



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Carlos Bustos F.  
**INSTITUTO :** Química  
**FACULTAD :** Ciencias

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:** Dr. J. Guillermo Cárcamo M.  
**INSTITUTO :** Bioquímica  
**FACULTAD :** Ciencias

## **SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ENSAYOS BIOLÓGICOS DE ISOXAZOLES CON CÉLULAS CANCERÍGENAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANA, HL-60**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico.

**ALICIA MARCELA RÍOS ALARCÓN**

VALDIVIA-CHILE

2008

*“No importa cuántas veces caíste,  
si cada vez te volviste a levantar,  
el éxito de la vida no consiste en la prisa,  
sino, en llegar.”*

*Anónimo.*

## **Agradecimientos.**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Nelson y Alicia, por todo su amor esfuerzo y apoyo, que me han brindado, no sólo desde el comienzo de mis estudios, sino desde que di mis primeros pasos. Siempre fueron pilares fundamentales y un ejemplo de vida para mí. ¡A ellos les dedico esta tesis!

A mis hermanos Andrea y Nelson por su amor y compañía día tras día.

A mi Tía Gladys por su comprensión, consejos oportunos e infinito cariño, que siempre será mi segunda mamá.

A mi novio Alberto por su amor incondicional, apoyo, paciencia y espera; por su alegría y hermosos momentos vividos.

A mis amigos Daniela Garcés, Susana Barra, Rebeca Saavedra, Vania Uribe, Carolina Cárdenas, Juan Eduardo Durán, Jorge Salvo, Alejandro Vera, Alex Sánchez por los grandes e inolvidables momentos compartidos, tanto dentro como fuera de la Universidad.

A Eduardo Schott y Cristian Mena, por su preocupación y ayuda, muchas veces sin solicitarla, para finalizar esta tesis.

A mi profesor Patrocinante Carlos Bustos, por su dedicación y excelente disponibilidad a la hora de compartir sus conocimientos y experiencias. Gracias por su amistad y consejos de vida.

A los profesores Adela Martínez y Juan Guillermo Cárcamo por aceptar participar como Copatrocinantes de esta tesis.

Finalmente, agradezco al proyecto DID-S-2006-45 y al proyecto FONDECYT 1080269 por el financiamiento otorgado.

## Índice de Contenidos.

|   |      |
|---|------|
| Agradecimientos.  | I    |
| Índice de Contenidos.   | Ii   |
| Índice de Tablas y Figuras.   | V    |
| Índice de Anexos.   | Vii  |
| Abreviaturas.   | Viii |
| 1. Resumen.   | 1    |
| 1. Abstract.  | 2    |
| 2. Introducción.  | 3    |
| 2.1 Hipótesis de Trabajo.   | 10   |
| 2.2 Objetivo General y Objetivos Específicos.                                       | 10   |
| 3. Parte Experimental utilizado en la síntesis y caracterización de los isoxazoles. | 11   |
| 3.1 Material Fungible.  | 11   |
| 3.2 Solventes.  | 12   |
| 3.3 Reactivos de Síntesis.  | 12   |
| 3.4 Equipamiento.   | 13   |
| 4. Parte experimental utilizada en el estudio biológico de los compuestos.          | 14   |

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Materiales.  | 14 |
| 4.2 Tampones, medios y soluciones.   | 15 |
| 4.3 Solución de los isoxazoles.  | 15 |
| 4.4 Cultivo celular  | 15 |
| 5. Métodos.  | 16 |
| 5.1 Métodos de Síntesis y Purificación.  | 16 |
| 5.2 Mediciones Físicas.  | 16 |
| 5.3. Métodos biológicos.   | 18 |
| 5.3.1 Métodos del cultivo celular  | 18 |
| 5.3.2 Procedimiento de Congelación de células.   | 19 |
| 5.3.3 Procedimiento de descongelación de células.  | 19 |
| 5.3.4 Lavado de las células.   | 20 |
| 5.4 Ensayos para determinar el efecto citotóxico de isoxazoles.                          | 20 |
| 5.4.1 Ensayos de viabilidad.   | 20 |
| 6. Síntesis.   | 22 |
| 6.1 Preparación de $\beta$ -dicetohidrazonas, 3-[2-(R-fenilhidrazono)]pentano-2,4-diona. | 22 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2 Preparación de los isoxazoles, (E)-3,5-dimetil-4-(R-fenildiazenil) isoxazoles. | 23 |
| 7. Resultados y Discusión.   | 24 |
| 7.1. Química.  | 24 |
| 7.2 Descripción de la estructura.  | 29 |
| 7.3 Ensayos biológicos <i>in vitro</i> .   | 33 |
| 8. Conclusiones.   | 37 |
| 9. Bibliografía  | 39 |
| 10. Anexos   | 45 |

## Índice de Tablas y Figuras.

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Estructura básica de los isoxazoles tri-sustituídos.  | 3  |
| <b>Figura 2:</b> Estructura de $\beta$ -dicetohidrazonas obtenidas mediante acoplamiento de una sal de diazonio con $\beta$ -dicetonas.  | 4  |
| <b>Figura 3:</b> Estructura de (4-R-diazenil)-3,5-dimetilisoxazoles, obtenidos por tratamiento de $\beta$ -dicetohidrazonas con cloruro de hidroxilamonio.   | 5  |
| <b>Figura 4:</b> Estructura de isoxazoles con actividad biológica.   | 6  |
| <b>Figura 5:</b> Estructura de isoxazoles sustituidos en posición <i>para</i> y del ácido 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)diazenil)benzoico.  | 28 |
| <b>Figura 6:</b> Espectro bidimensional HBMC registrado en un espectrofotómetro Bruker AC 200P. ( $^1\text{H}$ ) ( $^{13}\text{C}$ ) at 50,3 MHz, J mod. secuencia $^1\text{H}$ 200,1 MHz) en $\text{CDCl}_3$ y TMS interno. | 30 |
| <b>Figura 7:</b> Diagrama ORTEP del ácido 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)diazenil) benzoico ( <b>13</b> ) con un desplazamiento de los elipsoides de un 50% de probabilidad.   | 31 |
| <b>Figura 8:</b> Vista del enlace hidrógeno asistido por resonancia EHAR intermolecular observado en ( <b>13</b> ).  | 32 |
| <b>Figura 9:</b> Apilamiento $\pi$ - $\pi$ entre anillos aromáticos y anillos heterocíclicos en ( <b>13</b> ).   | 32 |
| <b>Tabla I:</b> Colección de datos cristalográficos del compuesto ( <b>13</b> )  | 17 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla II:</b> Relación m/e, de los principales fragmentos detectados en los espectros de masa de los isoxazoles.   | 25 |
| <b>Tabla III:</b> Espectros de absorción UV-visible de los isoxazoles (1)-(14).   | 26 |
| <b>Tabla IV:</b> Absorciones más importantes de los espectros IR  | 27 |
| <b>Tabla V:</b> Desplazamiento químico de las señales en el espectro RMN <sup>1</sup> H (δ: ppm) de los isoxazoles (1)-(5), (7), (9), (11), y (13) en CDCl <sub>3</sub> .     | 28 |
| <b>Tabla VI:</b> Desplazamiento químico de las señales (δ: ppm) en el espectro RMN <sup>13</sup> C de los isoxazoles en CDCl <sub>3</sub> .                                   | 29 |
| <b>Tabla VII:</b> Distancias y ángulos de enlace seleccionados del compuesto (13).  | 30 |
| <b>Tabla VIII:</b> Parámetros reticulares del EHAR presente en (13)   | 33 |
| <b>Tabla IX.</b> Valores de IC <sub>50</sub> para una serie de (R-fenildiazenil)-3,5-dimetilisoxazoles determinados para la línea celular cancerígena HL-60.                  | 34 |
| <b>Tabla X.</b> Valores de IC <sub>50</sub> de diferentes compuestos, encontrados en la literatura, hacia la línea celular cancerígena HL-60, leucemia promielocítica humana. | 35 |



## Índice de Anexos.

|  |    |
|--|----|
| <b>ANEXO I:</b> Datos cristalográficos de compuesto <b>(13)</b>  | 45 |
| <b>ANEXO II:</b> Espectros RMN $^1\text{H}$ de los compuestos <b>(1), (2), (3), (4), (5), (7), (9), (11)</b> y <b>(13)</b> | 49 |
| <b>ANEXO III:</b> Espectros RMN $^{13}\text{C}$ de los compuestos <b>(1), (2), (3), (4), (5), (7), (11)</b> y <b>(13)</b>  | 53 |
| <b>ANEXO IV:</b> Espectros HBMC de los compuestos <b>(1), (2), (3), (4), (5), (7), (11)</b> y <b>(13)</b> .                | 57 |
| <b>ANEXO V:</b> Espectros UV-Visible de los compuestos <b>(1) - (13)</b>   | 61 |
| <b>ANEXO VI:</b> Gráficos citotoxicidad celular de los compuestos <b>(1-14)</b> en línea celular HL-60.                    | 68 |

## Abreviaturas

|                     |   |
|---------------------|---|
| HOAc                | Ácido Acético   |
| acac <sup>-</sup>   | Anión acetilacetato   |
| KBr                 | Bromuro de potasio  |
| HCl                 | Ácido Clorhídrico   |
| UV-visible          | Ultravioleta-visible  |
| IR                  | Infrarrojo  |
| RMN <sup>1</sup> H  | Resonancia magnética nuclear de protones                          |
| NMR <sup>13</sup> C | Resonancia magnética nuclear de carbono                           |
| HBMC                | Resonancia magnética nuclear bidimensional de hidrógeno y carbono |
| EHR                 | Enlace de hidrógeno asistido por resonancia. En Inglés            |
| RHAB                |   |
| TMS                 | Tetrametilsilano  |

|                  |  |
|------------------|--|
| IC <sub>50</sub> | Concentración de droga que inhibe el 50% del crecimiento celular tumoral <i>in vitro</i> . |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido   |
| FBS              | Suero fisiológico bovino.  |

## 1. Resumen.

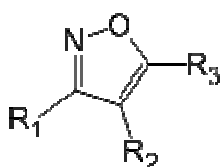
En esta investigación se ha sintetizado una serie 3,5-dimetil-4-[*E*-R-fenildiazenilisoxazoles], de fórmula 3,5-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>3</sub>NO-4-[*E*-N=N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-R], [R= p-OH (**1**), p-CH<sub>3</sub>O (**2**), p-CH<sub>3</sub> (**3**), p-H (**4**), p-Br (**5**), p-Cl (**6**), p-CO<sub>2</sub>H (**7**), p-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO (**8**), p-COCH<sub>3</sub> (**9**), p-CN (**10**), p-NO<sub>2</sub> (**11**), o-NO<sub>2</sub> (**12**), o-CO<sub>2</sub>H (**13**) p-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(**14**)], mediante una reacción de condensación de 3-[R-fenilhidrazonas] de fórmulas R-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NHN=C(COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, con cloruro de hidroxilamonio. Los compuestos fueron caracterizados mediante técnicas de análisis elemental, espectrometría GM y métodos espectroscópicos (UV-visible; IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y HMBC). La estructura cristalina y molecular del compuesto (**13**) fue resuelta mediante difracción de rayos X de monocristal. Por otro lado, se evaluó la toxicidad de los compuestos frente células HL-60 (*Células humanas de leucemia promielocítica*). El efecto citotóxico y antiproliferativo de los isoxazoles fue ensayado a través de la técnica de exclusión Azul de Tripano, en concentraciones que van desde 0 a 100 μM realizando el recuento cada 24 h. Todos estos resultados son discutidos en las secciones siguientes.

### 1.1. Abstract.

In this work we are synthesized a series of 3,5-dimethyl-4-[E-R-phenyldiazeylisoxazoles of formula 3,5-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>3</sub>NO-4-[E-N=N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-R], [R= p-OH (**1**), p-CH<sub>3</sub>O (**2**), p-CH<sub>3</sub> (**3**), p-H (**4**), p-Br (**5**), p-Cl (**6**), p-CO<sub>2</sub>H (**7**), p-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO (**8**), p-COCH<sub>3</sub> (**9**), p-CN (**10**), p-NO<sub>2</sub> (**11**), o-NO<sub>2</sub> (**12**), o-CO<sub>2</sub>H (**13**) p-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**14**)] , using a condensation reaction of β-diketohydrazones, formulated as R-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NHN=C(COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, with hydroxylammonium chloride. Compounds were characterized using elemental analysis, GM-chromatography and spectroscopic methods (UV-visible, IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C and HMBC). Crystal and molecular structure of (**13**) was solved by X-Ray diffraction. On the other hand, cytotoxic activity of each compounds toward HL-60 cells (*Human promyelocytic leukemia cells*) was evaluated. Cytotoxicity and antiproliferative effect of isoxazoles was tested by the blue Tripano exclusion technique in the range 0-100 μM, every 24 h. All these results are discussed in the next sections.

## 2. Introducción.

El interés de esta investigación está centrado en una familia particular de compuestos orgánicos denominados isoxazoles. La estructura básica de estos compuestos contiene un anillo heterociclo de cinco miembros, formado por tres átomos de carbono y otro de oxígeno contiguo a un nitrógeno, Figura 1. La versatilidad de las propiedades de estos compuestos ha sido objeto de numerosas publicaciones. En efecto, ellos son agonistas selectivos del receptor humano clonado de dopamina (D4) (Rowley *et al.*, 1996); muestran capacidad antagonista sobre GABA<sub>A</sub> (Frolund *et al.*, 2002); son usados como analgésicos, anti-inflamatorios y ulcerogénicos (Eid *et al.*, 1978; Menozzi *et al.*, 1997); antitrombótico (Batra *et al.*, 2004), antimicrobianos y antifúngicos (Bhatt *et al.*, 1998); son inhibidores de COX-2 (Talley *et al.*, 1999; Talley *et al.*, 2000; Giovannoni *et al.*, 2003) y, algunos de ellos, presentan también actividad antitumoral (Li *et al.*, 2003).

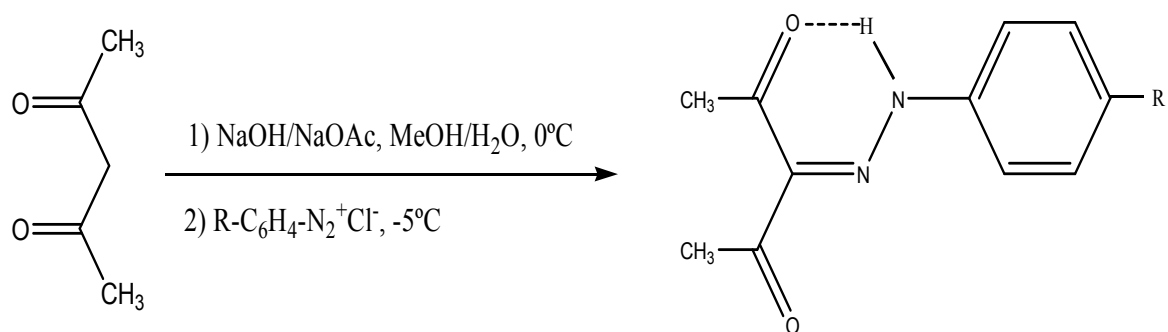


**Figura 1:** Estructura básica de los isoxazoles tri-sustituidos

En literatura se describen variados métodos de síntesis de isoxazoles sustituidos, entre ellos se puede mencionar las reacciones de cloruro de hidroxilamonio con compuestos 1,3-dicarbonílicos (Bandiera *et al.*, 1992), compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados (Cuadrado *et al.*, 2002) y nitrilos  $\alpha,\beta$ -insaturados (Vicentini *et al.*, 1990). Otros métodos involucran reacciones de

dianiones procedentes de una oxima con ésteres (He y Lin., 1994) o amidas (Barber y Olofson., 1978). Por otro lado, la cicloadición [3+2] de alquinos y óxidos de nitrilos también producen isoxazoles (Jaerger y Colina., 2002). Sin embargo, muchos de estos métodos requieren del uso de bases o ácidos minerales fuertes, altas temperaturas o presentan una baja regioselectividad.

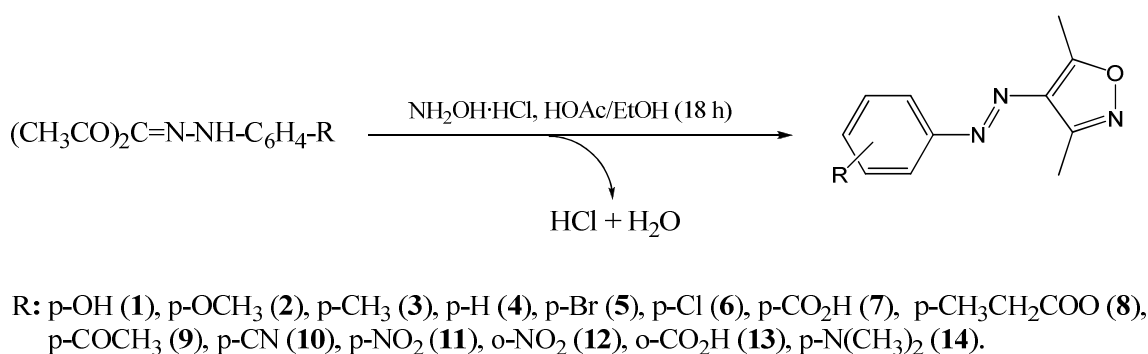
Esta investigación se ha orientado a mejorar las condiciones de síntesis de isoxazoles funcionalizados, utilizando precursores de fácil obtención, bajo costo y que, al mismo tiempo, permitan mejorar la regioselectividad de las reacciones. De este modo, se puede disponer de familias de isoxazoles para la realización de estudios relacionados con la potencial actividad biológica. La metodología sintética aquí desarrollada involucra a una serie de  $\beta$ -dicetohidrazonas, obtenidas mediante acoplamiento de una sal de diazonio aromática con  $\beta$ -dicetonas (Yao., 1964; Bustos *et al.*, 2007), Figura 2.



R= p-OH (1), p-OCH<sub>3</sub> (2), p-CH<sub>3</sub> (3), p-H (4), p-Br (5), p-Cl (6), p-CO<sub>2</sub>H (7), p-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO (8), p-COCH<sub>3</sub> (9), p-CN (10), p-NO<sub>2</sub> (11), o-NO<sub>2</sub> (12), o-CO<sub>2</sub>H (13), p-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (14)

**Figura 2:** Estructura de  $\beta$ -dicetohidrazonas obtenidas mediante acoplamiento de una sal de diazonio con  $\beta$ -dicetonas.

Las  $\beta$ -dicetohidrazonas, permiten obtener familias de (4-R-diazenil)-3,5-dimetilisoxazoles por tratamiento con cloruro de hidroxilamonio, Figura 3. Experimentalmente, se observa que las reacciones ocurren “*in situ*”, con suficiente regioselectividad en condiciones de reflujo ordinario. Los compuestos aislados (**1-14**), fueron purificados y caracterizados mediante técnicas de análisis elemental, A. E.; espectrometría gas-masas, CGM; espectroscopia infrarrojo, IR, ultravioleta visible, UV-visible y de resonancia magnética nuclear, RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , y, en algunos casos se incluyó técnicas de HBMC. Todos estos antecedentes son presentados en la discusión, *vide infra*, conjuntamente con la estructura cristalina y molecular de (**13**), resuelta mediante difracción de rayos-X.

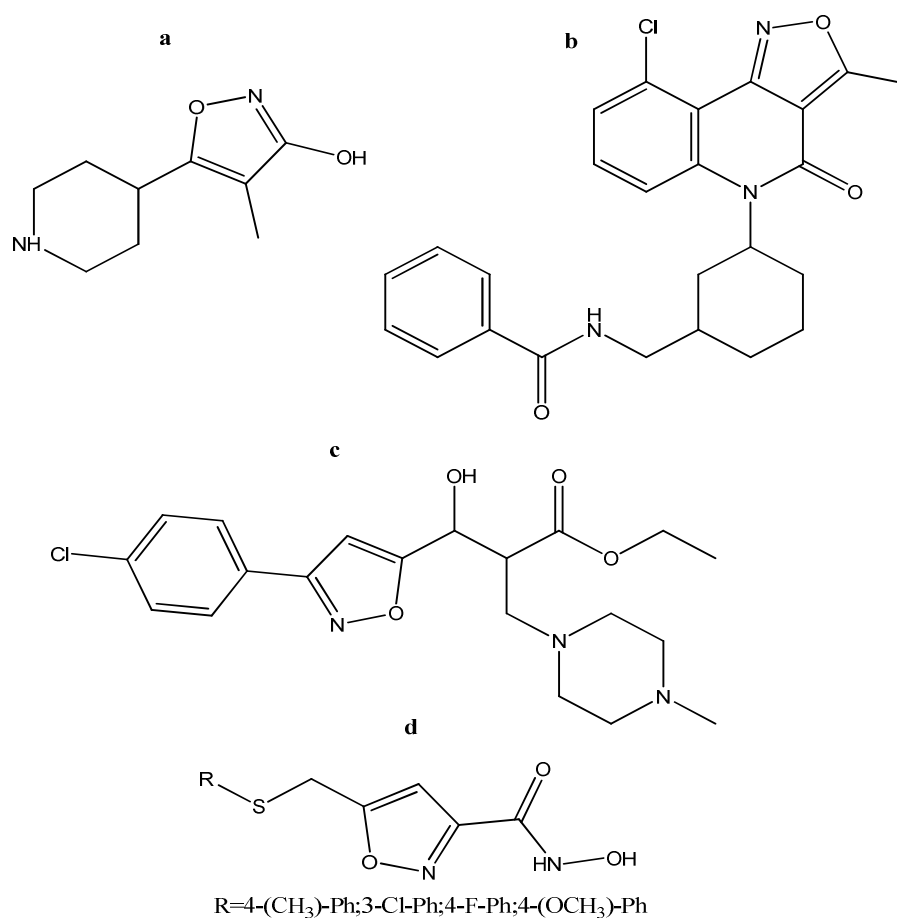


**Figura 3:** Estructura de (4-R-diazenil)-3,5-dimetilisoxazoles, obtenidos por tratamiento de  $\beta$ -dicetohidrazonas con cloruro de hidroxilamonio.

Por otra parte, suponemos que los compuestos preparados presentan características estructurales adecuadas para ser usados en estudios biológicos. Ejemplos de compuestos con estas propiedades, sin desmerecer otras potenciales aplicaciones, se muestran en la Figura 4. En efecto, 4a está emparentado con aquellos compuestos que presentan una eficiente inhibición de los canales GABA (Frolund *et al.*, 2002); 4b con aquellos que ejercen una fuerte modulación de las



proteínas MRP1 (Norman *et al.*, 2005), cuyo efecto modulador evitaría que este tipo de transportadores genere resistencia a las drogas anticancerígenas. Otro tipo de estructuras descritas en literatura relacionadas con los compuestos preparados en este trabajo, son aquellos que presentan actividad antitrombótica, Figura 4c (Batra *et al.*, 2004) y antimicrobiana, Figura 4d (Calí *et al.*, 2004).



**Figura 4:** Estructura de isoxazoles con actividad biológica. **a)** 4-metil-5-(piperidin-4-il)isoxazol-3-ol, con actividad en los canales GABA<sub>A</sub>. **b)** N-((3-(9-cloro-3-metil-4-oxoisoxazolo[4,3-c]quinolein-5(4H)-il)ciclohexil)metil)benzamida, con actividad sobre los canales MRP1. **c)** Etil 3-(3-(4-clorofenil)isoxazol-5-il)-3-hidroxi-2-((4-metilpiperazin-1-il)metil)propanoato, con actividad antitrombótica. **d)** N-hidroxi-5-(R-tiometil)isoxazol-3-carboxamida, con actividad antimicrobiana.

El cáncer es una patología que ha concentrado por muchos años gran atención y constante investigación en búsqueda de nuevos compuestos. Tradicionalmente, los medicamentos para el cáncer se descubrieron a través de pruebas a gran escala de sustancias químicas sintéticas y productos naturales en sistemas tumorales de proliferación rápida en animales, principalmente, leucemias murinas (Chabner y Roberts, 2005). Además, el cáncer, es una de las enfermedades más severas y de mayor afectación sobre la salud de las personas, tanto a nivel fisiológico, psicológico como económico. Se caracteriza por el desarrollo irregular de células escasamente diferenciadas, que proliferan de forma progresiva e incontrolada y que tienden a invadir localmente o a diseminarse a distancia del sitio inicial; donde también crecen, invaden y reemplazan el tejido normal, mediante un proceso denominado metástasis (Fidler y Hart, 1982)

El principal factor involucrado en la génesis del cáncer, es la alteración del ciclo celular que, en condiciones normales, consta de mecanismos intracelulares y extracelulares, que controlan y determinan si una célula entra o no en un ciclo de división celular (Reddy *et al*, 2003). Las células cancerígenas sufren alteraciones de este proceso de control, lo que desencadena una descontrolada proliferación independiente, cuya sumatoria de mutaciones puede finalizar con una señal de muerte celular programada, denominada apoptosis (Arango *et al.*, 1997). Los factores determinantes que finalmente definen que una persona desarrolle o no un determinado tipo de cáncer, dependen de factores ambientales como de las características propias del individuo. La primera mutación, normalmente, puede no ser suficiente para desarrollarlo, pero es el inicio de una serie de procesos que llevan a la célula mutada a la diferenciación respecto de su tejido de origen. La carcinogénesis puede durar años, pasando por diferentes fases como la iniciación, la promoción y la progresión. (Smith *et al*, 2006)

La iniciación ocurre a nivel del genoma y los agentes que actúan en esta primera etapa pueden ser físicos, químicos o virales. La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor, en ella participan factores de crecimiento y sus receptores, así como también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares. Finalmente, la progresión implica la capacidad de invadir tejidos vecinos a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esta capacidad está también codificada en los genes de la misma, que contiene modificaciones estructurales y funcionales. (Hodges y Rowlatt, 1994)

Las leucemias son un tipo de cáncer que afecta al sistema hematopoyético y a células que, inicialmente, proliferan en la médula ósea y, posteriormente, se diseminan a la circulación sanguínea. Se pueden clasificar en agudas y crónicas y subdividirse en linfoblásticas o mieloblásticas, dependiendo del origen de las células malignas: mieloide o linfoide (Finley, 2001). Las leucemias agudas son formas rápidamente progresivas caracterizadas por la sustitución de las células de la médula ósea normal por células blásticas provenientes de un clon originado por la transformación tumoral de células madres hematopoyéticas linfoides o mieloides. Por esta razón, constituyen una urgencia médica que debe ser evaluada lo más precozmente posible para iniciar las medidas terapéuticas (Finley, 2001).

En la actualidad, la investigación sobre la terapia anticancerígena generalmente involucra i) estrategias para la supresión farmacológica de fenotipos celulares malignos, ii) terapias de inhibición en la síntesis de ADN que provocan la muerte celular debido a la detención del metabolismo: crecimiento y proliferación celular, iii) terapias que producen lesiones en el ADN, capaces de activar procesos fisiológicos que conducen a la apoptosis y iv) terapias que actúan en el ciclo celular sobre proteínas reguladoras o efectoras. Sin embargo, en la práctica, para tratar el

cáncer se está incorporando, de manera progresiva, un gran número de citostáticos y nuevas alternativas de tratamiento dirigidos contra componentes de las células tumorales, *v. gr.*: antígenos y proteínas; ya que la destrucción selectiva de células tumorales se considera la clave del tratamiento. Actualmente, la búsqueda de nuevo arsenal terapéutico ha progresado con rapidez, mejorado el conocimiento de la biología del cáncer y su tratamiento. (Goodman y Gilman, 2006).

Es así como debido a la alta toxicidad y a la resistencia a multidrogas citostáticas utilizadas actualmente, además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes naturales antitumorales derivados de plantas. Existen evidencias clínicas de las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de un gran número de productos obtenidos de estas y que presentan menor toxicidad que los actuales tratamientos empleados. (Sawyer, 2004).

En esta línea de acción destaca leptocarpina, una lactona sesquiterpénica aislada de *Leptocarpha rivularis* (palito negro) perteneciente a la familia *Compositae*, usada como agente estimulante, carminativo y para el tratamiento de desordenes estomacales, en la medicina nativa de Chile. Estudios de la actividad biológica preliminar de leptocarpina muestran que provoca inhibición de la síntesis de proteínas en células HeLa, sin afectar la síntesis de ácidos nucleicos (Martínez *et al.*, 1995). Esta información, conjuntamente con la de otros de sus congéneres, permite afirmar que leptocarpina posee algún grado de actividad citotóxica, aunque su espectro y mecanismos de acción en células tumorales son aún desconocidos.

Por otro lado, el uso de la síntesis orgánica constituye la vía que aporta el mayor número de nuevos compuestos con potencial actividad biológica. En este sentido destaca la familia particular

de heterociclos denominada isoxazoles que, como se ha mencionado anteriormente, presentan interesantes propiedades farmacológicas como la posible actividad antitumoral (Li *et al.*, 2003). Dada la importancia de estas especies, se propone la síntesis y caracterización de una serie de isoxazoles, conforme a la Figura 3, para luego evaluar su actividad biológica, comenzando por determinar el efecto citotóxico sobre células cancerígenas HL-60.

## **2.1 Hipótesis de Trabajo**

A partir de compuestos de la familia  $\beta$ -dicetohidrazonas es posible sintetizar con facilidad series de isoxazoles 3,4,5-trisustituidos mediante una reacción con cloruro de hidroxilamonio en medio ácido. Los isoxazoles sintetizados poseen propiedades citotóxicas “*in vitro*” sobre la línea celular HL-60, proveniente de tumores de leucemia promielocítica de origen humano.

## **2.2 Objetivo General y Objetivos Específicos**

El objetivo general de la investigación es la síntesis y caracterización de una familia de isoxazoles y, luego, realizar ensayos de citotoxicidad con células HL-60.

Por otra parte, para cumplir con el objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis y purificación de los precursores del tipo  $\beta$ -dicetoarilhidrazonas.
2. Síntesis y caracterización de la familia de isoxazoles.
3. Estudios de actividad citotóxica *in vitro* de los isoxazoles sobre la línea celular humana de origen leucémico, HL-60, en términos de la viabilidad y del IC<sub>50</sub>.

### **3. Parte Experimental utilizado en la síntesis y caracterización de los isoxazoles.**

#### **3.1 Material Fungible**

- Pipetas Pasteur
- Guantes de procedimiento
- Espátulas metálicas
- Vasos de precipitado de 50, 100, 200, 250, 500 y 1000 mL
- Viales de 5, 10 y 20 mL
- Kitazatos de 500 mL
- Embudos Büchner
- Papel Filtro
- Barras magnéticas de agitación
- Frascos conserveros con tapa
- Pizetas
- Embudos de vidrio fritado
- Equipo de reflujo
- Algodón hidrófilo

### 3.2 Solventes

Los solventes fueron adquiridos de fuentes comerciales comunes y usados sin previa purificación.

- Acetona
- Acetonitrilo
- Ácido acético
- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Alcohol metílico
- Cloroformo
- Diclorometano
- Dimetilformamida
- Dimetilsulfóxido
- Éter dietílico
- n-Hexano
- Hexanos
- Tetrahydrofurano

### 3.3 Reactivos de Síntesis

Los reactivos de síntesis también fueron adquiridos de fuentes comerciales comunes y usados sin previa purificación.

- Acetilacetona

- Anilina
- 4-Nitroanilina
- p-Anisidina
- p-Toluidina
- 4-Bromoanilina
- 4-Aminofenol
- 4-Carboxianilina
- 2-Carboxianilina
- 4-Aminofeniletanona
- Cloruro de hidroxilamonio
- Ácido clorhídrico 37% p/p
- Acetato de sodio
- Hidróxido de sodio

### **3.4 Equipamiento**

- Manto calefactor
- Placa calefactora agitadora
- Rotavapor
- Analizador Elemental Perkin-Elmer Modelo 2400
- Espectrofotómetro UV-Vis Modelo Unicam 500
- Espectrofotómetro FT-IR Modelo Nexus
- Cromatógrafo de Gases con Detector de Masas Modelo HP 6890 Plus y HP 5973.



- Espectrofotómetro de Resonancia Magnética Nuclear, Brücker Modelo AC 200P
- Equipo Kofler para Punto de Fusión
- Una estufa de secado bajo vacío

#### **4. Parte experimental utilizado en el estudio biológico de los compuestos.**

##### **4.1 Materiales**

- Pipetas automáticas 1, 50, 200, 1000  $\mu\text{L}$ ,
- Vortex V-1.
- Centrífuga
- Tubos Eppendorf 1,5 mL
- Tubos universales de 25 y 50 mL
- Baño termoregulador
- Balanza analítica Scientech
- Tubos falcon 15 y 50 mL
- Pipetas Pasteur
- Cámara de recuento celular (Neubauer)
- Cámara de reflujo laminar
- Contenedores de Nitrógeno líquido.
- Criotubos
- Estufa de cultivo
- Frascos de cultivo con filtro
- Placas de cultivo de 6 pocillos

- Pipetas desechables de 5 y 10 mL
- Guantes desechables
- Microscopio óptico.
- Bomba de vacío
- Alcohol para limpiar mesón y materiales.

#### **4.2 Tampones, medios y soluciones**

- Medio de cultivo RPMI-1640 suplementado
- FBS.(suero fisiológico bovino)
- DMSO.(dimetilsulfóxido)
- Tampón 10 × PBS ( Phosphate buffered saline solución)

#### **4.3 Solución de los isoxazoles.**

Las disoluciones de isoxazoles usadas para este estudio fueron preparadas en concentración 100 mM en DMSO (dimetilsulfóxido) y se conservaron congeladas y debidamente etiquetadas.

#### **4.4 Cultivo celular.**

Línea celular de origen tumoral, HL-60 en stock en el laboratorio de Bioquímica y Farmacología Tumoral, Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

## 5. Métodos

### 5.1 Métodos de Síntesis y Purificación

Todas las reacciones de síntesis fueron realizadas usando un equipo de reflujo convencional con agitación constante. La purificación de cada compuesto se realizó usando métodos convencionales de cristalización. Para asegurar un alto grado de pureza de los isoxazoles hubo que recrystalizar tres veces cada compuesto mediante la mezcla 1:1 de EtOH/H<sub>2</sub>O.

### 5.2 Mediciones Físicas

Los puntos de fusión no corregidos fueron medidos en un aparato Kofler, provisto de un microcomputador HANNA HI 9063 y una K-Termocupla.

Los análisis elementales fueron registrados en un Analizador elemental Perkin-Elmer Modelo 2400. Los pesos moleculares fueron determinados en un Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard, equipado con un Detector de Masas.. Para ello las muestras fueron recrystalizadas tres veces en una mezcla de etanol/agua 1:1 y secadas en una estufa de vacío a 50 °C durante 24 h. Luego, cada compuesto fue disuelto en 1 mL de diclorometano a concentración aproximada de 5 ppm, inyectando 2 µL en la cámara del cromatógrafo.

Los espectros UV-visible fueron registrados en un espectrofotómetro UNICAM, provisto de una celda de 1 cm de longitud de paso, en el rango 600-220 cm<sup>-1</sup>; usando una disolución concentrada de cada compuesto en etanol,  $1,2 \times 10^{-3}$ – $4,2 \times 10^{-4}$  mol/L y diluyendo, convenientemente, hasta  $2,0 \times 10^{-4}$ – $4,0 \times 10^{-5}$  mol/L. Los espectros IR fueron registrados en estado sólido sobre pastillas de KBr en un Espectrofotómetro Nicolet FT-IR Nexus. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y

HMBC fueron obtenidos en disolución de  $\text{CDCl}_3$  sobre un espectrofotómetro Bruker AC 200P Spectrometer ( $^1\text{H}$ ) ( $^{13}\text{C}$ ) a 50,3 MHz,  $J_{\text{mod}}$  secuencia  $^1\text{H}$  200,1 MHz) usando TMS interno. El nombre de cada compuesto y su respectivo espectro teórico fue simulado utilizando ChemDraw Ultra, versión 9.0.

**Tabla I:** Colección de datos cristalográficos del compuesto (**13**)

|  |   |
|--|---|
| Formula empírica   | $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$                  |
| Peso fórmula   | $M_r = 245,24$  |
| T(K)   | 298   |
| $\lambda(\text{Å})$  | 0,71359   |
| Grupo espacial   | Ortorómbico, $P2_12_12_1$   |
| a (Å)  | 7,3550 (10)   |
| b (Å)  | 11,6182 (15)  |
| c (Å)  | 13,6335 (17)  |
| $\alpha = \beta = \gamma$  | 90  |
| V (Å <sup>3</sup> )  | 1165,0 (3)  |
| Z  | 4   |
| $D_{\text{calc.}}(\text{gcm}^{-3})$  | 1,398   |
| $\mu (\text{mm}^{-1})$   | 0,10  |
| Tamaño del cristal (mm)  | 0,26 x 0,20 x 0,18  |
| $\theta_{\text{rango}} (^\circ)$   | 2,3–27,9  |
| Rango de los índices   | -9<h<9, 14<k<15, 17<l<17  |
| $N_{\text{tot}}$ , $N_{\text{uniq}}(\text{R}_{\text{int}})$ , $N_{[I>2\sigma(I)]}$ | 8600, 1569(0.073), 945  |
| Parámetros refinados   | 165   |
| Correcciones de absorción  | Ninguna   |
| Número de reflexiones  | 8600  |
| Reflexiones independientes usadas  | 1569  |
| Reflexiones con $I > 2\sigma(I)$   | 945   |
| $R_{\text{int}}$   | 0,073   |
| $\theta_{\text{max.}}$   | 27,9°   |
| H  | -9 → 9  |
| k  | -14 → 15  |
| l  | -17 → 17  |
| Refinamiento con $F^2$ $R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$                                     | 0,043   |
| wR( $F^2$ )  | 0,074   |
| S  | 0,91  |
| Parámetros usados en el refinamiento   | 165   |
| W  | $1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0217P)^2]$ donde $P = F_o^2 + 2 F_c^2/3$ |
| $(\Delta/\sigma)_{\text{max}}$   | 0,019   |
| $\Delta\rho_{\text{max}}$  | 0,14 $\text{E}\text{Å}^{-3}$                                      |
| $\Delta\rho_{\text{min}}$  | -0,10 $\text{E}\text{Å}^{-3}$                                     |

Los datos para la determinación de la estructura mediante difracción de rayos-X de (**13**), se publicaron en un artículo previo. Todos ellos, excluyendo los factores de estructura, fueron

depositados en el Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), como publicación suplementaria CCDC N° 298370. Copias de esta información puede ser demandada sin cargo al Director en CCDC, 12 Unión Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. Fax: +44-1223-336-033; E-mail: [data\\_request@ccdc.cam.ac.uk](mailto:data_request@ccdc.cam.ac.uk); Web page: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>. La colección de datos y parámetros cristalinos así como las distancias y ángulos de enlace seleccionados se muestran en las Tablas I y VII, respectivamente; mientras que un diagrama ORTEP de la molécula se muestra en la Fig.7.

### **5.3. Métodos biológicos**

#### **5.3.1 Métodos del cultivo celular**

El manejo de la línea celular se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles.

La línea celular fue cultivada en medio, RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, L-glutamina 2 mM y antibiótico-antimicótico 1x. Para el cultivo se utilizaron frascos de cultivo estériles, placas de 6 pocillos y la incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

El medio de cultivo fue cambiado cada dos días, realizándose en cada ocasión un conteo celular mediante una placa hemocitométrica de Neubauer bajo un microscopio invertido.

La suspensión celular, caracterizada por presentar un número de partículas microscópicas dispersas en un fluido, se pasa a tubos Falcon estériles y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min. Se desecha el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en medio de cultivo nuevo,

pasándolo posteriormente a otro frasco de cultivo. Cuando el frasco se satura la muestra de células se divide en dos nuevo frascos de cultivo siguiendo el mismo procedimiento anterior.

### **5.3.2 Procedimiento de Congelación de células**

Para conservar la línea celular de HL-60 por un largo periodo de tiempo se congelan en Nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células en tubos Falcon durante 5 minutos y resuspendiendo el pellet de células en 1,5 mL medio de cultivo. Estas son dispensadas en criotubos (1 mL en cada uno) adicionando 110  $\mu$ L de DMSO, que al ser un anticoagulante impide la formación de cristales de agua en el interior de las células, manteniendo la integridad celular. El criotubo debe quedar herméticamente cerrado y rotulado, indicando nombre de la línea celular y fecha del procedimiento. Posteriormente se introducen rápidamente en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en un recipiente con alcohol isopropílico bajando la  $T^{\circ}$  a una velocidad de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , luego de 24 h se trasladan a tanques de Nitrógeno líquido.

### **5.3.3 Procedimiento de descongelación de células**

Este procedimiento tiene por objeto eliminar el medio de congelación, que contiene DMSO, molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento. Para ello el criotubo proveniente del tanque de Nitrógeno líquido se introduce en un baño termorregulador a  $37-38^{\circ}\text{C}$ . Cuando está parcialmente descongelado el criotubo se limpia con alcohol  $70^{\circ}$  y se procede a abrir bajo el flujo laminar evitando así su contaminación. Se vierten las células en un tubo con 5 mL de medio de cultivo sin suplementar, centrifugando por dos minutos aproximadamente a 1000 rpm, el

sedimento celular se resuspende con 5 mL medio de cultivo nuevo suplementado y se siembra en un frasco a la densidad deseada. Por último, el frasco de cultivo, debidamente rotulado, es guardado en el incubador para favorecer el crecimiento.

#### **5.3.4 Lavado de las células**

Esta operación se realiza para retirar los restos de medio de cultivo cuando las células van a ser sometidas a algún experimento posterior o cuando las células van a ser congeladas. Estas son centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min y al sedimento celular se le agrega 10 mL de PBS estéril y se vuelve a centrifugar.

### **5.4 Ensayos para determinar el efecto citotóxico de isoxazoles**

#### **5.4.1 Ensayos de viabilidad**

La línea celular HL-60 es cultivada en placas de 6 pocillos, con un número de células inicial  $2,1 \times 10^4$  células/mL. Cada pocillo contiene 3 mL, volumen experimental, con 700.000 células/mL en medio de cultivo adecuado para el crecimiento. Sobre cada pocillo se agregaron diferentes concentraciones de cada isoxazol (30 $\mu$ M, 60 $\mu$ M y 100 $\mu$ M), dejando un pocillo como control, con el objeto de determinar la viabilidad de las células en medio sin tratamiento. Estos fueron incubados por un periodo de 24 h. Transcurrido dicho periodo se realiza el recuento celular mediante la técnica de exclusión Azul de Tripano.

El Azul de Tripano es un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). La tinción con Azul de Tripano, y la utilización de una Cámara de Neubauer (Brand), permite hacer medidas de proliferación y viabilidad celular. Se utilizó esta tinción para determinar la densidad (nº células/mL) de los cultivos celulares y para asegurar que el cultivo había alcanzado su nivel óptimo de crecimiento antes de congelar o realizar cualquier otro experimento. También se utilizó este método de conteo para determinar el número de células viables después de los tratamientos con cada isoxazol.

Para realizar el conteo celular, se toma una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  en un tubo plástico de 1,5 mL, se adiciona una mezcla de 50 $\mu\text{L}$  de PBS y 50 $\mu\text{L}$  de azul de tripano. Luego, se depositan 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla en una cámara de Neubauer. Así se puede observar, en el microscopio óptico, las células vivas como esferas refringentes y claras; mientras que las muertas se aprecian opacas y teñidas de azul, dado que el colorante sólo penetra en las células muertas. Los experimentos fueron repetidos en triplicado.

La citotoxicidad se determinó calculando la concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  de los isoxazoles sobre la línea HL-60, concentración a la cual el compuesto inhibe el 50% del crecimiento celular tumoral. Estos cálculos de valores relativos de  $IC_{50}$  fueron realizados conforme al modelo de parámetros logísticos (4PL), Ecuación 1, también llamado “Hill-Slope Model”, obtenidos de las curvas de viabilidad, con la ayuda del programa estadístico  $\Sigma$ SigmaPlot 9.

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{Hill-Slope}} \quad \text{Ecuación 1}$$



## 6. Síntesis

### 6.1 Preparación de β-dicetohidrazonas, 3-[2-(R-fenilhidrazono)]pentano-2,4-diona:

#### *Reacción:*



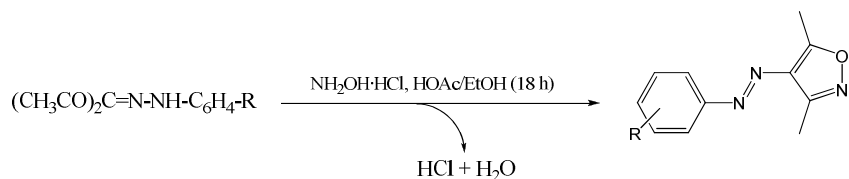
R: *p*-OH (1); *p*-OCH<sub>3</sub> (2); *p*-CH<sub>3</sub> (3); *p*-H(4); *p*-Br- (5); *4*-Cl (6); *p*-CO<sub>2</sub>H(7); *p*-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (8); *p*-COCH<sub>3</sub> (9); *p*-CN (10); (11), *p*-NO<sub>2</sub> (12); *o*-CO<sub>2</sub>H(13); *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(14)

**Procedimiento general:** En un vaso de precipitados de 1 L se añaden 5,0 mL (0,05 moles) de acetilacetona, Hacac, 2,00 g (0,05 moles) de hidróxido de sodio, NaOH, y 15,00 g (0,18 moles) de acetato de sodio, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>, en 400 mL de metanol, MeOH, completando luego con agua hasta un volumen aproximado de 800 mL. Esta disolución, que contiene el anión acetilacetonato, acac<sup>-</sup>, se agita vigorosamente y se enfría a -5 °C. En otro vaso de precipitados, se disuelven 0,05 moles de una conveniente anilina, base libre (R= *p*-HO-, 5,46 g; *p*-CH<sub>3</sub>O-, 6,16 g; *p*-CH<sub>3</sub>-, 5,36 g; *p*-H, 4,66 g; *p*-Br-, 8,06 g; *p*-Cl-, 6,38 g; *p*-HOOC-, 6,86 g; *p*-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO-, 8,25 g; *p*-CH<sub>3</sub>CO-, 6,75 g; *p*-NC-, 5,91 g; *p*-O<sub>2</sub>N-, 6,91 g; *o*-O<sub>2</sub>N-, 6,91 g; *o*-HOOC-, 6,86 g; *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4,88 g.) en 40 mL de ácido clorhídrico 5,0 mol/L. Se enfría a -5 °C y se agrega lentamente y con agitación una disolución acuosa saturada de 3,5 g (0,05 moles) de nitrito de sodio, NaNO<sub>2</sub>. La disolución de ión diazonio formada se agrega lentamente sobre la disolución de acac<sup>-</sup>. Durante la adición se obtiene un sólido, cuya coloración puede variar desde amarillo a anaranjado, que se filtra por succión lavando con abundante agua. El sólido obtenido se seca a vacío y se recristaliza en

mezclas metanol/agua o etanol/agua. Todos los productos obtenidos fueron confirmados por espectroscopía IR.

## 6.2 Preparación de los isoxazoles, (E)-3,5-dimetil-4-(R-fenildiazenil) isoxazoles.

### Reacción



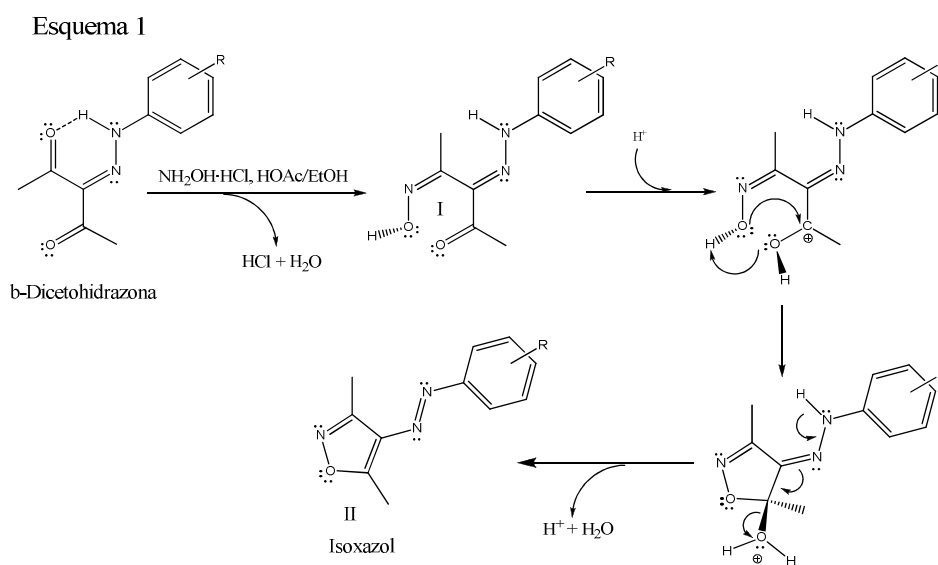
R: p-OH (**1**), p-OCH<sub>3</sub> (**2**), p-CH<sub>3</sub> (**3**), p-H (**4**), p-Br (**5**), p-Cl (**6**), p-CO<sub>2</sub>H (**7**), p-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO (**8**), p-COCH<sub>3</sub> (**9**), p-CN (**10**), p-NO<sub>2</sub> (**11**), o-NO<sub>2</sub> (**12**), o-CO<sub>2</sub>H (**13**), p-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**14**).

**Procedimiento general:** En un balón de destilación de 100 mL se adicionan 0,01 moles de β-dicetohidrazonas (R= p-HO-, 2,14 g; p-CH<sub>3</sub>O-, 2,31 g; p-CH<sub>3</sub>-, 2,15 g; p-H, 2,01 g; p-Br-, 2,80 g; p-Cl-, 2,35; p-HOOC-, 2,45; p-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO-, 2,73 g; p-CH<sub>3</sub>CO-, 2,43 g; p-NC-, 2,26 g; p-O<sub>2</sub>N-, 2,46 g; o-O<sub>2</sub>N-, 2,46 g; o-HOOC-, 2,45; p-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, 2,44 g) en 25 mL de etanol, 5 mL de ácido acético glacial o HCl y 0,005 moles (0,3475 g) de cloruro de hidroxilamonio. La mezcla se refluxe con agitación continua durante 18 h. Transcurrido este tiempo se lleva a temperatura ambiente y se precipita con 30 mL de agua. El sólido, cuyo color varía de amarillo a rojo, se filtra por succión, se lava con abundante agua y se seca a vacío. Los productos se pueden recrystalizar en etanol o mezclas 1:1 de etanol/agua. El compuesto (**13**) rinde monocristales, adecuados para el estudio difractométrico de Rayos-X, por difusión de cloroformo desde una disolución concentrada del compuesto en una mezcla hexano/cloroformo 1:3.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1. Química.

Los precursores  $\beta$ -dicetohidrazona reaccionan con cloruro de hidroxilamonio dando una serie de (4-diazenil)-3,5-dimetilisoxazoles, (**1-14**), con configuración *E* alrededor del enlace -N=N-, Esquema 1. Se propone que la reacción forma un intermediario oxima, I, que si se mantiene bajo reflujo en medio ácido, sufre una reacción de adición-desplazamiento para dar los correspondientes isoxazoles, II, Esquema 1. Todas las reacciones descritas ocurren *in situ* y con adecuada regioselectividad. Los compuestos obtenidos fueron exhaustivamente purificados mediante recristalización en una mezcla de etanol/agua 1:1 (tres veces), luego, fueron caracterizados usando análisis elemental, espectrometría GM, UV-visible, IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y HMBC.



**R:** *p*-OH (**1**); *p*-OCH<sub>3</sub> (**2**); *p*-CH<sub>3</sub> (**3**); *p*-H (**4**); *p*-Br (**5**); *p*-Cl (**6**); *p*-CO<sub>2</sub>H (**7**); *p*-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO (**8**);  
*p*-CH<sub>3</sub>CO (**9**); *p*-CN (**10**); *p*-NO<sub>2</sub> (**11**), *o*-NO<sub>2</sub> (**12**); *o*-CO<sub>2</sub>H (**13**); *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**14**)

**Tabla II:** Relación m/e de los principales fragmentos detectados en los espectros de masa de los isoxazoles.

| Comp. | Fórmula   | M <sub>r</sub><br>(g/mol) | C(%)  | H(%)  | N(%)  | m/e GM                                    | C(%)  | H(%) | N(%)  |
|-------|---|---------------------------|-------|-------|-------|---|-------|------|-------|
|       |   |                           | Calc. | Calc. | Calc. |   | Enc.  | Enc. | Enc.  |
| (1)   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 217,23                    | 60,82 | 5,10  | 19,34 | -   | 64,84 | 6,01 | 20,66 |
| (2)   | C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 231,25                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 231                      | -     | -    | -     |
| (3)   | C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O              | 215,25                    | 66,95 | 6,08  | 19,52 | -   | 66,59 | 5,51 | 19,75 |
| (4)   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O              | 219,23                    | 60,26 | 5,97  | 19,16 | -   | 60,95 | 5,71 | 18,75 |
| (5)   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O            | 280,12                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 279 y 281                | -     | -    | -     |
| (7)   | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub> | 245,23                    | 58,77 | 4,52  | 17,13 | -   | 59,26 | 5,08 | 16,85 |
| (8)   | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> | 273,29                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 273                      | -     | -    | -     |
| (9)   | C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> | 243,26                    | -     | -     | -     | [M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> = 228   | -     | -    | -     |
| (10)  | C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O              | 226,23                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 226                      | -     | -    | -     |
| (11)  | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 246,22                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 246                      | -     | -    | -     |
| (12)  | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 246,22                    | -     | -     | -     | M <sup>*+</sup> = 211,3                   | -     | -    | -     |
| (13)  | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> | 245,23                    | -     | -     | -     | [M-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> = 201,3 | -     | -    | -     |
| (14)  | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O              | 244,13                    | -     | -     | -     | M <sup>+</sup> = 244                      | -     | -    | -     |

Con excepción de (6), la Tabla II muestra los antecedentes obtenidos del análisis elemental y la relación masa/carga, m/e, de los principales fragmentos detectados mediante espectrometría GM de la mayoría de los isoxazoles en estudio. Probablemente, las muestras de (1) y (7) contienen solventes de la cristalización, pero el estudio espectroscópico está de acuerdo con la estructura propuesta, *vide infra*. Sin embargo, la cromatografía GM, en general, permitió demostrar la presencia de un sólo componente en la muestra. Los iones moleculares estables de (2), (5), (8), (10), (11) y (14) se observaron sin dificultad; mientras que los de (9) y (13), son inestables, pero de ellos se observan los fragmentos [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, m/e= 228, y [M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, m/e= 201,

respectivamente. Finalmente **(12)** forma un ión molecular metaestable, que por pérdida de una molécula de agua en el tubo separador de iones, origina un fragmento de  $m/e=211,3$ .

Los espectros UV-visible de los compuestos de **(1)-(14)** fueron registrados en disolución de etanol y presentan tres bandas principales de absorción en el rango 600-220 nm, Tabla II. La primera absorción,  $\lambda_1$ , observada en el rango de 435-404 nm está asociada con una transición  $\pi^* \leftarrow \pi$  debida, probablemente, al cromóforo -N=N-, lo cual es corroborado por los valores de  $\log \epsilon$ : 1,9-2,9. La segunda,  $\lambda_2$ , comprendida en el rango de 392-313 nm,  $\log \epsilon$ : 4,3-3,9, está asociada a transiciones  $\pi^* \leftarrow \pi$  del heterociclo, isoxazol, y la tercera,  $\lambda_3$ , situada bajo 263 nm,  $\log \epsilon$ : 4,0-3,6 se debe a transiciones  $\pi^* \leftarrow \pi$  internas del anillo bencénico.

**Tabla III:** Espectros de absorción UV-Visible de los isoxazoles **(1)-(14)**.

|             | (1)  | (2)  | (3)  | (4) | (5) | (6)  | (7) | (8)  | (9) | (10) | (11) | (12) | (13) | (14) |
|-------------|------|------|------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|------|------|------|------|
| $\lambda_1$ | 404  | 421* | 424  | 423 | 424 | 408* | 431 | 435* | 430 | 427  | 435* | 421  | 422  | 424* |
|             |      | 348* | 313* |     |     | 313* |     |      |     |      |      |      |      |      |
| $\lambda_2$ | 380* | 337  | 323  | 317 | 326 | 324  | 322 | 322  | 326 | 322  | 332  | 320  | 313  | 392  |
| $\lambda_3$ | 256  | 243  | 234  | 228 | 234 | 233  | 227 | 227  | -   | 227  | -    | 222  | 235* | 263  |

\* Hombro

Los espectros IR, registrados sobre discos de KBr, de los compuestos **(1)-(5)**, **(7)**, **(9)**, **(11)** y **(13)** muestran características comunes, Tabla IV. En ellos se puede observar claramente las bandas de estiramiento del enlace  $\nu(\text{C-H})$  aromático y alifático sobre y bajo  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. En el rango  $1603\text{-}1675 \text{ cm}^{-1}$  es posible observar claramente la banda de estiramiento del enlace  $\nu(\text{N=N})$  y entre  $1495\text{-}1618 \text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C=C})$  y/o  $\nu(\text{C=N})$ . La presencia del heterociclo queda de manifiesto por la presencia del  $\nu(\text{N-O})$  en el rango  $963\text{-}984 \text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, en la mayoría de

los compuestos se puede observar estiramientos característicos de los cromóforos pertenecientes a los grupos sustituyentes.

**Tabla IV:** Absorciones más importantes de los espectros IR.

|            | (1)              | (2)   | (3)   | (4)    | (5)   | (7)   | (9)   | (11)  | (13)             |
|------------|------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| v(CH) Ar   | 3088d            | 3067d | 3088d | 3070d  | 3067d |       | 3078d | 3100d |                  |
|            | 3027d            | 3051d | 3032d | 3032d  |       |       | 3057d | 3061d |                  |
|            |                  | 3037d |       |        |       |       | 3037d |       |                  |
| v(CH) Alif | 2939d            | 2964d | 2991d | 2984d  | 2996d | 2735d | 2996d | 2989d | 2781d            |
|            | 2832d            | 2944d | 2919d | 2970d  | 2934d | 2658d | 2929d | 2930d | 2668d            |
|            |                  | 2934d | 2863d | 2922d  |       |       |       | 2925d | 2601d            |
|            |                  | 2843d |       |        |       |       |       | 2850d |                  |
| v(N=N)     | 1623f            | 1603f | 1675f | 1618f  | 1670f | 1649f | 1654f | 1610m | 1613f            |
| C=C y/o    | 1582f            | 1582f | 1618f | 1593fh | 1603f | 1583f | 1606  | 1584d | 1594f            |
|            | 1511f            | 1495f | 1497m | 1505d  | 1516f | 1521f | 1528  |       | 1505f            |
| N-O        | 984 <sup>a</sup> | 977m  | 973d  | 977d   | 978m  | 963d  | 963d  | 975a  | 983 <sup>a</sup> |

f: banda fuerte. m: banda media. d: banda débil. a: banda ancha. h: hombro.

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, de los compuestos (1) - (5), (7), (9), (11) y (13) registrados en CDCl<sub>3</sub>, Tabla V, muestran la presencia de dos singuletes, correspondientes a los dos grupos metilos diferentes, ubicados sobre el anillo heterocíclico. Además, con excepción de (13) que presenta un multiplete en la región aromática, se observa un doblete de dobletes, correspondiente al sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> de los protones ubicados sobre el anillo aromático. Finalmente, cuando corresponde, también se observan las señales de los protones ubicados en los sustituyentes.

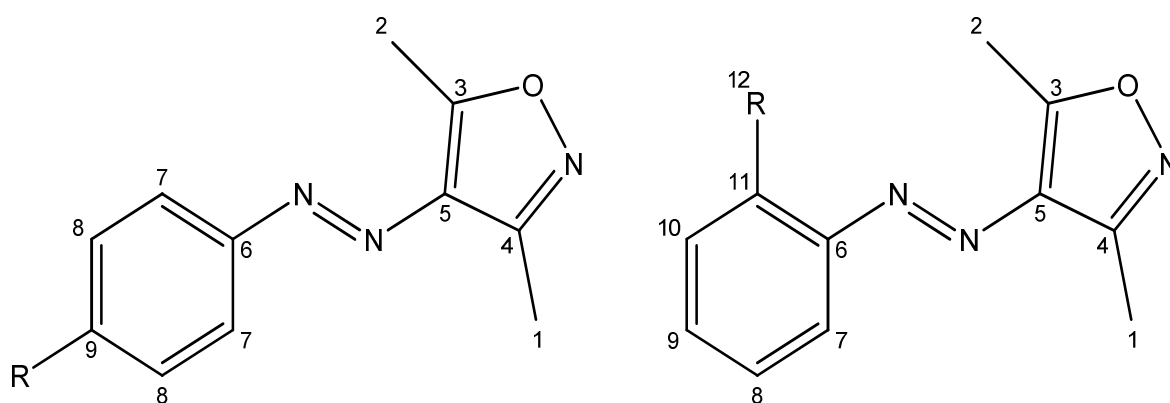
Por otro lado, en la Tabla VI se muestran las señales encontradas en los espectros de RMN <sup>13</sup>C. Estas señales fueron asignadas conforme a la numeración mostrada en la Figura 5 realizada con la ayuda de los espectros HMBC. En efecto, la Figura 6 muestra el espectro bidimensional HBMC de (11), típico de estos compuestos, donde se han destacado las interacciones carbono/hidrógeno

presentes en esta molécula. Los antecedentes encontrados son concordantes con las estructuras propuestas en la Figura 4.

**Tabla V:** Desplazamiento químico de las señales en el espectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : ppm) de los isoxazoles (1)-(5), (7), (9), (11), y (13) en  $\text{CDCl}_3$ .

|      | $\text{C}^1\text{H}_3$ , Alif. | $\text{C}^2\text{H}_3$ , Alif. | $\text{C}^7\text{H}$ , Arom. | $\text{C}^6\text{H}$ , arom. | R               |
|------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| (1)  | 2,39, s, 3H                    | 2,70, s, 3H                    | 8,03-8,05, dd, 2H            | 7,78-7,80, d, 2H             | No observada    |
| (2)  | 2,56, s, 3H                    | 2,76, s, 3H                    | 7,01-7,03, dd, 2H            | 7,83-7,85, d, 2H             | 3,92 s          |
| (3)  | 2,53, s, 3H                    | 2,74, s, 3H                    | 7,71-7,73, dd, 2H            | 7,27-7,29, d, 2H             | 2,43 s          |
| (4)  | 2,53, s, 3H                    | 2,74, s, 3H                    | 7,80-7,81, dd, 2H            | 7,44-7,50, m, 3H             | ---             |
| (5)  | 2,57, s, 3H                    | 2,79, s, 3H                    | 7,65-7,68, dd, 2H            | 7,71-7,74, d, 2H             | ---             |
| (7)  | 2,36, s, 3H                    | 2,62, s, 3H                    | 6,85-6,88, dd, 2H            | 7,62-7,65, d, 2H             | 10,19 s         |
| (9)  | 2,59, s, 3H                    | 2,82, s, 3H                    | 7,89-7,91, dd, 2H            | 8,11-8,14, d, 2H             | 2,0 s           |
| (11) | 2,54, s, 3H                    | 2,80, s, 3H                    | 7,91-7,94, dd, 2H            | 8,34-8,38, d, 2H             | ---             |
| (13) | 2,60, s, 3H                    | 2,88, s, 3H                    | 7,67-7,75, m, 2H             | 7,96-7,98, m, 1H             | 12,55-12,86 sa. |

s: singulete. dd: doblete de dobletes. m: mutipleto. sa: singuletes ancho.



**Figura 5:** Estructura de isoxazoles sustituidos en posición *para* y del ácido 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)diazenil)benzoico.

**Tabla VI:** Desplazamiento químico de las señales ( $\delta$ : ppm) en el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de los isoxazoles en  $\text{CDCl}_3$ .

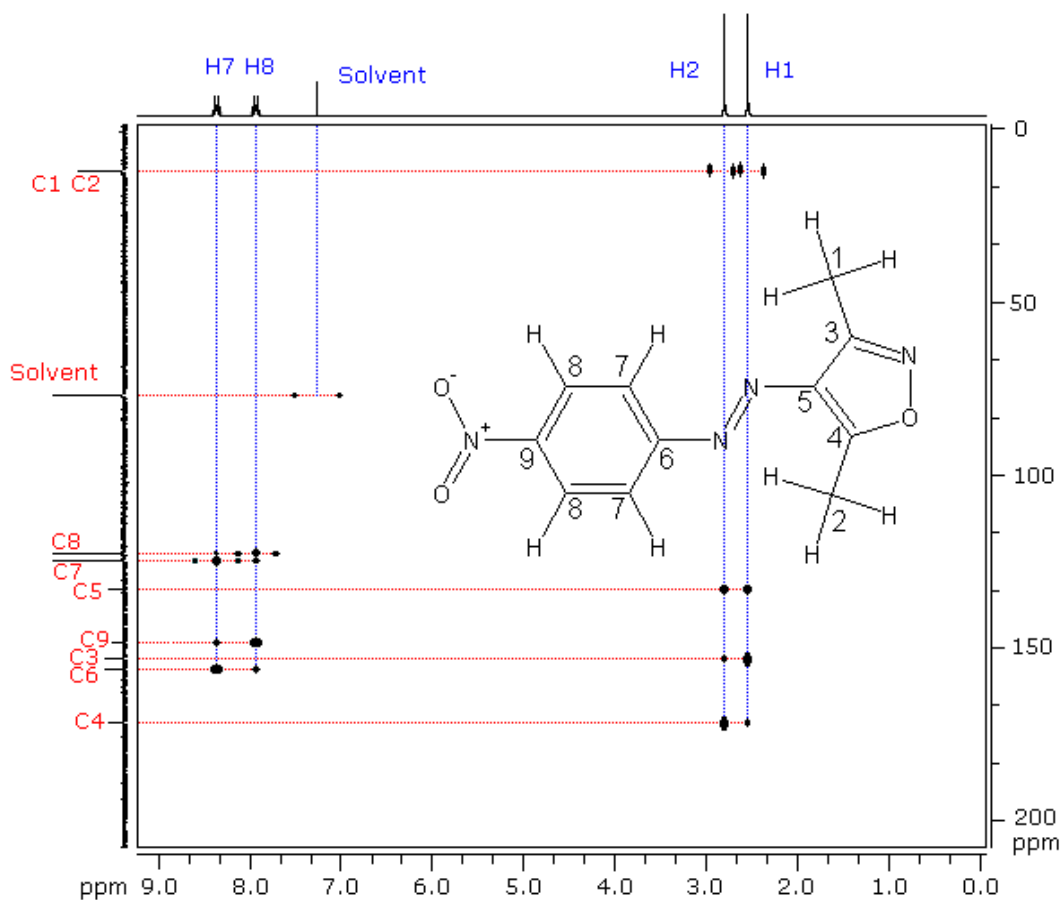
|                 | (1)    | (2)    | (3)    | (4)    | (5)    | (7)    | (9)    | (11)   | (13)   |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| C <sub>1</sub>  | 12,14  | 12,09  | 12,04  | 12,03  | 11,99  | 12,10  | 12,01  | 12,11  | 12,12  |
| C <sub>2</sub>  | 11,87  | 11,69  | 11,67  | 11,68  | 11,72  | 11,68  | 11,72  | 11,86  | 11,97  |
| C <sub>3</sub>  | 153,24 | 153,98 | 153,88 | 153,77 | 153,69 | 153,55 | 153,38 | 153,32 | 151,92 |
| C <sub>4</sub>  | 171,58 | 168,16 | 169,69 | 169,22 | 169,64 | 168,39 | 170,52 | 171,67 | 174,48 |
| C <sub>5</sub>  | 132,59 | 132,29 | 132,41 | 132,50 | 132,33 | 131,90 | 132,87 | 133,14 | 132,86 |
| C <sub>6</sub>  | 132,89 | 147,34 | 141,23 | 152,98 | 123,68 | 146,01 | 138,14 | 156,01 | 150,32 |
| C <sub>7</sub>  | 122,42 | 123,98 | 122,18 | 122,22 | 117,69 | 124,52 | 122,32 | 124,76 | 132,13 |
| C <sub>8</sub>  | 130,98 | 114,23 | 129,74 | 129,07 | 124,99 | 116,27 | 129,35 | 122,83 | 133,15 |
| C <sub>9</sub>  | 155,05 | 161,85 | 151,11 | 130,71 | 151,75 | 161,01 | 155,28 | 148,58 | 133,81 |
| C <sub>10</sub> | ---    | 55,63  | 21,47  | ---    | ---    | 116,58 | 197,18 | ---    | 126,36 |
| C <sub>11</sub> | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | 26,18  | ---    | 115,53 |
| C <sub>12</sub> | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    | 165,89 |

## 7.2 Descripción de la estructura

Un resumen de la colección de datos, distancias y ángulos de enlaces seleccionadas y los respectivos parámetros reticulares se muestran en las Tablas I y VII, respectivamente; así como un diagrama ORTEP de la molécula, Figura 7.

Los antecedentes encontrados muestran que la molécula es esencialmente plana, presenta una configuración *E* en torno del doble enlace N=N, con distancias y ángulos de enlace dentro de los límites encontrados en la literatura (Allen, F. H., 1987). Se observa, además, que el plano del anillo isoxazol respecto del plano del anillo bencénico forman un ángulo diedro de 6,2° a través del eje -N=N-. Por otro lado, la presencia de un enlace por puente de hidrógeno asistido por resonancia, EHAR, intermolecular, Tabla VIII, Figura 9, permite que la estructura tridimensional de la molécula adopte una estructura de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre anillos aromáticos y anillos heterocíclicos, respectivamente, Figura 8.

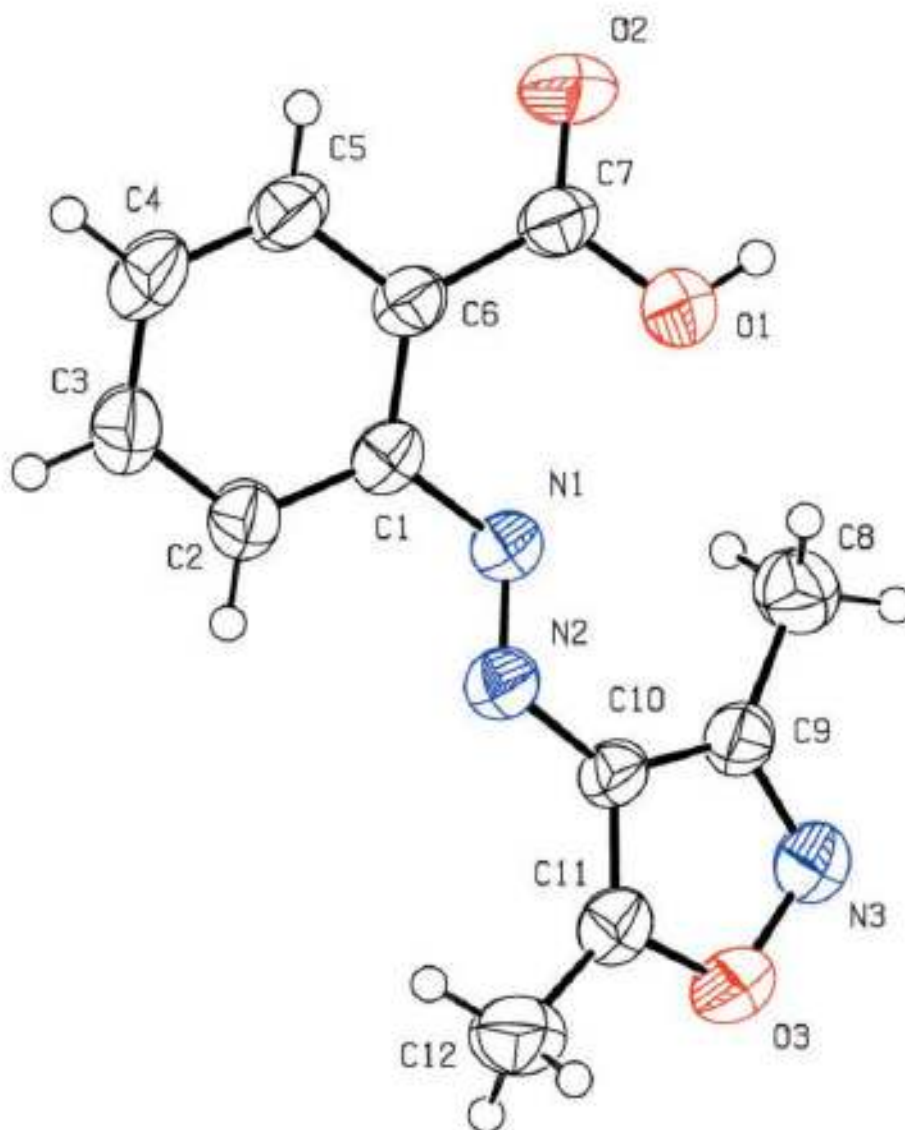




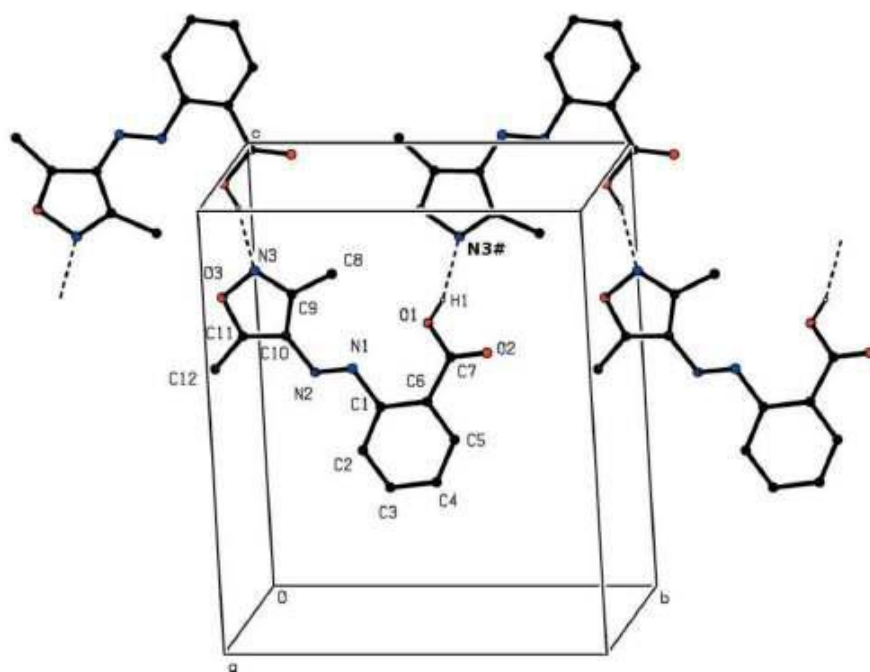
**Figura 6:** Espectro bidimensional HBMBC registrado en un espectrofotómetro Bruker AC 200P. ( $^1\text{H}$ ) ( $^{13}\text{C}$  at 50,3 MHz,  $J$  mod. secuencia  $^1\text{H}$  200,1 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  y TMS interno.

**Tabla VII:** Distancias y ángulos de enlace seleccionados del compuesto (13).

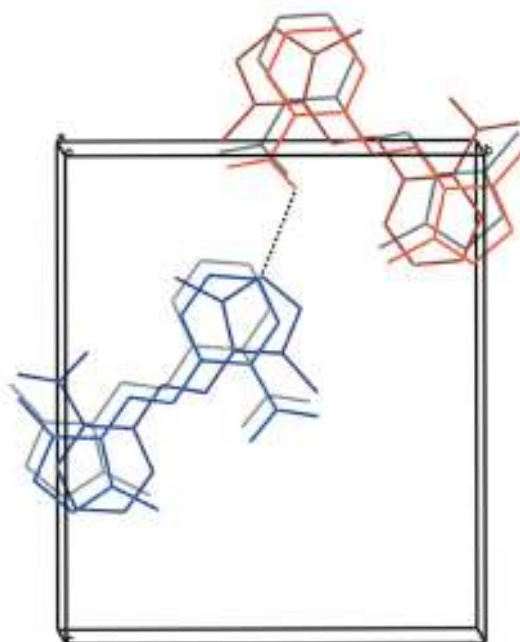
| Distancias (Å) |       | Ángulos (°)          |        |
|----------------|-------|----------------------|--------|
| O(3) – C(11)   | 1,352 | C(11) – O(3) – N(3)  | 107,81 |
| N(1) – C(1)    | 1,431 | N(2) – N(1) – C(1)   | 112,95 |
| N(2) – N(1)    | 1,254 | N(1) – N(2) – C(10)  | 113,22 |
| N(2) – C(10)   | 1,403 | C(9) – N(3) – O(3)   | 106,41 |
| N(3) – O(3)    | 1,424 | C(11) – C(10) – N(2) | 121,08 |
| C(9) – N(3)    | 1,301 | C(11) – C(10) – C(9) | 105,77 |
| C(9) – C(10)   | 1,418 | N(2) – C(10) – C(9)  | 133,15 |
| C(10) – C(11)  | 1,347 | C(10) – C(11) – O(3) | 109,41 |



**Figura 7:** Diagrama ORTEP del ácido 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)diazenil)benzoico (**13**) con un desplazamiento de los elipsoides de un 50% de probabilidad.



**Figura 8:** Vista del enlace hidrógeno asistido por resonancia, EHAR, intermolecular, en línea punteada, observado en **(13)**.



**Figura 9:** Apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre anillos aromáticos y anillos heterocíclicos en (13).

**Tabla VIII:** Parámetros reticulares del EHAR presente en (13)

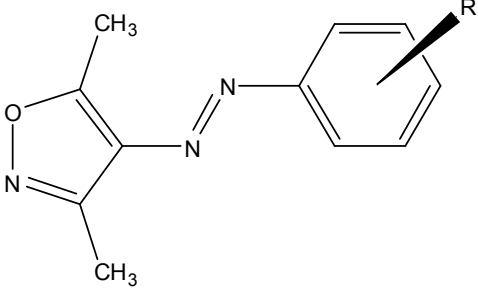
| $\angle(\text{D-H}\cdots\text{A})$ | $d(\text{D-H})$ | $d(\text{H}\cdots\text{A})$ | $d(\text{D}\cdots\text{A})$ | $\angle(\text{D-H}\cdots\text{A})$ |
|------------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| O(1)–H(1)⋯N(3)                     | 0.82            | 1.94                        | 2.735(3)                    | 163                                |

### 7.3 Ensayos biológicos *in vitro*.

El cultivo de la línea celular HL60 se realizó usando una metodología similar a la descrita en literatura (Lattmann *et al.*, 2004; Purohit y Reed, 1992) en medio, RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, L-glutamina 2 mM y antibiótico-antimicótico 1x. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. El recuento celular se realizó usando el método de exclusión Azul de Tripano. Por otra parte, se prepararon disoluciones stock de los isoxazoles (1)-(14) de concentración 100 mM en DMSO. De cada una de estas disoluciones se usó un volumen suficiente para alcanzar concentraciones de 0, 30, 60 y 100  $\mu\text{M}$ , en los pocillos que contenían las células en un volumen total de 3 mL. Cada experimento se realizó en triplicado y el recuento celular se llevó a cabo a las 24 h de su iniciación.

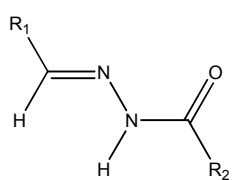
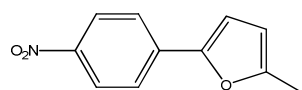
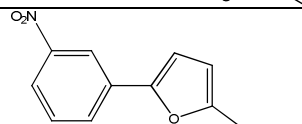
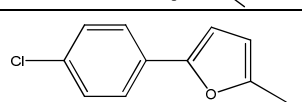
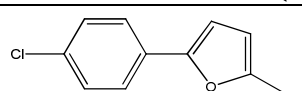
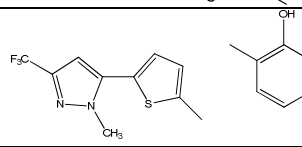
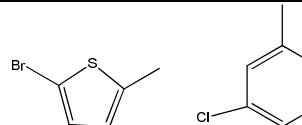
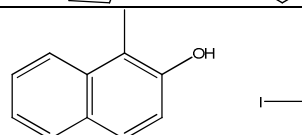
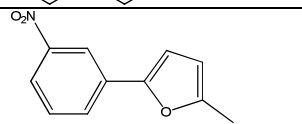
Las curvas de viabilidad (*vide infra*: Anexo) de células tumorales HL-60 manifiestan sensibilidad a los compuestos sintetizados, lo cual es corroborado por los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos expuestos en la Tabla IX. Desafortunadamente, el experimento de control con células normales de endotelio microvascular humano no se pudo realizar. Esto impidió comparar resultados.

**Tabla IX.** Valores de  $IC_{50}$  para una serie de (R-fenildiazenil)-3,5-dimetilisoxazoles determinados para la línea celular cancerígena HL-60.

|  |                                       |                             |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| Compuestos   | R                                     | $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
| (1)  | p-OH                                  | 39,6                        |
| (2)  | p-OCH <sub>3</sub>                    | 43,2                        |
| (3)  | p-CH <sub>3</sub>                     | 30,2                        |
| (4)  | p-H                                   | 63,0                        |
| (5)  | p-Br                                  | 131,4                       |
| (6)  | p-Cl                                  | 70,7                        |
| (7)  | p-CO <sub>2</sub> H                   | 89,8                        |
| (8)  | p-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO | 48,3                        |
| (9)  | p-COCH <sub>3</sub>                   | 14,8                        |
| (10)   | p-CN                                  | 67,4                        |
| (11)   | p-NO <sub>2</sub>                     | 20,7                        |
| (12)   | o-NO <sub>2</sub>                     | 70,5                        |
| (13)   | o-CO <sub>2</sub> H                   | 89,8                        |
| (14)   | p-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>    | 131,3                       |

Como se puede observar, Tabla IX, los compuestos (1)-(14) presentan un extenso rango de valores de  $IC_{50}$ , que oscilan entre 131,3-14,8  $\mu\text{M}$ , y no presentan correlación lineal en función de  $\sigma_p$ . Sin embargo, se deduce que los compuestos (11) y (9) presentan menores valores de  $IC_{50}$ , 20,7 y 14,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente; lo que indica que las células son más sensibles a estos dos compuestos.

**Tabla X.** Valores de IC<sub>50</sub> de diferentes compuestos, encontrados en la literatura, hacia la línea celular cancerígena HL-60, leucemia promielocítica humana.

| Compuestos  | R   | IC <sub>50</sub> (μM)      |
|---|---|----------------------------|
| Trióxido arsénico   | -   | (*) 2,2 × 10 <sup>-3</sup> |
| Leptocarpina  | -   | 31,7                       |
| <br>Acilhidrazidas |   |                            |
| Compuesto   | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub>   | IC <sub>50</sub> (μM)      |
| (1')  |    | 10,0                       |
| (2')  |   | 12,0                       |
| (3')  |  | 12,0                       |
| (4')  |  | 15,0                       |
| (5')  |  | 39,0                       |
| (6')  |  | 2,0                        |
| (7')  |  | 7,0                        |
| (8')  |  | 16,0                       |

\* Valor promedio

Los resultados obtenidos han sido comparados con una serie de compuestos con propiedades citotóxicas, Tabla X, cuyos ensayos de viabilidad y citotoxicidad, frente a células HL60, fueron determinados bajo condiciones similares a las usadas en esta investigación. En comparación con los isoxazoles, no es novedoso que trióxido de arsénico sea un poderoso agente citotóxico. Sin embargo, el interés por utilizarlo en terapia frente a células HL60,  $IC_{50} = 2,2 \times 10^{-3} \mu M$ , se debe a que es un poderoso inductor de apoptosis y su uso apunta a aquellos pacientes refractarios al tratamiento con ácido trans-retinoico, (Ruiz *et al* 2006). o retinol sintético, derivado de la vitamina A, que ejercen efectos importantes sobre el control del crecimiento celular y la diferenciación del epitelio lo que le confiere una importante actividad antitumoral (Wang *et al*, 2008) Por otro lado, comparados con leptocarpina,  $IC_{50} = 31,7 \mu M$ , Tabla X. (Lactona sequiterpénica natural aislada de *Leptocarpus rivularis*, planta autóctona de Chile), solamente (3), (9) y (11) tienen valores de  $IC_{50}$  menores.

Otro interesante artículo, que contiene una serie de acilhidrazidas, (1')-(8') Tabla X, muestra una serie compuestos con actividad citotóxica con un amplio rango de valores de  $IC_{50}$ , 39,0-2,0  $\mu M$  (Caffrey *et al*, 2002). En este artículo se propone que una potencial droga merece la atención si el  $IC_{50}$  está por debajo de 40  $\mu M$ .

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de líneas celulares derivadas de tumores humanos mediante la determinación del  $IC_{50}$  es una herramienta válida y útil para seleccionar o tamizar preliminarmente productos de origen natural o sintético con potencial actividad anticancerígena. (León *et al*, 2006). Este índice permite decidir si se justifica la realización de estudios más amplios en seres humanos, Fase 1, sin exponerlos a riesgos injustificados. (Goodman y Gilman, 2006).

Estos resultados indican que la presencia del sistema 1-(R-fenildiazenil)-3,5-dimetilisoxazol en todos los compuestos descritos, puede ser promisorio en el momento de evaluar la citotoxicidad. Probablemente, el efecto directo sobre el comportamiento antitumoral puede estar regulado o determinado por el efecto del sustituyente, R, ubicado en el anillo bencénico que se encuentra extensamente conjugado en los compuestos (1)-(14). Estos resultados pueden ser utilizados para tener una idea aproximada de las concentraciones de droga que se debería usar en estudios posteriores, con el objeto de conocer la capacidad de inducir apoptosis o para dilucidar los mecanismos de la acción antitumoral.

## **8. Conclusiones.**

En esta investigación se ha sintetizado una familia de compuestos heterocíclicos pertenecientes a la familia de isoxazoles del tipo 3,5-dimetil-4-(E-R-fenildiazenilisoxazoles), por condensación de  $\beta$ -dicetohidrazonas con cloruro de hidroxilamonio. Se propone que la reacción produce un intermediario oxima que, mantenida bajo reflujo, sufre una reacción de adición-desplazamiento originando los isoxazoles. El proceso global ocurre acompañado de la liberación de moléculas de agua. Los compuestos preparados fueron caracterizados mediante técnicas analíticas, espectrométricas y espectroscópicas. Uno de los miembros de la serie fue caracterizado mediante análisis difractométrico de rayos-X. Los resultados obtenidos son concordantes con las estructuras propuestas.

Por otro lado, se ha determinado el efecto citotóxico de estos compuestos frente a células cancerígenas HL-60, leucemia promielocítica humana. Los valores de  $IC_{50}$  se encuentran dispersos en un amplio rango de concentraciones y no muestran correlación de Hammett.



Desde el punto de vista farmacológico, los promisorios son aquellos cuyo  $IC_{50}$  es menor a  $40 \mu M$ . Sin embargo, es necesario complementar estos estudios con experimentos de control, inducción de apoptosis y dilucidación de mecanismos de acción. Además el uso de otras líneas celulares cancerígenas permitiría conocer el perfil completo de los isoxazoles para abordar las etapas “*in vivo*”.

## 9. Bibliografía.

Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. y Taylor, R. (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, S1–19.

Arango, P. C.; Llanes, F. L; Díaz, R.T.; Faxas, G.M. (1997) Apoptosis, características y papel en la formación maligna de la célula. *Rev. Cubana Oncol.* **13**(2):126-134

Bandiera, T. ; Grünanger, P.; Albini, F. M., (1992). On the Oximation of Diaryl-Beta-diketones. *J. Heterocycl. Chem.* **29**:1423-1428.

Barber, G. N.; Olofson, R. A., (1978). A useful, regiospecific synthesis of isoxazoles. *J. Org. Chem.* **43**:3015-3021.

Batra S.; Roy A. K.; Patra A.; Bhaduri A. P.; Surin W. R.; Raghavan S. A. V.; Sharma P.; Kapoor K.; Dikshit M., (2004). Baylis-Hillman reaction assisted parallel synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles and their in vivo bioevaluation as antithrombotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* **12**:2059-2077.

Bhatt, A. H.; Parekh, H.; Parikh, A. R., (1998). Synthesis of pyrazolines and isoxazoles as potential antimicrobial agents. *Heterocycl. Commun.***4**:361-336.

Bustos, C.; Sánchez, C.; Martínez, R.; Ugarte, R.; Schott, E.; Mac-Leod, D.; Garland, M. T.; Espinoza, L., (2007). Tautomeric, Spectroscopic, DFT Calculations and X-Ray Studies on O<sub>2</sub>N-4-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NHN=C(COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. *Dyes and Pigments*, **74**, 615-621.

Caffrey, C.R., Schanz, M., Nkemgu-Njinkeng, J., Brush, M., Hansell, E., Cohen, F.E., Flaherty, T.M., McKerrow, J.H., Steverding, D. (2002) Screening of acyl hydrazide proteinase inhibitors for antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (2002) 227–231.

Calí, P.; Naerum L.; Mukhija S. y Hjelmencrantz A., (2004). Isoxazole-3-hydroxamic acid derivatives as peptide deformylase inhibitors and potential antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14:5997–6000.

Chabner, BA.; Roberts, TG. Jr., (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *J. Med. Chem* 5(1):65-72.

Cuadrado, P.; Gonzalez-Nogal, A. M.; Valero R., (2002). Regiospecific synthesis of 5-silyl azoles. *Tetrahedron* 58:4975-4980.

Eid, A. I.; Kira, M. A.; Fahmy, H. H., (1978). Synthesis of new pyrazolones as potent anti-inflammatory agents. *J. Pharm. Belg.* 33:303-311.

Fidler, I.; Hart, I., (1982). Biological diversity in metastatic neoplasm: origins and implications. *Science*, 217: 998-1003.

Finley, S. R. (2001) Haematologic Malignancies. En: Koda-Kimble, M. A. 7<sup>a</sup> Ed. *Applied Therapeutics, The Clinical Use of Drugs*. 88-1 – 88-2. Vancouver, Washington

Frolund, B.; Jorgensen, A. T.; Tagmose, L.; Stensbol, T. B.; Vestergaard, H. T.; Engblom, C.; Kristiansen, U.; Sanchez, C.; Krogsgaard-Larsen, P. y Liljefors, T., (2002). Novel class of potent 4-arylalkyl substituted 3-isoxazolol GABA(A) antagonists: Synthesis, pharmacology, and molecular modeling. *J. Med. Chem.* **45**:2454-2468.

Giovannoni, M. P.; Vergelli, C.; Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Bartolini, A.; KalPias, V., (2003). [(3-Chlorophenyl)piperazinylpropyl]pyridazinones and analogues as potent antinociceptive agents. *J. Med. Chem.* **46**:1055-1059.

Goodman, A.; Gilman. (2006) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. México: McGraw Hil **5**:129-143.

He, Y.; Lin, N.-H., (1994). Studies On Isoxazole Formation from Alkyl Carboxylic Esters. *Synthesis* **9**:989-992.

Hodges, G., Rowlatt, C. (1994). Developmental Biology and Cancer. 3rd edition CRC Press. **4**:85-88

Jaerger, V.; Colinas, P. A. (2002); In *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*; Padwa, A., Pearson, W. H., Eds.; Chemistry of Heterocyclic Compounds; Wiley; Hoboken, Vol. **59**, pp 361-472.

Lattmann, E; Kinchington, D; Dunn, S; Singh, H; Ayuco, W; Tisdale, M.J, (2004) Cytotoxicity of 3,4-dihalogenated 2 (5H)-furanonas. *J. pharmacy and pharmacology.* **56**:1163-1170.

León, C.; Gomez, S., Morantes, S.; Cordero, C.; Ariztizábal. (2006) Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica.* **26**:161-8

Li, W.-T.; Hwang, D.-R.; Chen, C.-P.; Shen, C.-W.; Huang, C.-L.; Chen, T.-W.; Lin, C.-H.; Chang, Y.-L.; Chang, Y.-Y.; Lo, Y.-K.; Tseng, H.-T.; Lin, C.-C.; Song, J.-S.; Chen, H.-C.; Chen, S.-J.; Wu, S.-H.; Chen, C.-T., (2003). Synthesis and biological evaluation of N-heterocyclic indolyl glyoxylamides as orally active anticancer agents. *J. Med. Chem.* **46**:1706-1715.

Martínez R, Kesternich V, Gutierrez E, Dolz H, Mansilla H, (1995). Conformational analysis and biological activity of leptocarpin and leptocarpin acetate. *Planta Med*, **61**:188-9.

Menzio, G.; Mosti, L.; Fossa, P.; Mattioli, F.; Ghia, M., (1997). Omega -dialkylaminoalkyl ethers of phenyl-(5-substituted 1-phenyl-1h-pyrazol-4-yl)methanols with analgesic and anti-inflammatory activity. *J. Heterocycl. Chem.* **34**: 963-968.

Norman B, Lander P.; Gruber J. Kroin J., Cohen J., Jungheim L., Starling J., Law K., Self T. Tabas L., Williams D., Paul D. y Dantzig A., (2005). Cyclohexyl-linked tricyclic isoxazoles are potent and selective modulators of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**:5526-5530.

Purohit. A., Reed. M.J; (1992) Oestrogen sulphatase activity in hormone-dependent and hormone-independent breast-cancer cells: modulation by steroidal and non-steroidal therapeutic agents. *Int. J. Cancer*: **50**,901-905.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD, (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther.* **99**(1):1-13.

Rowley, M.; Broughton, H. B.; Collins, I.; Baker, R.; Emms, F.; Marwood, R.; Patel, S.; Ragan, C. I., (1996). 5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-3-(1-(2-phenylethyl) piperidin-4-yl)isoxazole, selective antagonist at human cloned dopamine D<sub>4</sub> receptors. *J. Med. Chem.* **39**:1943-1945.

Ruiz, R. G., Sánchez, L.A., Bello, G.J., Ferrada, A.M., Colom, L.Y. (2006) Evaluación de la citotoxicidad del trióxido de arsénico en líneas celulares tumorales humanas con la técnica colorimétrica de la sulforhodamina B. *Rev cubana med* v.45 n.1 Ciudad de la Habana.

Sawyer, C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature*, **432**:294-297.

Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM, (2006). Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* **12**(19):2979-90.

Talley, J. J., (1999). Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Prog. Med. Chem.* **13**:201-234.

Talley, J. J.; Brown, D. L.; Carter, J. S.; Graneto, M. J.; Koboldt, C. M.; Masferrer, J. L.; Perkins, W. E. Rogers, R. S.; Shaffer, A. F.; Zhang, Y. Y.; Zweifel, B. S.; Seibert, K., (2000). 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]- benzenesulfonamide, valdecoxib: a potent and selective inhibitor of COX-2. *J. Med. Chem.* **43**:775-777.

Vicentini, C. B.; Verones, A. C.; Poli, T. ; Guarneri, M. Giori, P. ; Ferreti, V., (1990). A synthetic entry to isoxazolo[5,4-d]pyrimidine-4[5H]thione and isothiazolo[4,3-d]isoxazole. *J. Heterocycl. Chem.* **27**:1481.

Wang, A.; Ding, X.; Sheng, S.; Yao, Z., (2008) Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **375**, (3):435-439

Yao, H. C., (1964). Azohydrazone Conversion. II. The Coupling of Diazonium Ion with  $\beta$ -Diketones. *J. Org. Chem.* **29**:2959.

## 10. ANEXOS

### ANEXO I:

Posiciones atómicas de los átomos en (13).

| Átomo | X       | Y       | Z      |
|-------|---------|---------|--------|
| O1    | -0,0456 | 0,4383  | 0,5856 |
| O2    | 0,0666  | 0,6032  | 0,5365 |
| O3    | 0,1131  | -0,0733 | 0,6679 |
| N1    | 0,1334  | 0,2583  | 0,5109 |
| N2    | 0,0938  | 0,1546  | 0,4967 |
| N3    | 0,1450  | 0,0195  | 0,7339 |
| C1    | 0,1269  | 0,3258  | 0,4232 |
| C2    | 0,1738  | 0,2786  | 0,3325 |
| C3    | 0,1851  | 0,3466  | 0,2505 |
| C4    | 0,1504  | 0,4629  | 0,2576 |
| C5    | 0,1059  | 0,5106  | 0,3461 |
| C6    | 0,0931  | 0,4433  | 0,4300 |
| C7    | 0,0404  | 0,5038  | 0,5224 |
| C8    | 0,1733  | 0,2247  | 0,7306 |
| C9    | 0,1443  | 0,1129  | 0,6812 |
| C10   | 0,1099  | 0,0867  | 0,5813 |
| C11   | 0,0908  | -0,0285 | 0,5772 |
| C12   | 0,0560  | -0,1113 | 0,4975 |
| H1    | -0,0708 | 0,4761  | 0,6346 |
| H2    | 0,1976  | 0,2002  | 0,3277 |
| H3    | 0,2160  | 0,3143  | 0,1904 |
| H4    | 0,1573  | 0,5090  | 0,2020 |
| H5    | 0,0838  | 0,5893  | 0,3501 |
| H8A   | 0,1688  | 0,2140  | 0,8004 |
| H8B   | 0,0799  | 0,2777  | 0,7110 |
| H8C   | 0,2900  | 0,2550  | 0,7125 |
| H12A  | 0,1457  | -0,1713 | 0,4995 |
| H12B  | 0,0626  | -0,0724 | 0,4355 |
| H12C  | -0,0628 | -0,1442 | 0,5055 |



## Distancias (Å) y Ángulos (°) de enlace en (13)

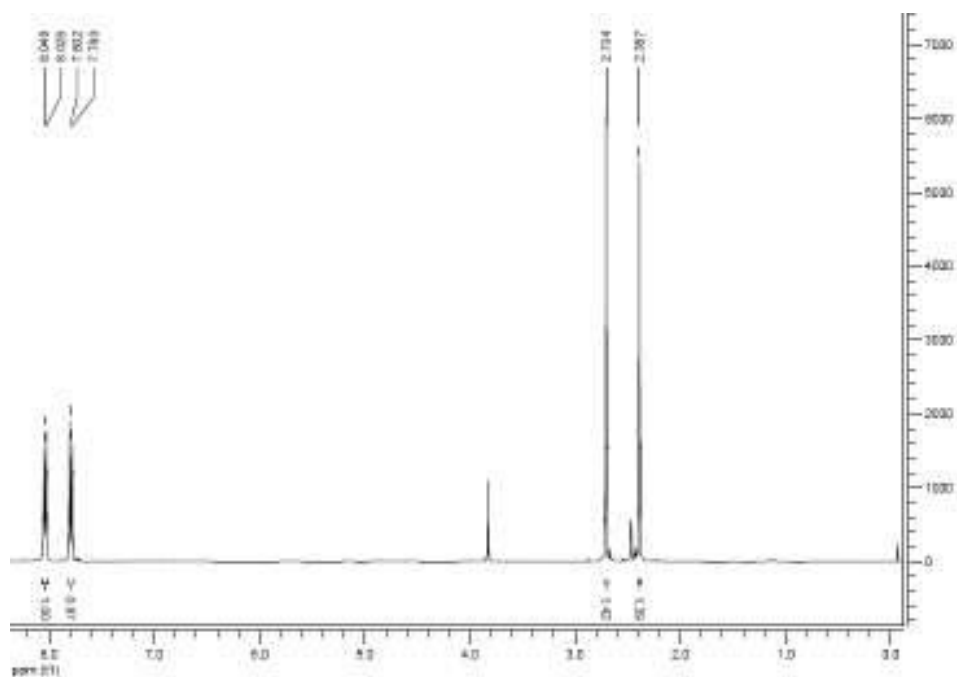
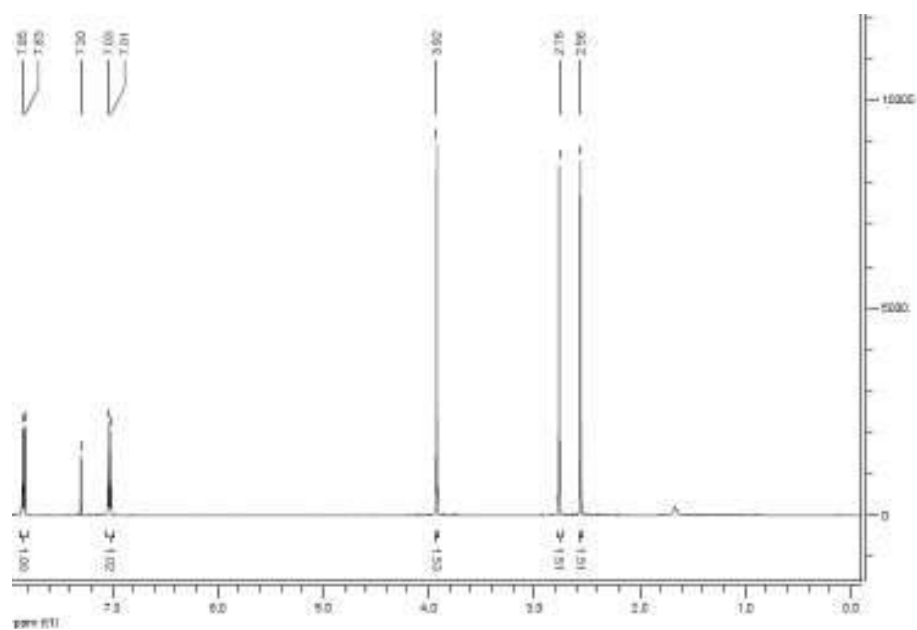
Distancias de enlace

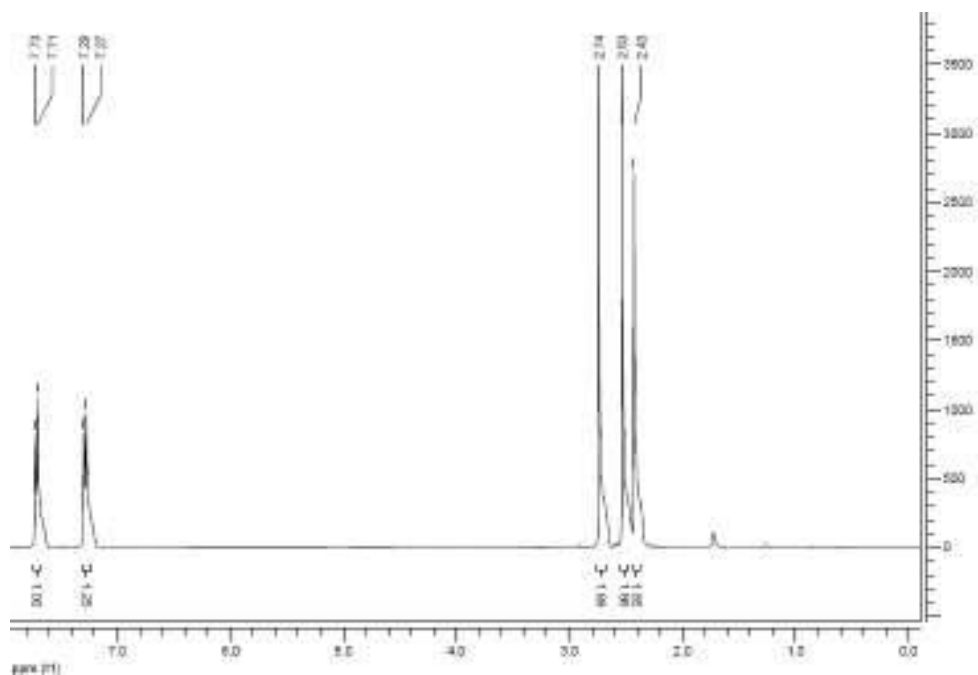
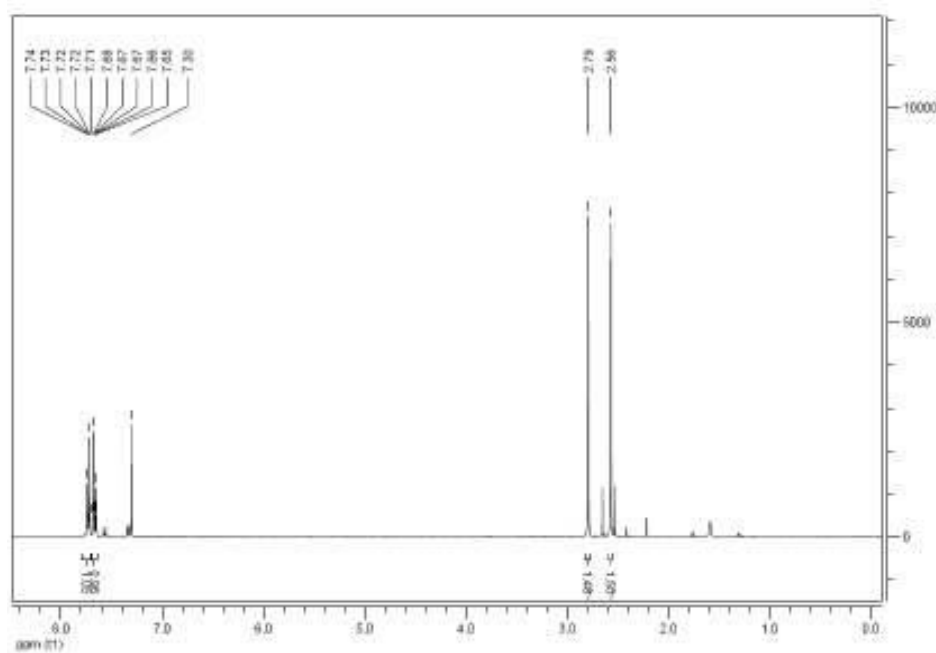
| Átomo 1 | Átomo 2 | Distancia (Å) |
|---------|---------|---------------|
| O1      | H1      | 0,82          |
| H3      | C3      | 0,929         |
| H2      | C2      | 0,93          |
| H4      | C4      | 0,93          |
| H5      | C5      | 0,93          |
| C2      | H2      | 0,93          |
| H8a     | C8      | 0,96          |
| H8b     | C8      | 0,96          |
| H8c     | C8      | 0,96          |
| H12a    | C12     | 0,96          |
| H12b    | C12     | 0,96          |
| H12c    | C12     | 0,96          |
| O2      | C7      | 1,187(3)      |
| N1      | N2      | 1,254(3)      |
| N3      | C9      | 1,301(3)      |
| C7      | O1      | 1,312(3)      |
| C11     | C10     | 1,347(3)      |
| C11     | O3      | 1,352(3)      |
| C5      | C4      | 1,367(4)      |
| C3      | C2      | 1,372(4)      |
| C4      | C3      | 1,379(5)      |
| C6      | C5      | 1,389(4)      |
| C6      | C1      | 1,391(3)      |
| C2      | C1      | 1,396(4)      |
| C10     | N2      | 1,403(3)      |
| C10     | C9      | 1,418(4)      |
| N3      | O3      | 1,424(3)      |
| C1      | N1      | 1,431(3)      |
| C11     | C12     | 1,474(4)      |
| C9      | C8      | 1,479(3)      |
| C7      | C6      | 1,494(4)      |

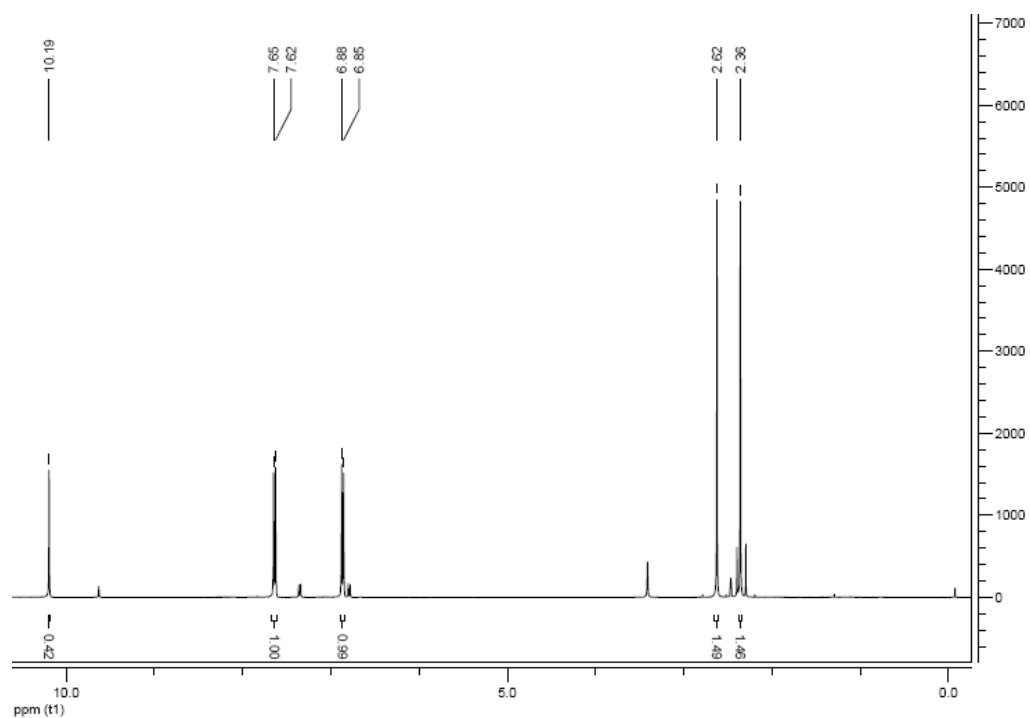
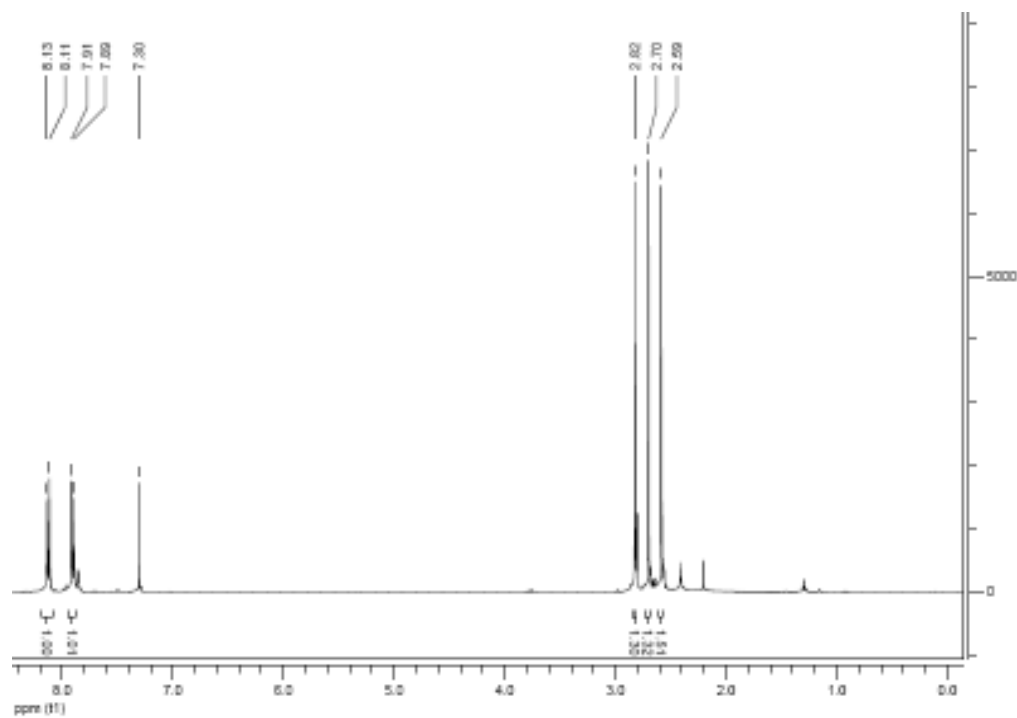
## Ángulos de enlace

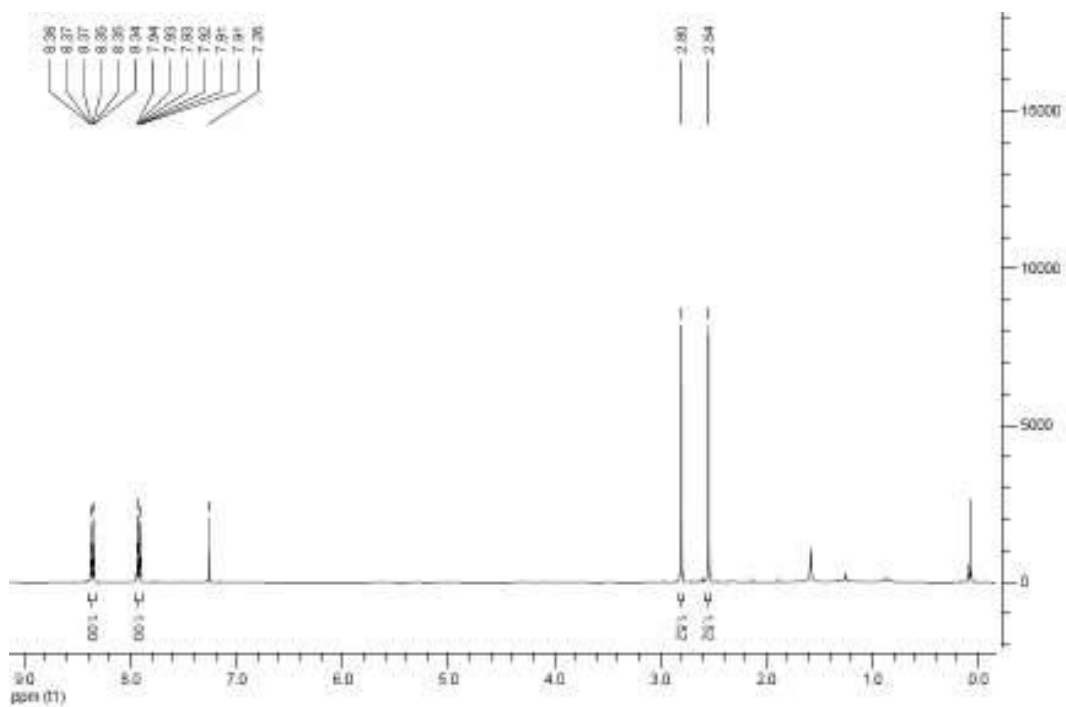
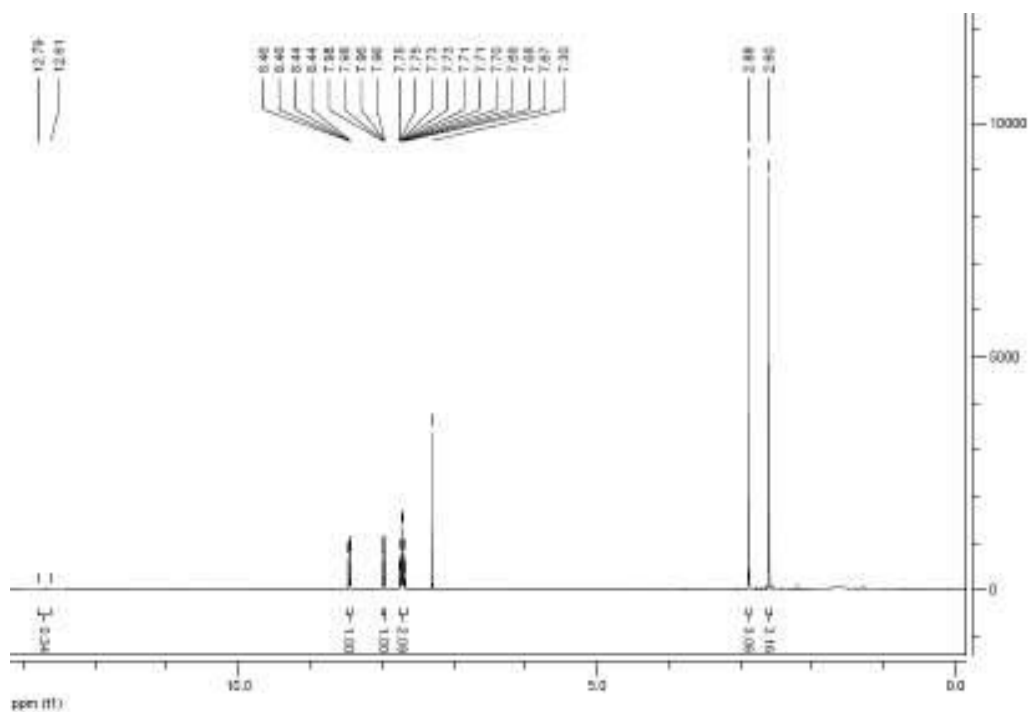
| Atomo 1 | Atomo 2 | Atomo 3 | Angulo (°) |
|---------|---------|---------|------------|
| H1      | O1      | C7      | 109,00     |
| C11     | C10     | C9      | 105,8(2)   |
| C9      | N3      | O3      | 106,4(2)   |
| C11     | O3      | N3      | 107,8(18)  |
| H12b    | C12     | H12a    | 109,00     |
| C10     | C11     | O3      | 109,00     |
| H8a     | C8      | C9      | 109,00     |
| H8c     | C8      | H8a     | 109,00     |
| H8c     | C8      | H8b     | 109,00     |
| H12c    | C12     | H12a    | 109,00     |
| H8b     | C8      | C9      | 109,00     |
| H12b    | C12     | C11     | 109,00     |
| H12b    | C12     | H12c    | 109,00     |
| H12a    | C12     | C11     | 109,00     |
| H8a     | C8      | H8b     | 110,00     |
| H8c     | C8      | C9      | 110,00     |
| H12c    | C12     | C11     | 110,00     |
| N3      | C9      | C10     | 110,6(2)   |
| N2      | N1      | C1      | 113,0(2)   |
| N1      | N2      | C10     | 113,2(2)   |
| O1      | C7      | C6      | 114,0(2)   |
| O3      | C11     | C12     | 116,4(2)   |
| C5      | C6      | C7      | 116,6(2)   |

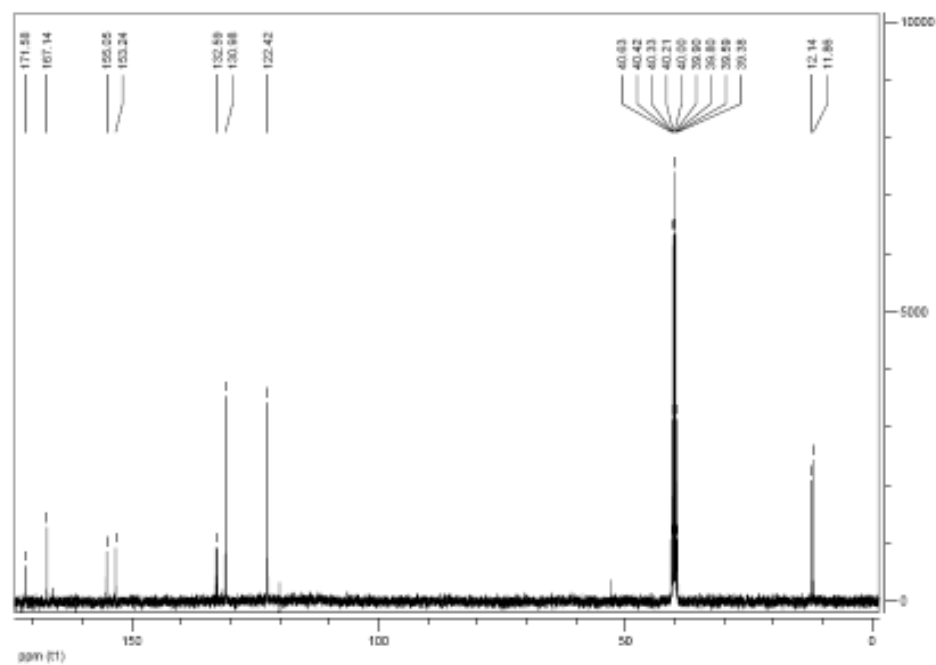
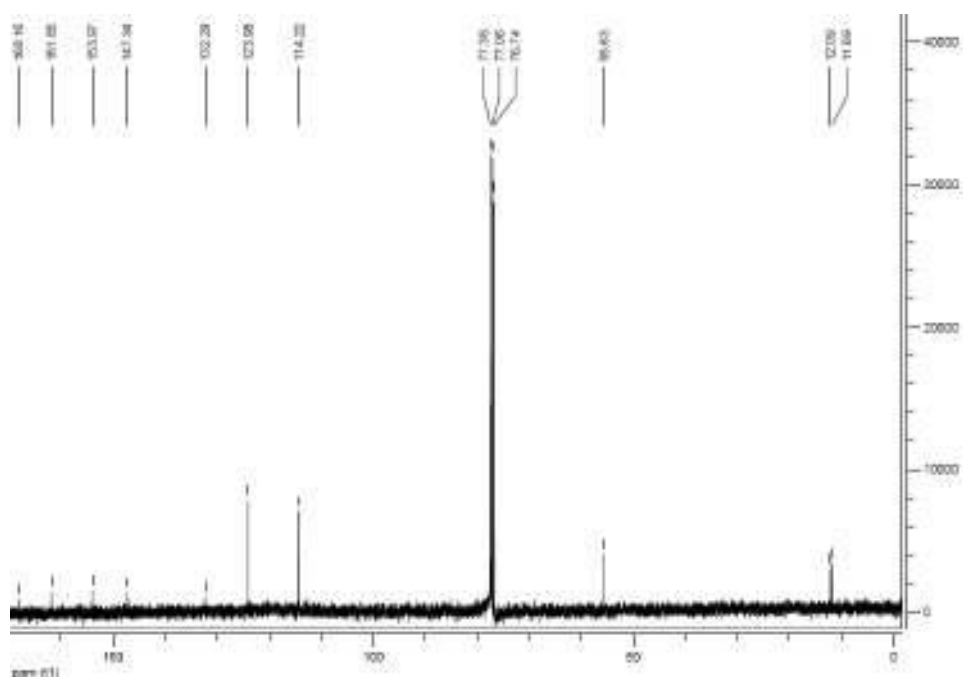
|     |     |     |          |
|-----|-----|-----|----------|
| N3  | C9  | C8  | 118,7(2) |
| C5  | C6  | C1  | 119,0(2) |
| C6  | C1  | N1  | 119,2(2) |
| C6  | C1  | C2  | 119,3(2) |
| C2  | C3  | C4  | 119,8(3) |
| H5  | C5  | C4  | 120,00   |
| H5  | C5  | C6  | 120,00   |
| H2  | C2  | C1  | 120,00   |
| H2  | C2  | C3  | 120,00   |
| H4  | C4  | C3  | 120,00   |
| H4  | C4  | C5  | 120,00   |
| H3  | C3  | C2  | 120,00   |
| H3  | C3  | C4  | 120,00   |
| C5  | C4  | C3  | 120,2(3) |
| C3  | C2  | C1  | 120,7(2) |
| C4  | C5  | C6  | 121,0(2) |
| C11 | C10 | N2  | 121,1(2) |
| C2  | C1  | N1  | 121,1(2) |
| O2  | C7  | O1  | 122,4(3) |
| O2  | C7  | C6  | 123,6(3) |
| C1  | C6  | C7  | 124,4(2) |
| C10 | C9  | C8  | 130,7(2) |
| N2  | C10 | C9  | 133,2(2) |
| C10 | C11 | C12 | 134,2(3) |

**ANEXO II: RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos (1), (2), (3), (4), (5), (7), (9), (11) y (13).****1. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (1)****2. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (2)**

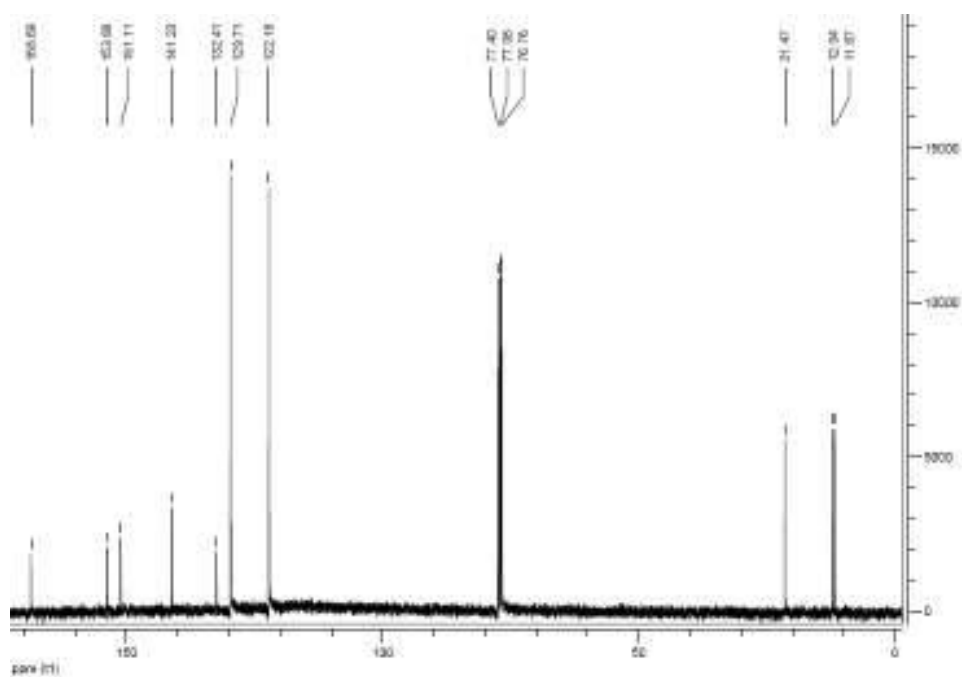
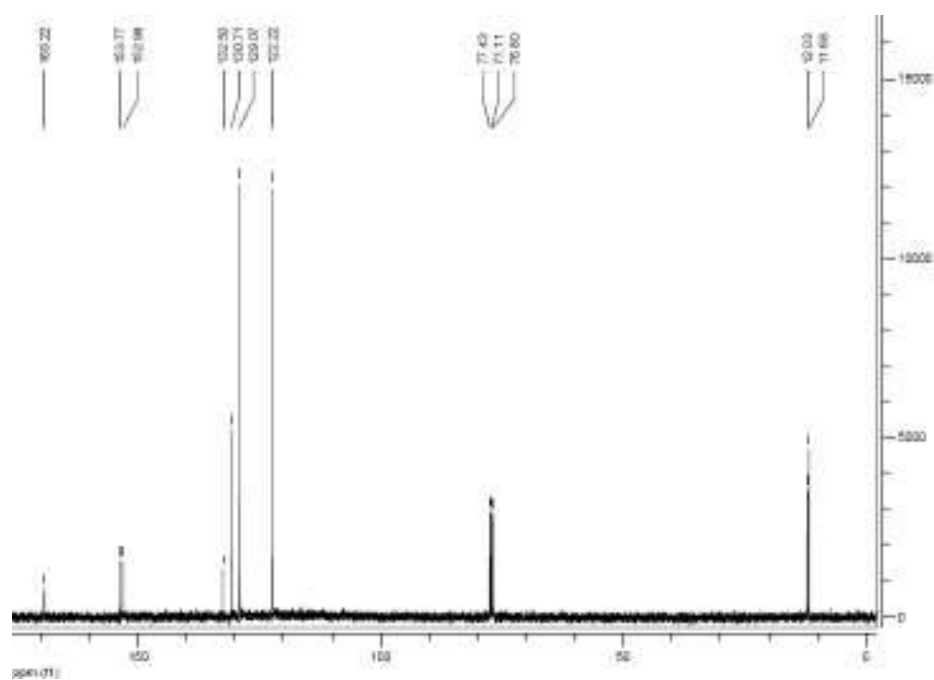
3. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (3)4. Espectro  $^1\text{H}$  RMN compuesto (4)(4)5. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (5)

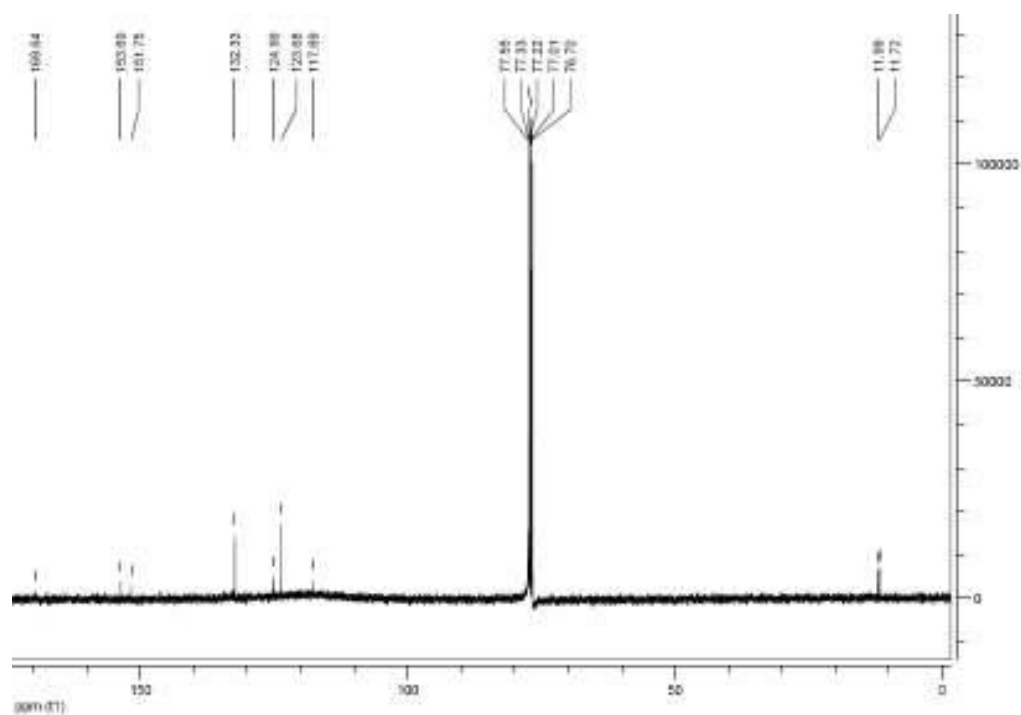
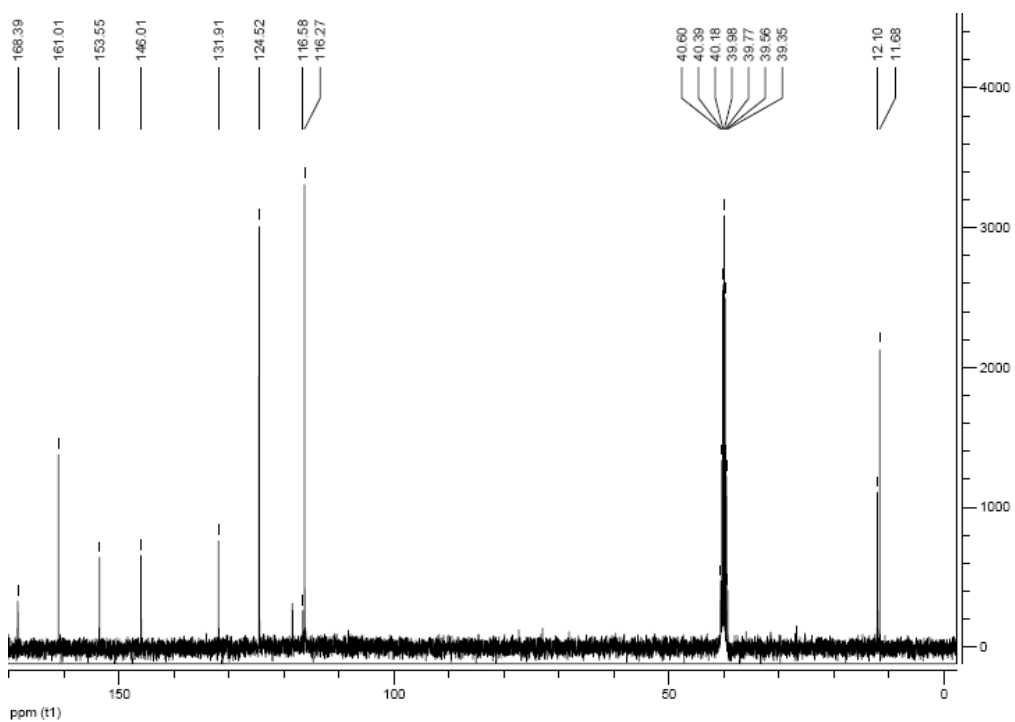
6. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (7)7. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (9)

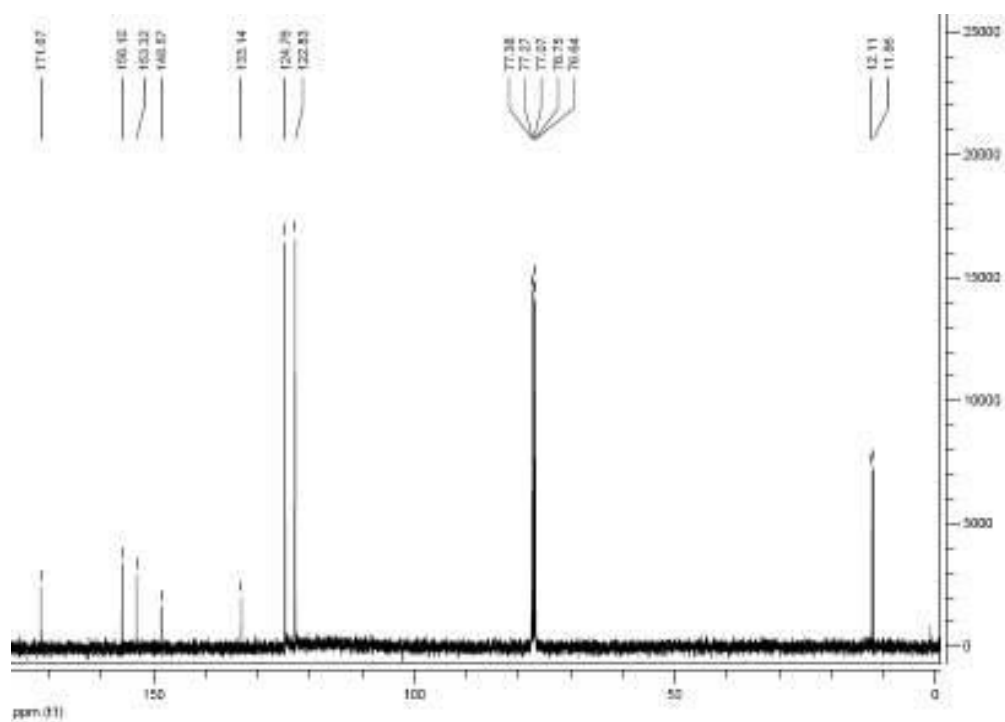
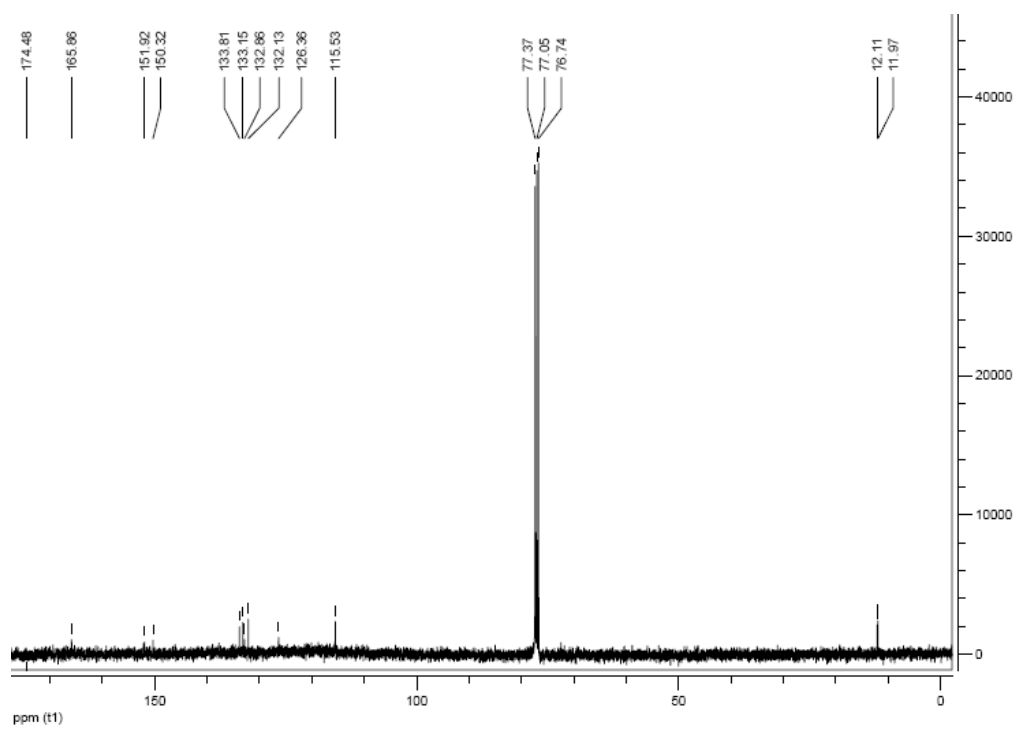
8. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (11)9. Espectro RMN  $^1\text{H}$  compuesto (13)

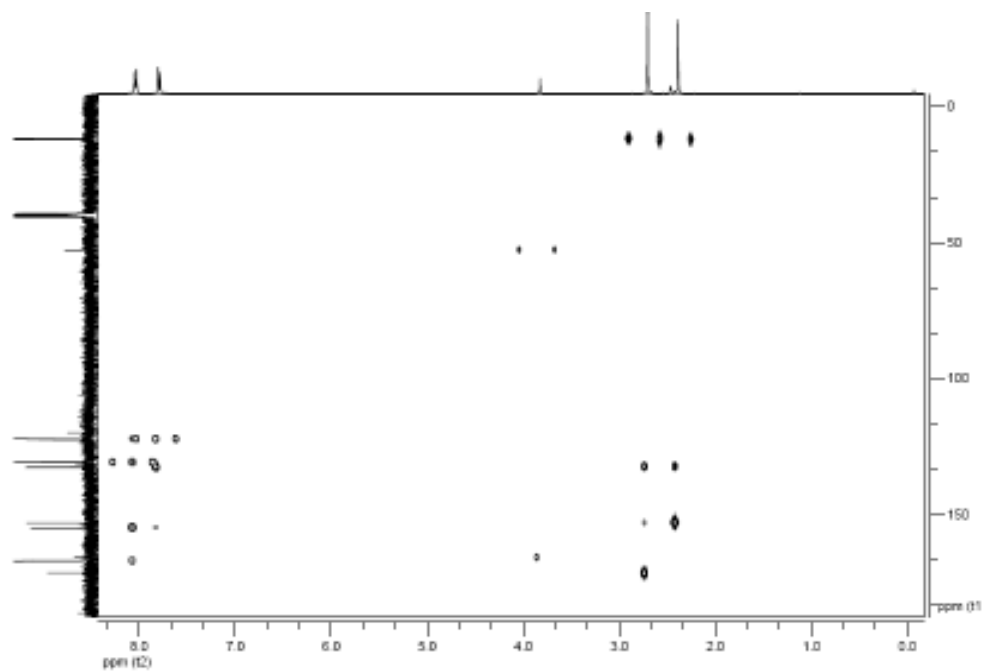
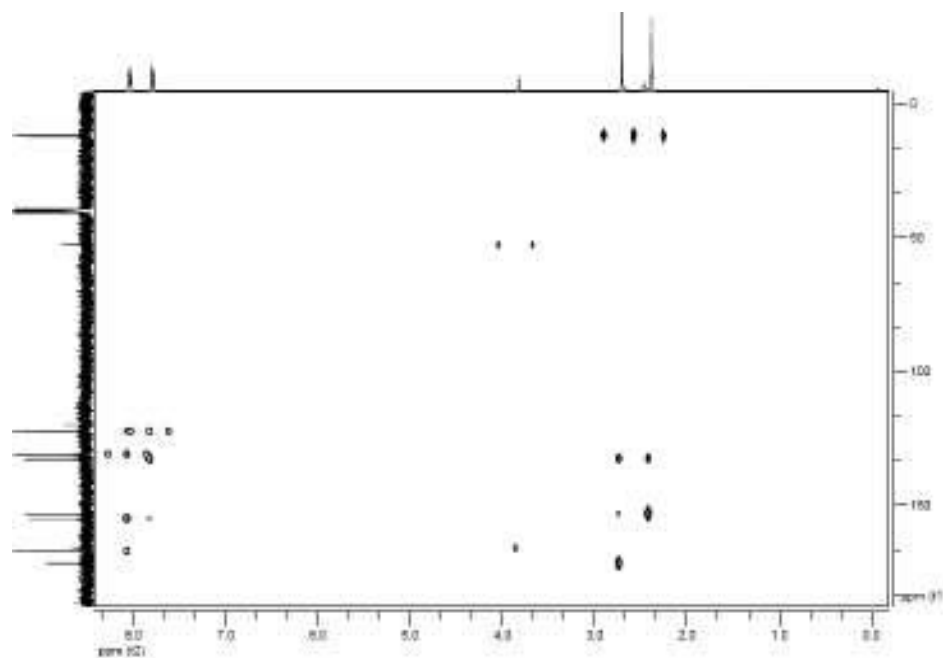
**ANEXO III: RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos (1), (2), (3), (4), (5), (7), (11) y (13).****1. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (1)****2. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (2)**



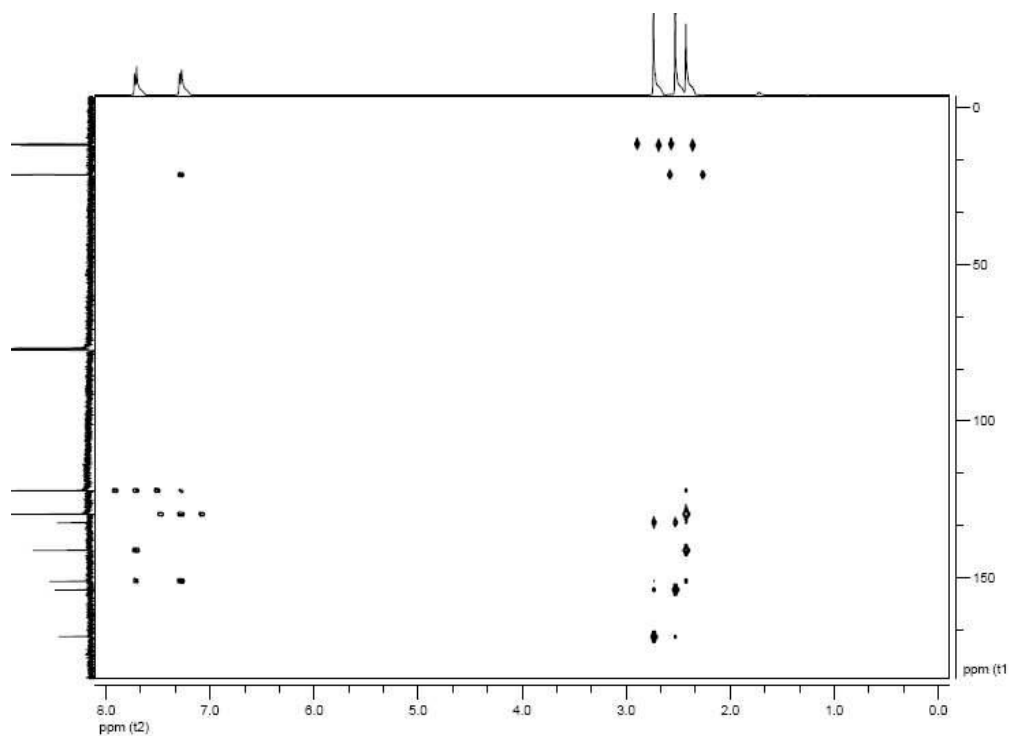
3. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (3)4. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (4)

5. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (5)6. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (7)

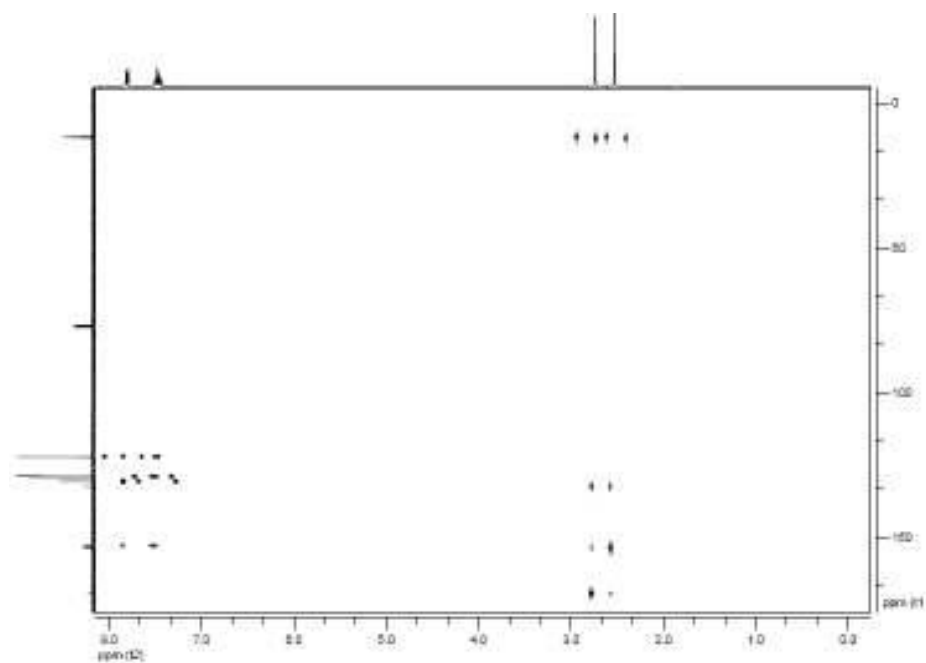
7. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (11)8. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  compuesto (13)

**ANEXO IV: HMBC de los compuestos (1), (2), (3), (4), (5), (7), (11) y (13).****1. Espectro HMBC compuesto (1)****2. Espectro HMBC compuesto (2)**

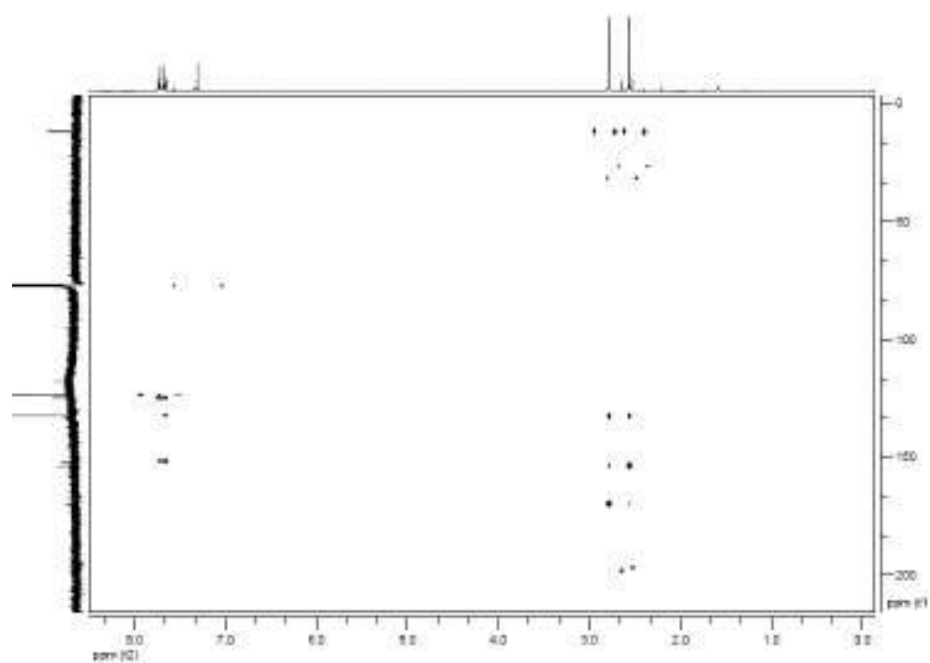
## 3. Espectro HMBC compuesto (3)



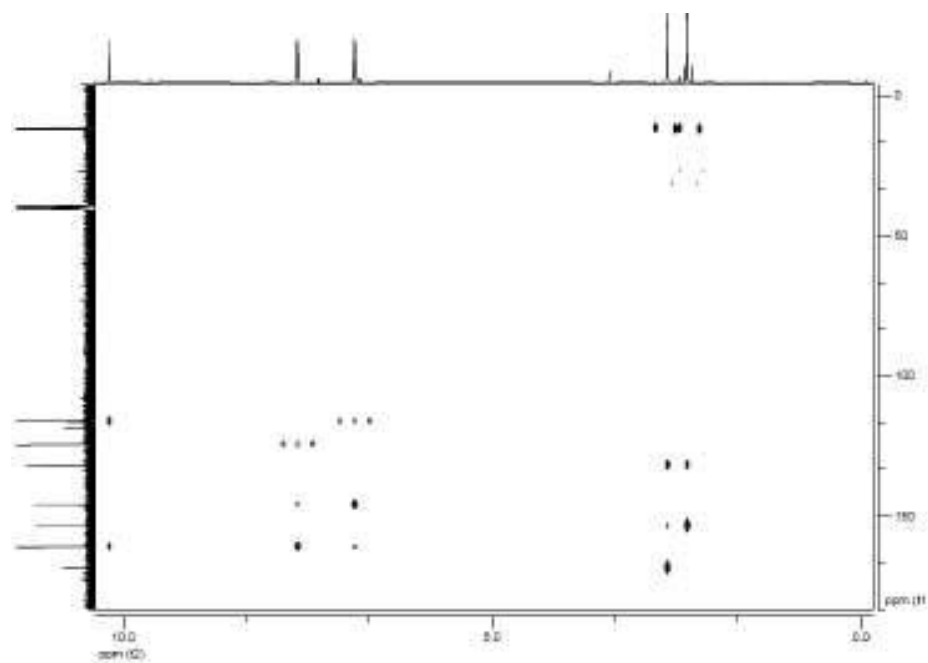
## 4. Espectro HMBC compuesto (4)



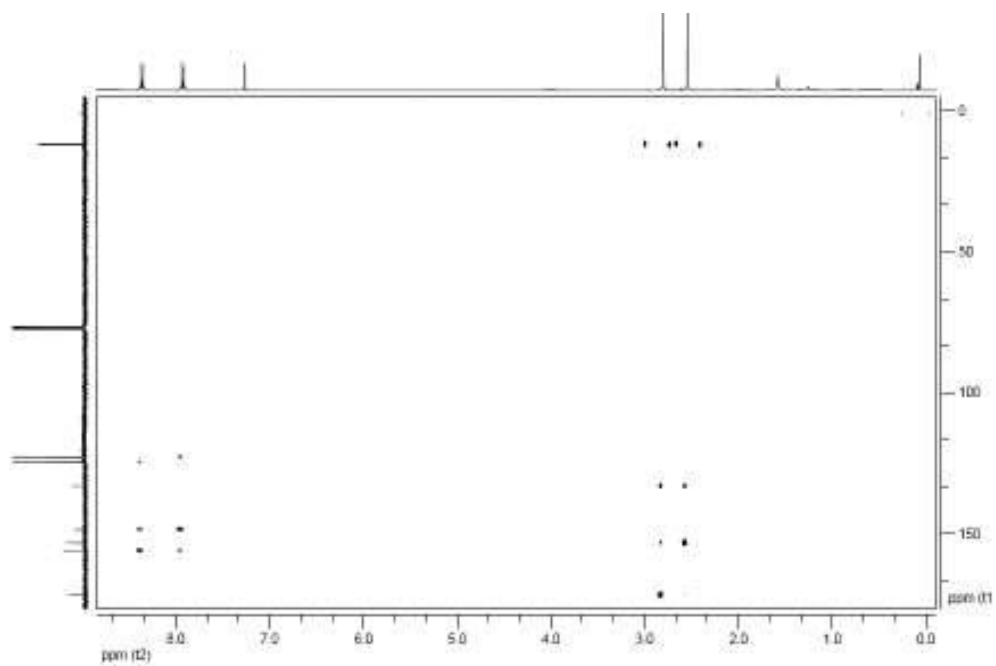
## 5. Espectro HMBC compuesto (5)



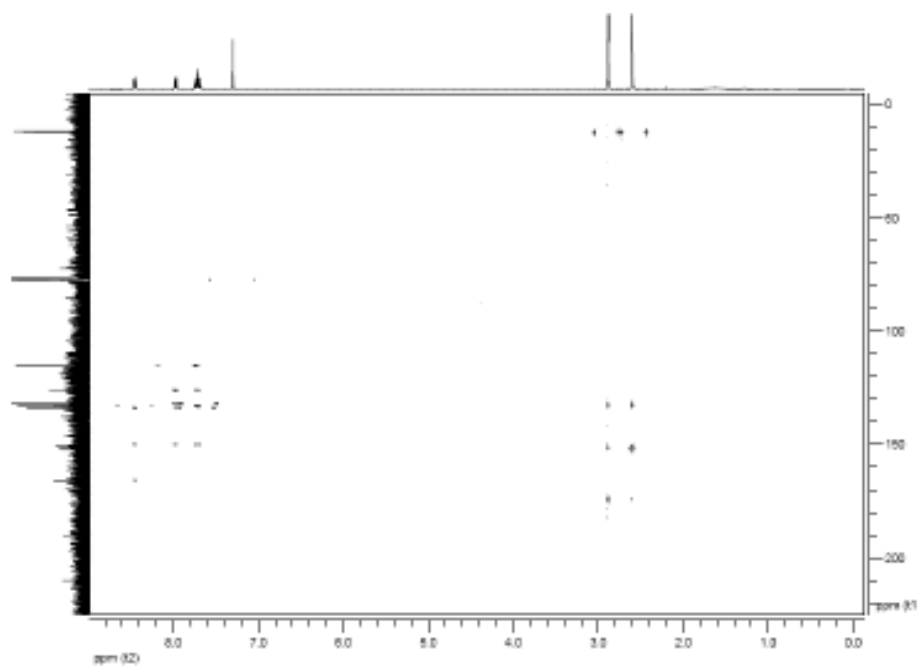
## 6. Espectro HMBC compuesto (7)



## 7. Espectro HMBC compuesto (11)

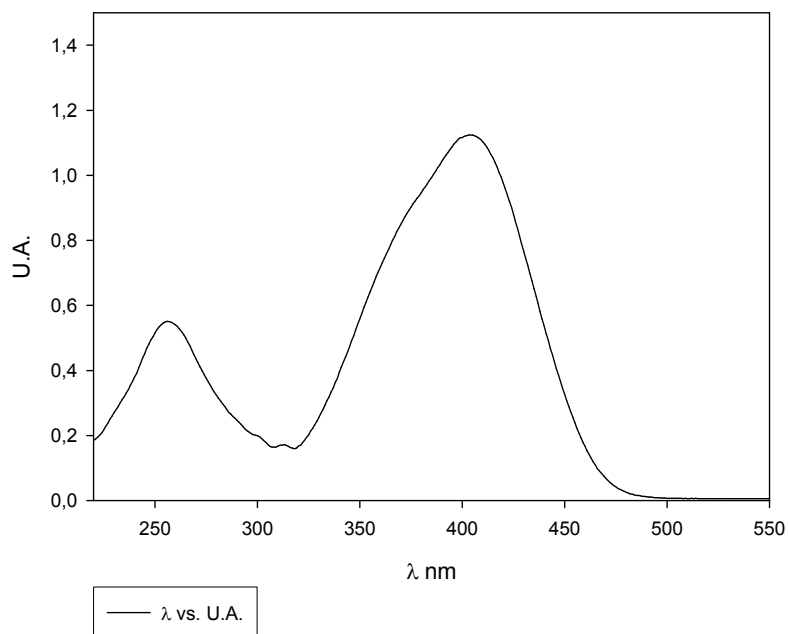


## 8. Espectro HMBC compuesto (13)

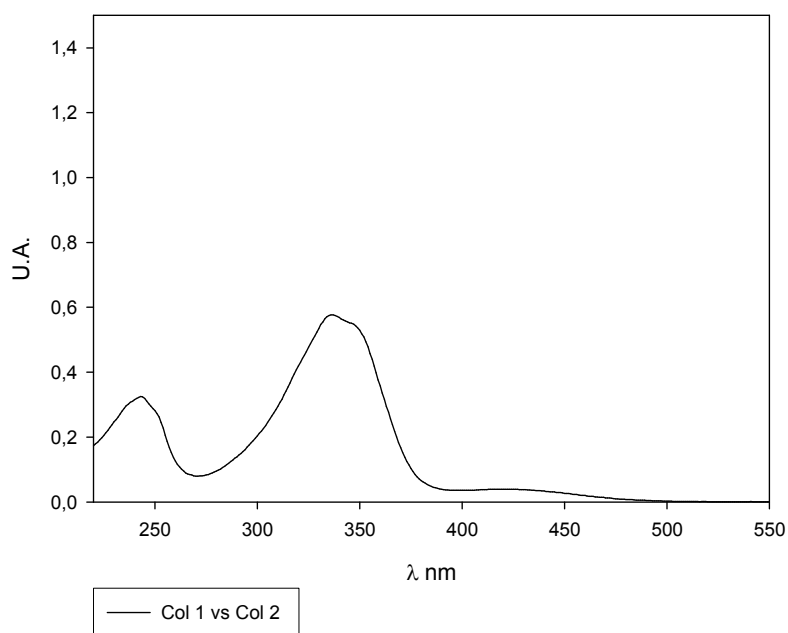


**ANEXO V: UV-vis de los compuestos (1) - (13).**

## 1. Espectro UV-Visible compuesto (1), concentración 5,38E-05 mol/L

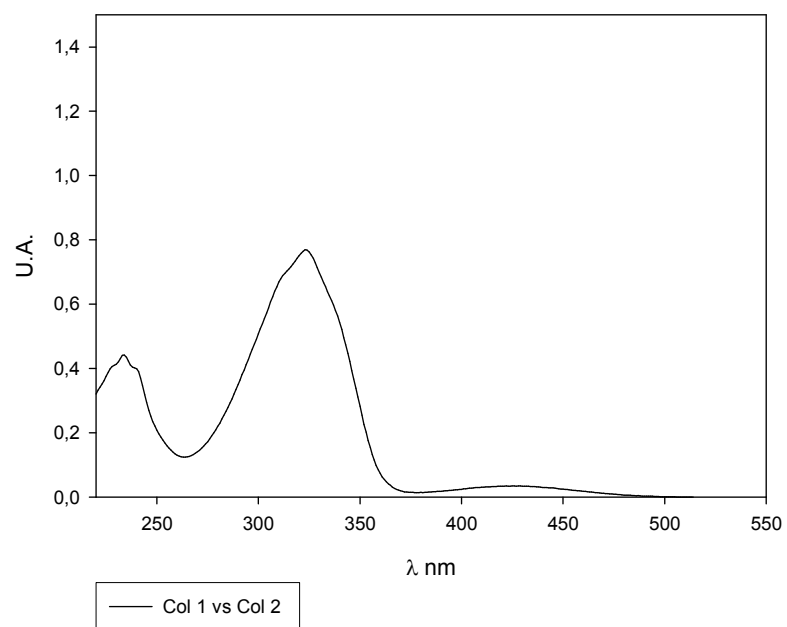


## 2. Espectro UV-visible compuesto (2), concentración 5,19E-06 mol/L

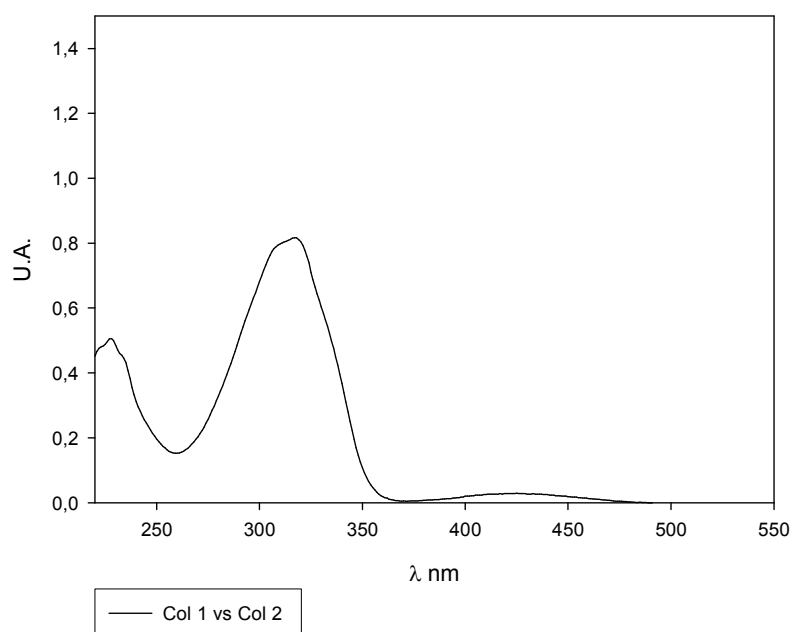




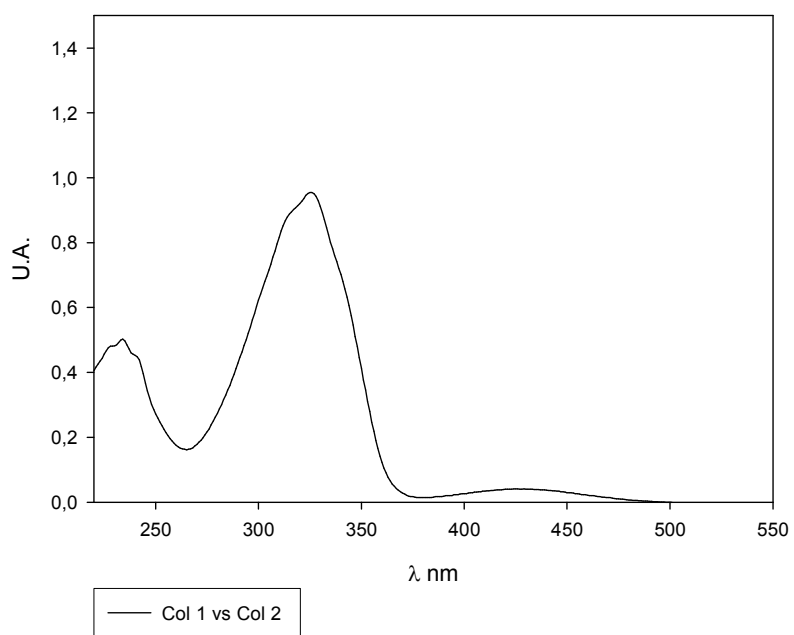
3. Espectro UV-visible compuesto (3), concentración  $5,15E-06$  mol/L



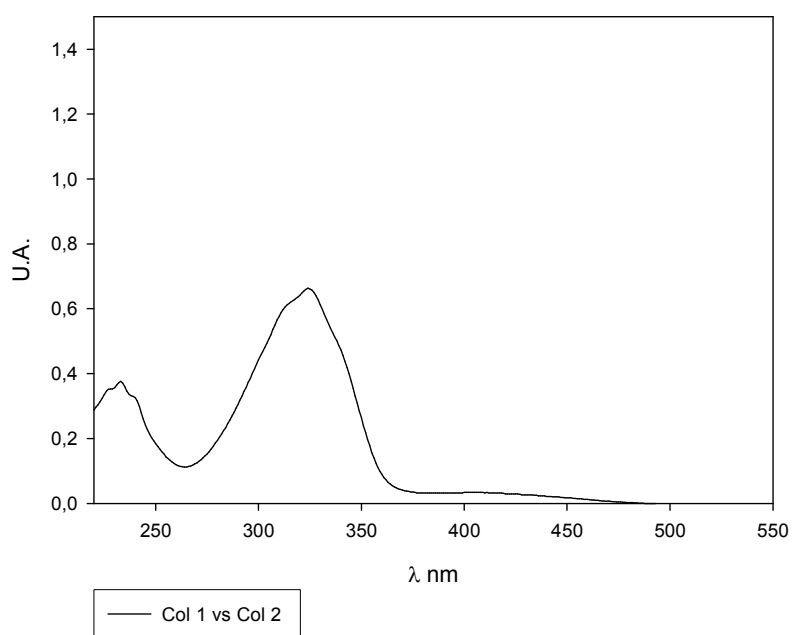
4. Espectro UV-visible compuesto (4), concentración  $4,87E-06$  mol/L



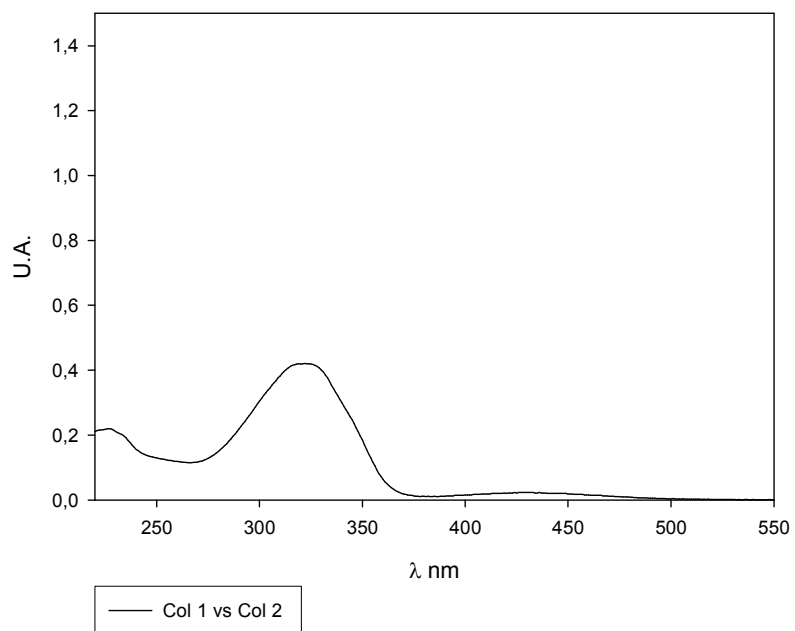
5. Espectro UV-visible compuesto (5), concentración  $6,12E-06$  mol/L



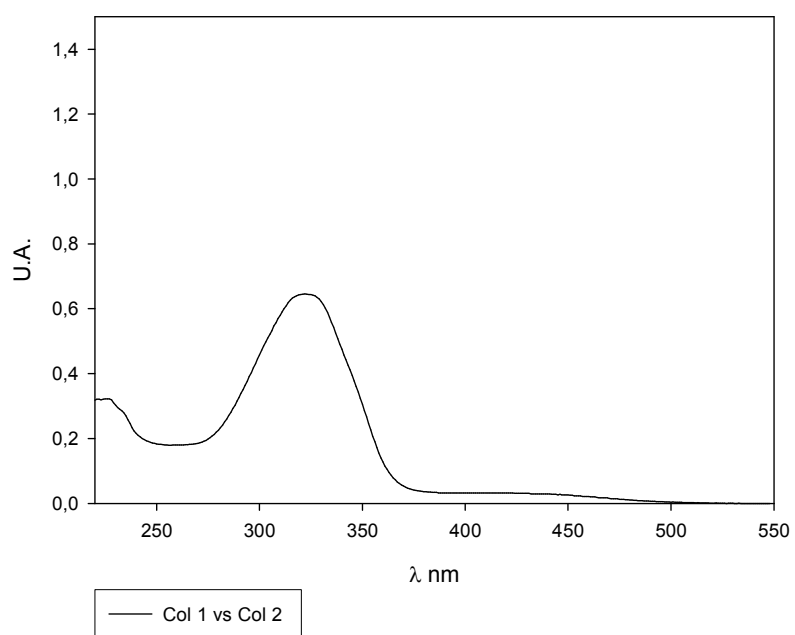
6. Espectro UV-visible compuesto (6), concentración  $4,92E-06$  mol/L



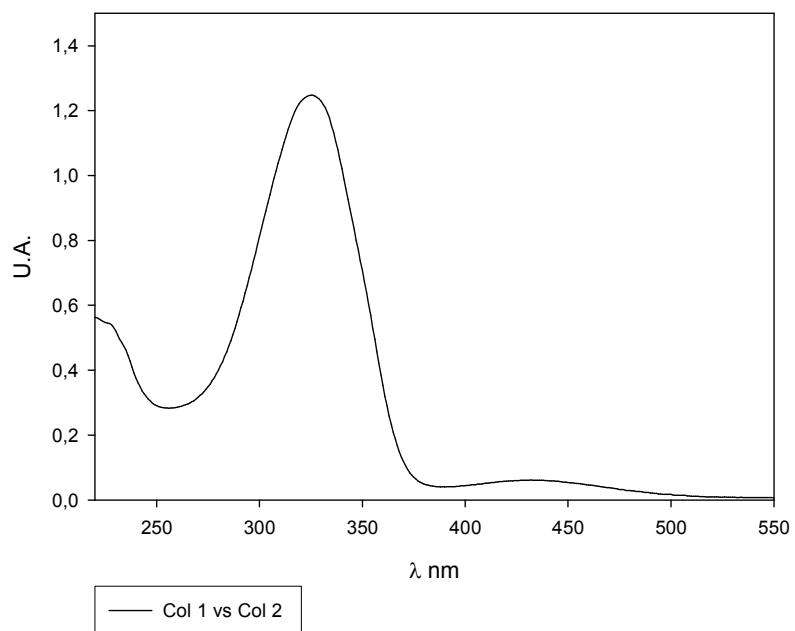
7. Espectro UV-visible compuesto (7), concentración  $5,17E-06$  mol/L



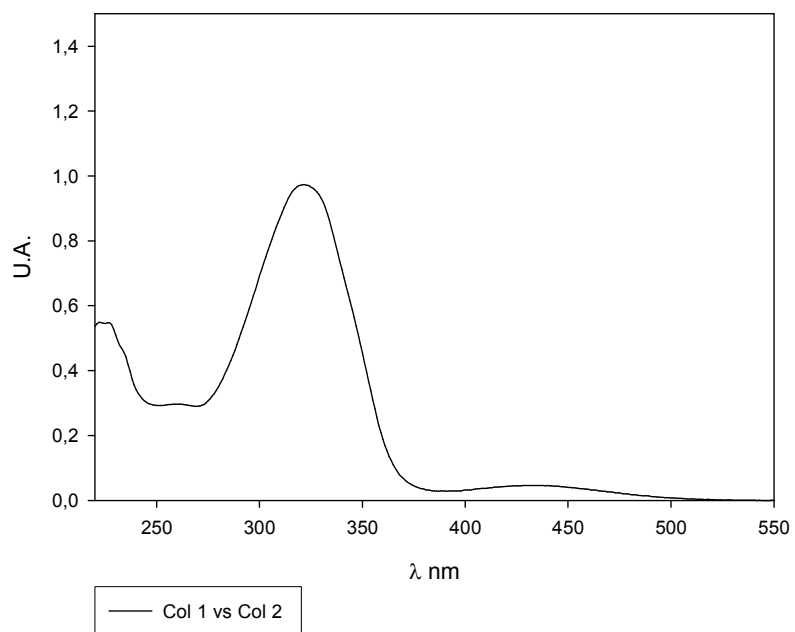
8. Espectro UV-visible compuesto (8), concentración  $5,19E-06$  mol/L

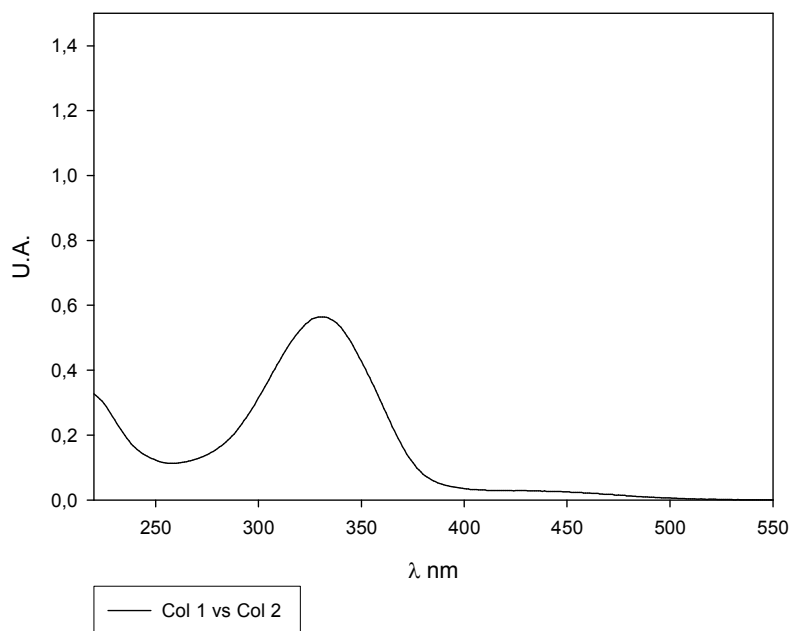
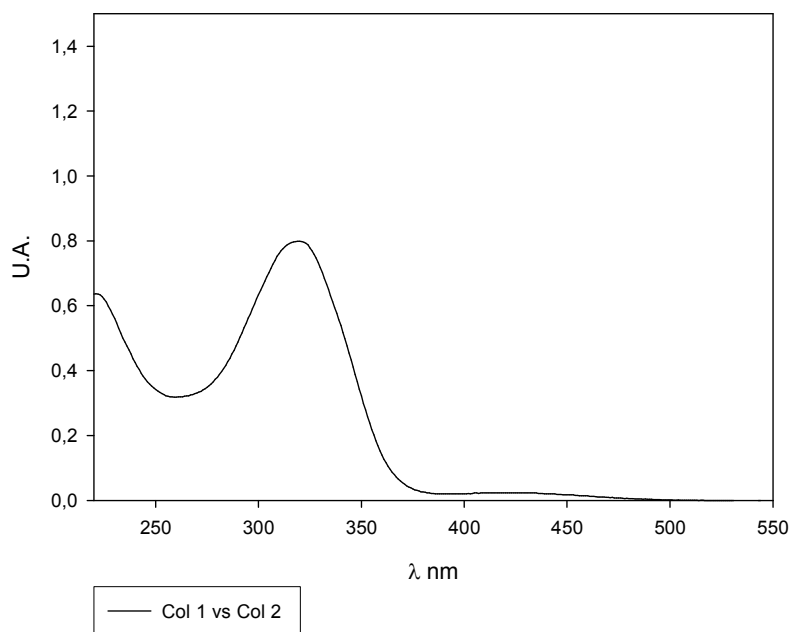


9. Espectro UV-visible compuesto (**9**), concentración  $5,02E-06$  mol/L

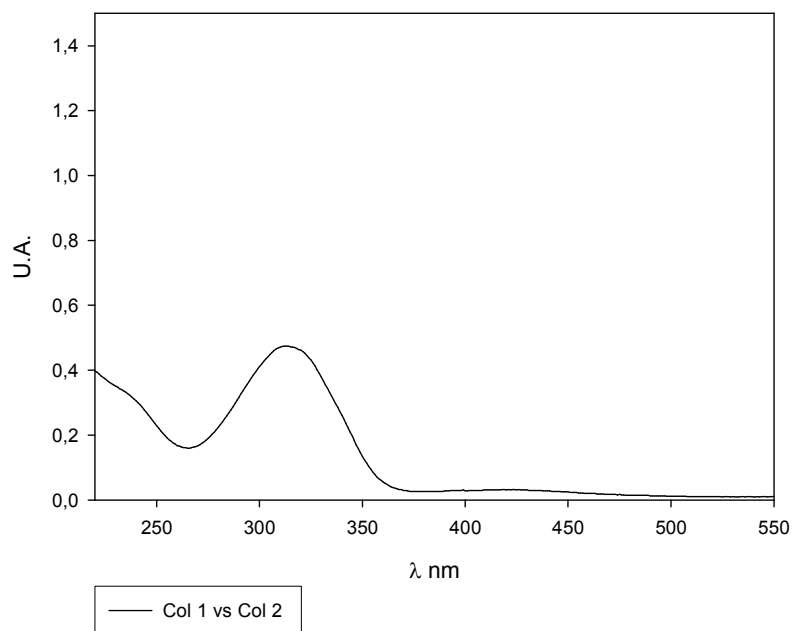


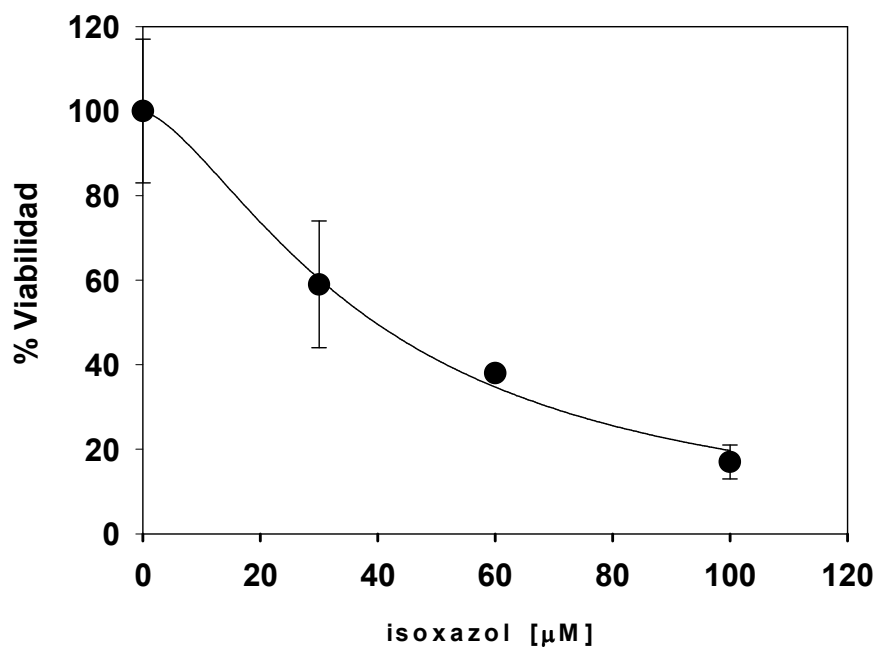
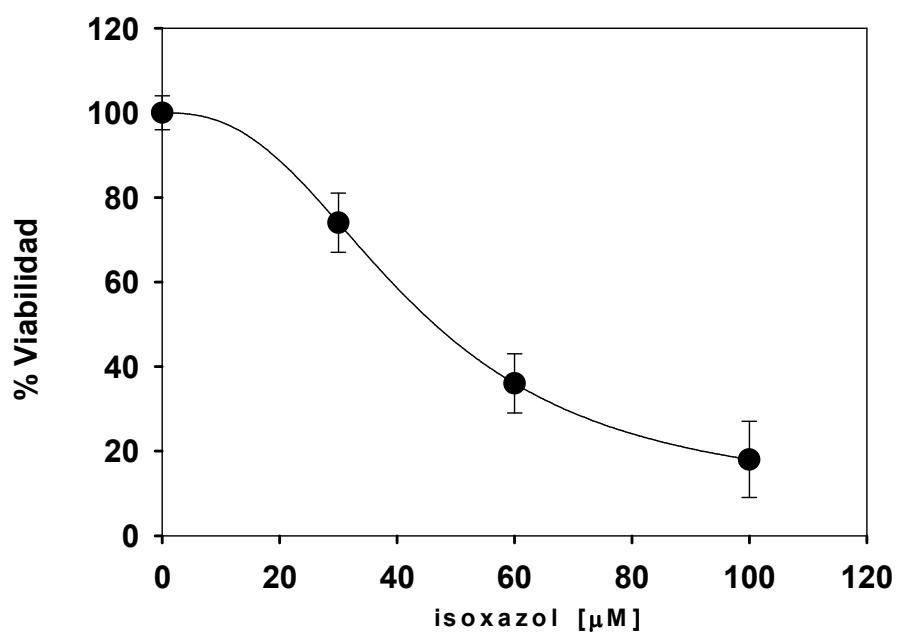
10. Espectro UV-visible compuesto (**10**), concentración  $5,04E-06$  mol/L



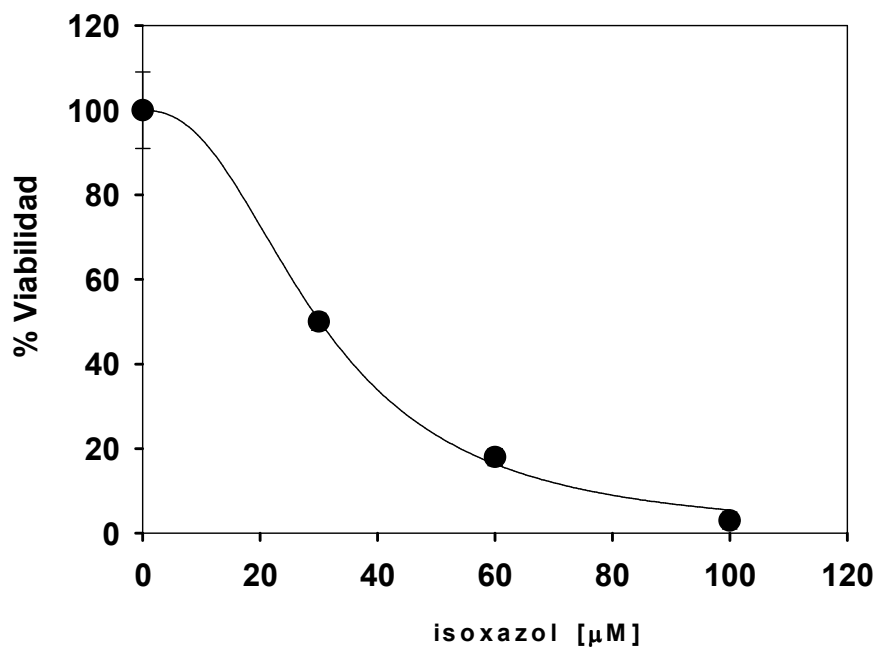
11. Espectro UV-visible compuesto (11), concentración  $5,04E-06$  mol/L12. Espectro UV-visible compuesto (12), concentración  $5,92E-06$  mol/L

## 13. Espectro UV-visible compuesto (13), concentración 5,17E-06 mol/L

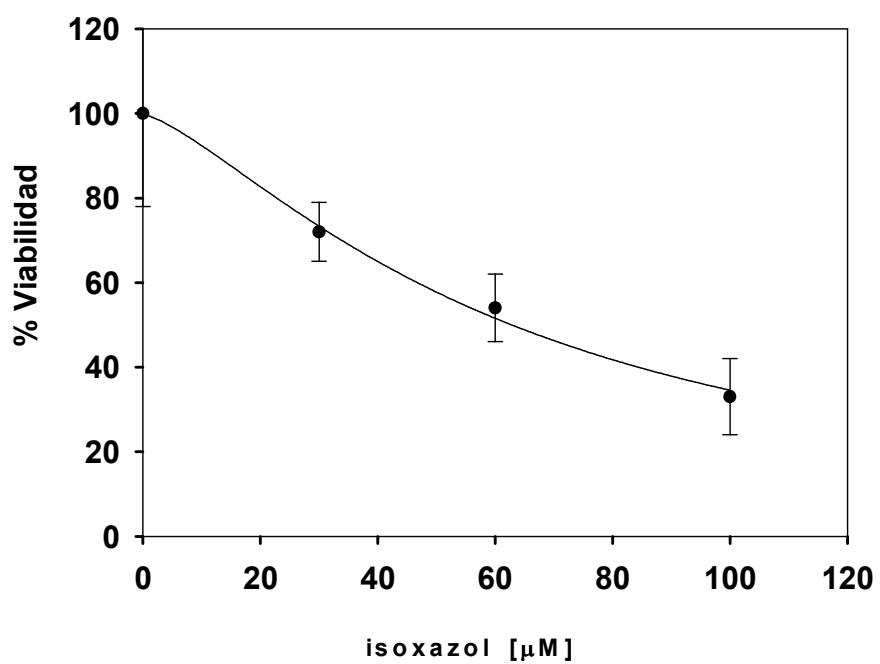


**ANEXO VI: Gráficos citotoxicidad celular de los compuestos (1-14) en línea celular HL-60.****1. Gráfico viabilidad celular compuesto (1)****2. Gráfico viabilidad celular compuesto (2)**

## 3. Gráfico viabilidad celular compuesto (3)

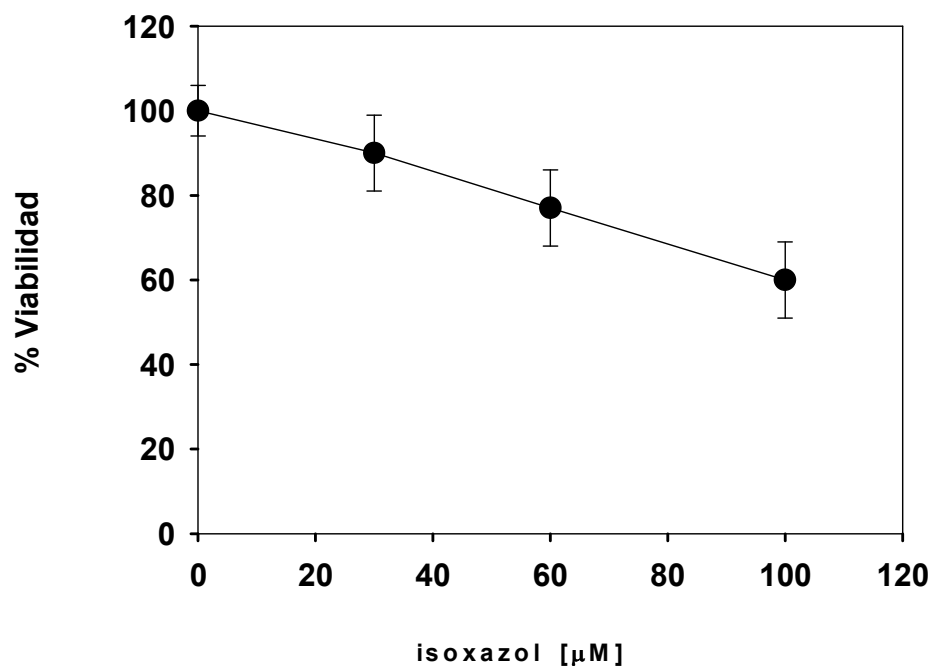


## 4. Gráfico viabilidad celular compuesto (4)

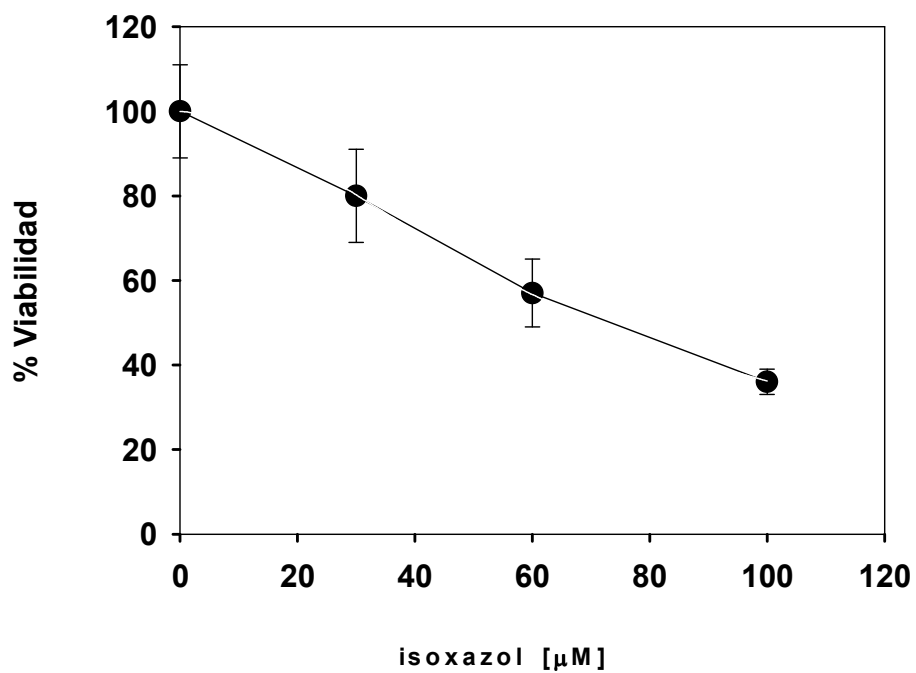




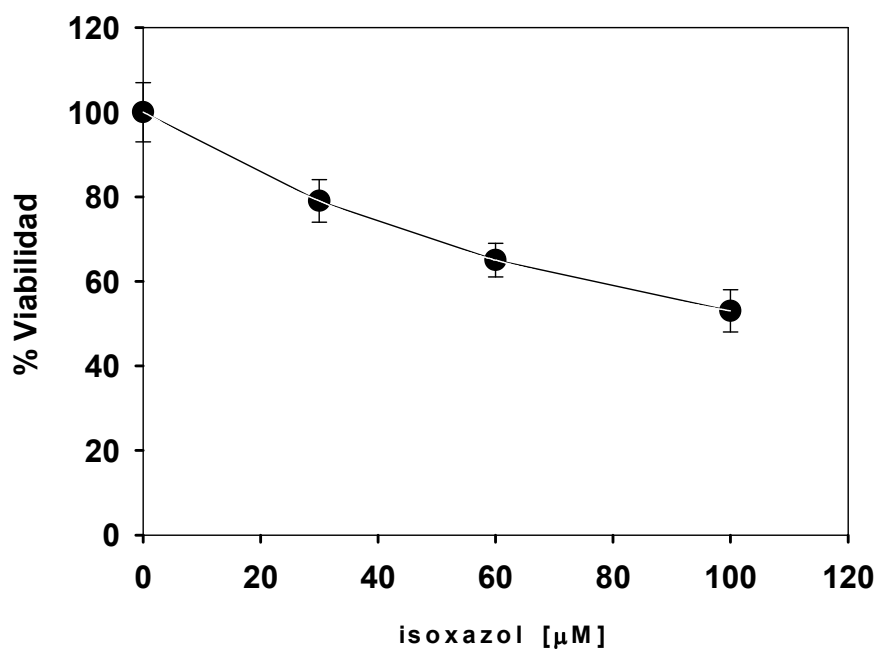
## 5. Gráfico viabilidad celular compuesto (5)



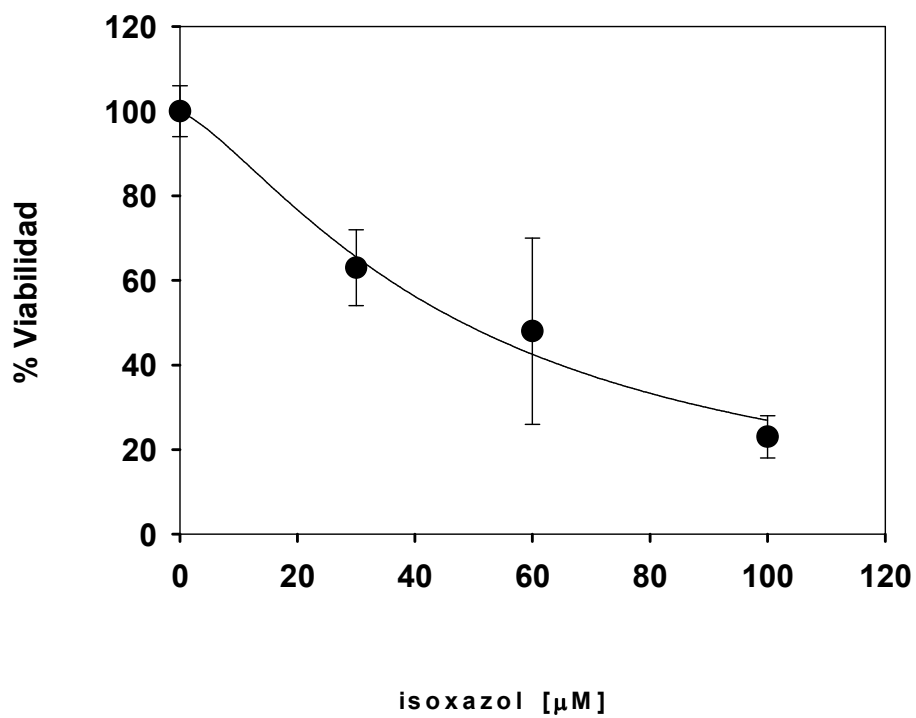
## 6. Gráfico viabilidad celular compuesto (6)



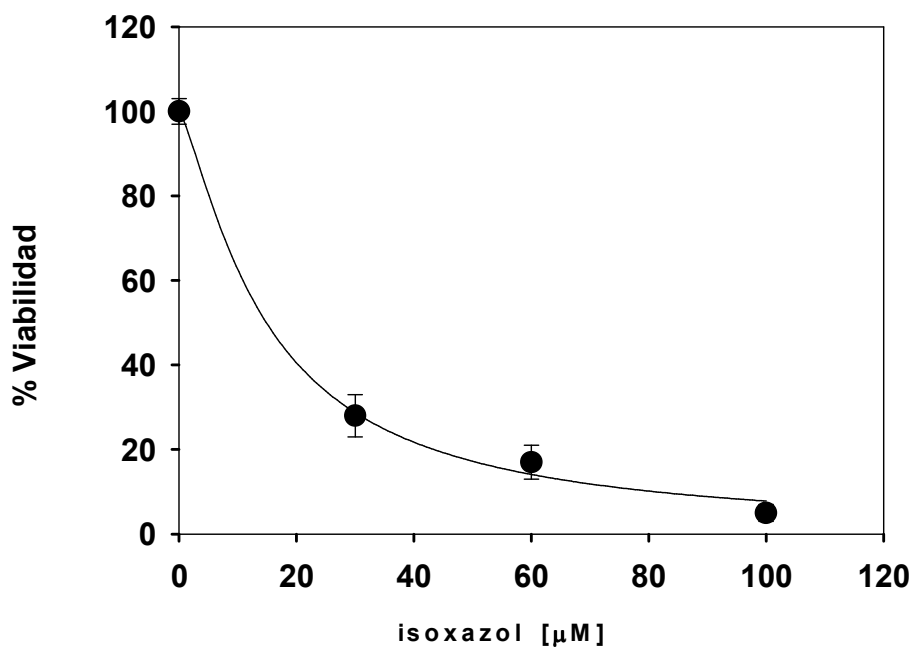
7. Gráfico viabilidad celular compuesto (7)



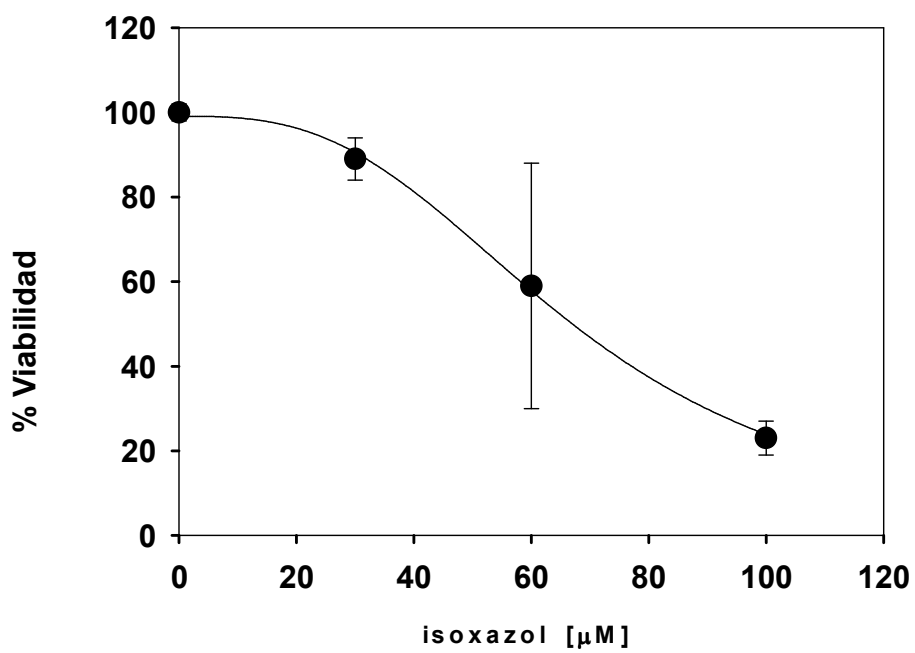
8. Gráfico viabilidad celular compuesto (8)



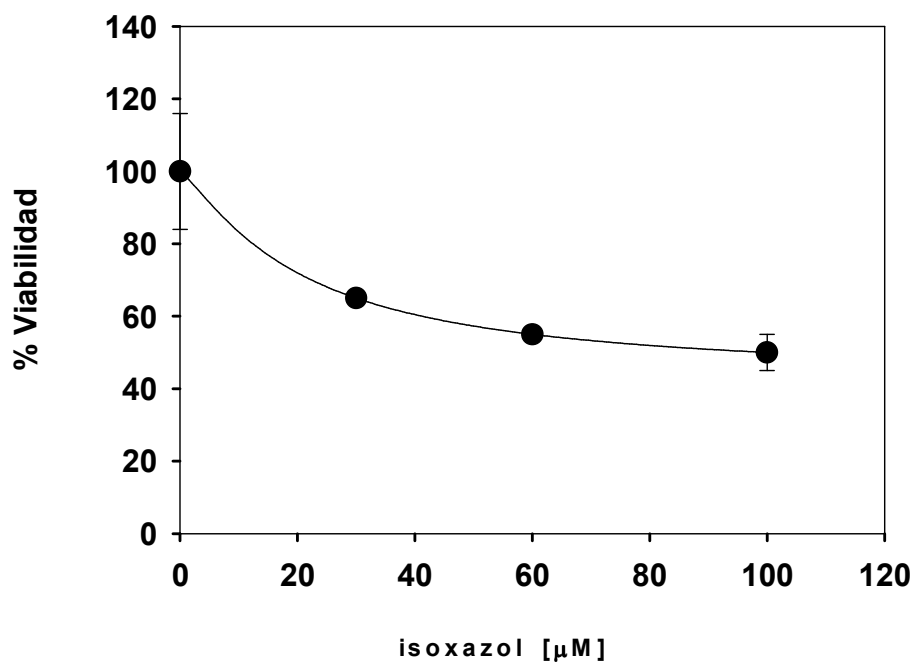
9. Gráfico viabilidad celular compuesto (9)



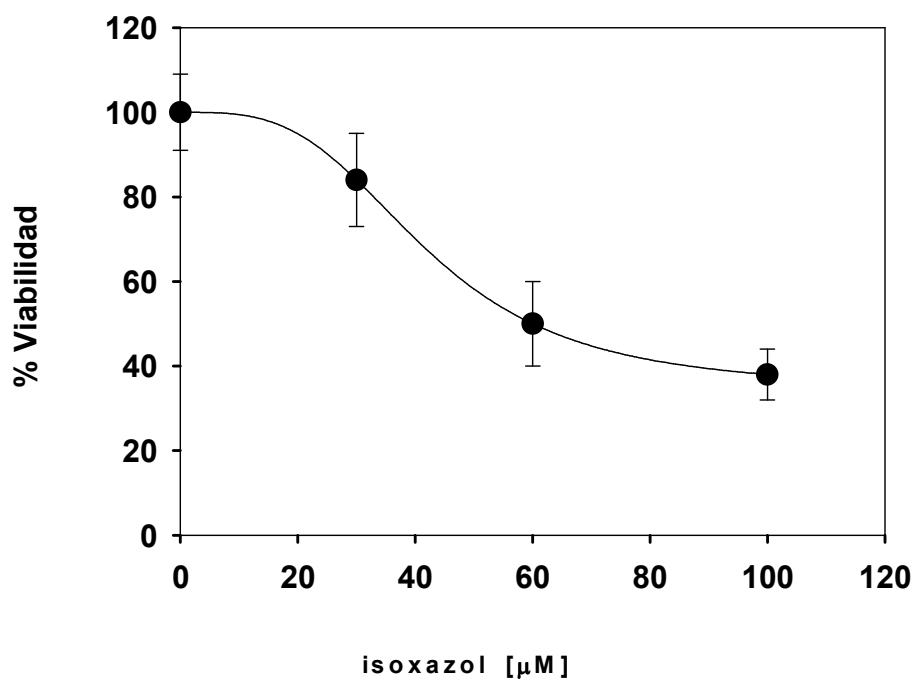
10. Gráfico viabilidad celular compuesto (10)



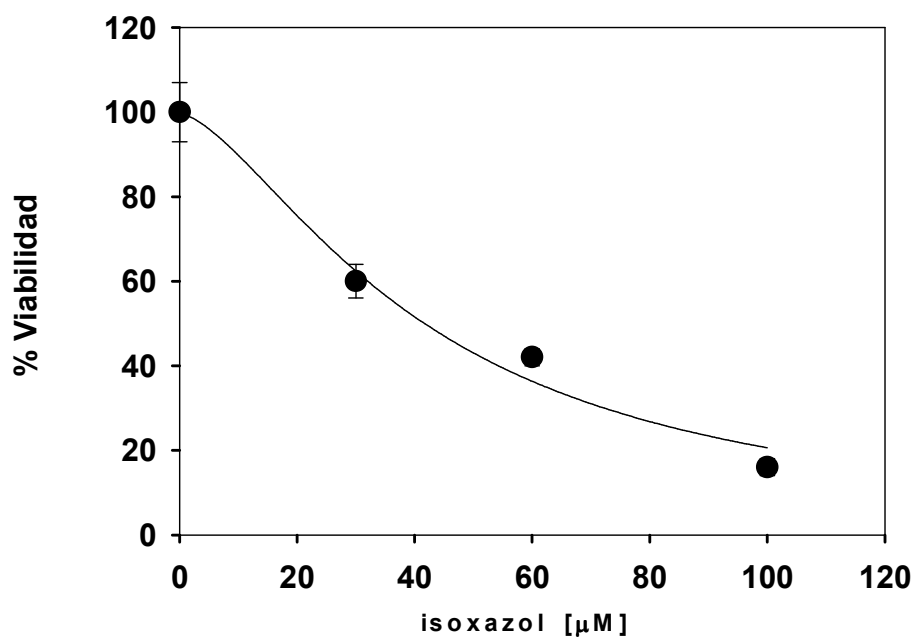
11. Gráfico viabilidad celular compuesto (11)



12. Gráfico viabilidad celular compuesto (12)



13. Gráfico viabilidad celular compuesto (13)



14. Gráfico viabilidad celular compuesto (14)

