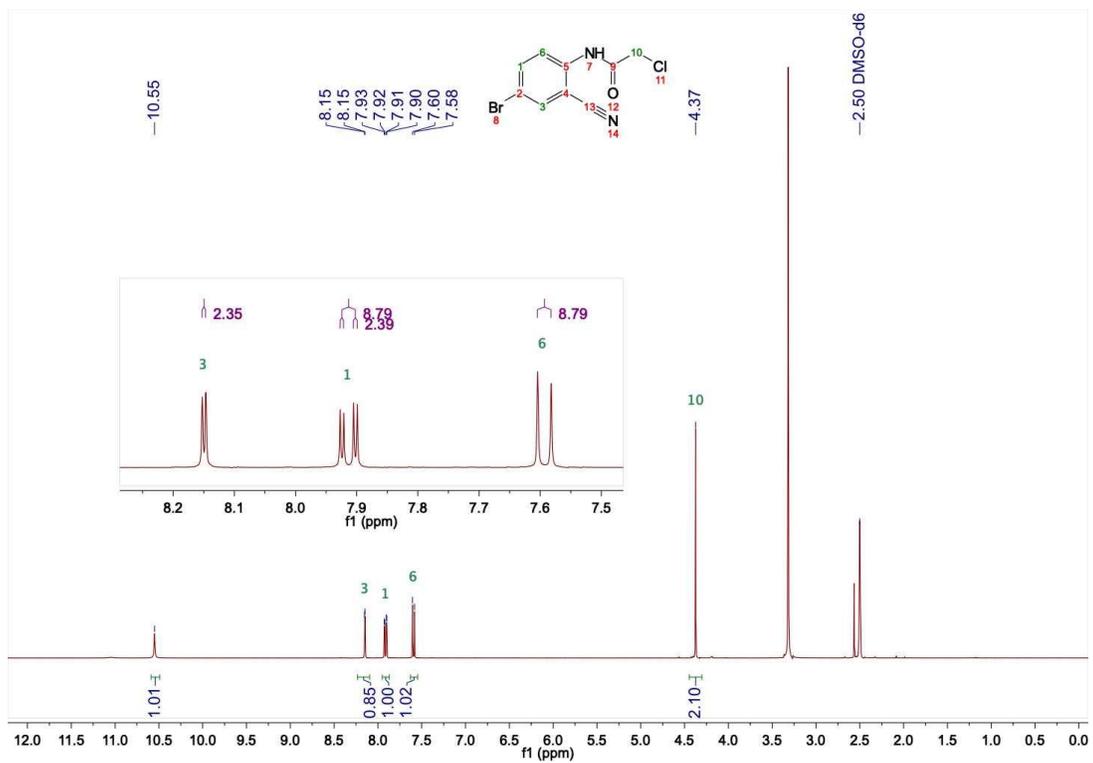


Espectro 40. RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-metilfenil)-2-cloroacetamida (C11)

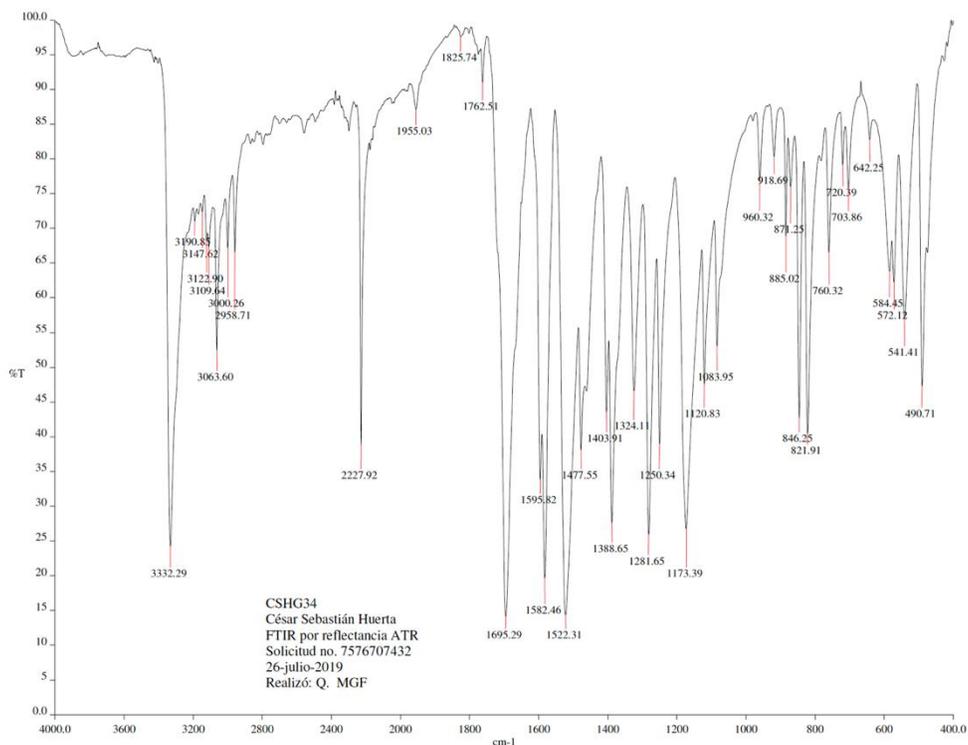


Espectro 41. RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-metilfenil)-2-cloroacetamida (C11)

### 13.15. *N*-(4-Bromo-2-cianofenil)-2-cloroacetamida (C12)

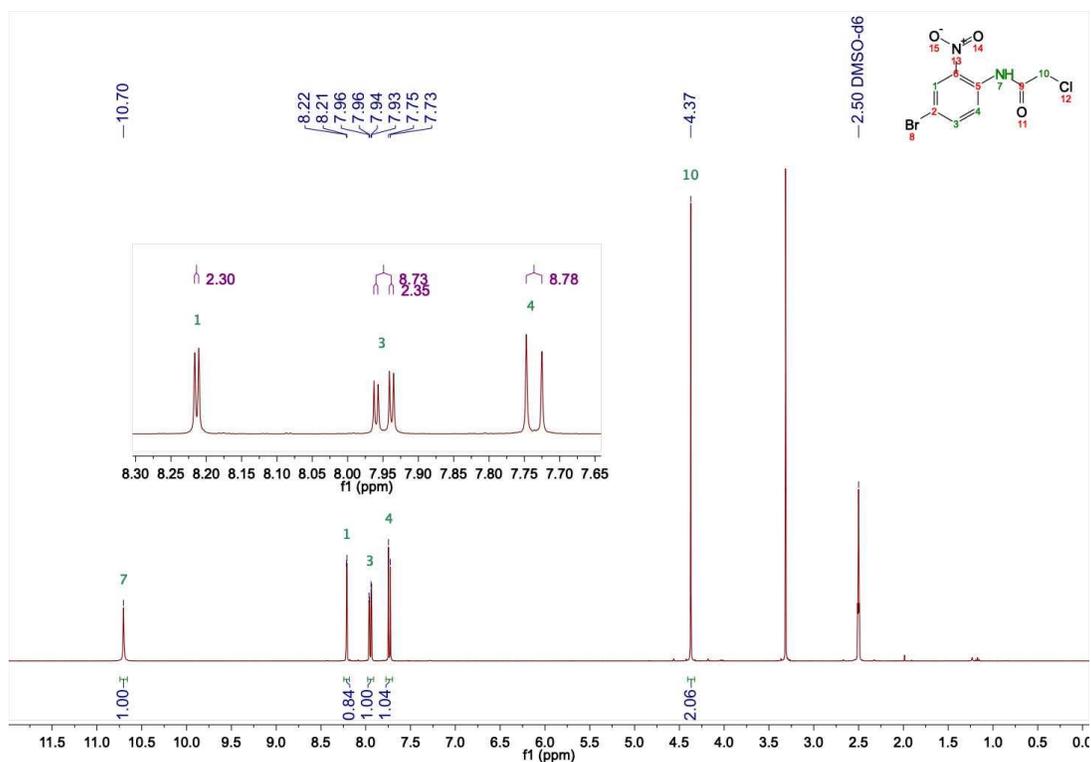


Espectro 42. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-cianofenil)-2-cloroacetamida (C12)

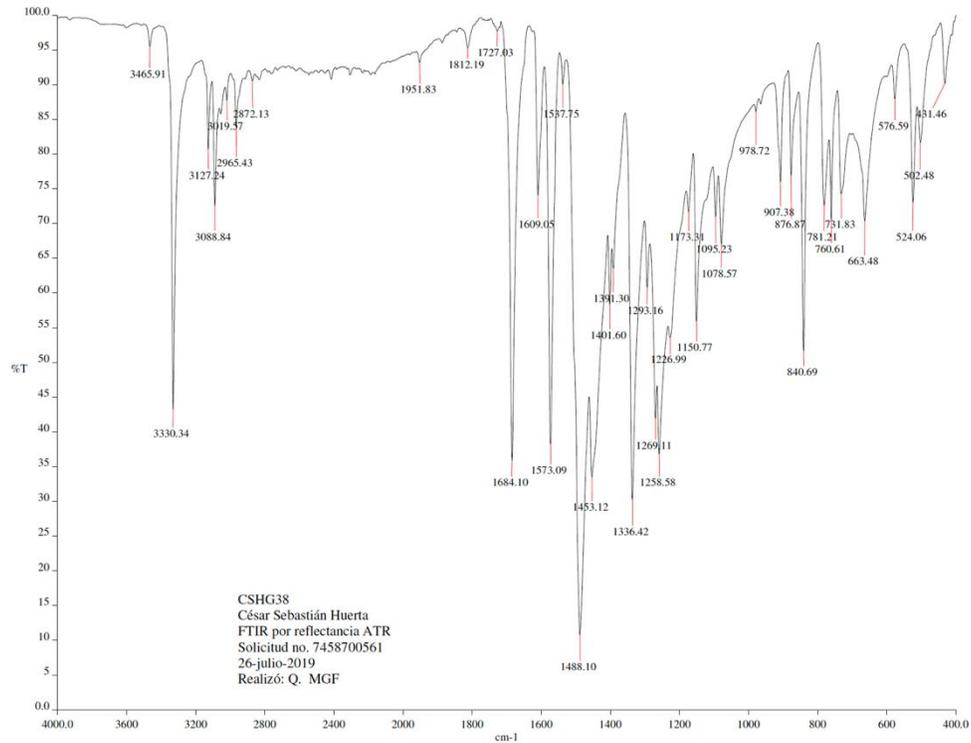


Espectro 43. IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-cianofenil)-2-cloroacetamida (C12)

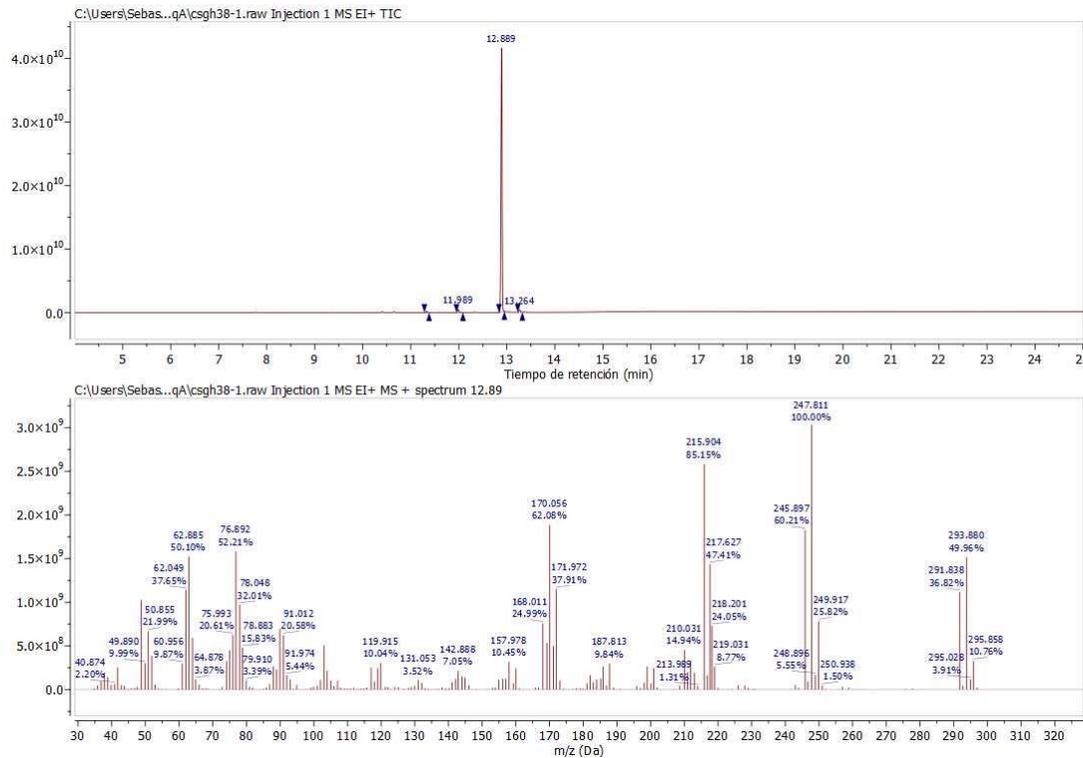
**13.16. *N*-(4-Bromo-2-nitrofenil)-2-cloroacetamida (C13)**



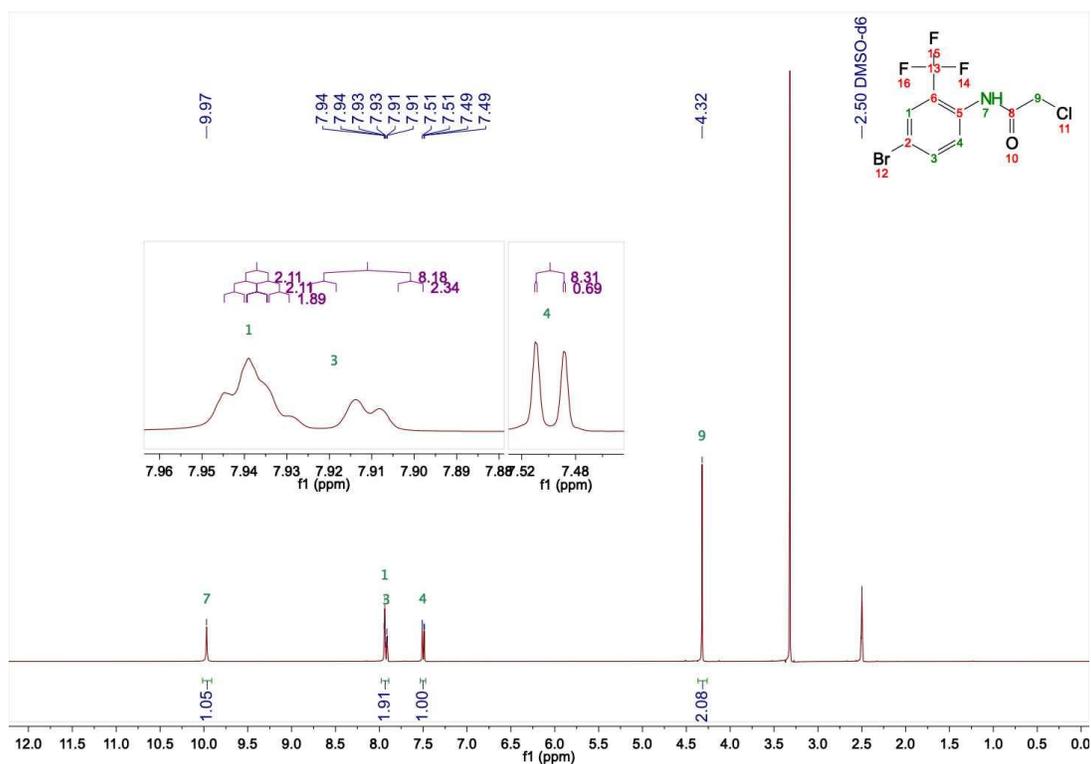
Espectro 44. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-nitrofenil)-2-cloroacetamida (C13)



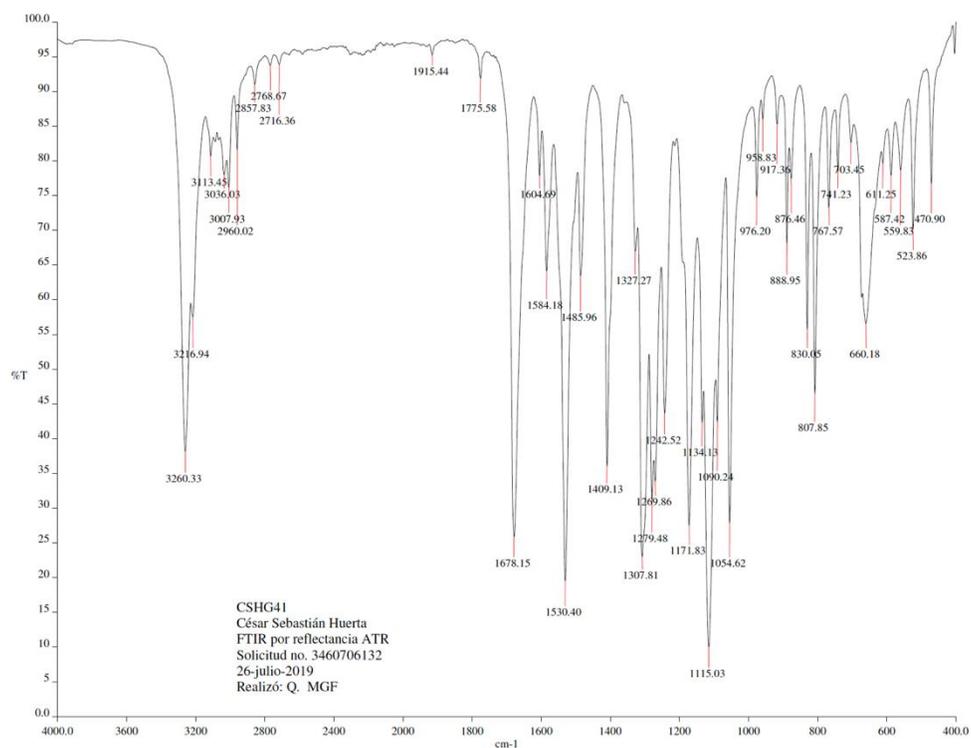
**Espectro 45.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-nitrofenil)-2-cloroacetamida (**C13**)



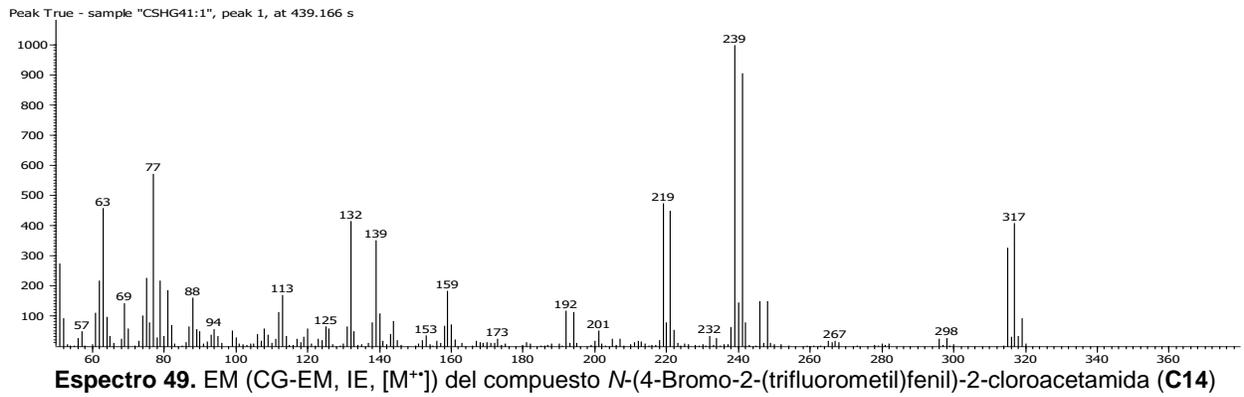
**Espectro 46.** EM (CG-EM, IE,  $[M^{+}]$ ) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-nitrofenil)-2-cloroacetamida (**C13**)

13.17. *N*-(4-Bromo-2-(trifluorometil)fenil)-2-cloroacetamida (C14)

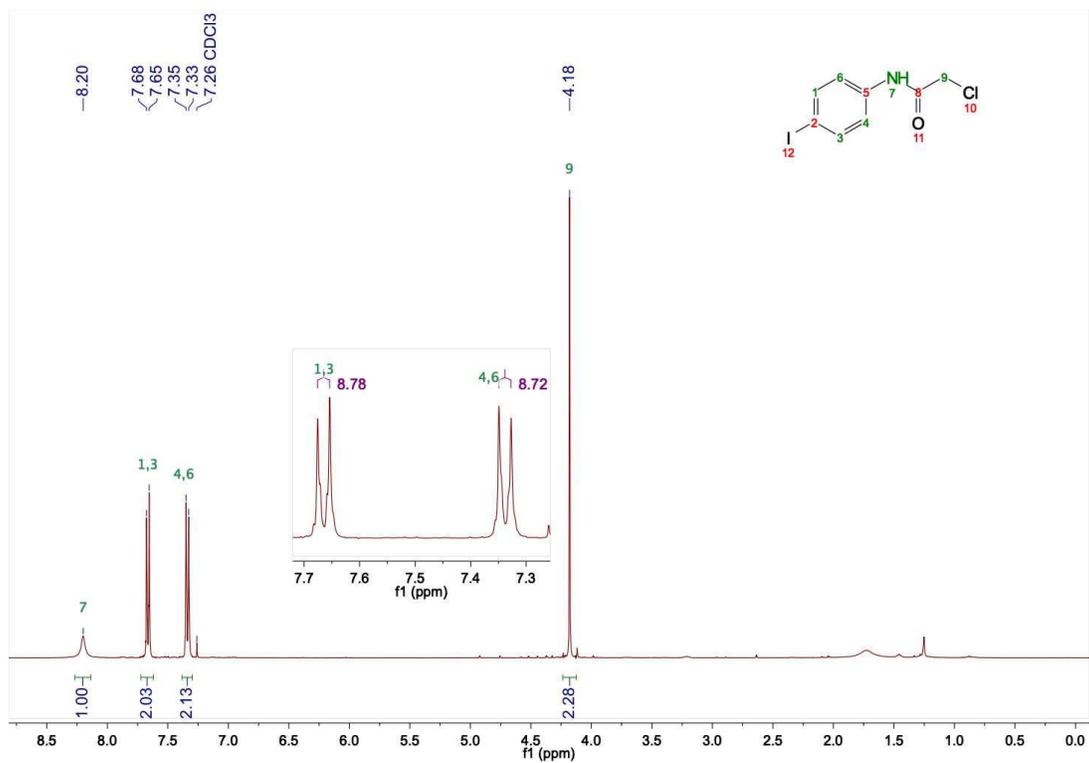
**Espectro 47.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-(trifluorometil)fenil)-2-cloroacetamida (C14)

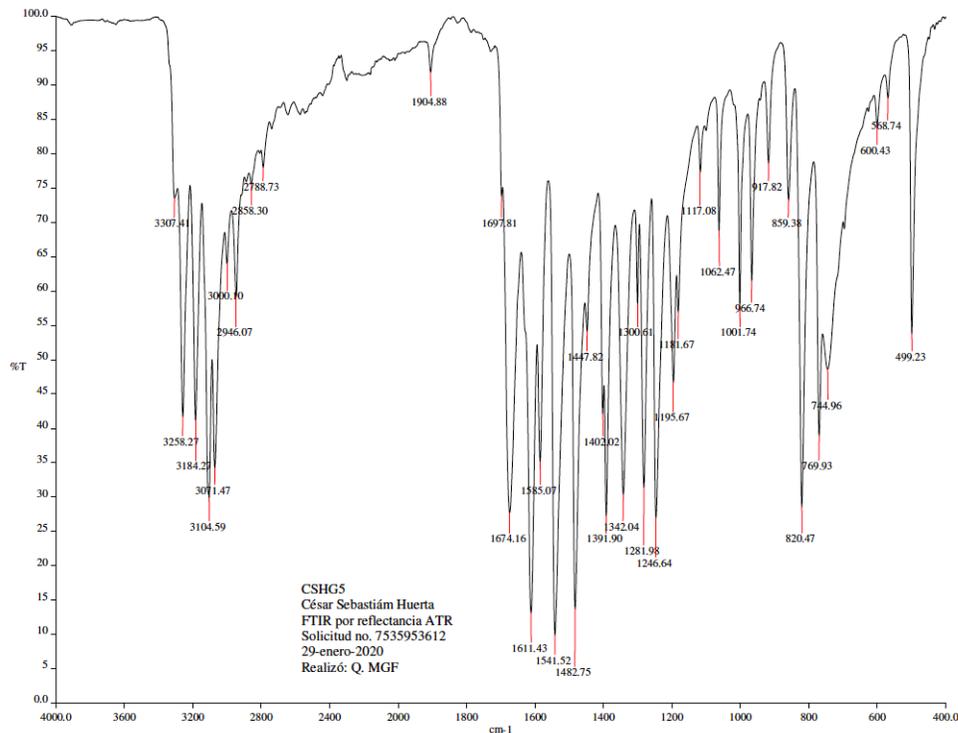


**Espectro 48.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto *N*-(4-Bromo-2-(trifluorometil)fenil)-2-cloroacetamida (C14)



### 13.18. 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (C15)





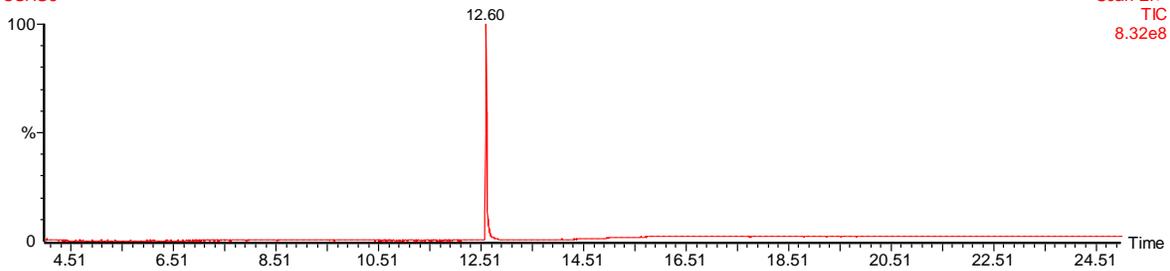
Espectro 51. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (C15)

RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 12:27:39

CSHG5

Scan EI+  
TIC  
8.32e8

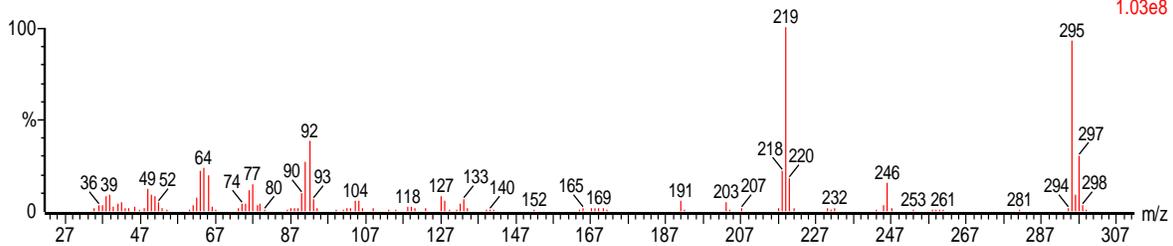


RAFAEL CASTILLO

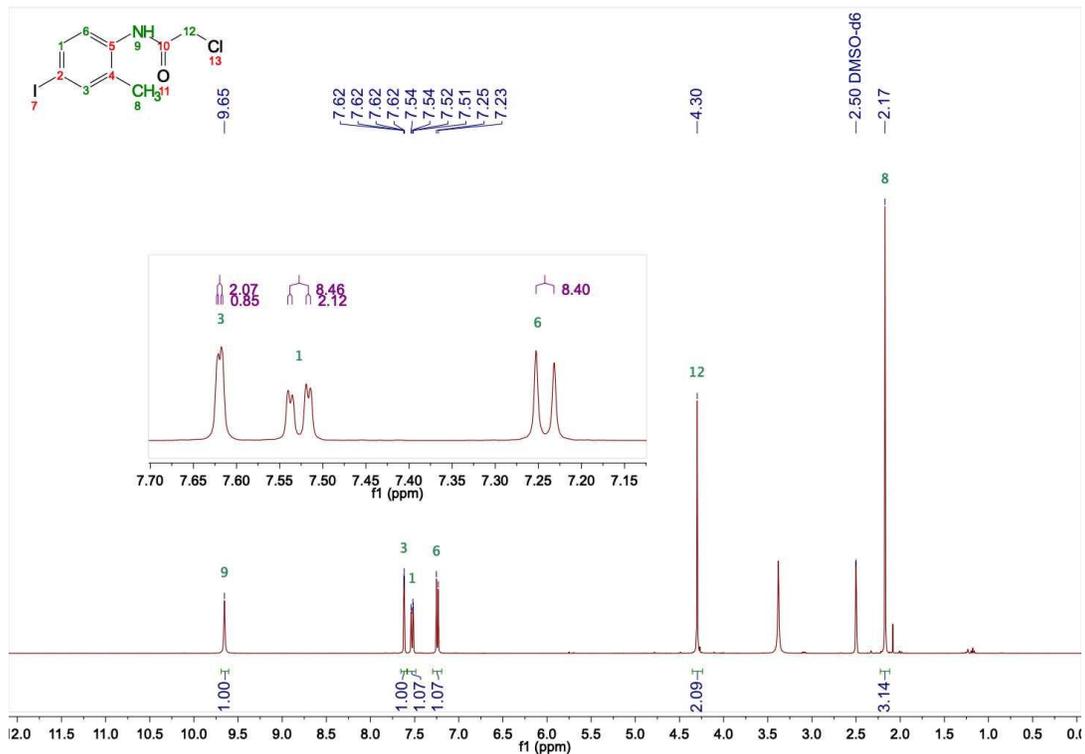
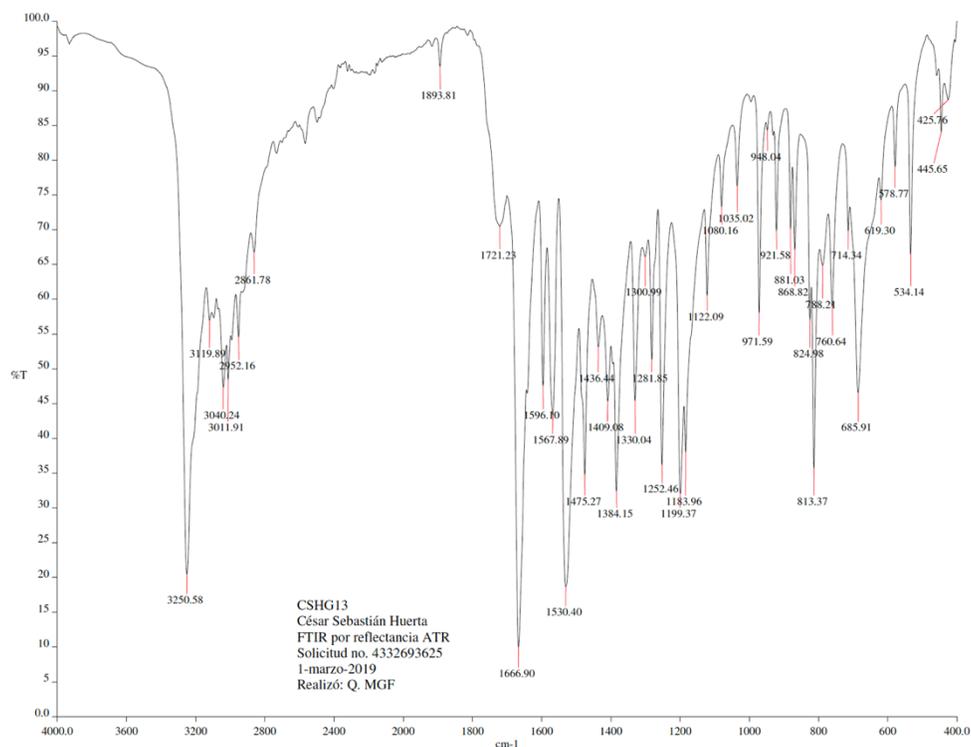
, 03-abr-2019 + 12:27:39

CSHG5 1147 (12.604) Cm (1145:1148)

Scan EI-  
1.03e8



Espectro 52. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-yodofenil)acetamida (C15)

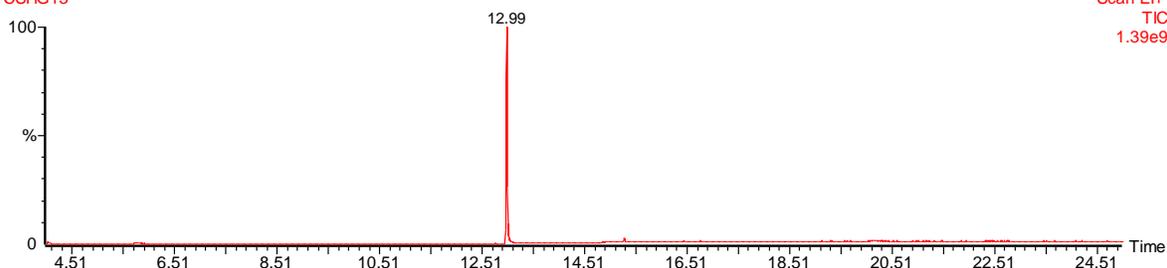
13.19. 2-Cloro-N-(2-metil-4-yodofenil)acetamida (C16)Espectro 53. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-N-(2-metil-4-yodofenil)acetamida (C16)Espectro 54. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Cloro-N-(2-metil-4-yodofenil)acetamida (C16)

RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 11:55:42

CSHG13

Scan EI+  
TIC  
1.39e9

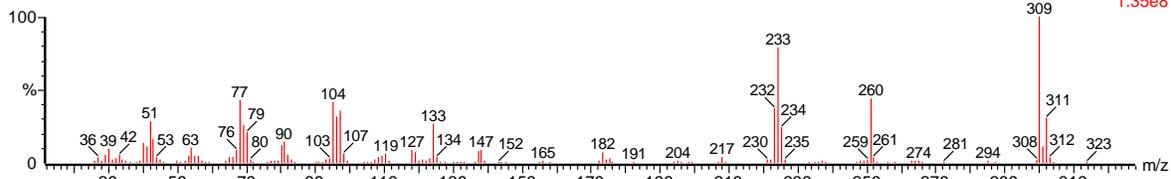


RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 11:55:42

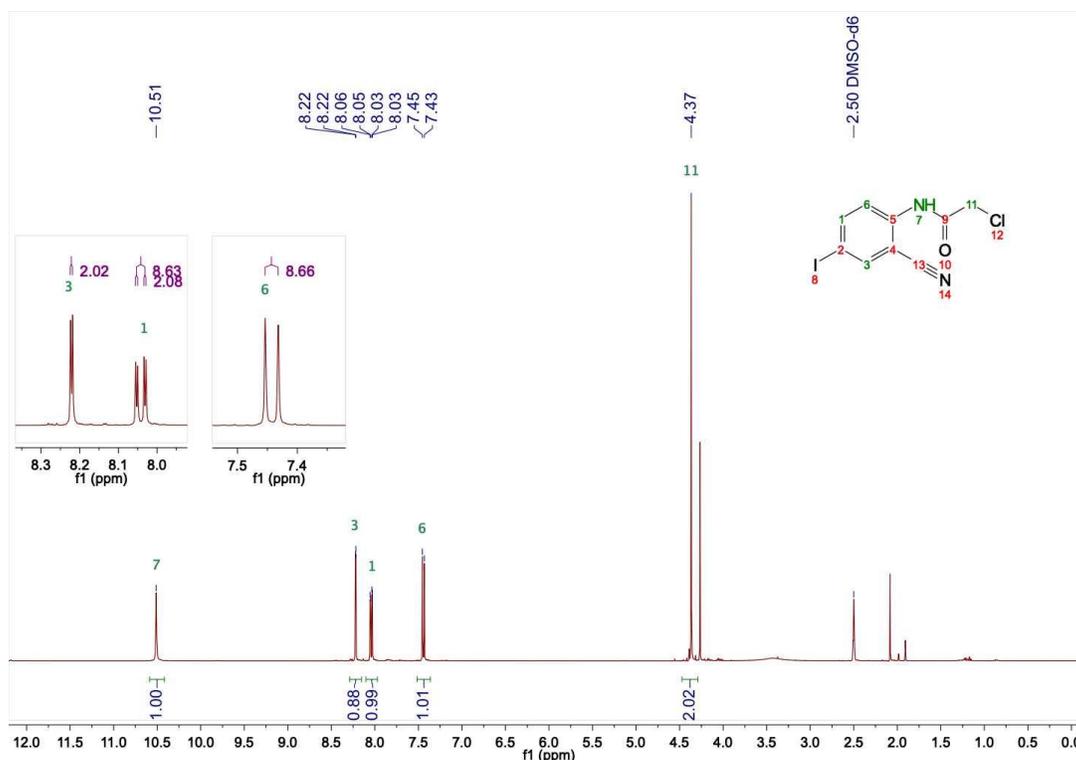
CSHG13 1198 (12.987) Cm (1197:1199)

Scan EI+  
1.35e8

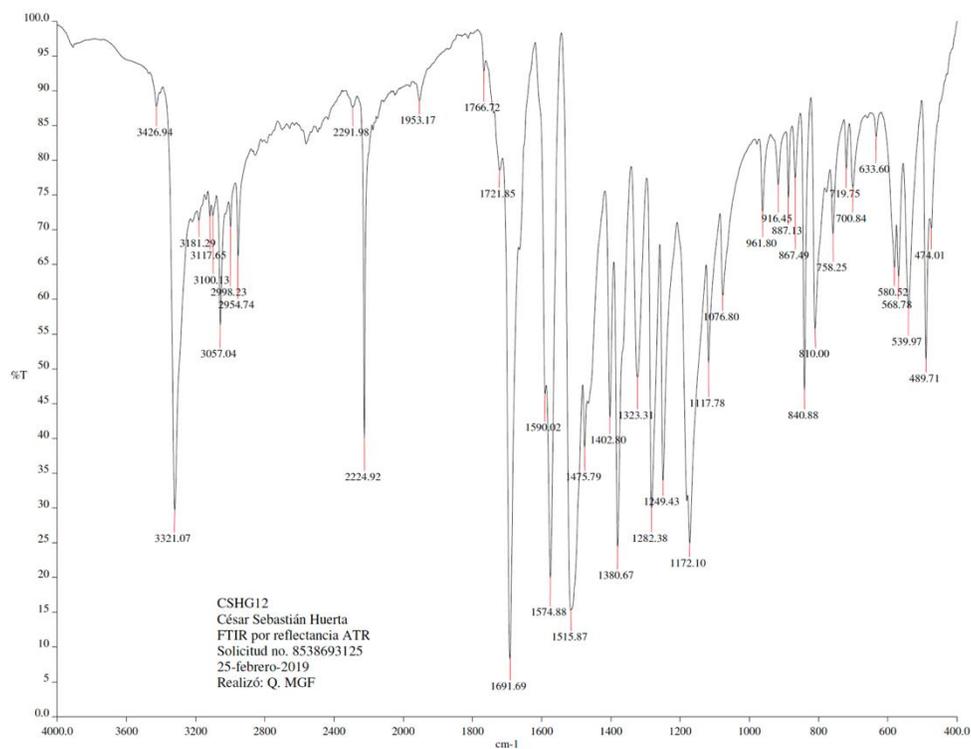


Espectro 55. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto 2-Cloro-N-(2-metil-4-yodofenil)acetamida (C16)

**13.20. 2-Cloro-N-(4-yodo-2-cianofenil)acetamida (C17)**

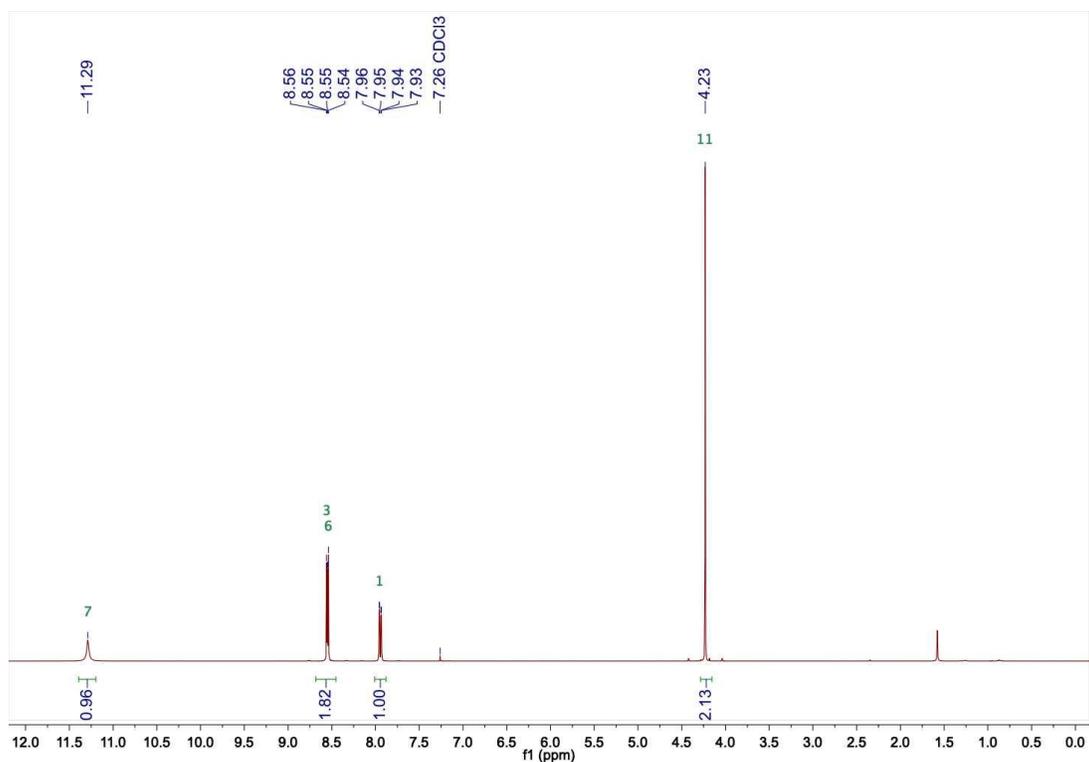


Espectro 56. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-N-(4-yodo-2-cianofenil)acetamida (C17)

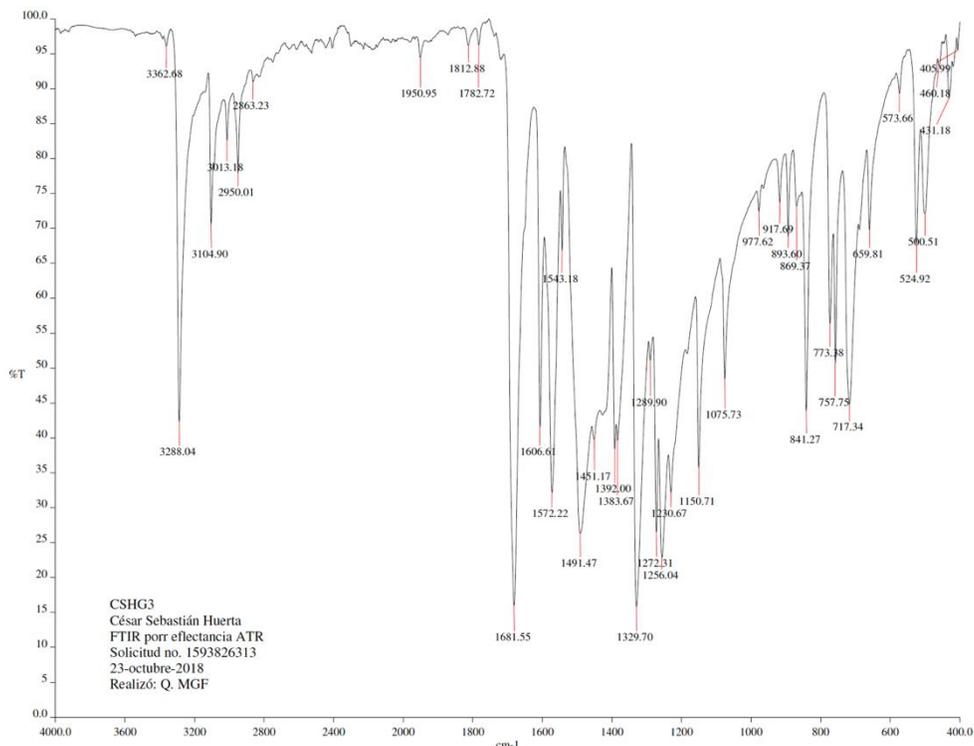


Espectro 57. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Cloro-*N*-(4-yodo-2-cianofenil)acetamida (C17)

### 13.21. 2-Cloro-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)acetamida (C18)



Espectro 58. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)acetamida (C18)



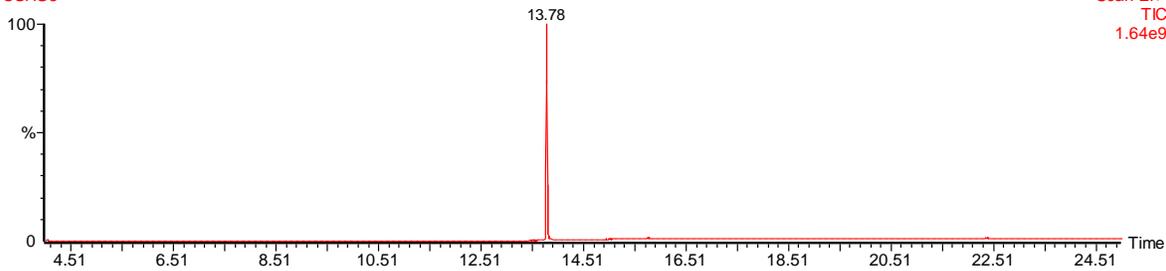
Espectro 59. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Cloro-N-(2-nitro-4-yodofenil)acetamida (C18)

RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 11:25:49

CSHG3

Scan EI+  
TIC  
1.64e9

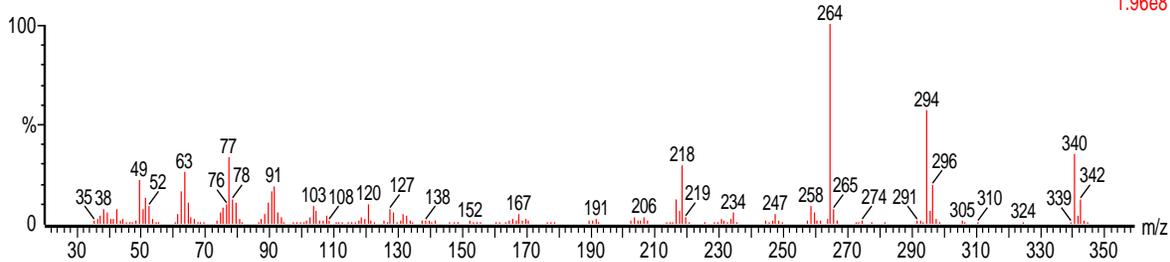


RAFAEL CASTILLO

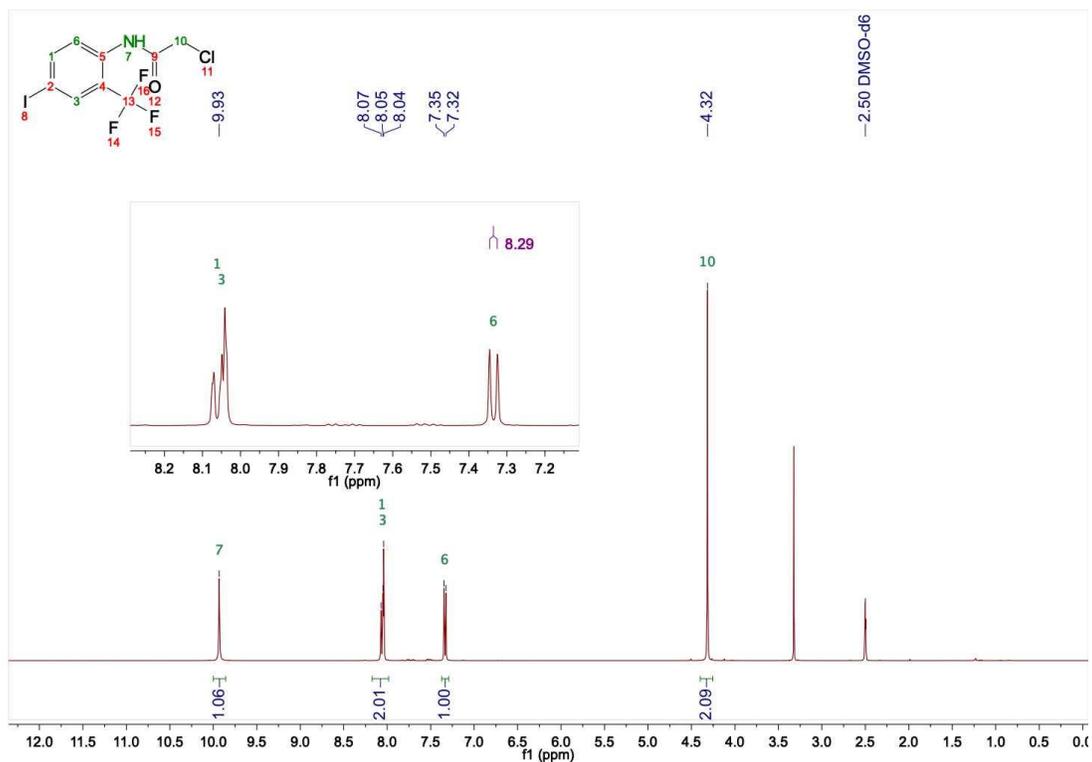
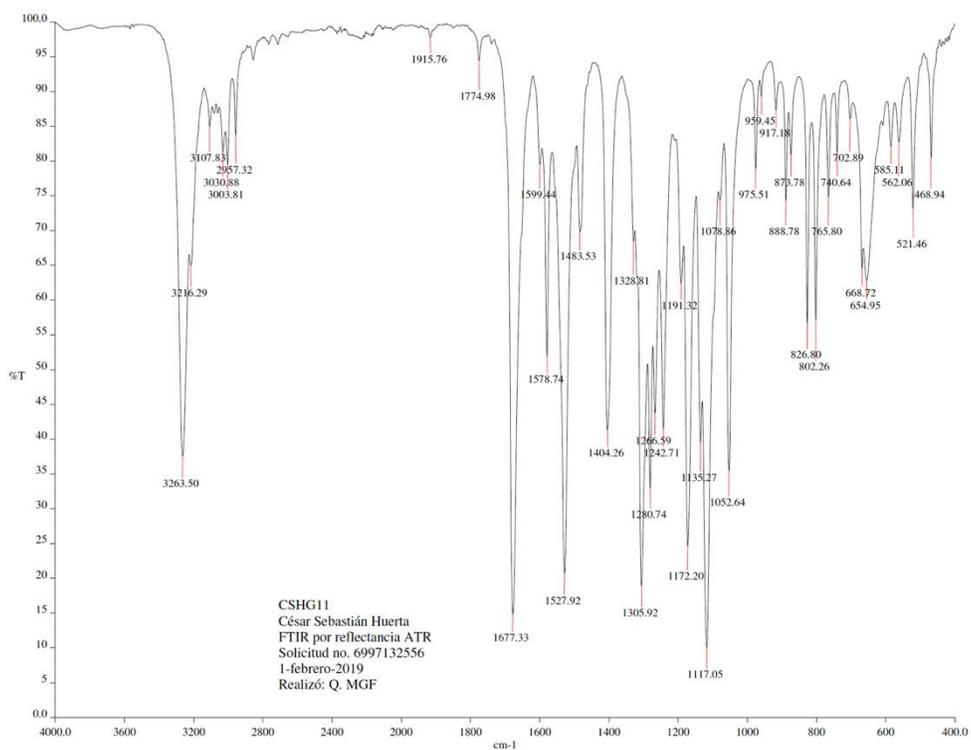
, 03-abr-2019 + 11:25:49

CSHG3 1304 (13.782) Cm (1303:1305)

Scan EI+  
1.96e8



Espectro 60. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto 2-Cloro-N-(2-nitro-4-yodofenil)acetamida (C18)

13.22. 2-Cloro-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)acetamida (C19)Espectro 61. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 2-Cloro-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)acetamida (C19)Espectro 62. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 2-Cloro-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)acetamida (C19)

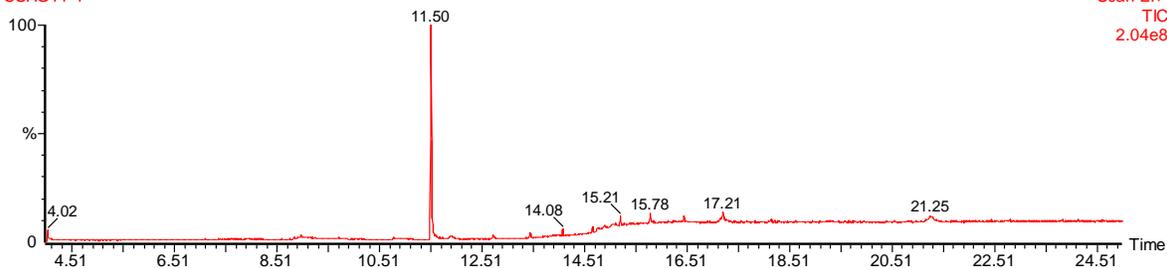
# ANEXO III-ESPECTROS

RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 10:57:04

CSHG11-1

Scan EI+  
TIC  
2.04e8

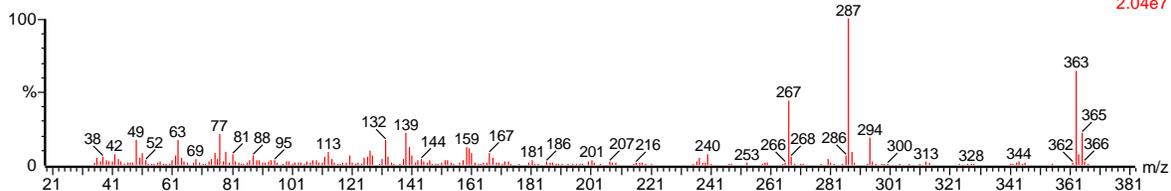


RAFAEL CASTILLO

, 03-abr-2019 + 10:57:04

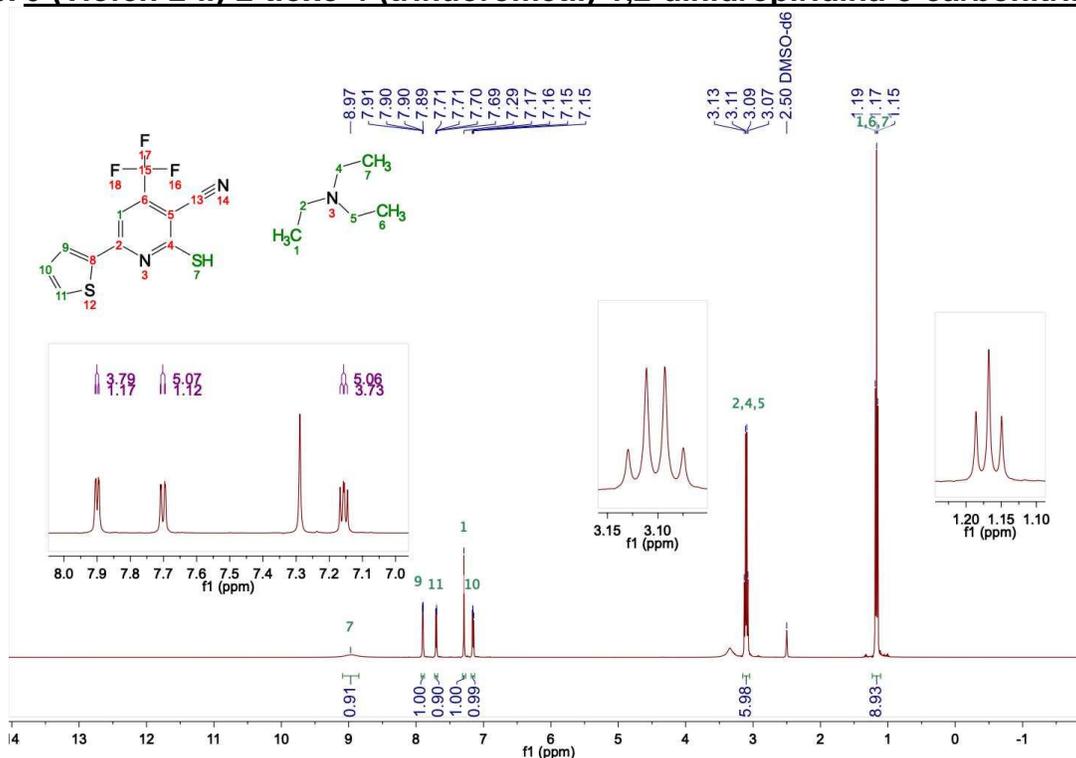
CSHG11-1 1000 (11.501) Cm (999:1002)

Scan EI+  
2.04e7

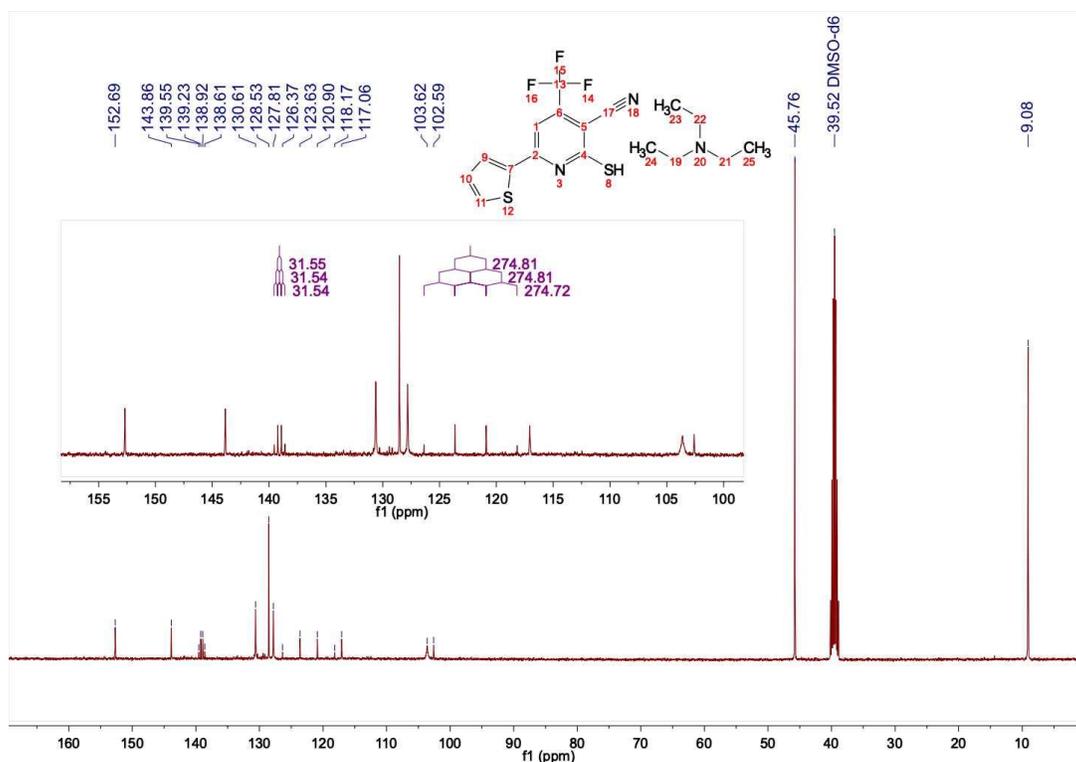


Espectro 63. EM (CG-EM, IE, [M<sup>+</sup>]) del compuesto 2-Cloro-N-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)acetamida (C19)

## 13.23. 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)

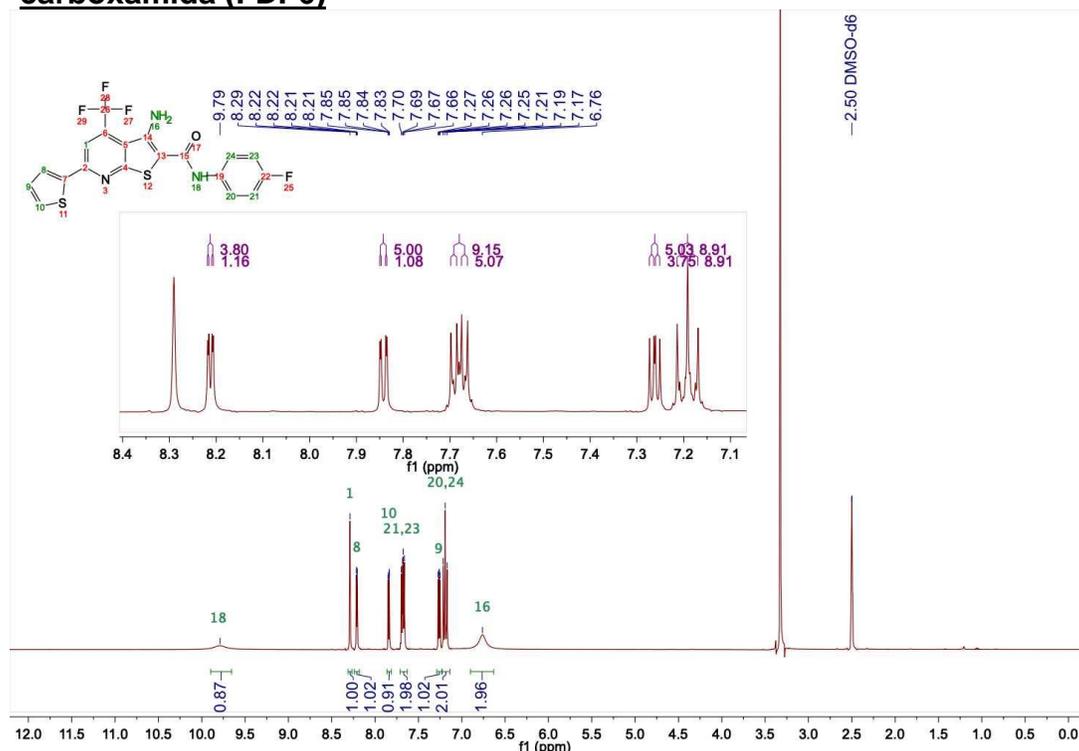


**Espectro 64.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)

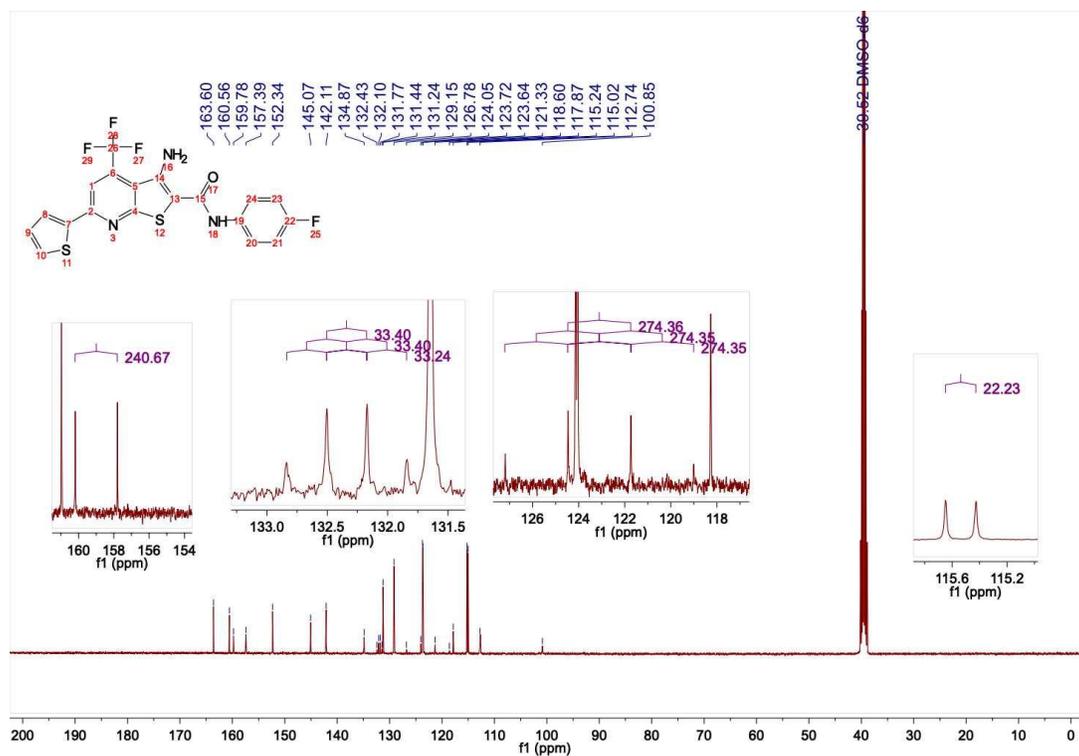


**Espectro 65.** RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 6-(Tiofen-2-il)-2-tioxo-4-(trifluorometil)-1,2-dihidropiridina-3-carbonitrilo (TPR)

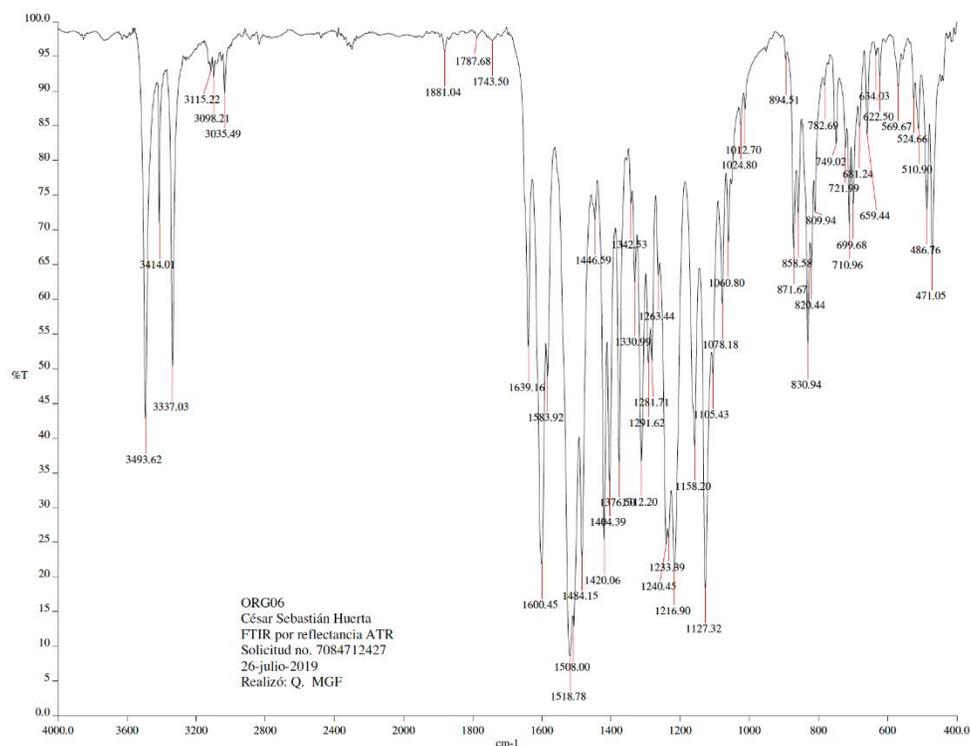
### 13.24. 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (FDI-6)



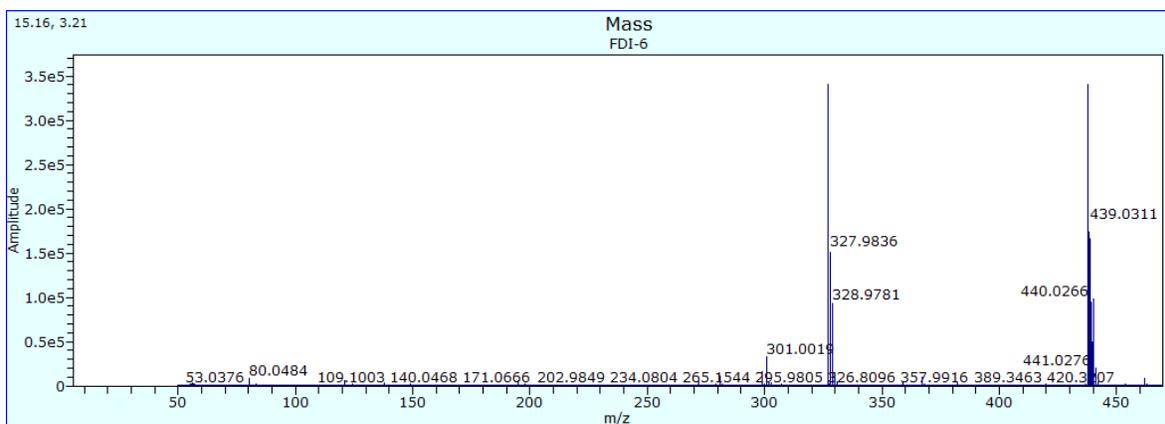
**Espectro 66.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (FDI-6)



**Espectro 67.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (FDI-6)

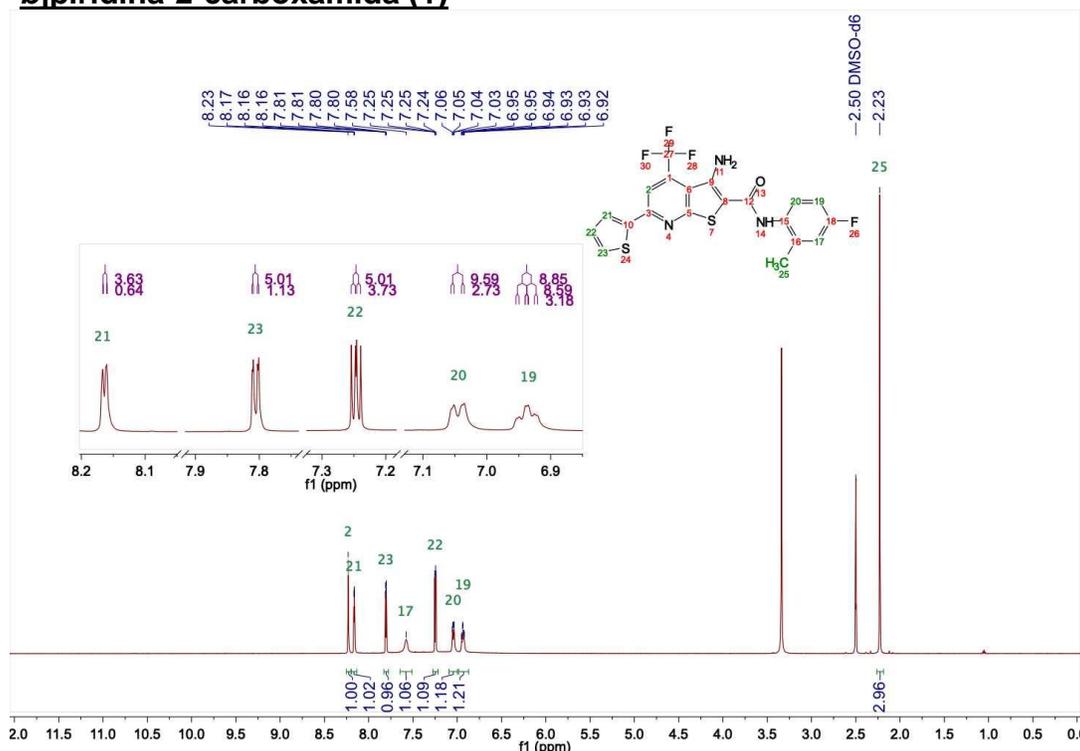


**Espectro 68.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**FDI-6**)

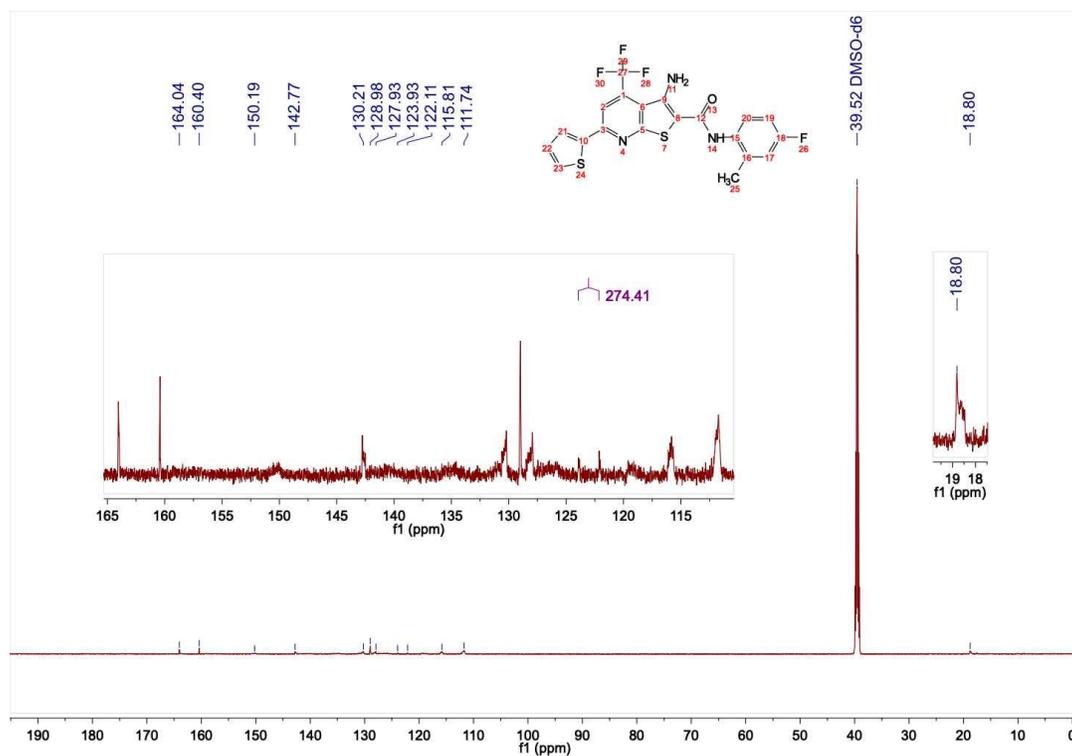


**Espectro 69.** EMAR (APCI,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**FDI-6**)

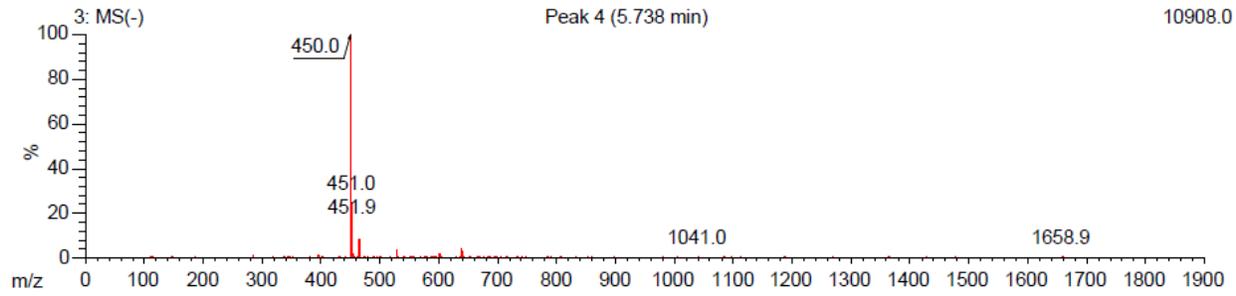
**13.25. 3-Amino-N-(4-fluoro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (1)**



**Espectro 70.** RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-fluoro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (1)

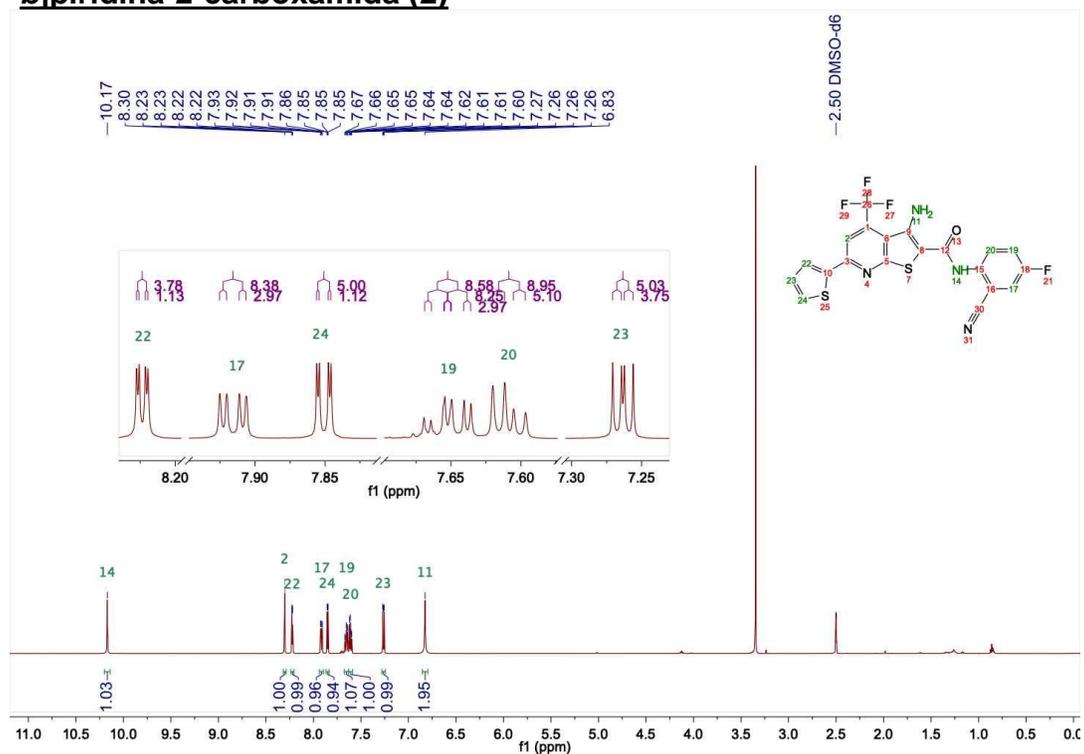


**Espectro 71.** RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-fluoro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (1)

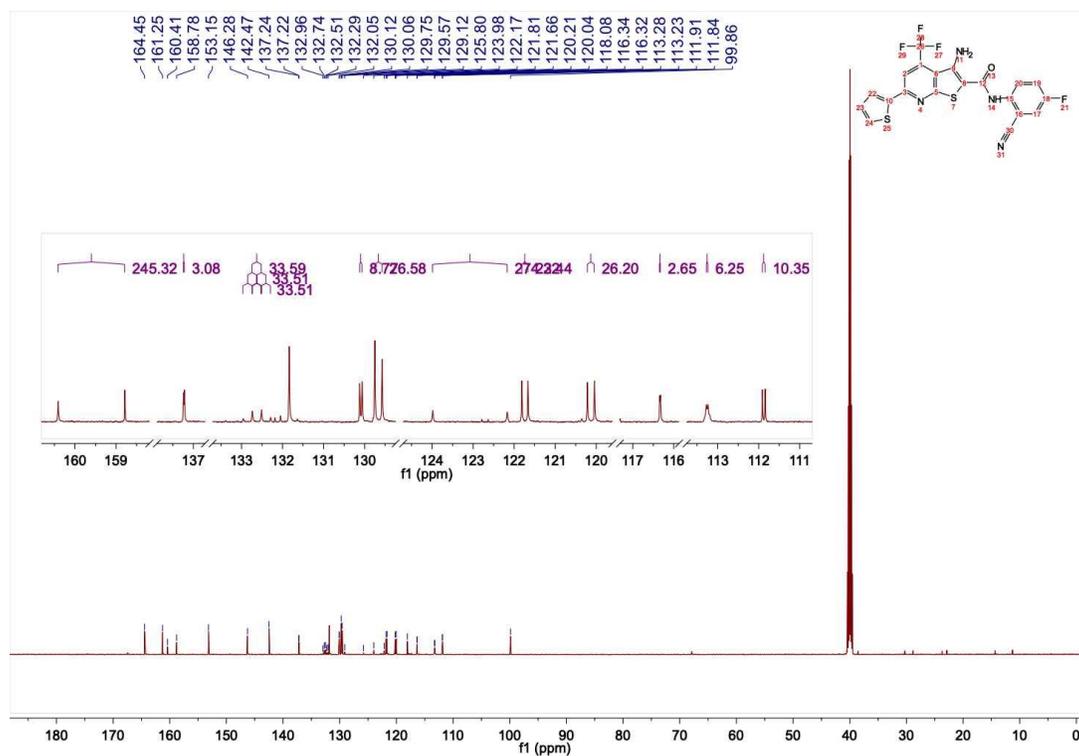


**Espectro 72.** EM (LCMS-DAD/ESI, M<sup>-</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (1)

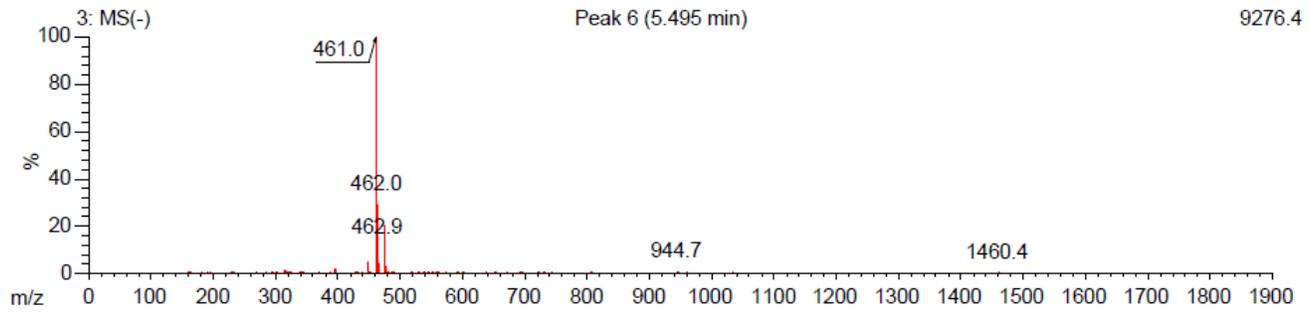
### 13.26. 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (2)



Espectro 73. RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (2)

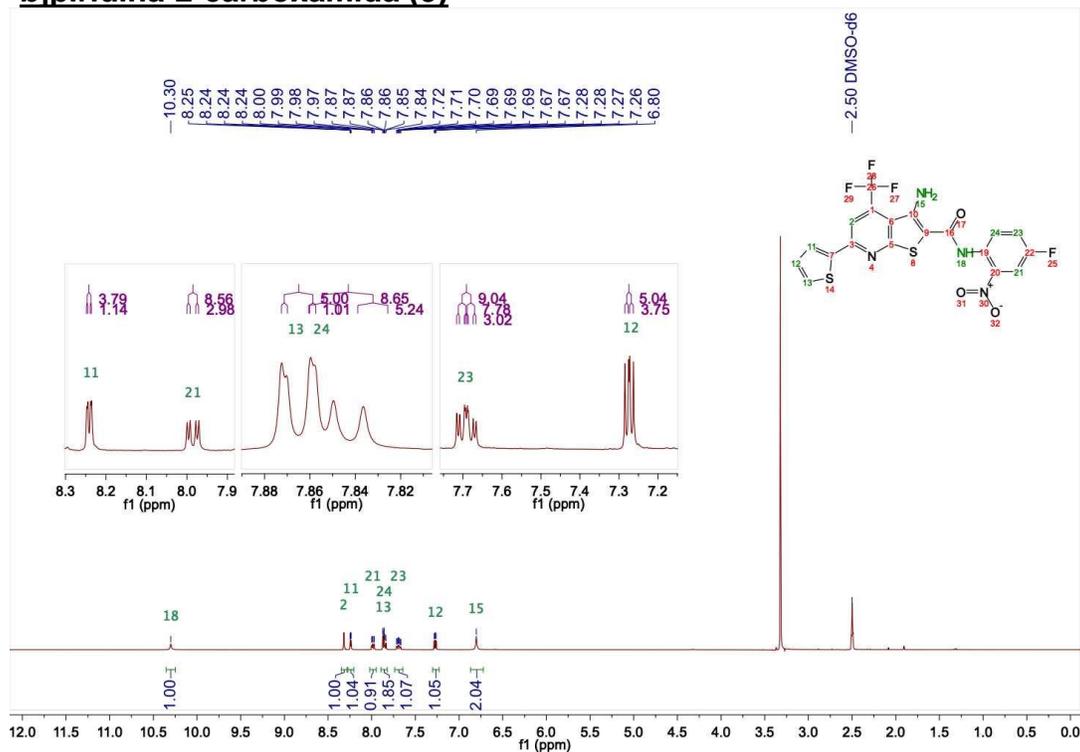


Espectro 74. RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (2)

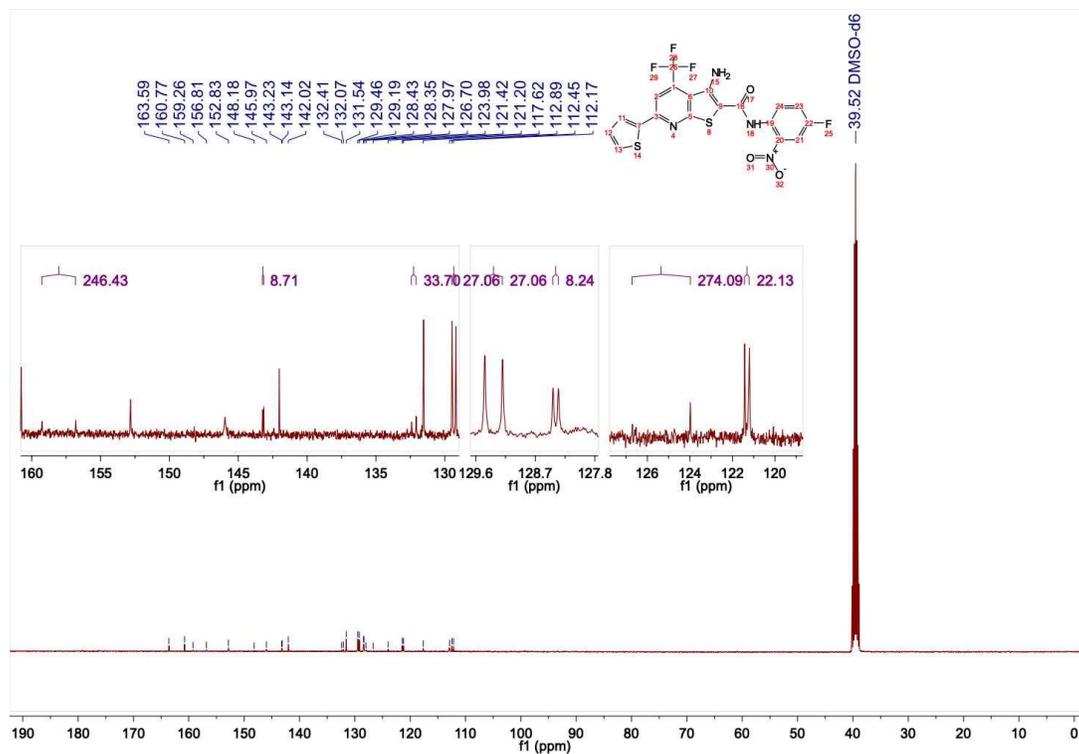


**Espectro 75.** EM (LCMS-DAD/ESI, [M]<sup>-</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-fluorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**2**)

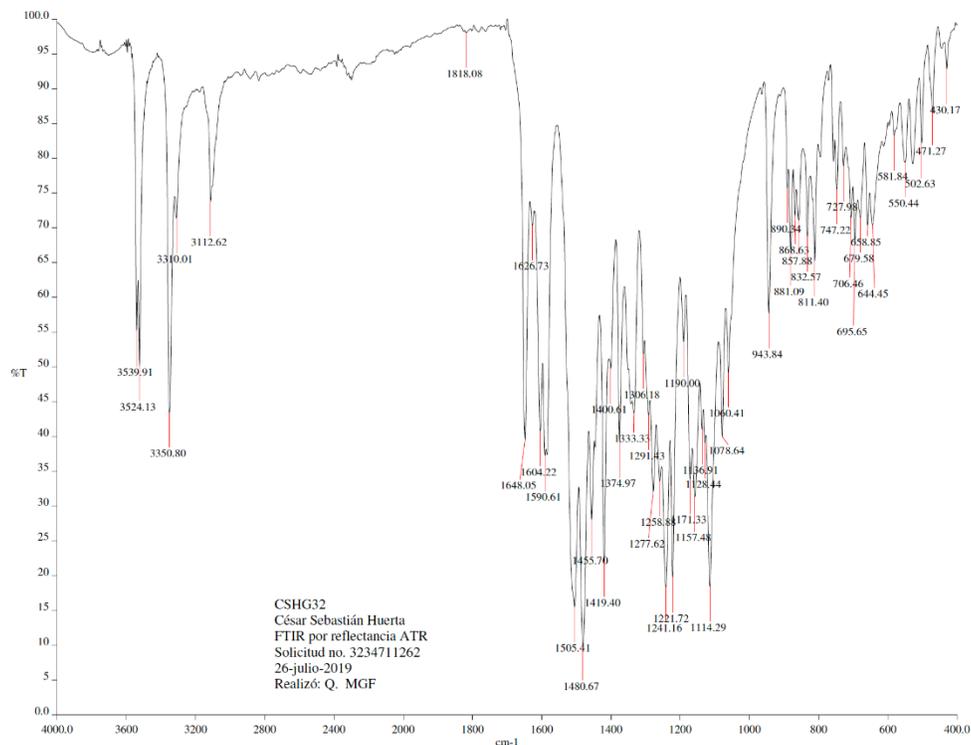
**13.27. 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (3)**



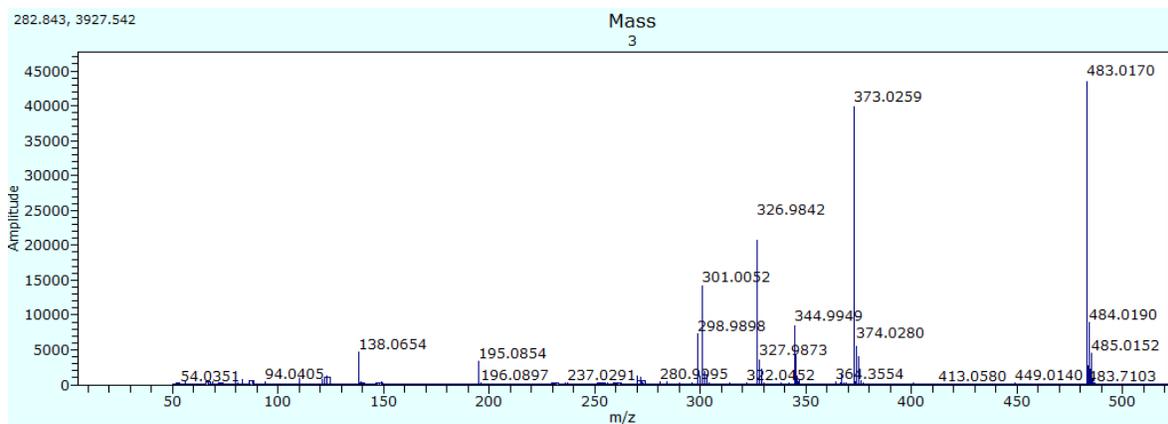
**Espectro 76.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (3)



**Espectro 77.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (3)

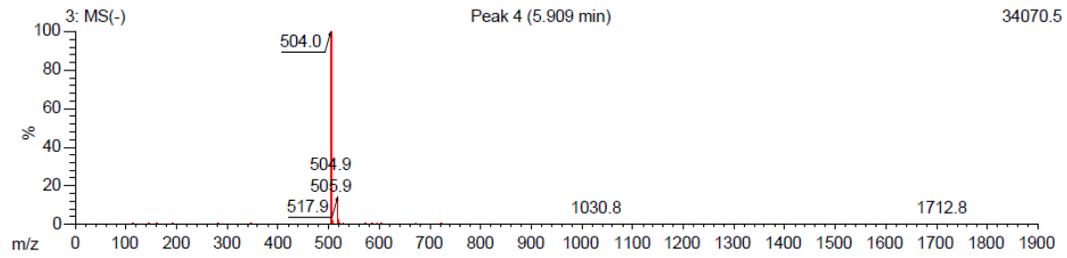


**Espectro 78.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**3**)



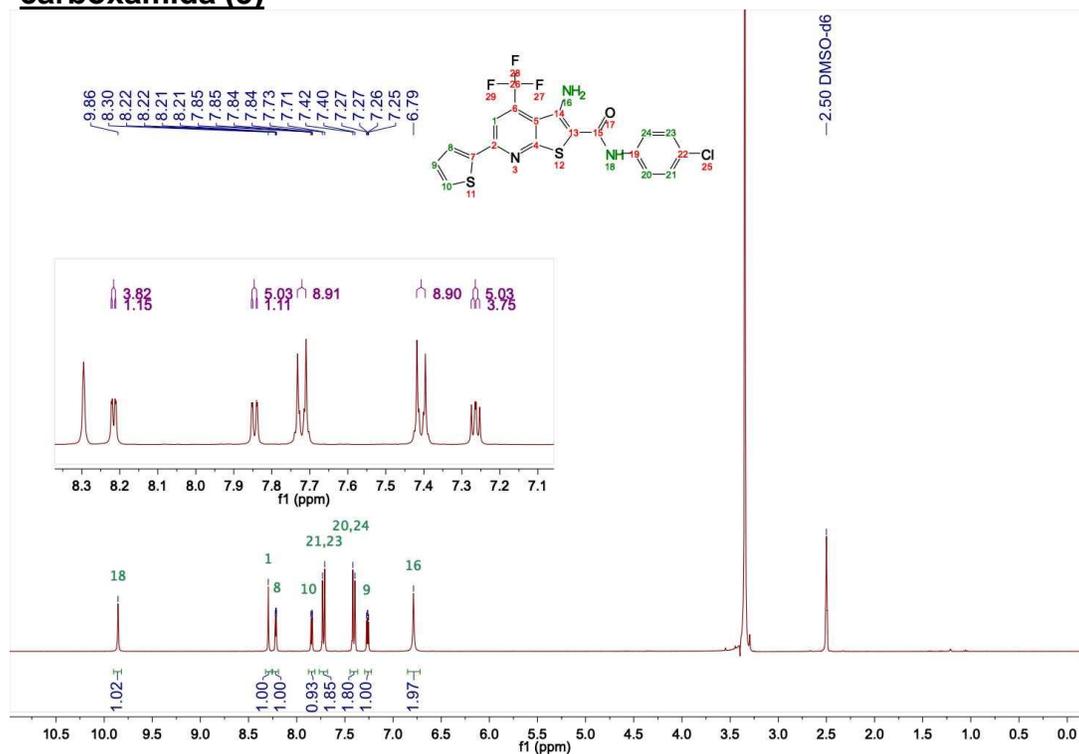
**Espectro 79.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluoro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**3**)



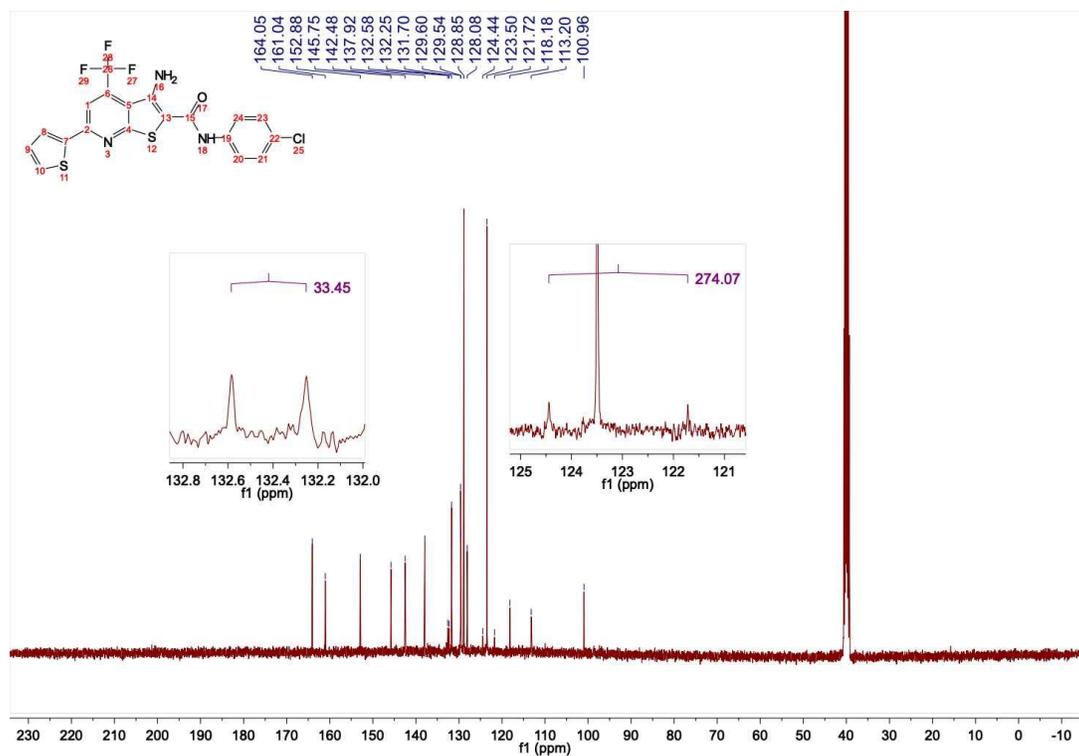


**Espectro 82.** EM (LCMS-DAD/ESI, [M]<sup>-</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-fluor-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**4**)

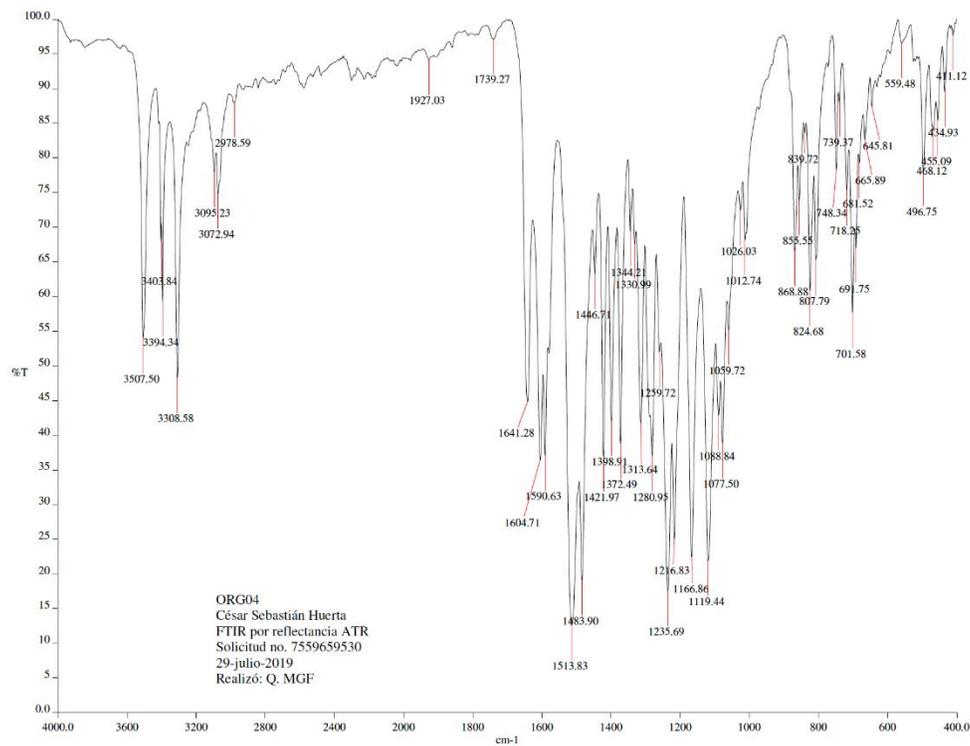
### 13.29. 3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (5)



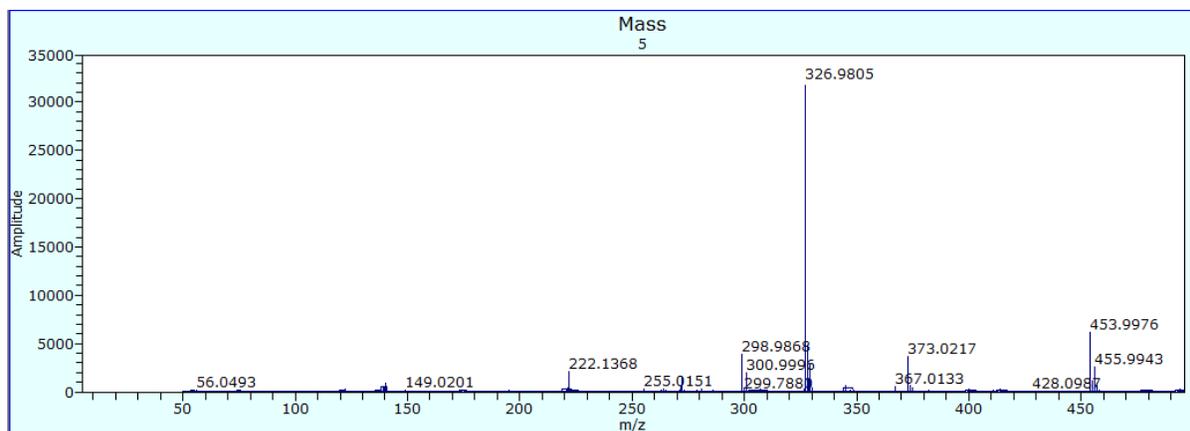
**Espectro 83.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (5)



**Espectro 84.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (5)

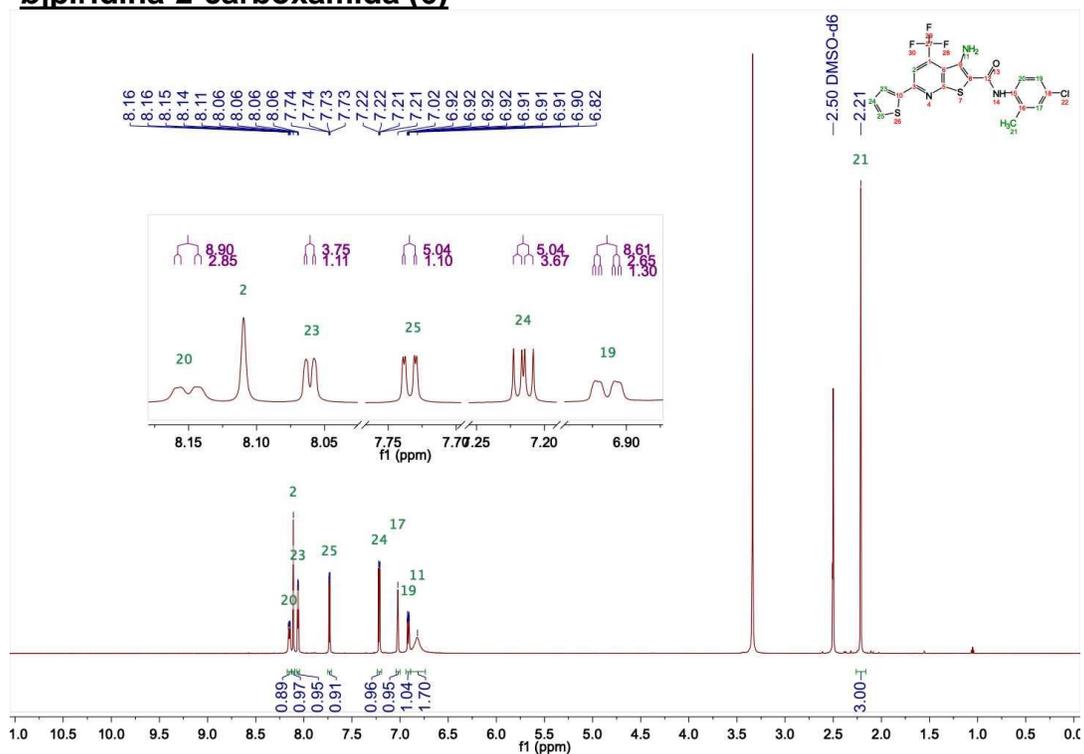


**Espectro 85.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**5**)

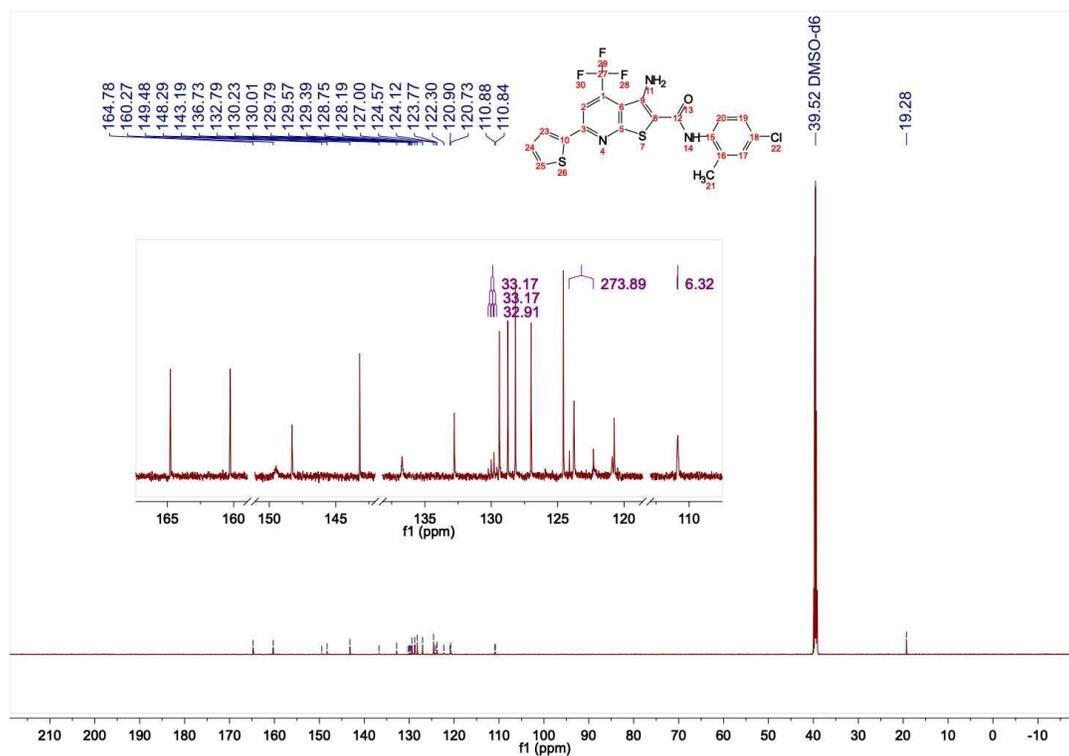


**Espectro 86.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**5**)

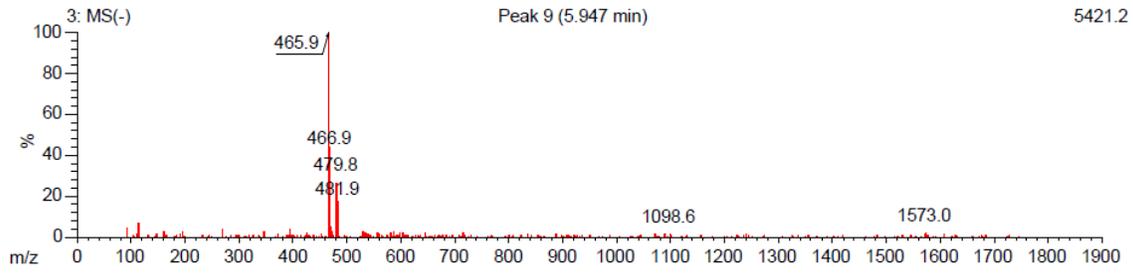
### 13.30. 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (6)



**Espectro 87.** RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (6)

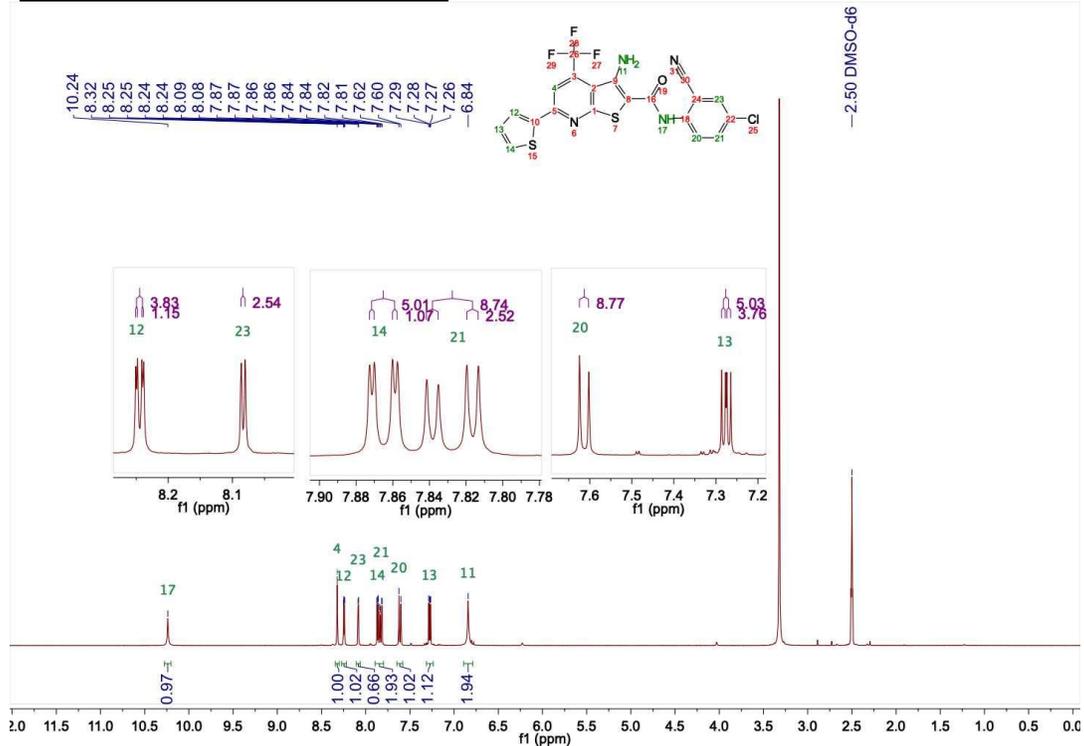


**Espectro 88.** RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (6)

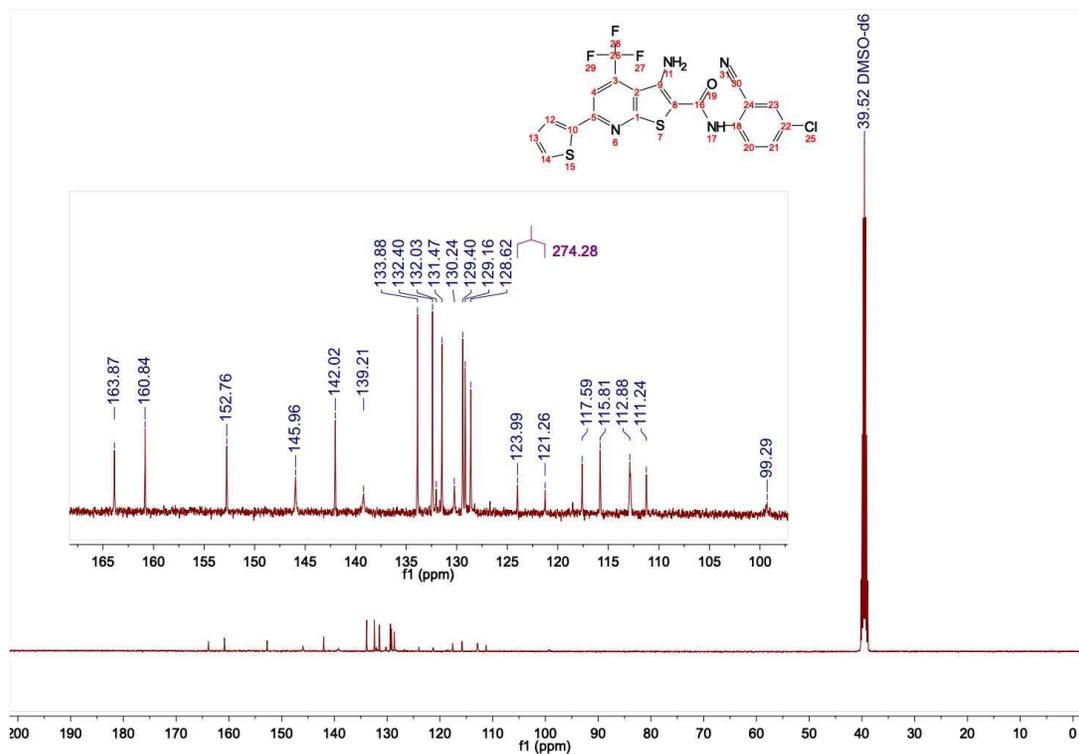


**Espectro 89.** EM (LCMS-DAD/ESI, [M],  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**6**)

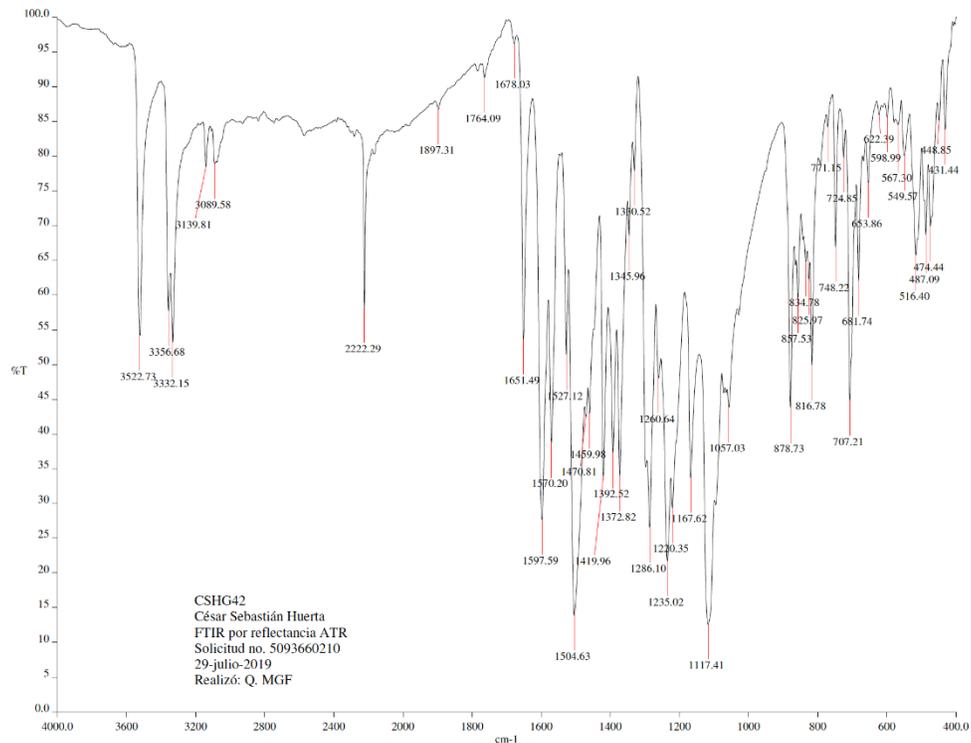
**13.31. 3-Amino-N-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (7)**



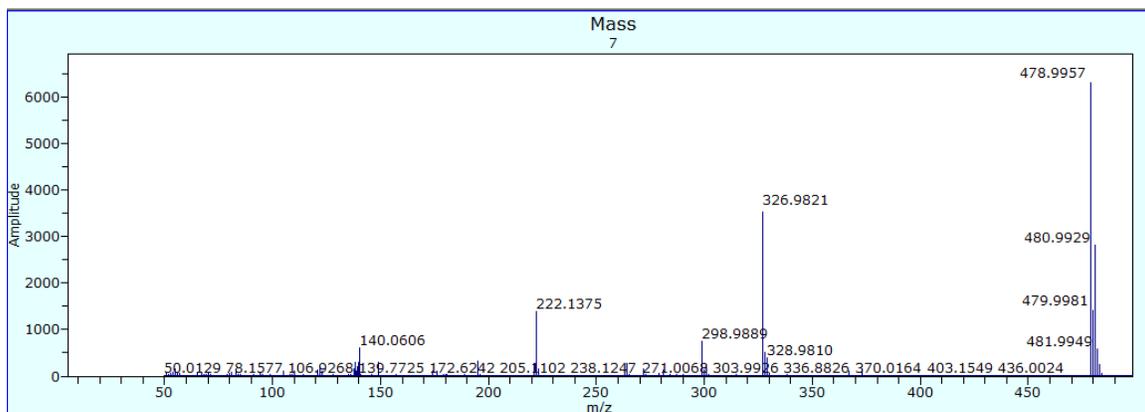
**Espectro 90.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (7)



**Espectro 91.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (7)

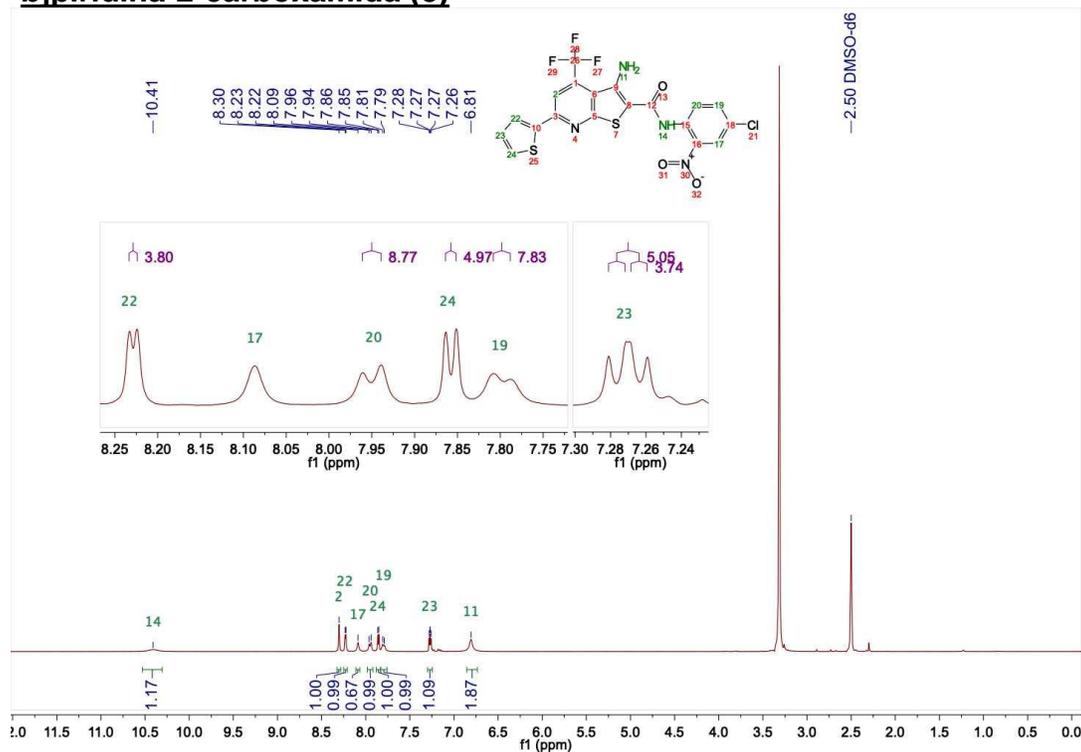


**Espectro 92.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**7**)

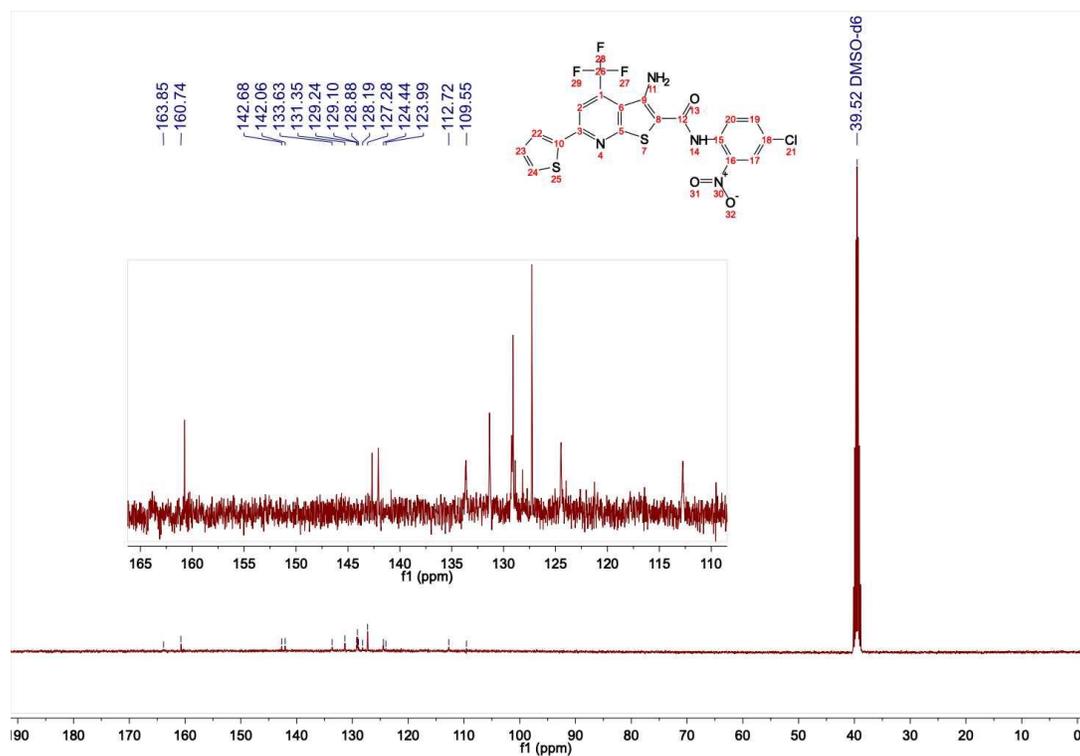


**Espectro 93.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-clorofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**7**)

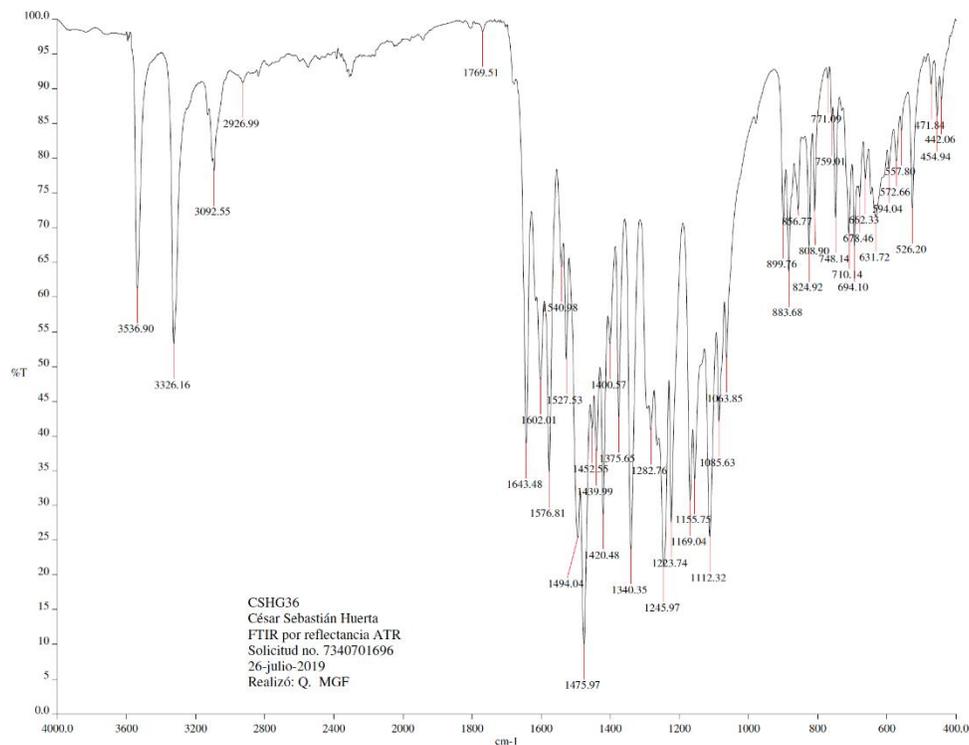
**13.32. 3-Amino-N-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (8)**



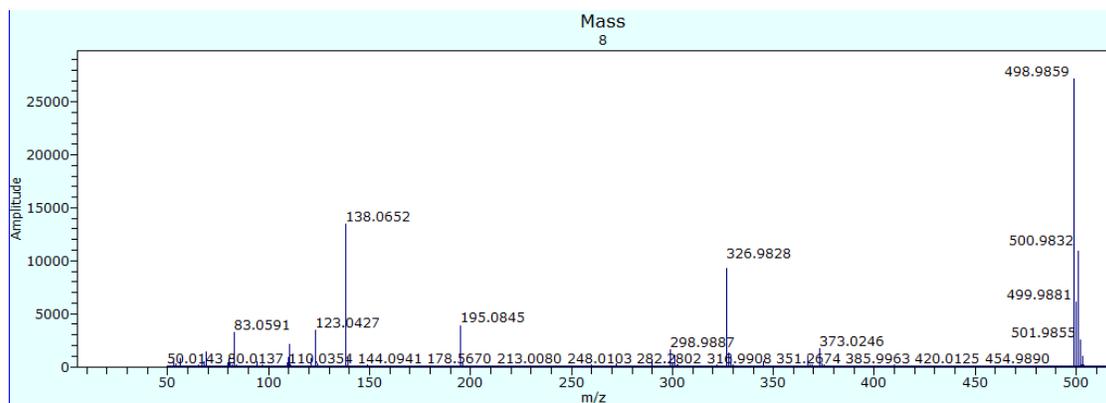
**Espectro 94.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (8)



**Espectro 95.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (8)

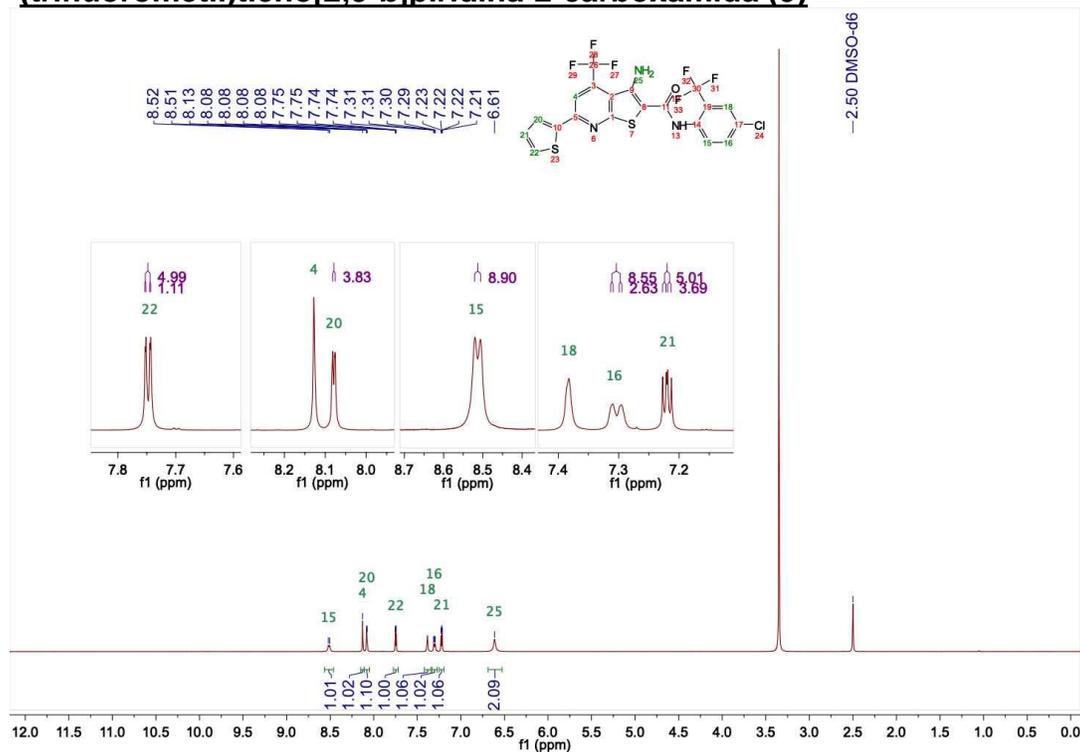


**Espectro 96.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**8**)

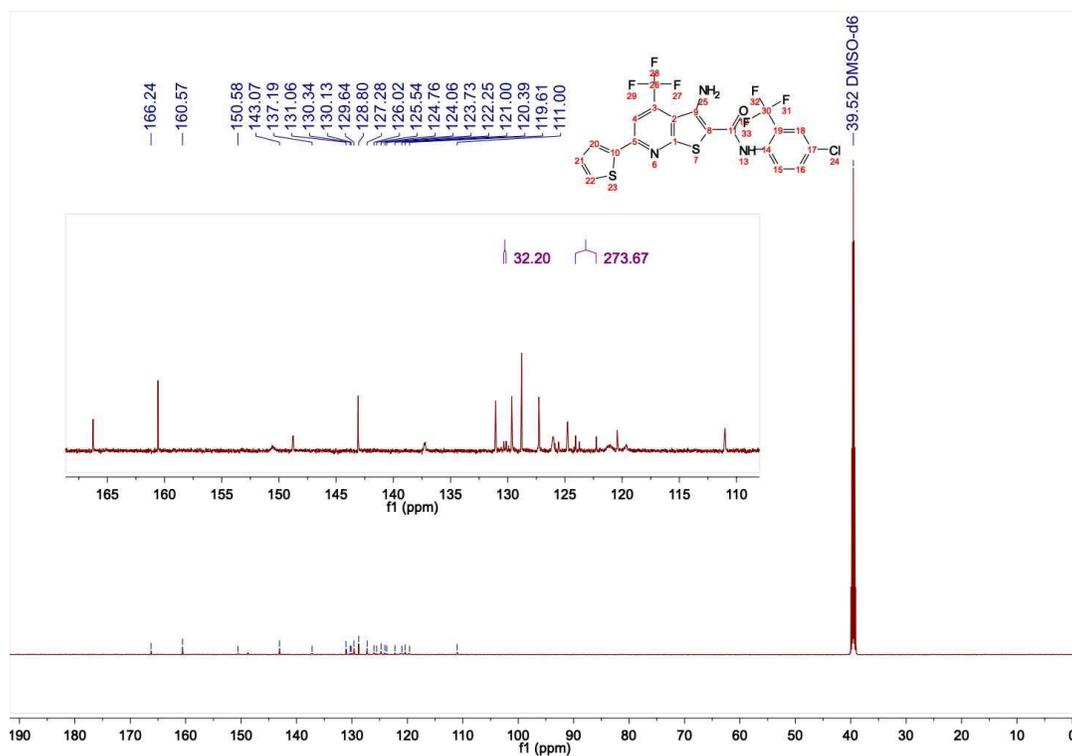


**Espectro 97.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-cloro-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**8**)

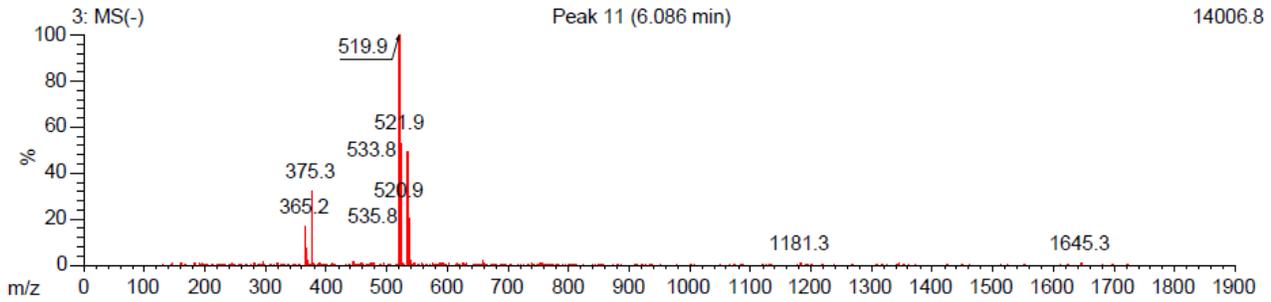
**13.33. 3-Amino-N-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (9)**



**Espectro 98.** RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (9)

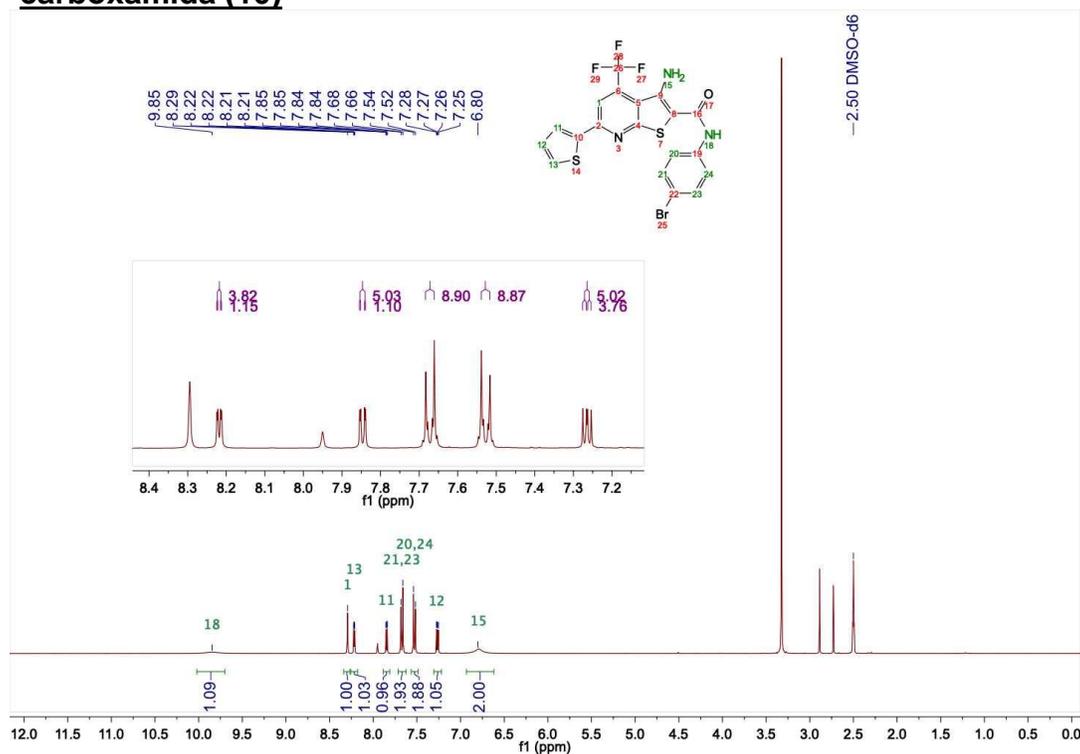


**Espectro 99.** RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (9)

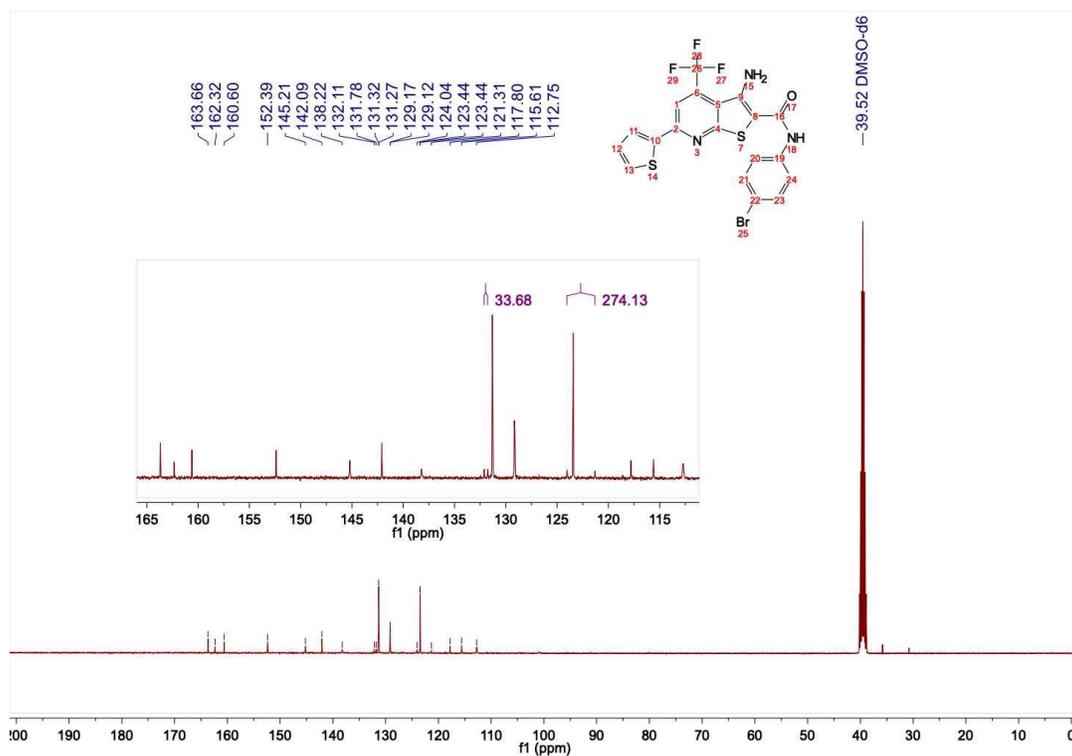


**Espectro 100.** EM (LCMS-DAD/ESI, [M]<sup>+</sup>, m/z) del compuesto 3-Amino-N-(4-cloro-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (**9**)

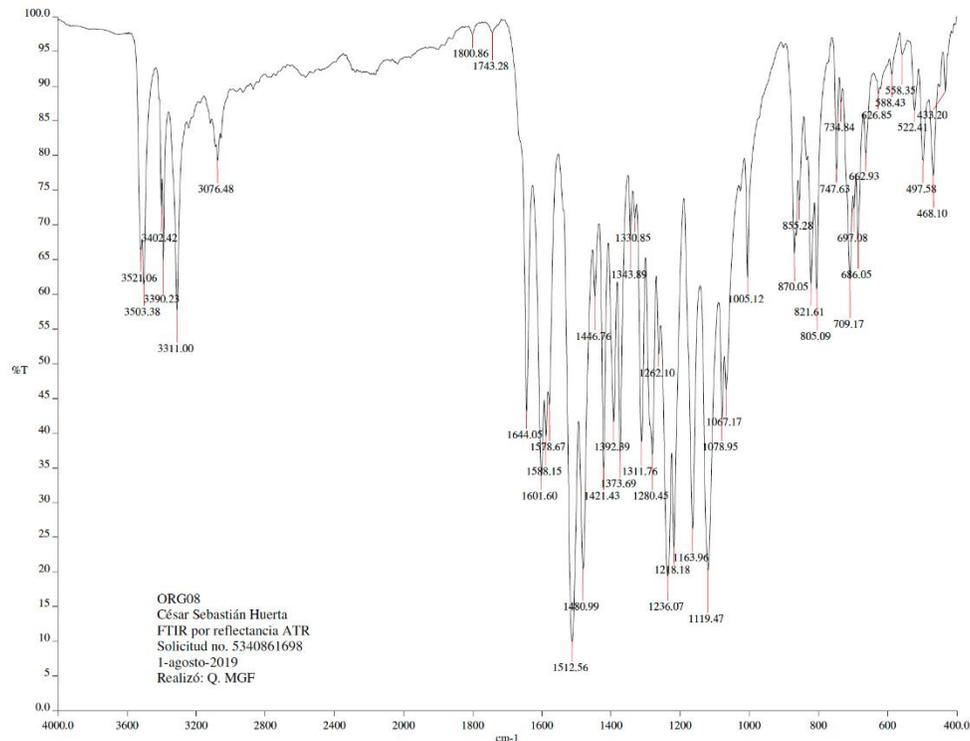
### 13.34. 3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (10)



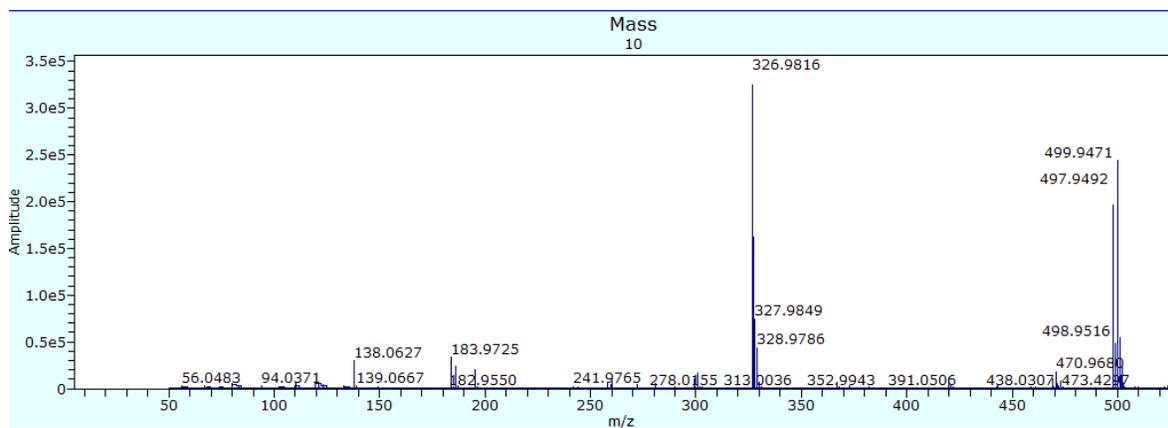
Espectro 101. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (10)



Espectro 102. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (10)

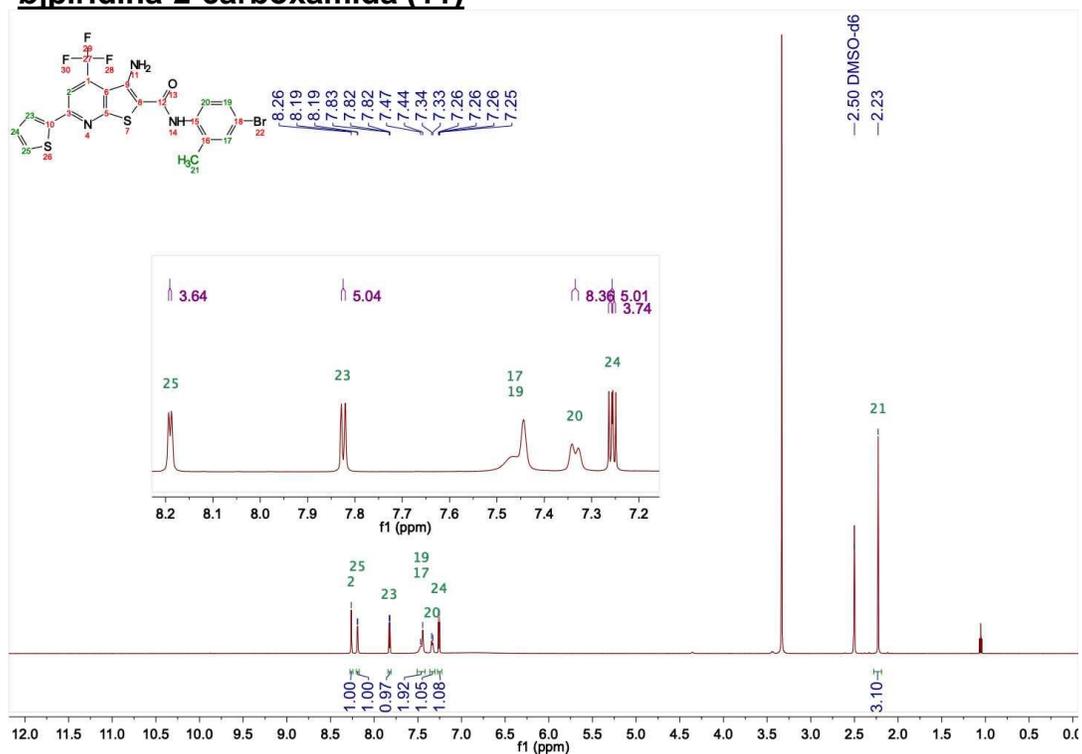


**Espectro 103.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**10**)

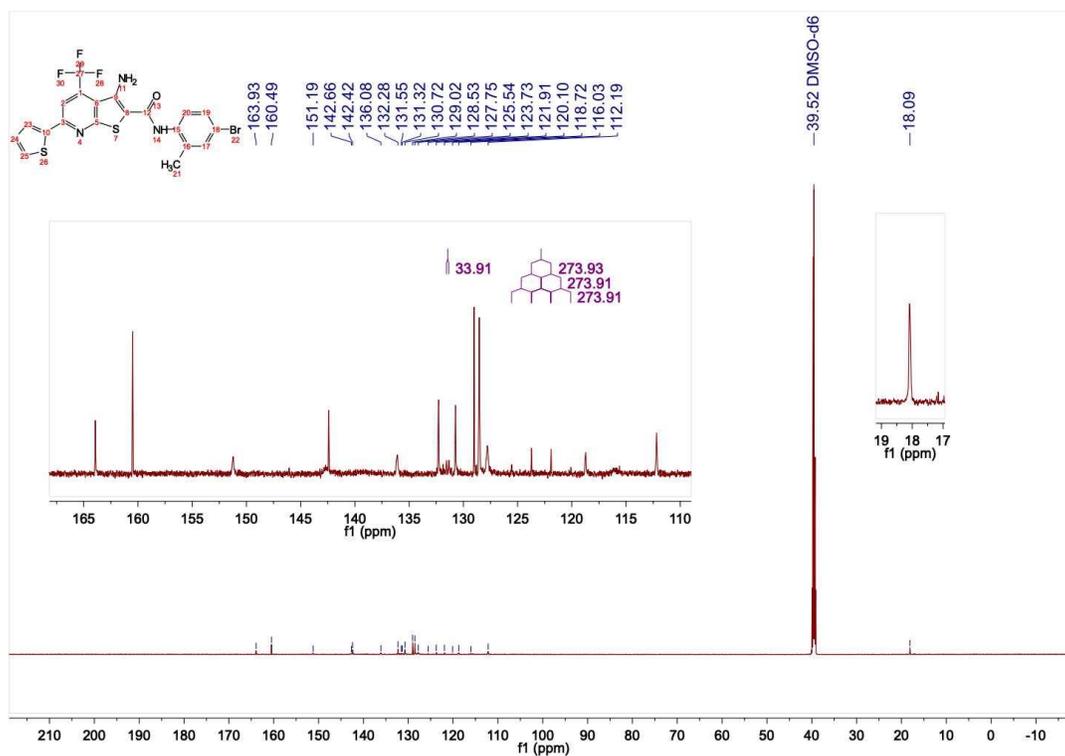


**Espectro 104.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**10**)

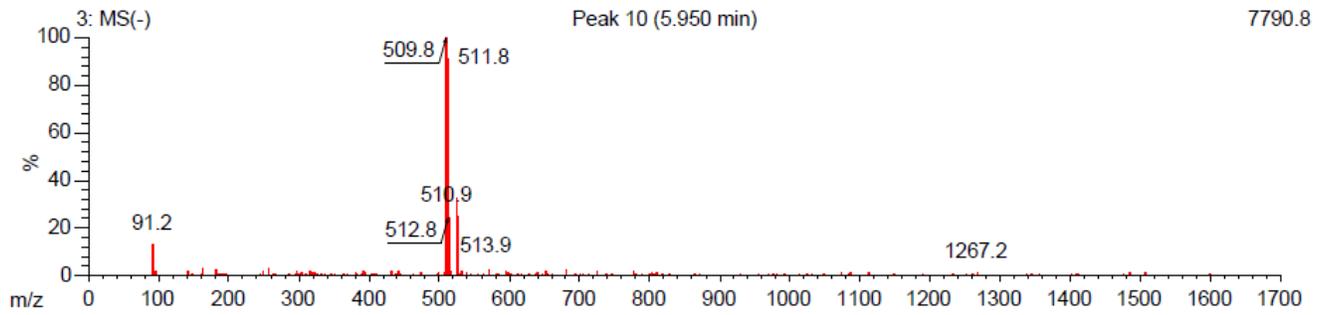
### 13.35. 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (11)



**Espectro 105.** RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (11)

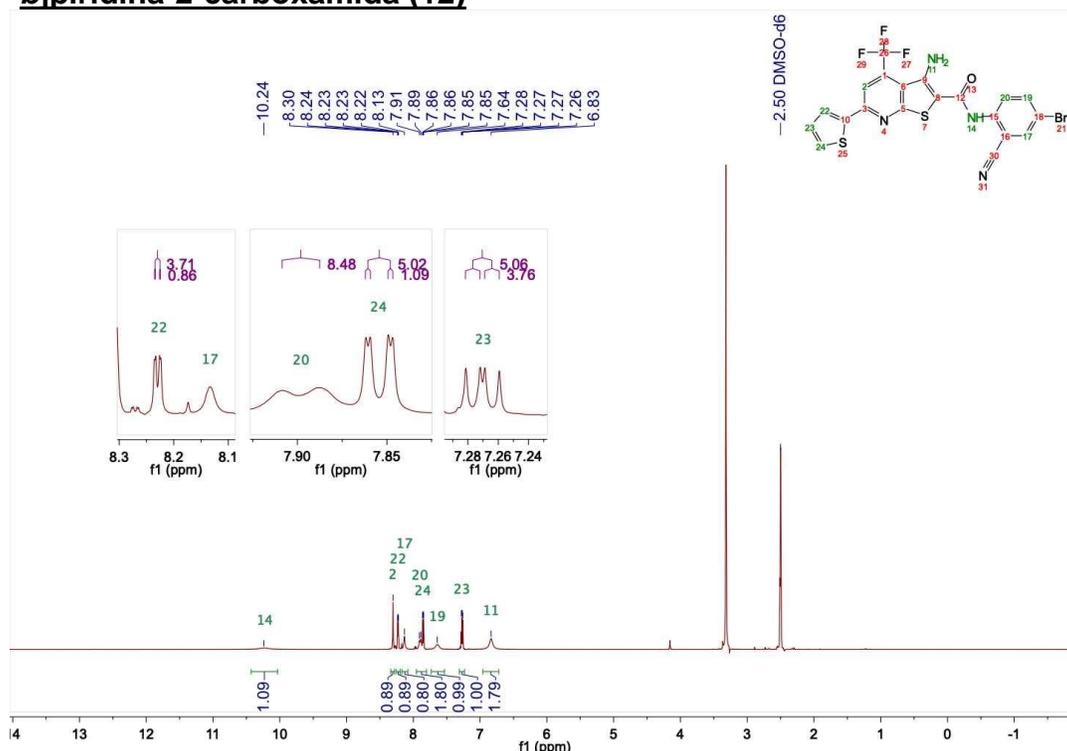


**Espectro 106.** RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (11)

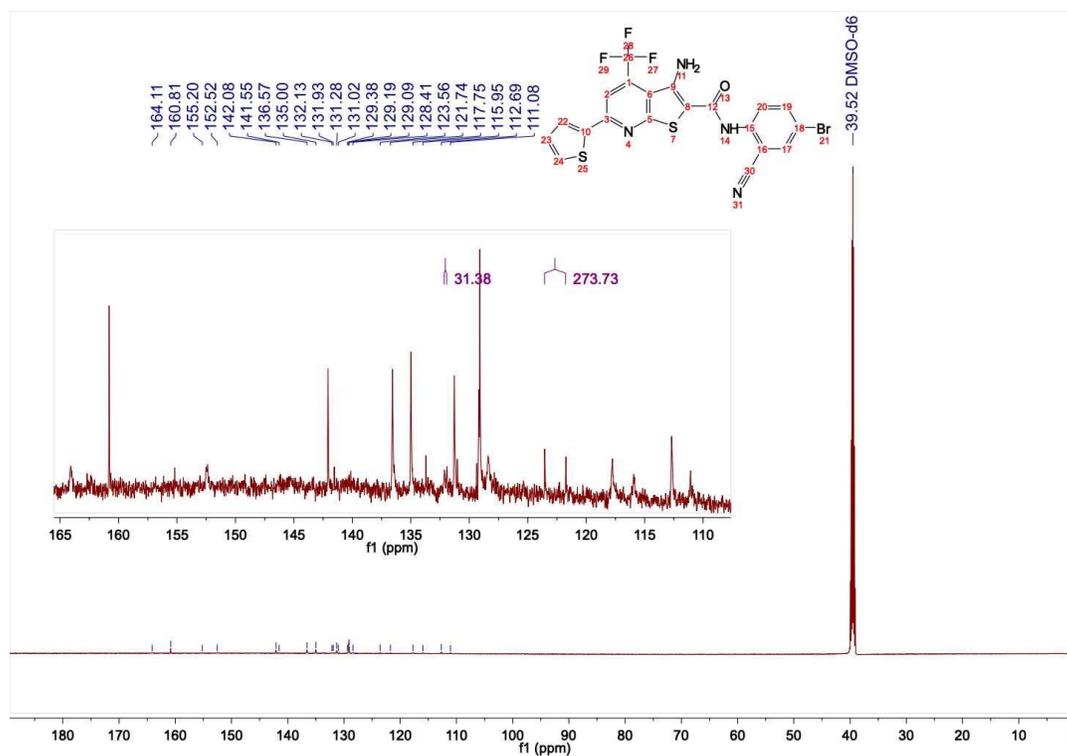


**Espectro 107.** EM (LCMS-DAD/ESI, [M]<sup>-</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-metilfenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**11**)

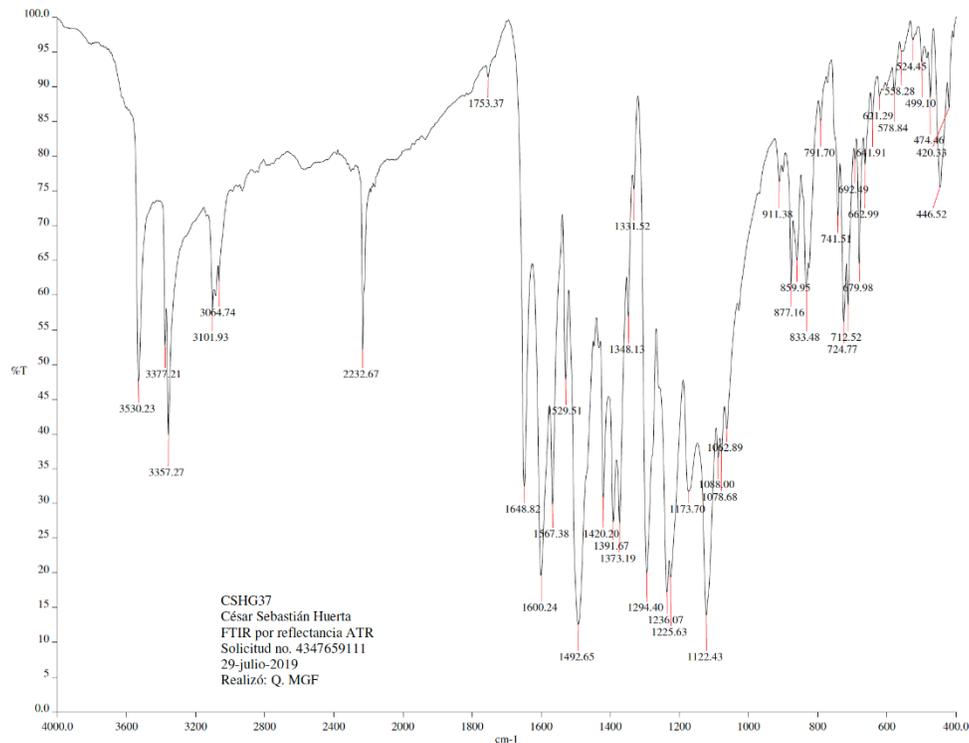
### 13.36. 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (12)



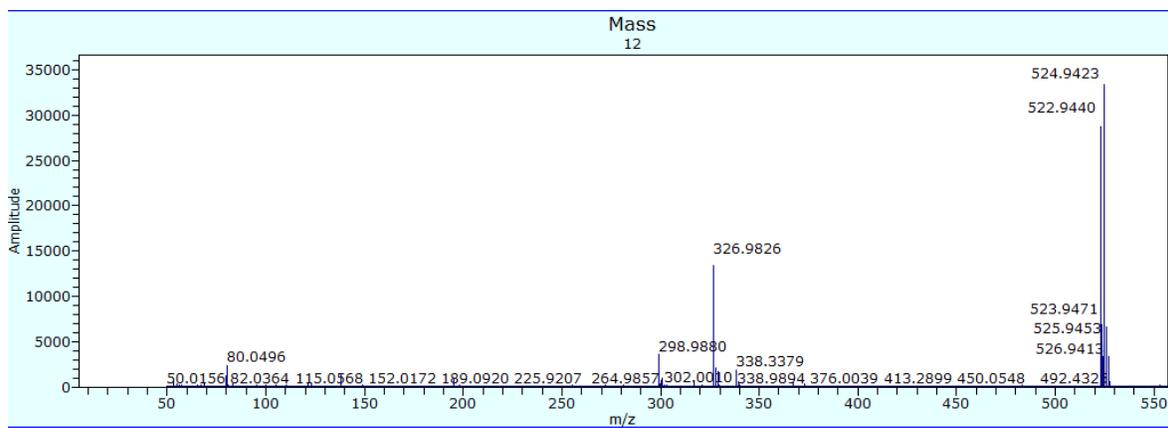
**Espectro 108.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (12)



**Espectro 109.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (12)

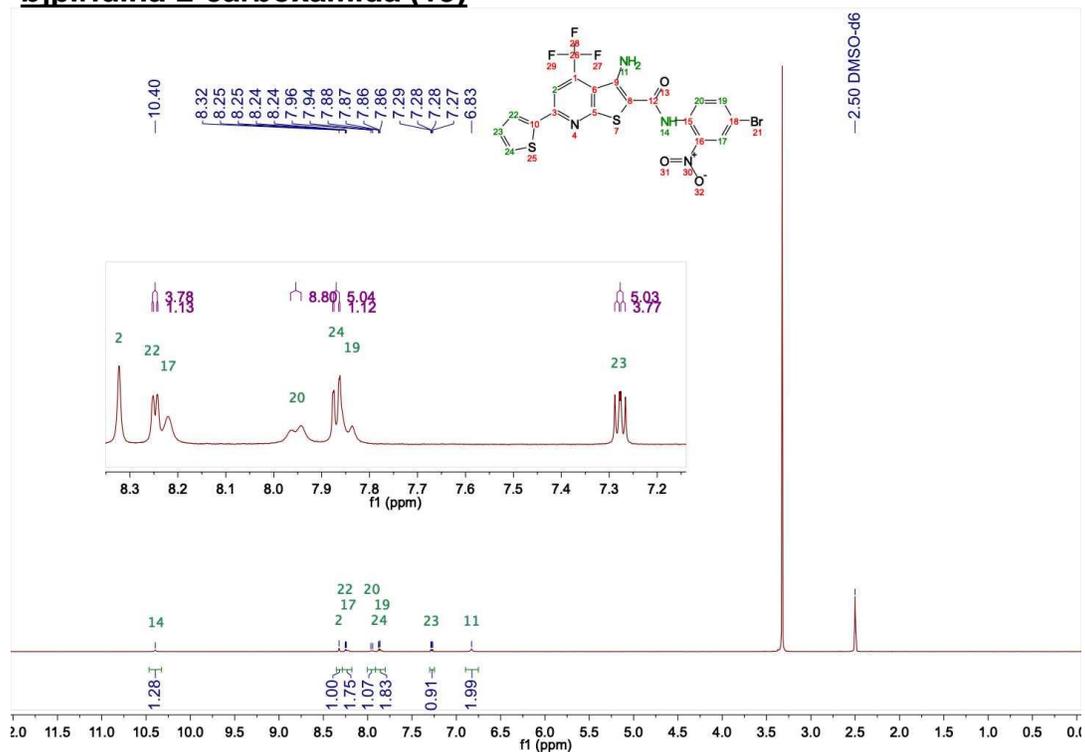


**Espectro 110.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**12**)

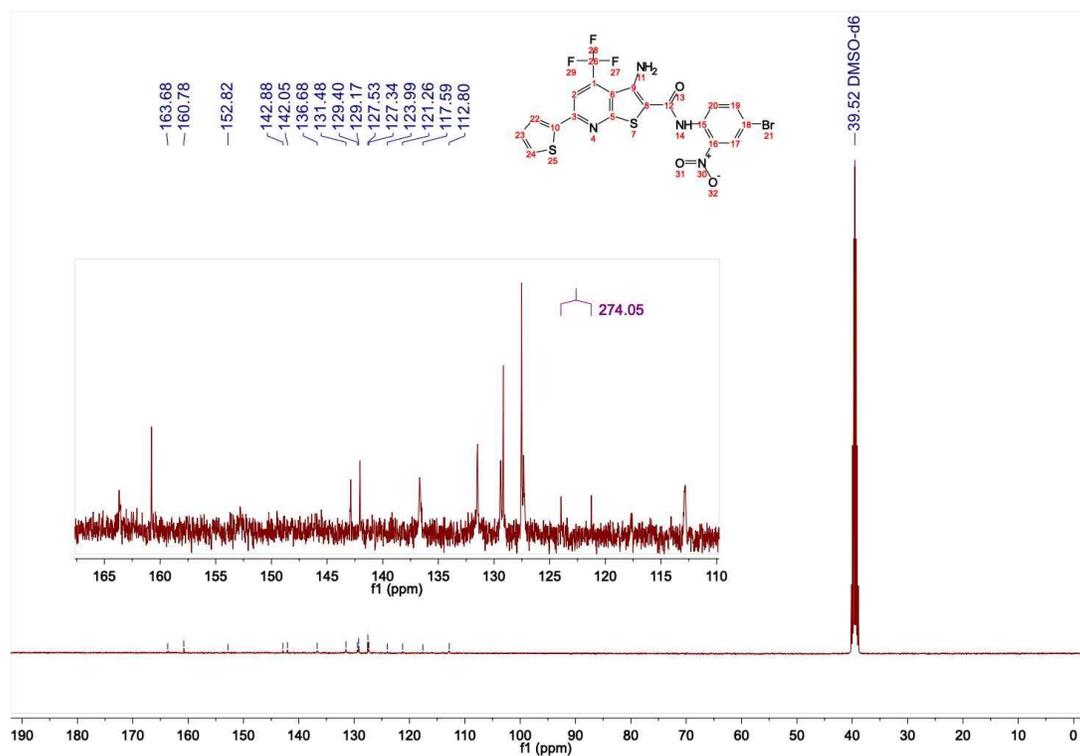


**Espectro 111.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-cianofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**12**)

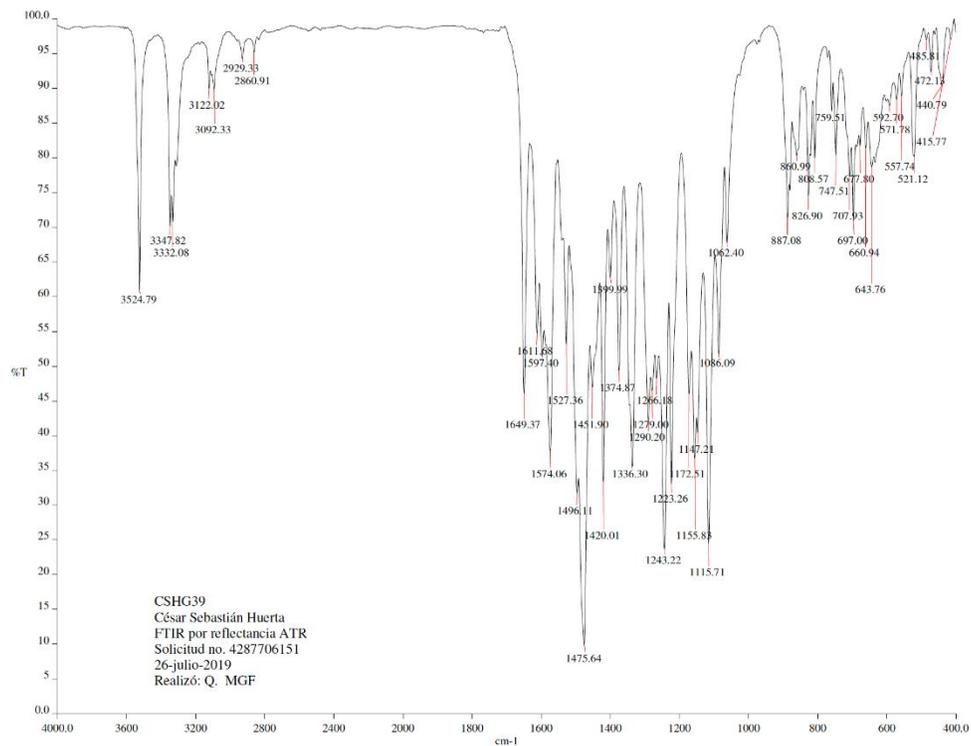
**13.37. 3-Amino-N-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (13)**



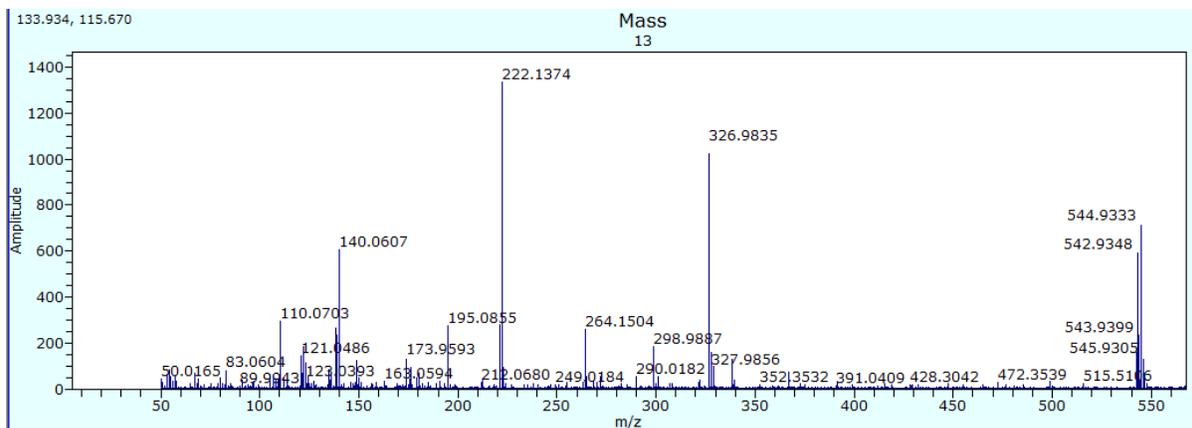
**Espectro 112.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (13)



**Espectro 113.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (13)

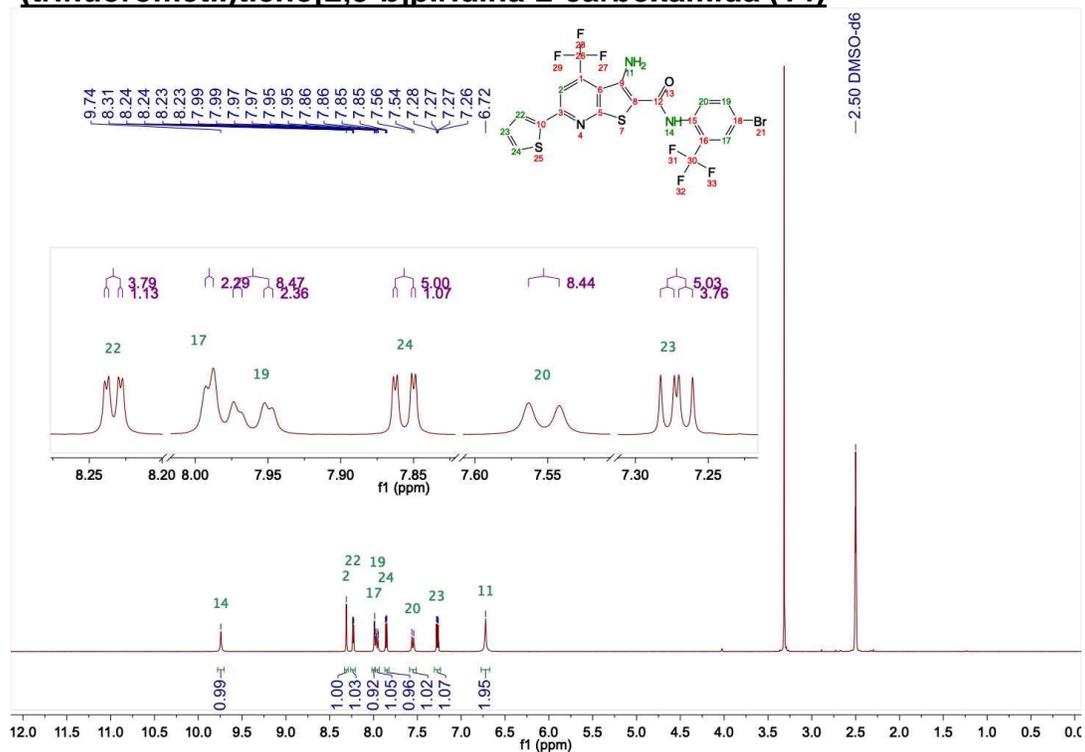


**Espectro 114.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**13**)

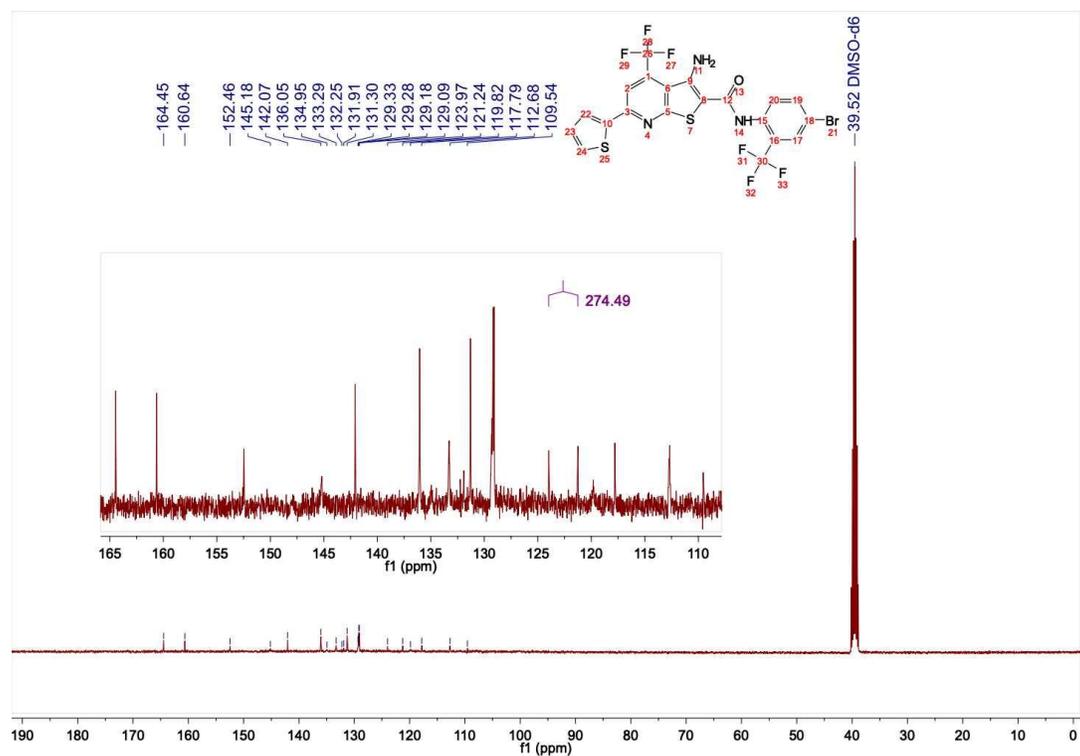


**Espectro 115.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-nitrofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**13**)

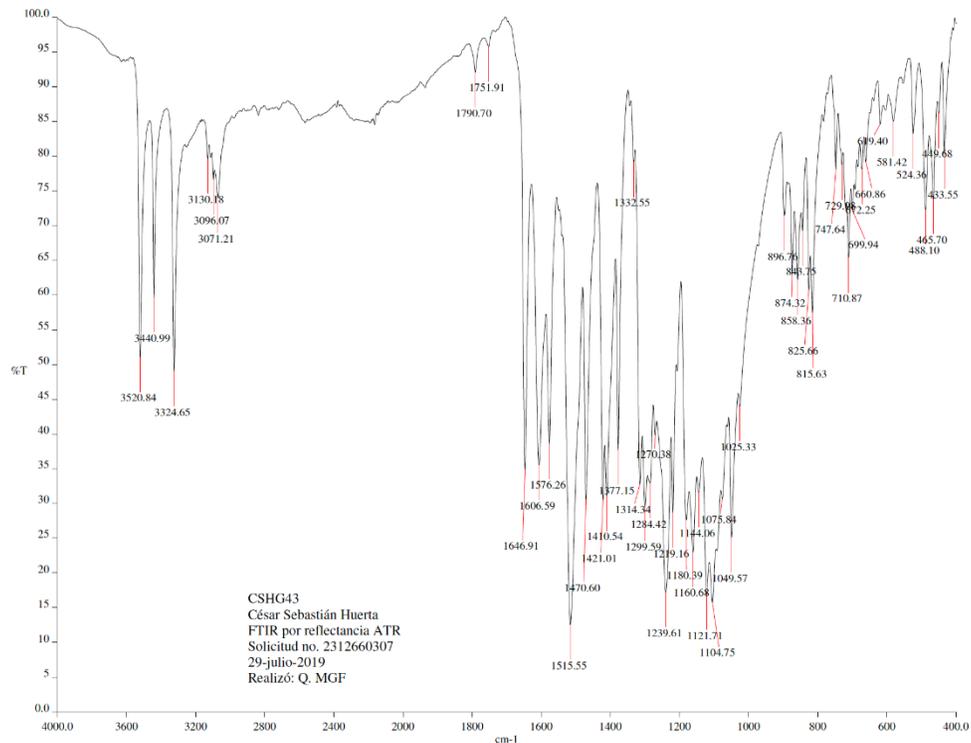
**13.38. 3-Amino-N-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (14)**



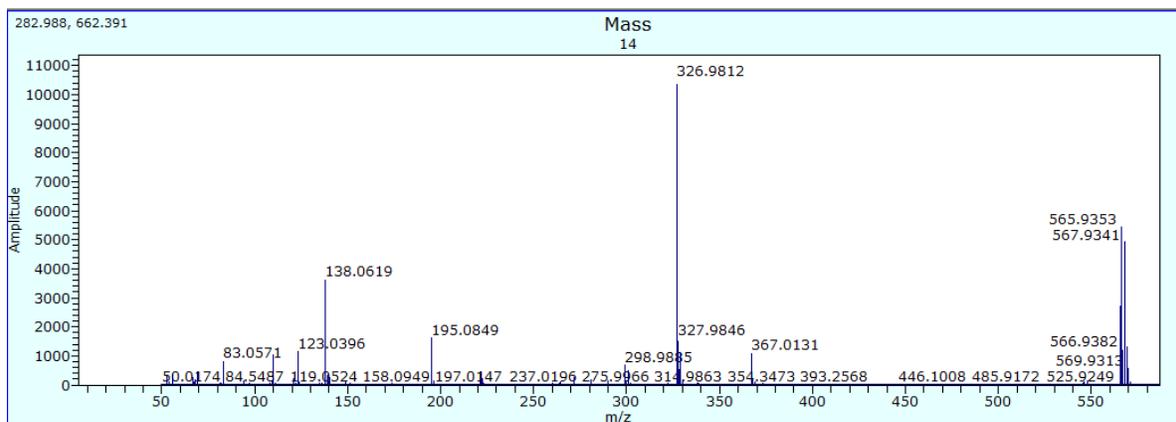
**Espectro 116.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (14)



**Espectro 117.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (14)

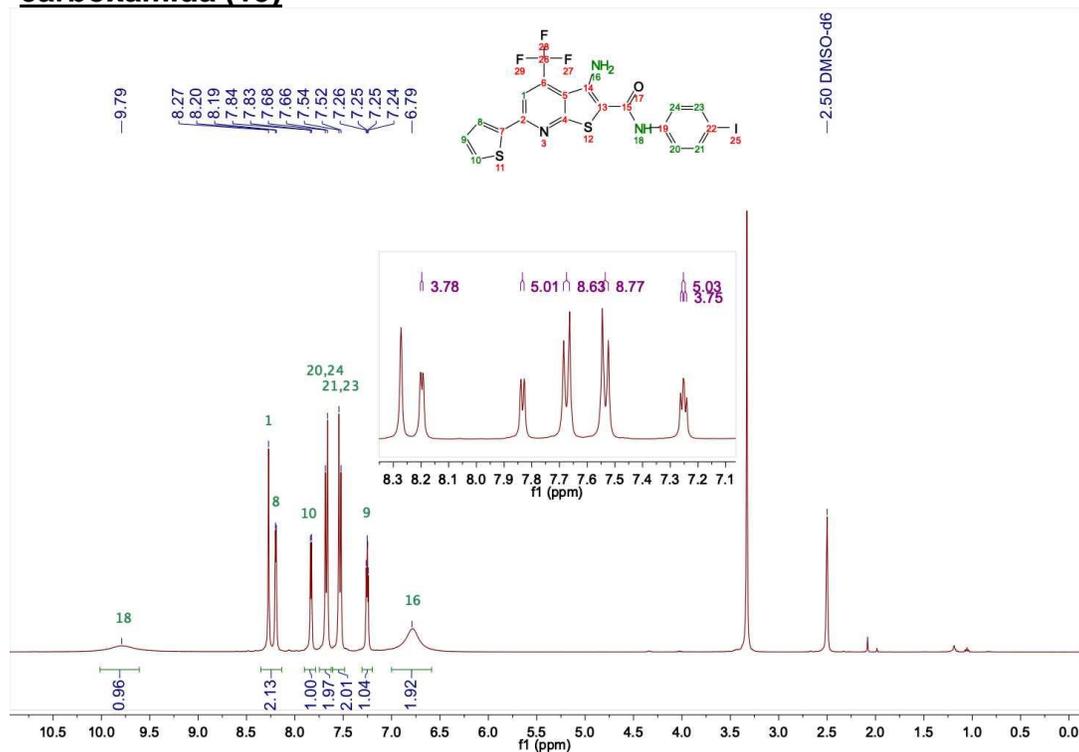


**Espectro 118.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**14**)

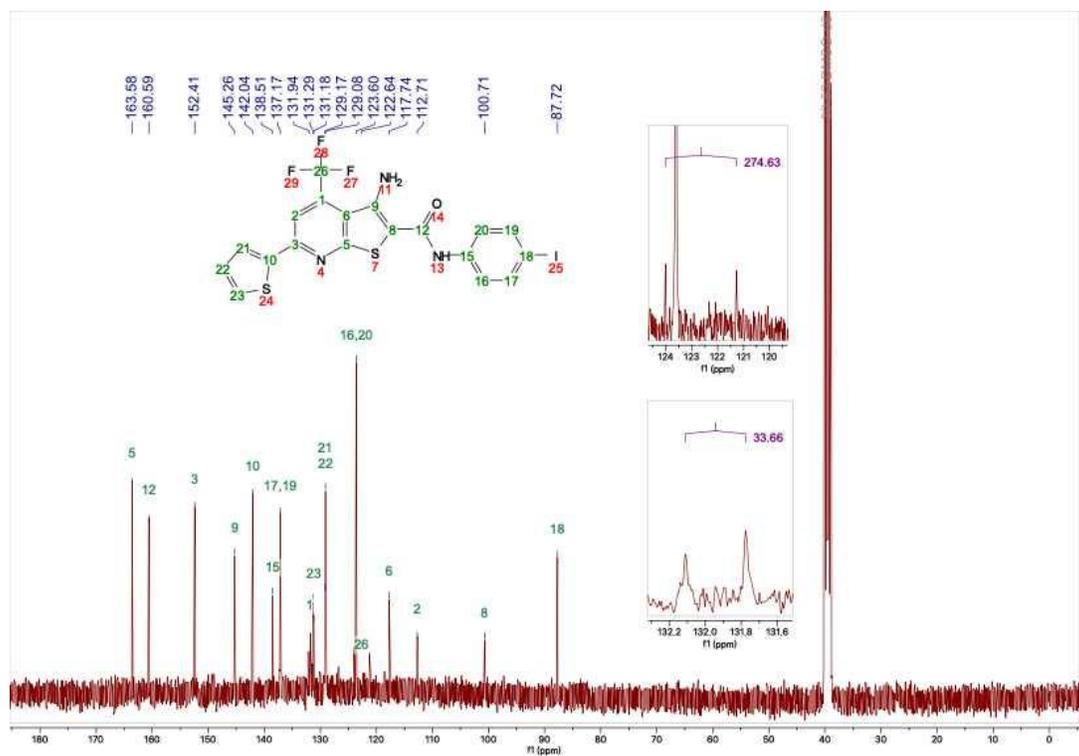


**Espectro 119.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(4-bromo-2-(trifluorometil)fenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**14**)

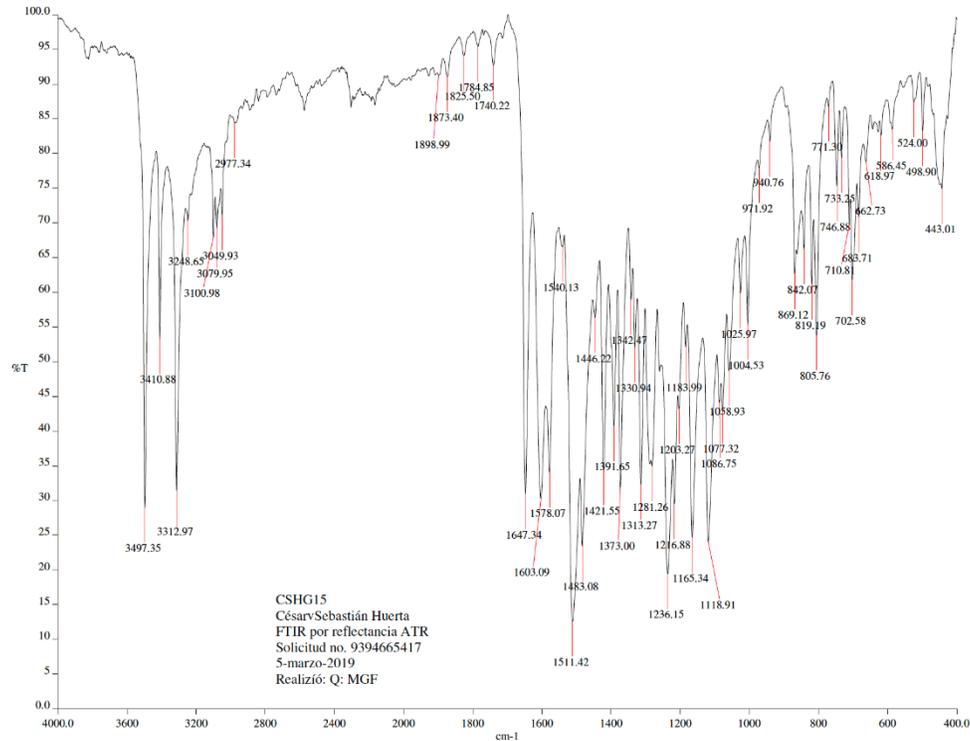
### 13.39. 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (15)



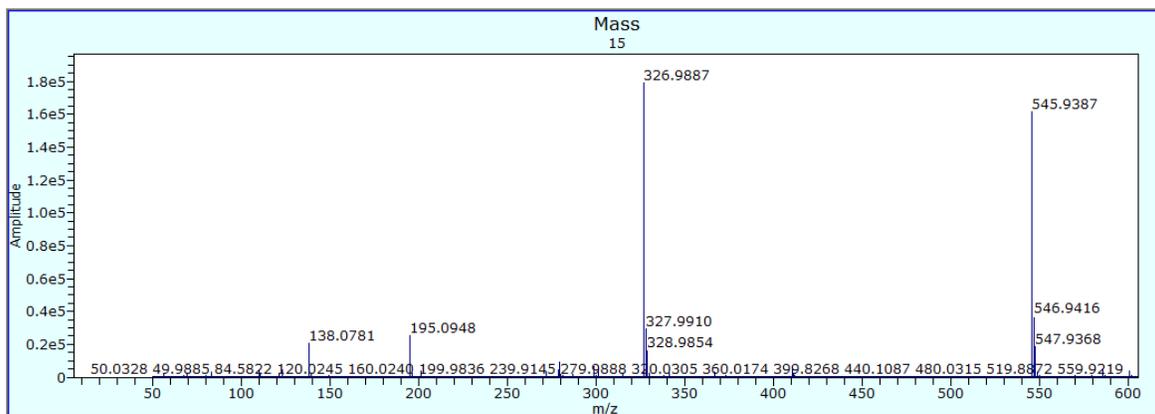
Espectro 120. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (15)



Espectro 121. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-*N*-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (15)

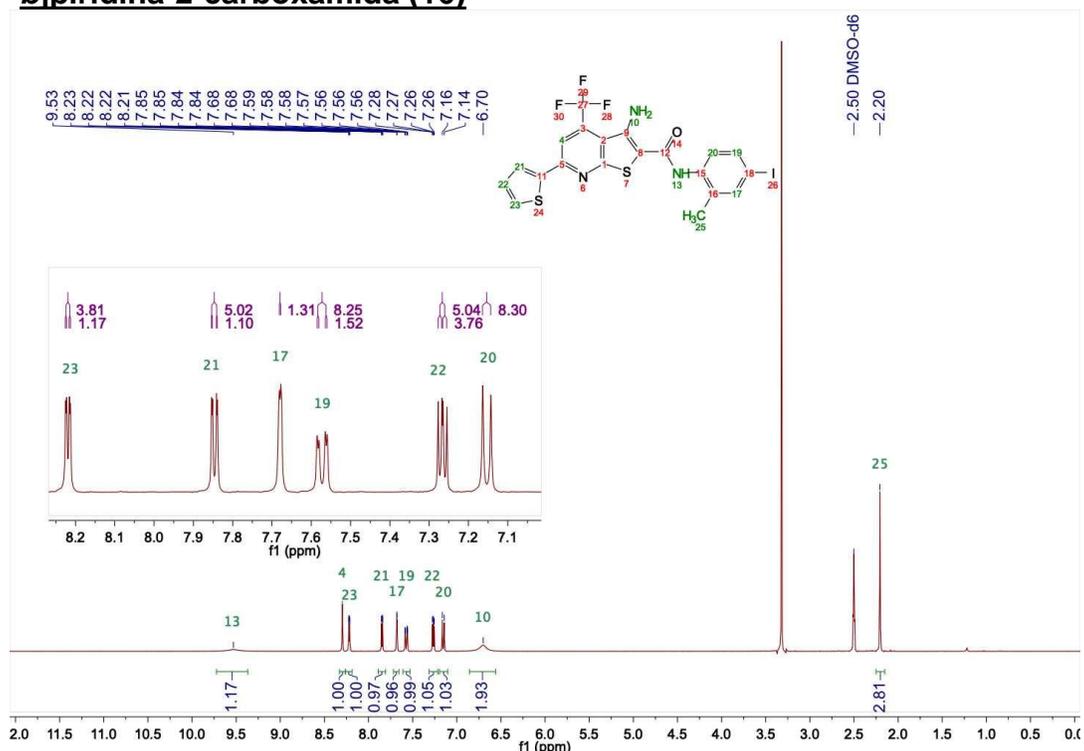


**Espectro 122.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-N-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**)

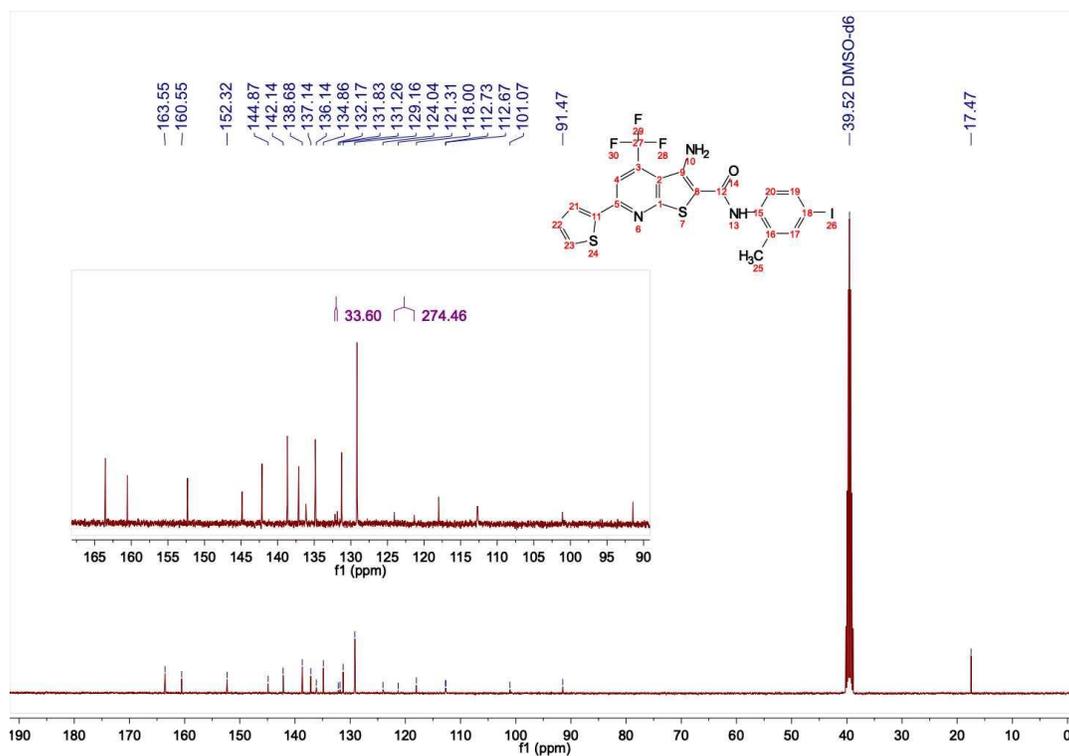


**Espectro 123.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) del compuesto 3-Amino-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)-N-(4-yodofenil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**15**)

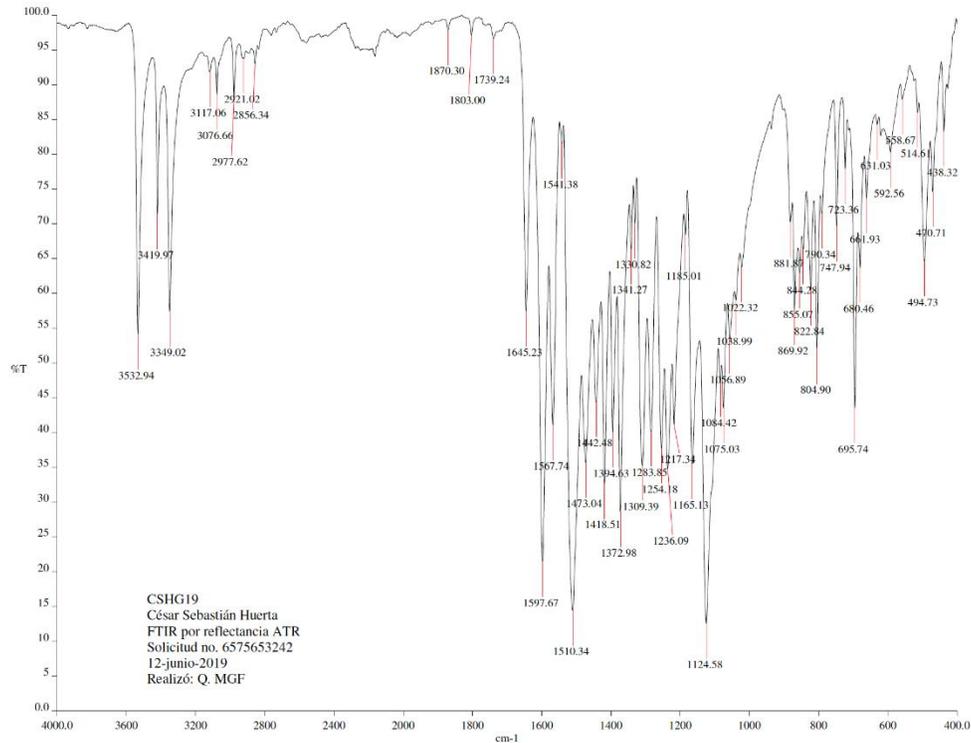
### 13.40. 3-Amino-*N*-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (16)



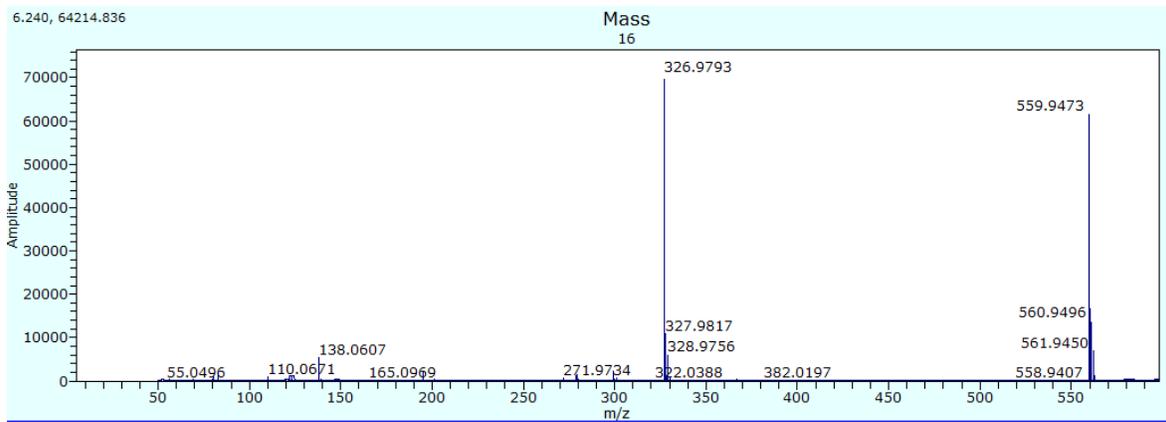
**Espectro 124.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (16)



**Espectro 125.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (16)

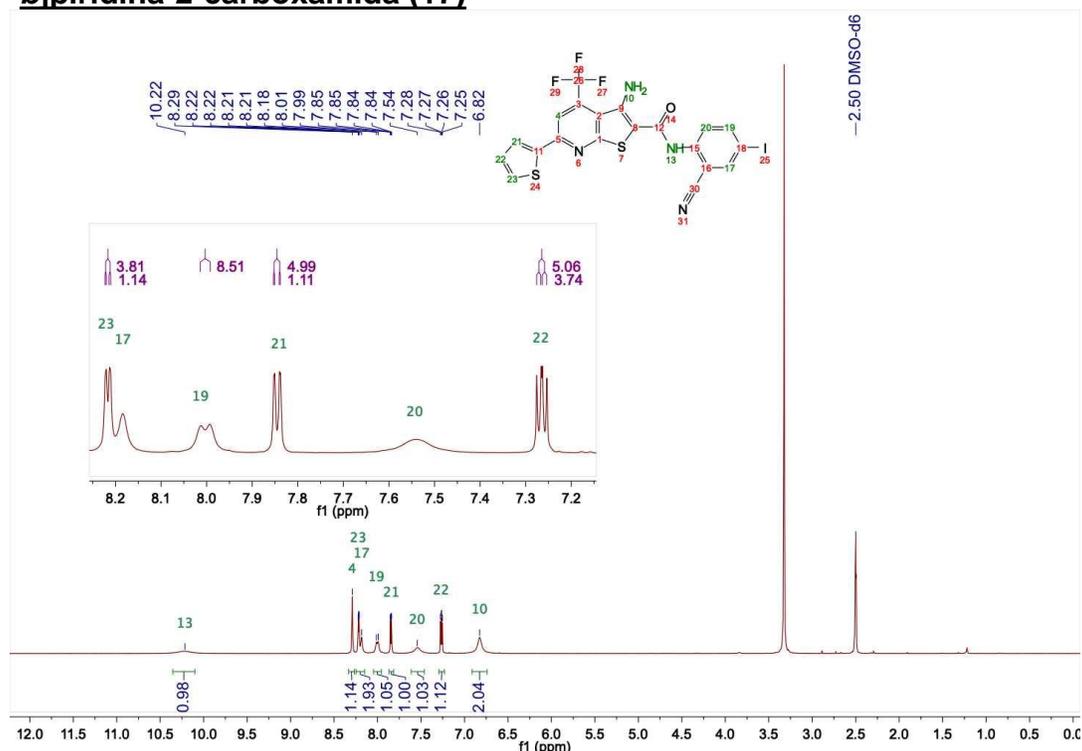


**Espectro 126.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**16**)

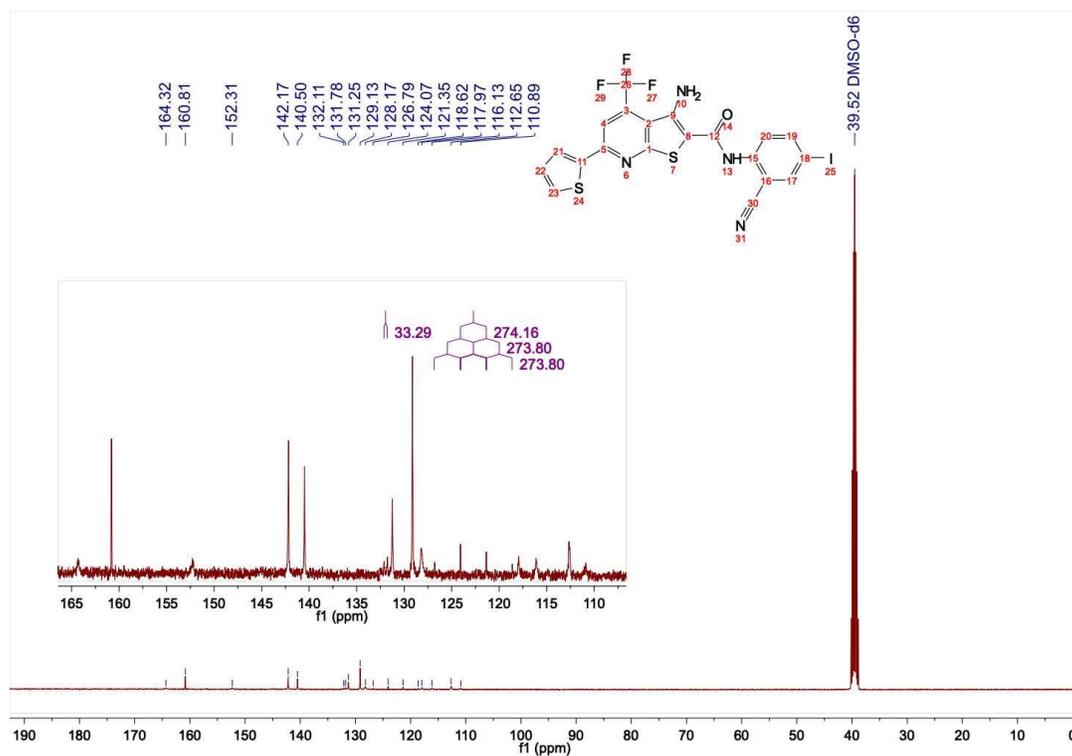


**Espectro 127.** EMAR (APCI,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-metil-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**16**)

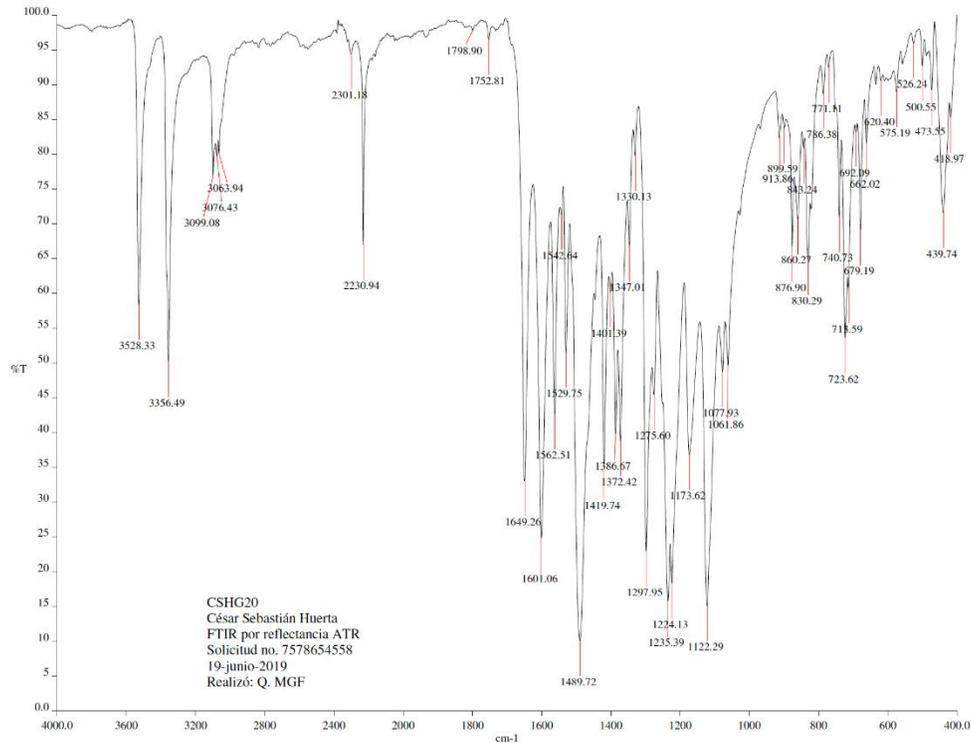
### 13.41. 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (17)



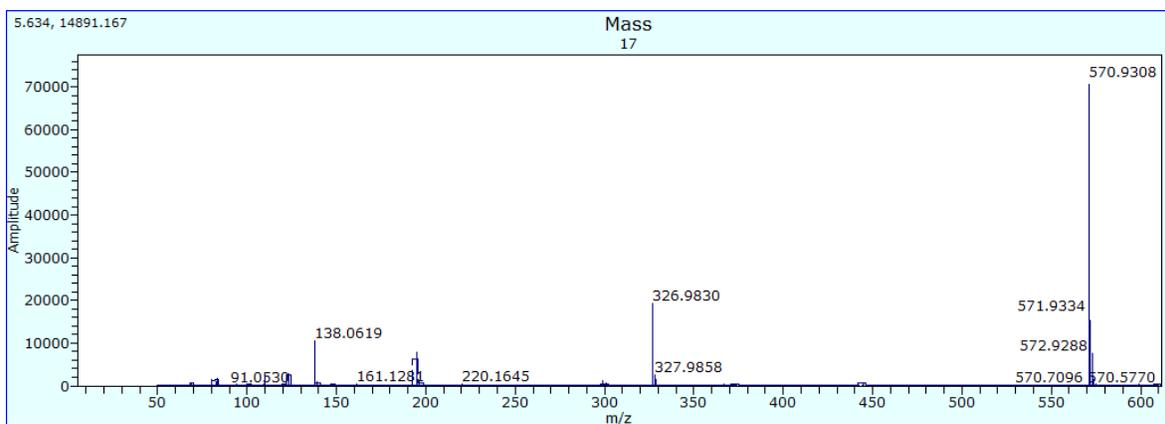
**Espectro 128.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (17)



**Espectro 129.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (17)

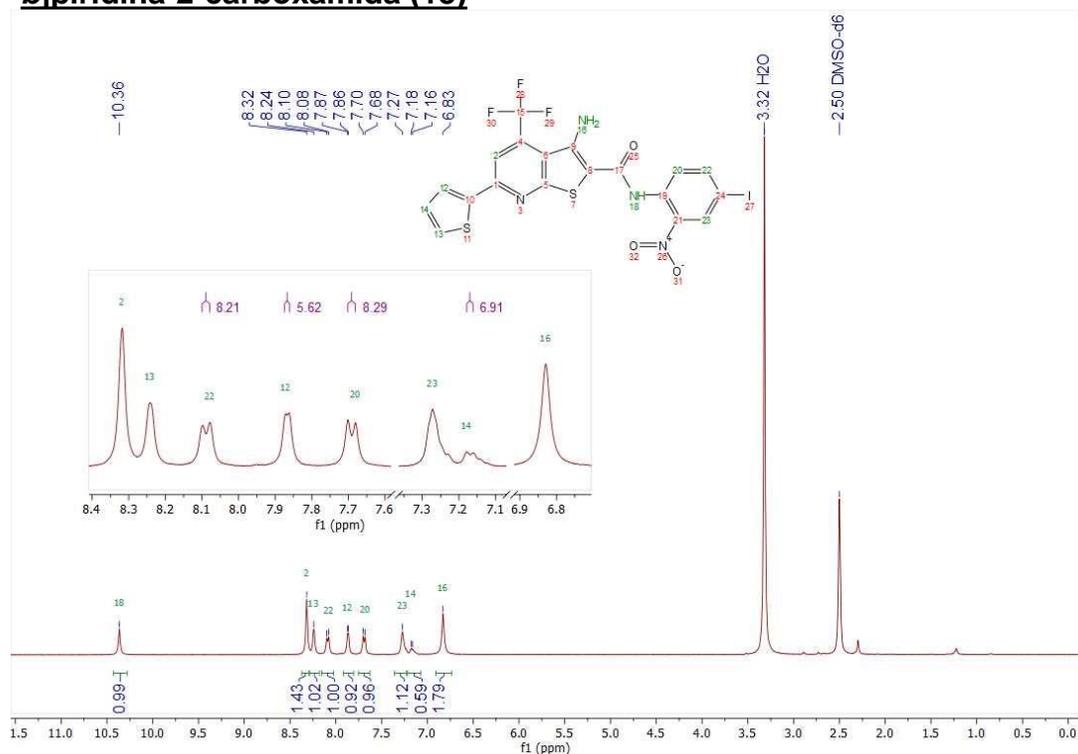


**Espectro 130.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**17**)

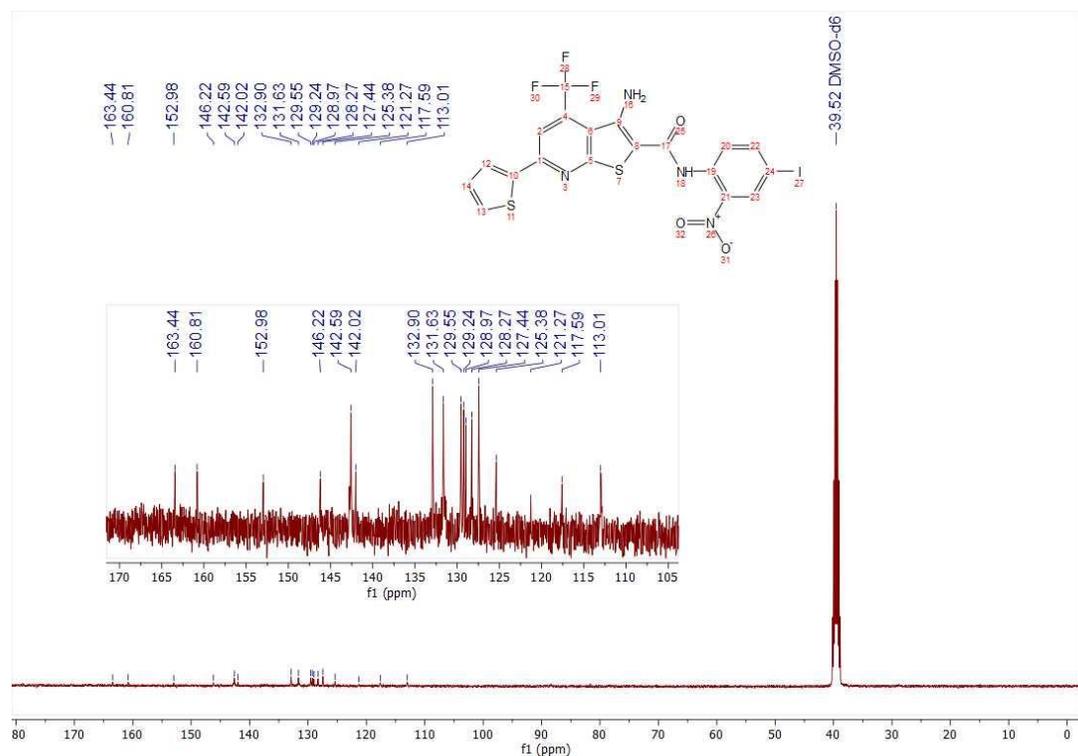


**Espectro 131.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z*) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-ciano-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**17**)

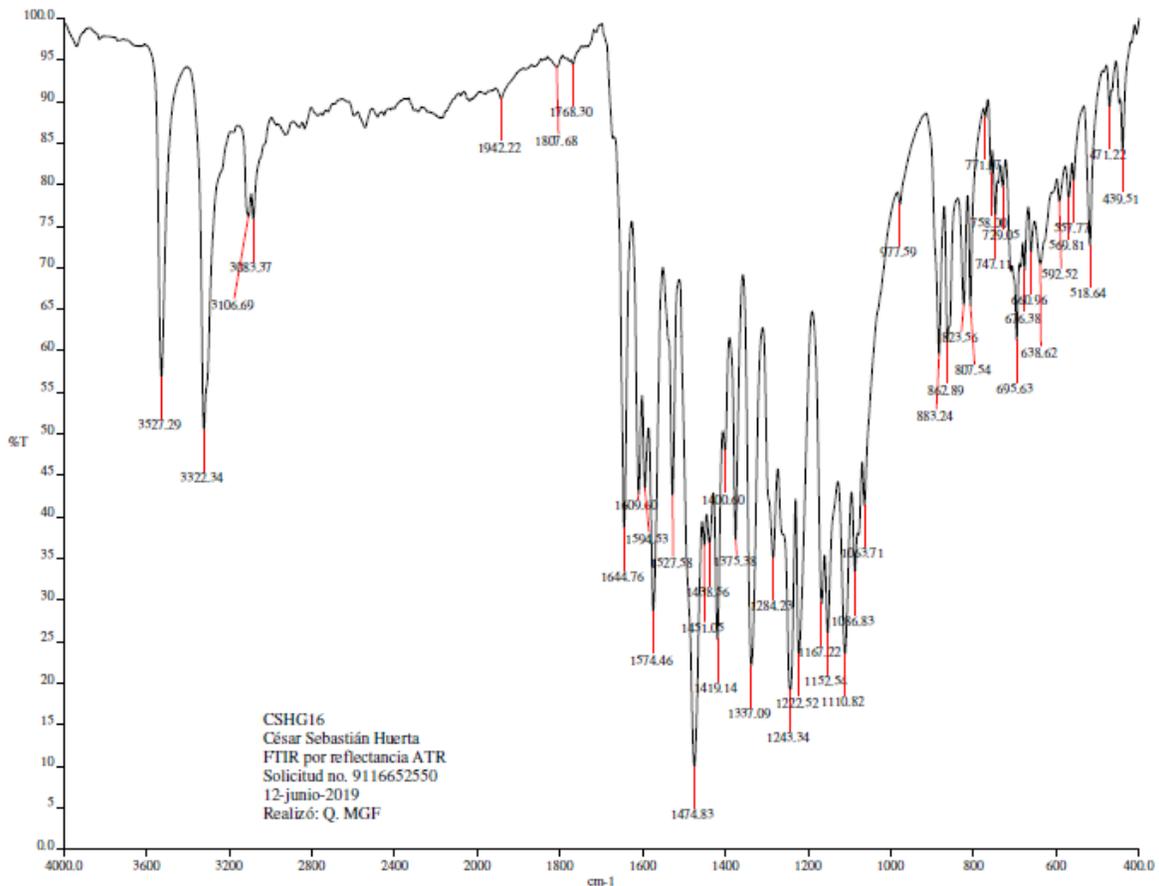
### 13.42. 3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (18)



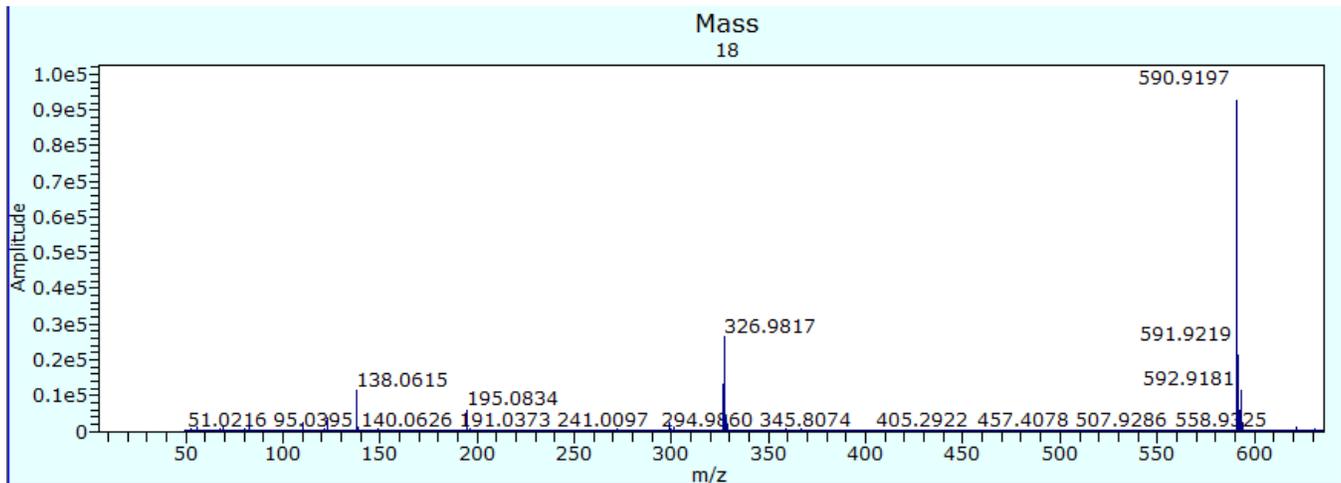
Espectro 132. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (18)



Espectro 133. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  en ppm) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (18)

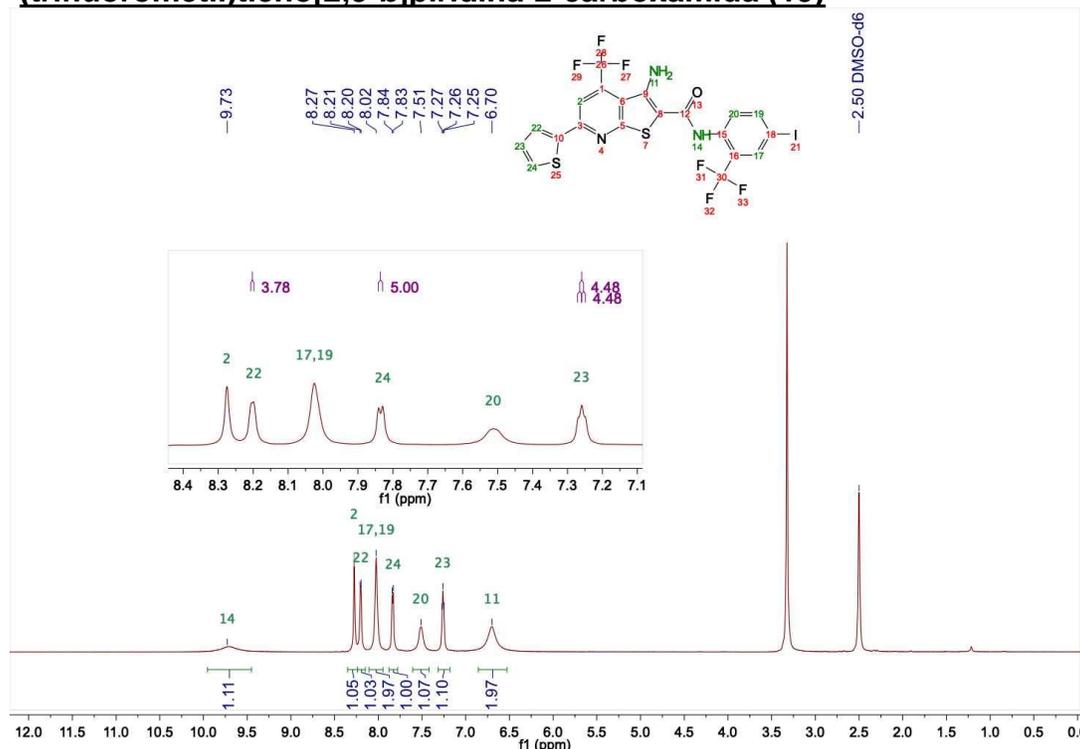


**Espectro 134.** IR (FTIR por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**18**)

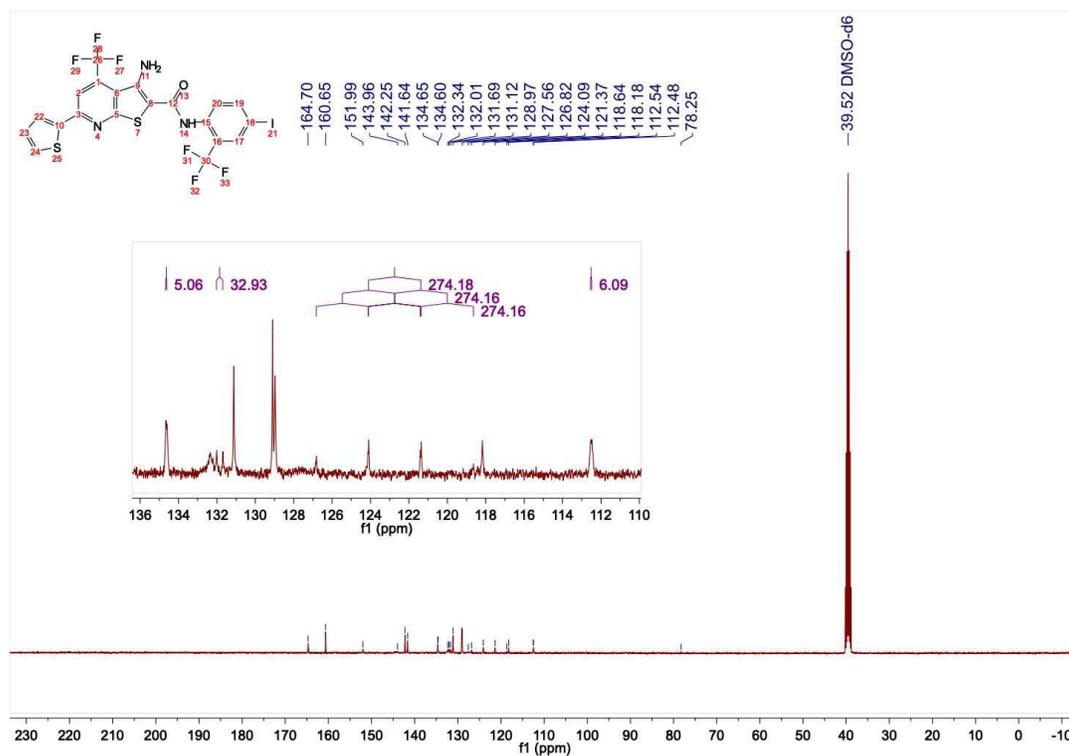


**Espectro 135.** EMAR (APCI, [M+H]<sup>+</sup>, m/z) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-nitro-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**18**)

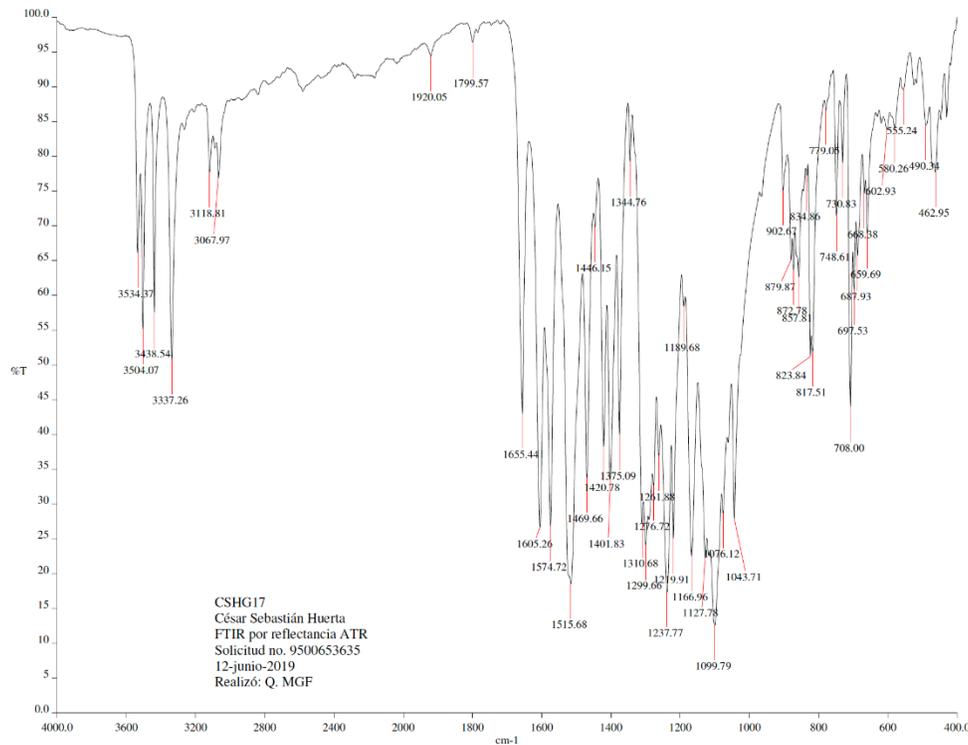
**13.43. 3-Amino-N-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (19)**



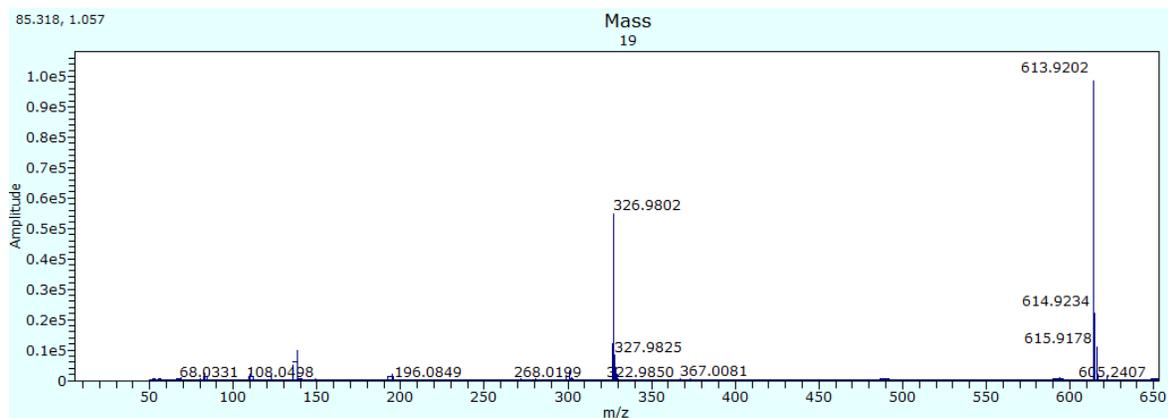
**Espectro 136.** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (19)



**Espectro 137.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ en ppm) del compuesto 3-Amino-N-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida (19)



**Espectro 138.** IR (FTIR por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**19**)



**Espectro 139.** EMAR (APCI,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$ ) del compuesto 3-Amino-*N*-(2-(trifluorometil)-4-yodofenil)-6-(tiofen-2-il)-4-(trifluorometil)tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxamida (**19**)