



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

---

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DE  
2-HIDRAZONILFURANO C-5 SUSTITUIDOS COMO  
COMPONENTE ESTRUCTURAL RESPONSABLE DE  
LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE NITROFURANOS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Doctor en Farmacología por:

**CARLOS ANDRÉS GALLARDO GARRIDO**

Director de Tesis: Dr. Hernán Armando Pessoa Mahana

Co-Director de Tesis: Dr. Mario Antonio Faúndez Cáceres

---

Santiago, Chile

Julio, 2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y**  
**FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado de

**CARLOS ANDRÉS GALLARDO GARRIDO**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día:

---

Director de Tesis:  
Dr. Hernán Pessoa Mahana

\_\_\_\_\_

Co-Director de Tesis:  
Dr. Mario Faúndez Cáceres

\_\_\_\_\_

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya Arango (presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Claudio Olea Azar

\_\_\_\_\_

Dr. Gonzalo Cabrera Vallejos

\_\_\_\_\_

Dr. Rodrigo López Muñoz

\_\_\_\_\_

Durante esta tesis se contó con el financiamiento de las siguientes becas y proyectos, otorgadas por:

- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas:

Beca de Facultad, 2016

Beca de Rebaja de Arancel, 2016 a 2020

- CONICYT:

Beca de Doctorado Nacional N° 21170382

FONDECYT N° 1170269

FONDEQUIP EQM 160042

*A mis padres, quienes me han dado todo...*  
*A Giovanna Martínez, quien me ha dado su amor, compañía y apoyo...*

# Agradecimientos

Al Dr. Hernán Pessoa, agradecer su disposición por haber aceptado dirigir esta tesis. Gracias por los incontables consejos tanto académicos como no académicos. Gracias por las muchas veces que me recibió en su oficina simplemente para conversar de la vida, y por los muchos almuerzos que compartimos. Sin duda la formación doctoral es más profunda que el desarrollo de una tesis y la publicación de un artículo científico. Gracias de todo corazón.

Al Dr. Mario Faúndez, agradecer por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme hasta el cansancio. Agradecer la confianza depositada en mi y la ayuda dedicada en toda mi formación doctoral. Gracias por las conversaciones en la oficina, por escuchar mis descargos y aguantar mis torpezas, por los comentarios a los experimentos, por las correcciones, por la enseñanza constante que supone trabajar con usted. Gracias también por todo el café compartido y por todas las conversaciones que este maravilloso brebaje suscitó.

A la Profesora María Eugenia Letelier (Q.E.P.D), que si bien hoy no está entre nosotros, antes de partir nos regaló una gran cantidad de reactivos e insumos, los cuáles "servirán mucho para tu tesis" (*sic*). Y así fue. Gracias por sus enseñanzas y su sabiduría. También agradecer, como se lo dije un par de veces, por ayudarme a tomar algunas decisiones respecto a mi vida profesional, lo que ha puesto de manifiesto mi amor por la ciencia y por sobretodo la farmacología. Gracias MEL.

A los miembros de la comisión, gracias por todos los comentarios, correcciones y observaciones que realizaron desde el examen de calificación hasta el último examen privado, y la presente tesis. Cada observación sirvió para que esta tesis y mi formación pudiera desarrollarse de la mejor forma posible.

A Young Hwa Cho (Analia) gracias por compartir todo este tiempo en el labora-

torio, por aguantar mis quejas, por el café todo el día y por acompañarme escuchando música. Gracias por la ayuda en la realización de los cálculos de los potenciales electrostáticos y por todos los consejos y comentarios durante el desarrollo de la parte química de esta tesis.

A Carlos Alarcón por la ayuda en la interpretación de los resultados y en el análisis realizado. Gracias también por la ayuda en los cálculos de los coeficientes de partición y en la asignación de las señales de espectroscopía de carbonos.

A Valentina Celis por su ayuda en las últimas revisiones de la tesis. Gracias por el esfuerzo, la dedicación y el compromiso.

A la gente del Departamento de Farmacia por acompañarme durante el periodo de desarrollo de la tesis. Por compartir no sólo el trabajo de laboratorio, sino los incontables cafés, las sobremesas eternas, los completos, las papas fritas y por sobretodo la amistad. Gracias a Alejandra Guerrero, Katherine Bastias, Valentina Elgueta, Valentina Vergara, Joaquín Cifuentes, Bernardo Olivares, Dra. Ana María Zárate, Dr. Manuel Faúndez, Emily Martínez, y a Diego Alarcón (lo más grande que ha tenido el Departamento de Farmacia), sin duda todos ustedes hicieron esto más llevadero.

Al Dr. Javier Romero por su incontable ayuda e innumerables consejos durante los primeros años del desarrollo de esta tesis. Agradezco de todo corazón tu ayuda y tu disposición.

A la Dra. Andrea del Campo por su ayuda en la etapa final del desarrollo de esta tesis, por los comentarios en los seminarios y en la preparación de las presentaciones.

A la Dra. Mónica Antilén de la Universidad Católica por la ayuda en los experimentos electroquímicos, al facilitarme las instalaciones y el uso de los equipos y reactivos asociados a los ensayos.

Al Dr. Pedro Aguirre de la Universidad de Chile por la ayuda en los experimentos de reducción por hidrogenación catalítica.

Al Dr. David Vásquez de la Universidad de Chile por la ayuda en los experimentos microbiológicos, por abrirme las puertas de su laboratorio y facilitarme los materiales para esto. Gracias también por los consejos y la disposición a ayudar en lo que fuera necesario.

Al Dr. David Pessoa de la Universidad Católica de Chile por facilitarme las instalaciones y materiales para el desarrollo de la parte sintética de esta tesis.

Al Dr. Ramiro Araya de la Universidad de Talca por la realización de los espectros de masas de alta resolución.

A mis padres y mi hermana, por su constante apoyo. Si bien los últimos años han sido difíciles, nunca han dejado de brindarme su apoyo en todas las aventuras que he emprendido; y esta es una de ellas. Gracias por todo lo que hicieron, han hecho y siguen haciendo por mi.

A Giovanna Martínez. Creo que no hay palabras suficientes para agradecer tu apoyo durante todo este tiempo. Sin duda alguna has sido un apoyo fundamental, no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino que en mi vida.

## PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS

---

### **Nitrofuran Drugs Beyond Redox Cycling: Evidence of Nitroreduction-Independent Cytotoxicity Mechanism**

**Gallardo-Garrido C**, Cho Y, Cortés-Rios J, Vasquez D, Pessoa-Mahana CD, Araya-Maturana R, Pessoa-Mahana H, Faúndez M. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020; 115104. Doi: 10.1016/j.taap.2020.115104

## PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES

---

### **XLI Congreso de la Sociedad Chilena de Farmacología. Concepción, Chile (2019)**

Cytotoxicity of Nitrofurans and C-5 Substituted Furans. Evidence of Nitroreduction-Independent Cytotoxic Effects

**Gallardo CA**, Pessoa-Mahana H, Faúndez M.



# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL . . . . .	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS . . . . .	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1. MATERIALES . . . . .	15
4.2. METODOLOGÍA: QUÍMICA . . . . .	17
4.2.1. Procedimiento General de Síntesis . . . . .	17
4.2.2. Caracterización de los Derivados Sintetizados . . . . .	18
4.2.3. Cálculo de Mapas de Potencial Electrostáticos . . . . .	19
4.2.4. Cálculo de los Valores de LogP . . . . .	19
4.3. METODOLOGÍA: FARMACOLOGÍA . . . . .	20
4.3.1. Cultivo Celular . . . . .	20
4.3.2. Ensayos de Viabilidad Celular . . . . .	21
4.3.3. Ensayos de Generación de ERO Intracelular . . . . .	23
4.3.4. Ensayos de Generación de Anión Superóxido Inducido por Re- ciclaje Redox de Nitrofuranos . . . . .	25
4.3.5. Ensayos de Actividad Glutación <i>S</i> -Transferasa Citosólica de Hígado de Rata . . . . .	26
4.3.6. Efecto de los 2-Hidrazonilfurano Derivados Sobre la Actividad Glutación <i>S</i> -transferasa . . . . .	27

4.3.7.	Determinación de Proteínas Totales . . . . .	28
4.3.8.	Determinación de la CIM bacteriana . . . . .	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
5.1.	ENSAYOS DE NITROREDUCCIÓN DE NITROFURANTOÍNA Y FURAZOLIDONA . . . . .	31
5.1.1.	Ensayos de Reducción por Hidruros Metálicos y Metales en Medio Ácido . . . . .	31
5.1.2.	Ensayos de Reducción por Hidrogenación Catalítica . . . . .	35
5.1.3.	Ensayos de Reducción Electroquímica . . . . .	36
5.2.	SÍNTESIS DE 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS C-5 SUSTI- TUIDOS . . . . .	38
5.2.1.	Síntesis de Familia <b>1</b> . Obtención de Derivados de Semicarba- zida: <b>1a-1d</b> y <b>NFZ</b> . . . . .	39
5.2.2.	Síntesis de Familia <b>2</b> . Obtención de Derivados de Fenilhidrazi- na: <b>2a-2c</b> . . . . .	40
5.2.3.	Síntesis de Familia <b>3</b> . Obtención de Derivados de Aminohidant- toína: <b>3a-3d</b> y <b>NHT</b> . . . . .	42
5.2.4.	Síntesis de Familia <b>4</b> . Obtención de Derivados de Hidrazida Benzoica: <b>4a-4e</b> . . . . .	43
5.2.5.	Síntesis de Familia <b>5</b> . Obtención de Derivados de Hidrazida <i>p</i> -hidroxibenzoica: <b>5a-5d</b> y <b>NFX</b> . . . . .	44
5.3.	MAPAS DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE DERIVADOS SINTETIZADOS . . . . .	46
5.4.	VALORES DE <i>CONSENSUS</i> LogP DE LOS DERIVADOS SINTE- TIZADOS . . . . .	55

5.5. EFECTO DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR . . . . .	57
5.6. EFECTO DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS EN LA GENERACIÓN DE ERO INTRACELULAR EN LAS LÍNEAS HL-60 Y HEP G2 . . . . .	67
5.7. EFECTO DE DERIVADOS DE 2-HIDRAZONILFURANO EN LA GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO INDUCIDO POR RECICLAJE REDOX . . . . .	72
5.8. EFECTO DE LOS DERIVADOS SINTETIZADOS SOBRE LA ACTIVIDAD GST CITOSÓLICA HEPÁTICA . . . . .	78
5.9. EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS DERIVADOS SINTETIZADOS . . . . .	84
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>88</b>
<b>Apéndice A. EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS REPRESENTATIVOS</b>	<b>99</b>
A.1. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular A549 . . . . .	99
A.2. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular Hep G2 . . . . .	101
A.3. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular HL-60 . . . . .	103
A.4. Experimentos Representativos de Generación de ERO intracelular . .	104
A.5. Generación de Anión Superóxido Inducido por Reciclaje Redox . . . .	108
A.6. Determinación de la CIM Bacteriana . . . . .	109

Apéndice B. MARCHAS DE REACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS SINTETIZA-  
DOS

110

# Índice de Figuras

1.	Nitrofuranos de uso actual . . . . .	2
2.	Nitroreductasas de tipo I y II . . . . .	4
3.	Reciclaje redox de nitrofuranos . . . . .	7
4.	Esqueleto farmacofórico de nitrofuranos . . . . .	11
5.	Esquema general de síntesis de 2-hidrazonilfurano derivados . . . . .	18
6.	Sistema microsómico para generación de NADPH . . . . .	26
7.	Ensayo de actividad GST . . . . .	27
8.	Ensayos de reducción con hidruros metálicos . . . . .	32
9.	Ensayos de reducción con metales en medio ácido . . . . .	33
10.	Apertura del anillo furano por tautomerismo del intermediario . . . . .	34
11.	Ensayos de reducción mediante hidrogenación catalítica . . . . .	35
12.	Voltametría cíclica de nitrofurantoína y furazolidona . . . . .	37
13.	Ensayos de reducción electroquímica . . . . .	38
14.	Mapas de potencial electrostático de derivados de familia <b>1</b> . . . . .	47
15.	Mapas de potencial electrostático de derivados de familia <b>2</b> . . . . .	48
16.	Mapas de potencial electrostático de derivados de familia <b>3</b> . . . . .	49
17.	Mapas de potencial electrostático de derivados de familia <b>4</b> . . . . .	50
18.	Mapas de potencial electrostático de derivados de familia <b>5</b> . . . . .	51
19.	Generación de ERO intracelular en HL-60 . . . . .	68
20.	Generación de ERO intracelular en Hep G2 . . . . .	69
21.	Generación de anión superóxido inducido por reciclaje redox . . . . .	74
22.	Mecanismo propuesto para la reducción del grupo 5-nitro . . . . .	77
23.	Mecanismo de inhibición de nitrofurantoína sobre la actividad GST citosólica . . . . .	82

# Índice de Tablas

1.	Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) del carbono imínico de la hidrazona . . . . .	54
2.	Valores de <i>consensus</i> LogP calculados para derivados sintetizados . . .	56
3.	Efecto de derivados de la familia <b>1</b> sobre la viabilidad celular . . . . .	62
4.	Efecto de derivados de la familia <b>2</b> sobre la viabilidad celular . . . . .	63
5.	Efecto de derivados de la familia <b>3</b> sobre la viabilidad celular . . . . .	64
6.	Efecto de derivados de la familia <b>4</b> sobre la viabilidad celular . . . . .	65
7.	Efecto de derivados de la familia <b>5</b> sobre la viabilidad celular . . . . .	66
8.	Efecto de derivados de 2-hidrazonilfurano sobre la actividad GST de citosol de hígado de rata . . . . .	80
9.	Determinación de la CIM bacteriana de los derivados sintetizados . . .	85

# Abreviaciones

**NFX** nifuroxazida

**NFZ** nitrofurazona

**NHT** nitrofurantoína

**ADN** ácido desoxirribonucleíco

**ALDH** aldehído deshidrogenasa

**CDNB** 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

**CI<sub>50</sub>** concentración inhibitoria 50

**CIM** concentración inhibitoria mínima

**DCFDA** diclorodihidrofluoresceína diacetato

**DMEM** *Dulbecco's Minimal Essential Medium*

**DMSO** dimetilsulfóxido

**EMAR** espectrometría de masas de alta resolución

**ERO** especies reactivas del oxígeno

**FBS** suero fetal bovino

**FT-IR** espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

**GR** glutatión reductasa

**GSH** glutatión reducido

**GST** glutatión *S*-transferasa

**HBSS** solución salina balanceada de Hank

**HEPES** ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico)

**LogP** coeficiente de partición octanol-agua

**MEM** *Minimal Essential Medium*

**MTT** bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio

**NAD(P)H** nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido

**PBS** tampón fosfato salino

**PGR** rojo de pirogalol

**p.f.** punto de fusión

**RMN** resonancia magnética nuclear

**RN** rojo neutro

**RPMI** *Roswell Park Memorial Institute*

**SDS** dodecilsulfato de sodio

**STAT3** transductor de señal y activador de la transcripción 3

**TBAP** perclorato de tetrabutilamonio

**THF** tetrahidrofurano

**TLC** cromatografía en capa fina

**TMS** tetrametilsilano



**UFC** Unidad Formadora de Colonias

## Resumen

Los nitrofuranos (cuyo farmacóforo es el esqueleto 5-nitro-2-hidrazonilfurano) son un grupo de fármacos antimicrobianos ampliamente utilizados pero asociados a una variedad de efectos adversos. Los mecanismos moleculares asociados a los efectos citotóxicos de los nitrofuranos no están del todo establecidos. La reducción mono-electrónica del grupo 5-nitro catalizada por enzimas del hospedero y la subsecuente generación de EROs mediada por reciclaje redox han sido asociados como mecanismos responsables de la toxicidad celular. No obstante, la evidencia actual sugiere que la generación de EROs por sí sola no es suficiente para explicar la totalidad de los efectos adversos asociados al consumo de nitrofuranos, proponiendo así mecanismos de toxicidad independientes de la nitroreducción. En el presente trabajo, se sintetizó una serie de derivados nitrados y no nitrados de nitrofuranos los cuales se sometieron a evaluación *in vitro* en cuanto a su citotoxicidad, capacidad generadora de EROs, efecto sobre la actividad glutatión *S*-transferasa y actividad antibacteriana. Nuestros resultados mostraron que sobre un modelo celular humano, los derivados no nitrados son menos tóxicos que los fármacos parentales, pero inesperadamente preservan la capacidad de generar ERO intracelular en cantidades similares a los nitrofuranos, a pesar de no poder entrar en reciclaje redox. Además, algunos derivados no nitrados a pesar de no generar ERO mostraron las más altas toxicidades entre todos los derivados. También se observó inhibición de la actividad glutatión *S*-transferásica por parte de algunos derivados. Finalmente, sólo los derivados nitrados mostraron efecto antibacteriano. Estos resultados sugieren que la porción 2-hidrazonilfurano, el reciclaje redox de los 5-nitrofuranos, y los efectos inhibitorios sobre enzimas antioxidantes serían finalmente los responsables de los efectos tóxicos sobre células de mamíferos asociados a los nitrofuranos estudiados.

# Abstract

Nitrofurans (5-nitro-2-hydrazoneylfuran as pharmacophore) are a group of widely used antimicrobial drugs but also associated to a variety of side effects. The molecular mechanisms that underlie the cytotoxic effects of nitrofuran drugs are not yet clearly understood. One-electron reduction of 5-nitro group by host enzymes and ROS production via redox cycling have been attributed as mechanisms of cell toxicity. However, the current evidence suggests that nitrofuran ROS generation by itself is incapable to explain the whole toxic effects associated to nitrofuran consumption, proposing a nitro-reduction independent mechanism of toxicity. In the present work, a series of nitrated and non-nitrated derivatives of nitrofuran drugs were synthesized and evaluated *in vitro* for their cytotoxicity, ROS-producing capacity, effect on GSH-*S*-transferase and antibacterial activity. Our studies showed that in human cells non-nitrated derivatives were less toxic than parental drugs but, unexpectedly preserved the ability to generate intracellular ROS in similar amounts to nitrofurans despite not entering into a redox cycle mechanism. In addition, some non-nitrated derivatives although being incapable to generate ROS exhibited the highest cell toxicity among all derivatives. Inhibition of cytosolic glutathione-*S*-transferase activity by some derivatives was also observed. Finally, only nitrofuran derivatives displayed antibacterial effect. Results suggest that the combined 2-hydrazoneylfuran moiety, redox cycling of 5-nitrofuran, and inhibitory effects on antioxidant enzymes, would be finally responsible for the toxic effects of the studied nitrofurans on mammalian cells.

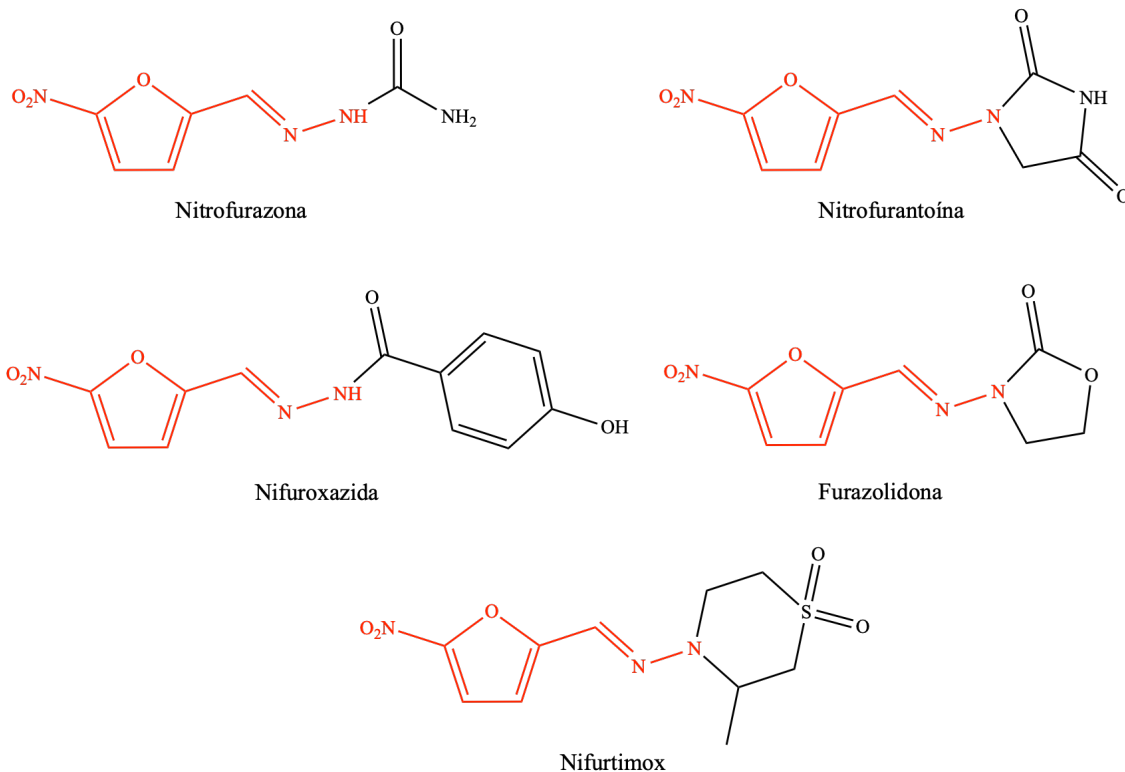
# 1. INTRODUCCIÓN

Los nitrofuranos son una familia de fármacos antibacterianos y antiparasitarios que poseen en su estructura un anillo furano sustituido con un grupo nitro en el carbono 5 y una hidrazona en el carbono 2 de este heterociclo [1]. Estos fármacos fueron sintetizados como una nueva familia de antisépticos<sup>1</sup> a principios de los años 40 [2], donde se determinó que el grupo 5-nitro sería el responsable de su actividad antibacteriana [3].

Producto de la alta eficacia antibacteriana de estos derivados de furanos sobre diversas cepas de microorganismos, surgió el interés de diferentes laboratorios por el desarrollo de nuevos derivados de nitrofuranos. Esto llevó a la síntesis de una gran cantidad de nuevos derivados, los cuales, si bien exhibían una alta potencia antibacteriana, generaban diversos efectos adversos en los pacientes que los consumían [4–6]. Por este motivo, del universo de nitrofuranos sintetizados, a la fecha sólo perduran para uso humano una pequeña porción de estos, dentro de los cuales se encuentran: nitrofurazona, nitrofurantoína, nifuroxazida, furazolidona y nifurtimox (figura 1) [1, 7].

---

<sup>1</sup>Así definidos en la patente original de 1943



**Figura 1.** Nitrofuranos de uso actual

Los cinco nitrofuranos que se muestran en la figura comparten el esqueleto farmacofórico de 5-nitro-2-hidrazonilfurano (en rojo).

Estos fármacos tienen un mecanismo de acción atípico, asociado a la reducción enzimática del grupo 5-nitro. Tanto bacterias como protozoos poseen enzimas capaces de metabolizar compuestos mono- y polinitrados. Estas enzimas dependientes de NAD(P)H<sup>2</sup> catalizan la reducción de compuestos nitroaromáticos, así como quinonas y derivados de riboflavinas [8]. Las, así llamadas, nitroreductasas, son clasificadas en dos grandes familias de enzimas dependiendo del tipo de reducción que catalizan

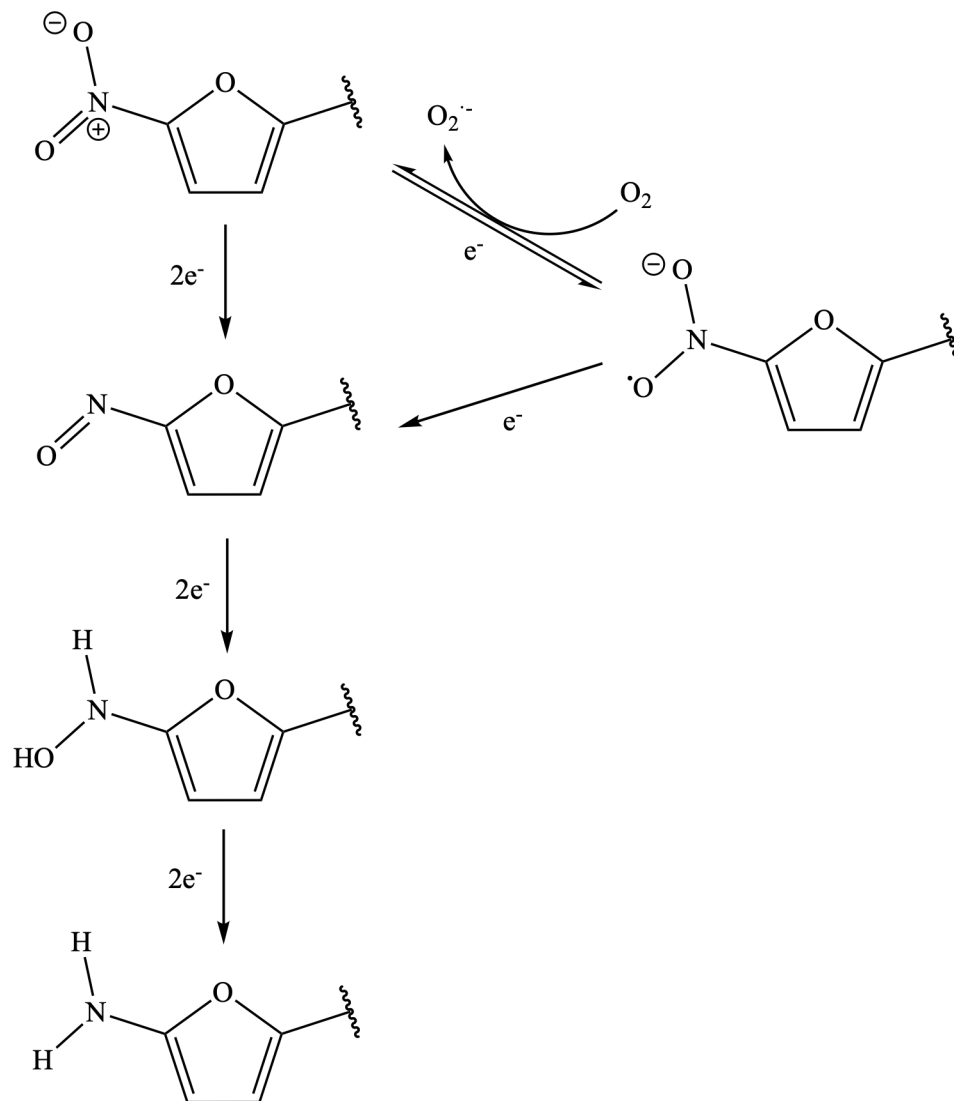
---

<sup>2</sup>Es decir, NADH o NADPH

sobre su sustrato (figura 2). De esta forma, se denominan nitroreductasas de tipo I (u oxígeno-insensible) a aquellas que catalizan reducciones dielectrónicas, y nitroreductasas de tipo II (u oxígeno-sensible) a aquellas que catalizan reducciones de tipo monoelectrónicas [8].

La reducción del grupo nitro conduce a la formación de una amina terminal, luego de la entrega de 6 electrones al grupo nitro ( $-\text{NO}_2 \xrightarrow{6e} -\text{NH}_2$ ). En las nitroreductasas de tipo I, los electrones son entregados al grupo nitro en pares, por lo que se obtienen los respectivos intermediarios reducidos nitroso ( $-\text{N}=\text{O}$ ) e hidroxilamina ( $-\text{NH}-\text{OH}$ ), con 2 y 4 electrones entregados, respectivamente.

En cambio, las nitroreductasas de tipo II entregan electrones al grupo nitro a través de un mecanismo monoelectrónico, de manera que el primer intermediario obtenido es la especie radicalaria denominada radical nitroanión ( $-\text{NO}_2^{\bullet-}$ ). Este radical puede reaccionar con el oxígeno presente en el medio, regenerando al grupo nitro parental y generando de esta forma al radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Es por este motivo que estas nitroreductasas se denominan también como *oxígeno-sensible*, puesto que el oxígeno presente en el medio inhibe la reducción del grupo nitro favoreciendo de esta forma la reducción de tipo dielectrónica [9, 10].



**Figura 2.** Nitroreductas de tipo I (oxígeno-insensible) y de tipo II (oxígeno-sensible)

Las nitroreductas de tipo II catalizan la reducción monoelectrónica, que al verse inhibida en presencia de oxígeno, favorece la reducción dielectrónica.

Adaptado de Roldán et al. [8].

En microorganismos, el metabolismo de nitrofuranos ocurre principalmente a través de enzimas nitroreductas de tipo I [11]. Como se mencionó, este tipo de

reducción genera especies intermediarias, nitroso e hidroxilamina, las cuales poseen centros electrofílicos capaces de interactuar inespecíficamente con macromoléculas presentes en el microorganismo como ribosomas, proteínas, e incluso el ADN (figura 2) [10, 12, 13]. Esta inespecificidad en la unión a biomoléculas en el microorganismo ha permitido que exista una muy baja generación de resistencia a nitrofuranos.

En efecto, está demostrado que la generación de mutantes *Escherichia coli* resistentes a nitrofurantoina está asociado a un coste energético tal, que es muy difícil incluso para los mutantes resistentes poder mantener un perfil infeccioso [14]. Esto permite explicar porqué los nitrofuranos conservan su eficacia antibacteriana y anti-parasitaria aún luego de más de 70 años de uso. Sumado a lo anterior, aún cuando no sea posible evidenciar actividad nitroreductasa en los microorganismos, los nitrofuranos conservan su actividad bacteriostática, lo que sugiere que el mecanismo de acción antibacteriano de estos fármacos no depende únicamente de la reducción enzimática del grupo 5-nitro y la generación de especies intermediarias electrofílicas [15].

Por otra parte, en el hospedero existen variadas enzimas con actividad nitroreductasa capaces de reducir compuestos nitroaromáticos, tales como la xantina deshidrogenasa y la DT-diaforasa<sup>3</sup>, las que pueden llevar a cabo nitroreducciones dielectrónicas [16]. Sin embargo, estas enzimas son capaces de reducir compuestos

---

<sup>3</sup>También llamada NAD(P)H:quinona oxidoreductasa



como 4-nitroquinolina o derivados de 2-nitronaftaleno pero no nitrofuranos, los cuales no son sustratos de estas enzimas [17]. Además, enzimas como la aldehído oxigenasa, citocromo c oxidasa, xantina oxidasa y la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa<sup>4</sup> son capaces de reducir compuestos nitrados de forma monoelectrónica, siendo esta última la principal enzima reductora de nitrofuranos [18, 19].

La citocromo P450 reductasa es una flavoenzima que media la transferencia de electrones entre flavinas reducidas y otras proteínas como la heme oxigenasa, la citocromo *b5* y las monooxigenasas de la familia citocromo P450 involucradas en el metabolismo de xenobióticos, así como diversas moléculas endógenas [20]. Esta enzima, al igual que las nitroreductasas bacterianas de tipo II, al reducir monoelectrónicamente el grupo 5-nitro genera un radical nitroanión que reacciona con oxígeno molecular generando anión superóxido y regenerando al grupo 5-nitro, proceso conocido como *reciclaje redox* (figura 3) [19].

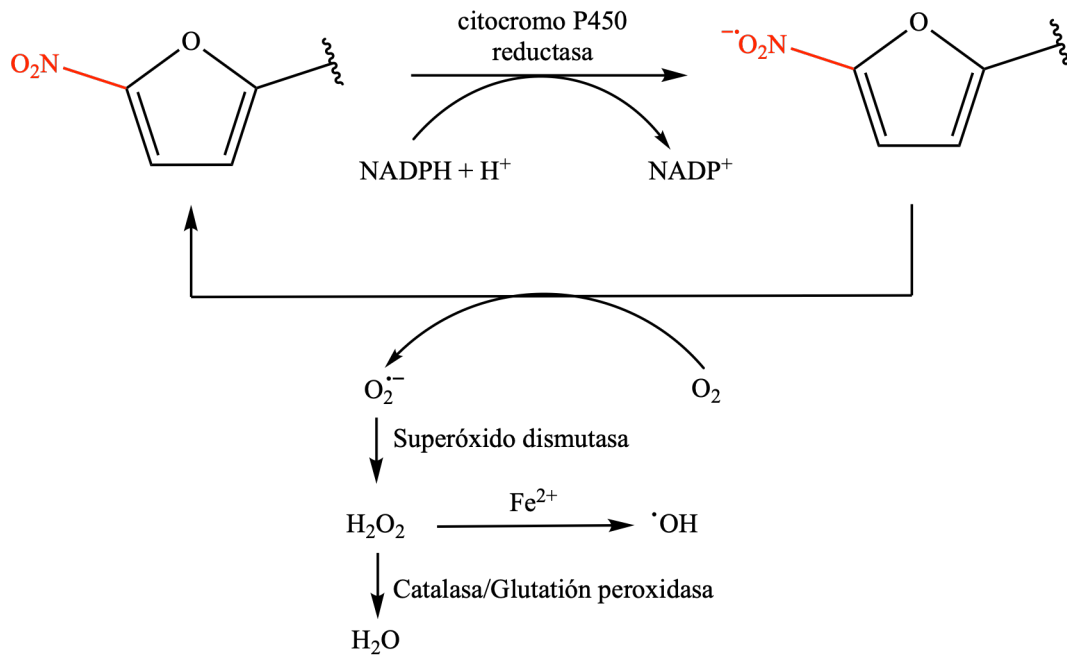
A diferencia de lo que ocurre en los microorganismos, en mamíferos no hay enzimas capaces de reducir de forma dielectrónica al grupo 5-nitro de los nitrofuranos, de manera que éste debe ser metabolizados a través de dos reducciones monoelectrónicas sucesivas para generar el derivado nitroso<sup>5</sup> [21]. Es por este motivo que, en mamíferos, la principal vía metabólica de los nitrofuranos está relacionada al reciclaje redox.

---

<sup>4</sup>De aquí en adelante se nombrará como citocromo P450 reductasa

<sup>5</sup>Esto se discute con más detalle en la sección 5.7, figura 22

Este ciclo, en donde se genera constantemente anión superóxido y se regenera el grupo 5-nitro parental, puede conducir a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), induciendo finalmente la generación de estrés oxidativo celular. Esto último permitiría explicar los diferentes efectos adversos asociados al consumo de estos fármacos, entre los cuales se han descrito: fibrosis pulmonar, daño hepático, trastornos hematológicos (agranulocitosis y anemia hemolítica), polineuropatía sensitiva motora, trastornos gastrointestinales, y otros [4, 22, 23].



**Figura 3.** Reciclaje redox de nitrofuranos  
La enzima citocromo P450 reductasa es la principal responsable del reciclaje redox de nitrofuranos. Este ciclo fútil, produce una generación constante de ERO intracelular que puede conducir a la generación de estrés oxidativo. Adaptado de Wang et al. [19].

En la literatura, esta generación de ERO a través de la reducción monoelectrónica del grupo 5-nitro, y el consecuente estrés oxidativo, ha sido asociada a la generación de daño celular y efectos secundarios relacionados al consumo de estos fármacos. No obstante, la sola generación de estos no es capaz por sí sola de explicar la toxicidad asociada a su consumo. Al respecto, se ha descrito que la generación de ERO en diversas líneas celulares está correlacionada con los niveles de expresión de la citocromo P450 reductasa, pero esta generación de ERO intracelular no se correlaciona con la citotoxicidad de nitrofurantoína expresada en términos de inhibición de la viabilidad en diversas líneas celulares de mamíferos (murinas y humanas) [19].

Algunos antecedentes indican que nitrofuranos, entre ellos nitrofurazona, nitrofurantoína y furazolidona, son capaces de inhibir a la glutatión reductasa (GR), enzima responsable del mantenimiento de los niveles celulares de glutatión reducido (GSH), molécula nucleofílica y agente reductor importante para la protección contra estrés oxidativo, mantención del balance redox celular y metabolización de xenobióticos lipoelectrofilicos [8, 24]. En el estudio realizado por Čénas et al. [24], aquellos derivados de nitrofuranos en los cuales el grupo nitro fue eliminado o sustituido por un grupo metilo, no fueron capaces de inhibir a la GR pero sí produjeron toxicidad celular a través de la disminución de ATP y GSH, a través de un mecanismo, a la fecha, desconocido.

Así también, se ha descrito que metabolitos de nitrofuranos, como nitrofurantoína y furazolidona, son capaces de unirse tanto *in vitro* (en macromoléculas aisladas y modelos celulares), como *in vivo*, a biomoléculas como ADN de peces, porcinos y ratas, así como a tejido microsómico de hígado de rata, lo que estaría explicado por el metabolismo reductivo de estos fármacos [12, 25–27]. A través de reducciones monoelectrónicas sucesivas se genera el intermediario electrofílico nitroso, el cual es rápidamente reducido a la correspondiente hidroxilamina, siendo estos capaces de interactuar con macromoléculas (figura 2) [4, 28, 29]. Sumado a lo anterior, se ha descrito que durante la reducción de la hidroxilamina a la amina terminal ( $-\text{NH}-\text{OH} \longrightarrow -\text{NH}_2$ ), el anillo furano puede abrirse generando un derivado nitrilo terminal<sup>6</sup>, el cual puede reaccionar con el ADN [30–32].

Recientemente, se ha descrito que algunos nitrofuranos, entre ellos nifuroxazida y nifurtimox, son capaces de inhibir a enzimas de la familia aldehído deshidrogenasa (ALDH) [33, 34]. Estas enzimas utilizan  $\text{NAD(P)}^+$  como aceptor de electrones<sup>7</sup>, catalizando la oxidación del acetaldehído altamente reactivo al respectivo acetato [35]. Sumado a lo anterior, también se ha descrito que nifuroxazida es un potente inhibidor del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), evidenciando efectos antitumorales y antimetastásicos por parte de este fármaco [36–39]. A la fecha se ha descrito que estas proteínas (ALDH y STAT3) parecieran estar relacionadas al

---

<sup>6</sup>Esto se discute con más detalle en la sección 5.1.1, figura 10

<sup>7</sup>Corresponde a la forma oxidada de  $\text{NAD(P)H}$

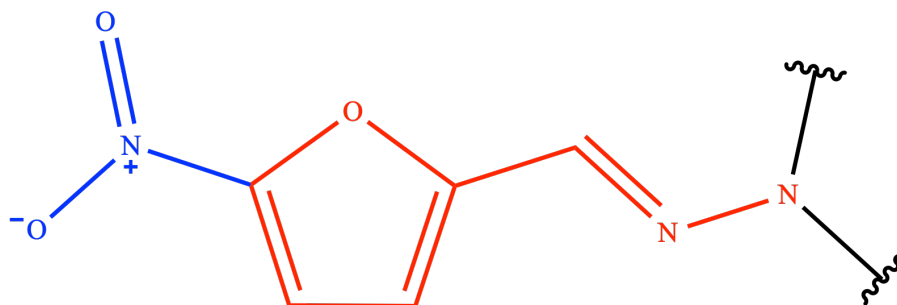
desarrollo de algunos tipos de cáncer, por lo que se ha abierto una ventana al uso de nitrofuranos como potencial tratamiento de estas enfermedades [23, 40].

Por otra parte, existe un reporte sobre el efecto de diversos antibióticos sobre la actividad de una enzima de la familia de las glutatión *S*-transferasa (GST), donde se describe que nitrofurantoína es capaz de inhibir a la isoforma GST1B-1 de la bacteria *Proteus mirabilis* [41]. Este estudio sugiere que esta enzima actuaría como secuestradora de antibióticos, protegiendo de esta forma al microorganismo expuesto a estos. A la fecha, no existen reportes de metabolismo de nitrofuranos por alguna glutatión *S*-transferasa, y de hecho, no existen reportes de conjugados de nitrofuranos con GSH, por lo que estos fármacos no serían sustratos de esta familia de enzimas [42].

Tomados en conjunto, estos antecedentes sugieren que la generación del radical nitroanión producto de la reducción monoelectrónica del grupo 5-nitro, y con ello la formación de ERO intracelular, no es el único responsable de los efectos citotóxicos causados por nitrofuranos.

Estructuralmente, los nitrofuranos comparten el núcleo farmacofórico basal de 5-nitro-2-hidrazonilfurano, donde se constata la presencia de la función hidrazona (correspondiente a la estructura  $-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-$ ) (figura 4) [1]. Esta función hidrazona en la posición 2 del anillo furano actúa como un puente que permite el movimiento

de electrones a lo largo de la molécula, generando en ésta centros ricos en electrones, y centros electrofílicos potencialmente reactivos [43].



**Figura 4.** Esqueleto farmacofórico de nitrofuranos  
Todos los nitrofuranos comparten este esqueleto farmacofórico (ver figura 1), donde en azul se muestra el grupo 5-nitro y en rojo se destaca la porción 2-hidrazonilfurano.

Dados los antecedentes presentados, postulamos que la porción 2-hidrazonilfurano del esqueleto farmacofórico de nitrofuranos es la responsable de los efectos citotóxicos que no están relacionados a la generación de ERO producto del reciclaje redox del grupo 5-nitro. Con tal propósito se sintetizaron una serie de derivados de 2-hidrazonilfurano, en las cuales se introdujeron cambios a las unidades farmacofóricas de los nitrofuranos, sustituyendo al grupo 5-nitro por grupos electrónicamente neutros como  $-H$ , electrodonor como  $-CH_3$  y electroattractores como halógenos  $-Br$  y  $-Cl$ . Esto permitió la obtención de derivados no nitrados de los fármacos nitrofurazona, nitrofurantóina y nifuroxazida; y dos nuevas familias de 2-hidrazonilfuranos C-5 sustituidos que permitieron determinar la influencia del sustituyente a la hidrazona

en la densidad electrónica del puente de 2-hidrazonilfurano.

Los compuestos sintetizados fueron caracterizados a través de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), punto de fusión (p.f.) y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Estos derivados de 2-hidrazonilfuranos se sometieron a evaluación *in vitro* en cuanto a su efecto sobre la viabilidad de cultivos celulares humanos, los cuales fueron escogidos de forma representativa a los efectos adversos asociados al consumo de nitrofuranos, previamente mencionados. Además, fue evaluado el efecto de los compuestos sintetizados sobre la generación de ERO intracelular en las líneas celulares humanas HL-60 y Hep G2. También, se evaluó la capacidad de los derivados de inducir la generación de anión superóxido a través de la reducción monoelectrónica catalizada por la enzima citocromo P450 reductasa presente en microsomas hepáticos de rata. Posteriormente, y dadas las características electrónicas y de lipofilia de los nitrofuranos y de los derivados de 2-hidrazonilfurano sintetizados, se evaluó el efecto inhibitorio de éstos sobre la actividad glutatión *S*-transferásica de citosol hepático de rata. Finalmente, los compuestos fueron evaluados en su actividad farmacológica sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Los antecedentes expuestos llevan a proponer la siguiente hipótesis:

## 2. HIPÓTESIS

La porción estructural de 2-hidrazonilfurano es responsable de la toxicidad celular de nitrofuranos que es independiente de la generación de especies reactivas del oxígeno asociada al reciclaje redox del grupo 5-nitro.



## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la contribución de la porción 2-hidrazonilfurano en la toxicidad inducida por nitrofuranos en modelos *in vitro*.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar una serie de derivados de 2-hidrazonilfuranos.
2. Evaluar el efecto de los derivados sintetizados sobre la viabilidad de cultivos celulares humanos.
3. Determinar la capacidad de los derivados sintetizados de generar especies reactivas del oxígeno en cultivos celulares humanos, y a través de reducción enzimática utilizando microsomas hepáticos de rata.
4. Evaluar el efecto de los derivados sintetizados sobre la actividad glutatión *S*-transferasa de citosol de hígado de rata.
5. Evaluar el efecto farmacológico de los derivados sintetizados sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIALES

Las distintas líneas celulares se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Farmacología y Toxicología Molecular, Departamento de Farmacia, Facultad de Química y de Farmacia de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los microsomas y el citosol hepático de rata fueron obsequiados por la Prof. María Eugenia Letelier (Q.E.P.D.). Estos fueron obtenidos a través de la metodología descrita por Letelier et al. [44].

Los medios de cultivo celular RPMI<sup>8</sup> 1640 y DMEM<sup>9</sup>-F12, los aminoácidos no esenciales MEM<sup>10</sup> (100X), la solución de penicilina (10.000 U/ml)-estreptomicina (10 mg/ml), el suero fetal bovino (FBS) y la tripsina (10X) fueron obtenidos de Biological Industries, Israel Beit Haemek LTD.

Las cepas bacterianas fueron obtenidas de la colección del Laboratorio de Desarrollo de Fármacos, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El medio Mueller

---

<sup>8</sup>Por medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)

<sup>9</sup>Por medio *Dulbecco's Minimal Essential Medium* (DMEM)

<sup>10</sup>Por medio *Minimal Essential Medium* (MEM)

Hinton y las placas de agar sangre fueron obtenidos de Liofilchem s.r.l..

El  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$  y reactivo de Folin-Ciocalteu fueron obtenidos de Merck, Darmstadt.

La nitrofurantoína, furazolidona, glutatión reducido (GSH), 2-furaldehído, 5-cloro-2-furaldehído, 1-aminohidantoína clorhidrato, hidrazida benzoica, diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA), ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanesulfónico) (HEPES), solución salina balanceada de Hank (HBSS), rojo de pirogalol (PGR), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), rojo neutro (RN), fenilhidrazina clorhidrato,  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

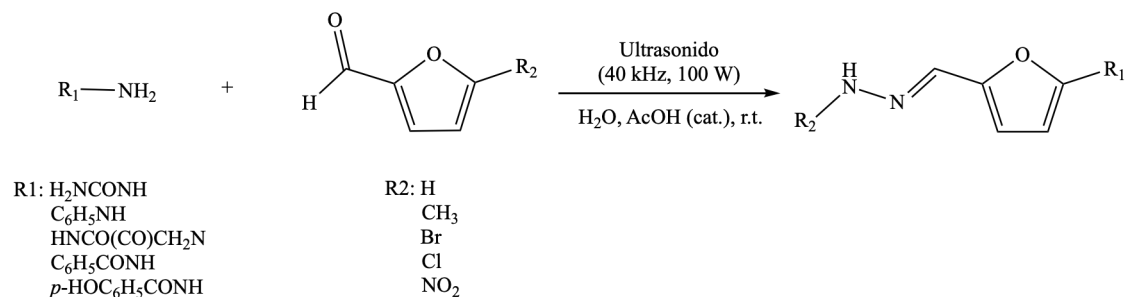
El 5-nitro-2-furaldehído, 5-metil-2-furaldehído, 5-bromo-2-furaldehído, hidrazida *p*-hidroxibenzoica, Pd-C al 5 %, bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT), y semicarbazida clorhidrato fueron obtenidos de AkSci, USA.

Los solventes orgánicos empleados en la síntesis y disolución de los derivados fueron adquiridos de Merck, Sigma-Aldrich, Bioslab, J.T. Baker y Apollo Sci. Todos los solventes utilizados fueron de calidad p.a.

## 4.2. METODOLOGÍA: QUÍMICA

### 4.2.1. Procedimiento General de Síntesis de 2-Hidrazonilfurano Derivados

Las reacciones fueron llevadas a cabo según lo descrito previamente por Leite et al. [45], con algunas modificaciones. En breve, las soluciones de hidrazinas fueron preparadas en agua destilada (10 ml), la cual contenía ácido acético glacial (100  $\mu$ l). Estas soluciones fueron sonicadas durante 30 min por ultrasonido en un equipo Ultrasonic Cleaner SB-3200 DTD bajo las siguientes condiciones: 220 V, 100 W, 40 kHz. A estas soluciones se añadieron gota a gota los correspondientes aldehídos, en proporción equimolar a las hidrazinas, observándose la presencia de precipitados. Finalizado el tiempo de reacción, las soluciones fueron filtradas, los filtrados lavados con agua destilada helada (2 x 15 ml). Los sólidos resultantes fueron secados durante 24 h en una estufa a vacío a 50 °C, correspondiendo a los productos finales.



**Figura 5.** Esquema general de síntesis de 2-hidrazonilfurano derivados

#### 4.2.2. Caracterización de los Derivados Sintetizados

La caracterización de los compuestos obtenidos fue realizada mediante espectroscopía de RMN de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RMN) y carbono (<sup>13</sup>C-RMN), FT-IR, p.f. y EMAR.

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear fue realizada en un espectrómetro Bruker Avance-400 (400 MHz) y se realizaron en solvente deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) y los valores de constantes de acoplamiento ( $J$ ) se indican en Hertz (Hz). La Espectroscopía de Infrarrojo fue efectuada en un espectrofotómetro Bruker Vector 22 (FT-IR) utilizando pellets de KBr como matriz para sólidos. Los puntos de fusión fueron determinados en un medidor de punto de fusión Stuart SMP10 Melting Point Instrument y se expresan como valores no corregidos. La Espectrometría de Masas de Alta Resolución fue realizada en un espectrómetro de masas DSA-TOF AxION 2 TOF MS (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA), en modo positivo.

### 4.2.3. Cálculo de los Mapas de Potencial Electrostático de los Derivados Sintetizados

La optimización geométrica y mapas de potencial electrostático molecular fueron realizados utilizando cálculos *ab initio* Hartree-Fock con el set 6-31G\*. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el software Spartan -08 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA). Los mapas de potencial electrostático molecular fueron realizados a una isodensidad de superficie equivalente a 0,002 para cada molécula. Las superficies fueron coloreadas de acuerdo con su potencial electrostático, considerando regiones ricas en electrones (potencial negativo) coloreadas rojas, y regiones pobres en electrones (potencial positivo) coloreadas azul.

### 4.2.4. Cálculo de los Valores de Partición Octanol-Agua LogP

El cálculo de los valores de LogP de los derivados sintetizados se realizó a través del software de uso libre *SwissADME* (desarrollado por el *Swiss Institute of Bioinformatics*). Esta herramienta computacional entrega un valor denominado *consensus* LogP, obtenido a través del cálculo de la media aritmética de 5 diferentes cálculos teóricos independientes: XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT e iLOGP [46].

### 4.3. METODOLOGÍA: FARMACOLOGÍA

#### 4.3.1. Cultivo Celular

Las líneas celulares HL-60<sup>11</sup> y HCT 116<sup>12</sup> fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % para crecimiento o 5 % para mantenimiento, bicarbonato de sodio 0,22 %, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y aminoácidos no esenciales MEM 1X.

Las líneas celulares HEK-293<sup>13</sup> y Hep G2<sup>14</sup> fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % para crecimiento o 5 % para mantenimiento, bicarbonato de sodio 0,37 %, HEPES 0,36 %, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y aminoácidos no esenciales MEM 1X.

La línea celular A549<sup>15</sup> fue cultivada en medio DMEM-F12 suplementado con FBS al 10 % para crecimiento o 5 % para mantenimiento, bicarbonato de sodio 0,37 %, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y aminoácidos no esenciales MEM 1X.

---

<sup>11</sup>Leucemia promielocítica aguda humana

<sup>12</sup>Carcinoma colorectal humano

<sup>13</sup>Riñón embrión humano

<sup>14</sup>Carcinoma hepatocelular humano

<sup>15</sup>Carcinoma pulmonar humano

### 4.3.2. Ensayos de Viabilidad Celular

El efecto de los diferentes 2-hidrazonilfuranos sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares fue evaluado a través de dos técnicas: reducción mitocondrial de sales de tetrazolio (MTT) e incorporación lisosomal de la tinción catiónica rojo neutro. Para ambos ensayos, las diferentes líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por ml de medio de cultivo al 5% de FBS, y se dejaron incubando toda la noche en una incubadora humidificada en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, los diferentes compuestos fueron agregados en diluciones seriadas manteniendo el porcentaje de solvente dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% v/v. Las células fueron incubadas por 72 horas y posteriormente fue evaluado el efecto sobre la viabilidad celular según se describe a continuación para cada técnica empleada:

1. MTT: Transcurrido el tiempo de tratamiento, a cada pocillo se le adicionó 10  $\mu\text{l}$  de MTT 5 mg/ml en agua destilada, se incubaron las placas por 4 horas, y luego el precipitado de cristales de formazán fue disuelto agregando 100  $\mu\text{l}$  de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% en HCl 1 mM incubando las placas toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera humificada. La intensidad de color se midió a 570 nm considerando una longitud de onda de 690 nm como referencia en un equipo Cytation<sup>TM</sup>5 de Biotek, USA.



2. RN: Estos ensayos se llevaron a cabo según lo descrito por Repetto et al. [47], con algunas modificaciones. En breve, luego del tiempo de tratamiento, el medio de incubación fue removido y reemplazado con 100  $\mu$ l por pocillo de una solución 10  $\mu$ g/ml de rojo neutro en medio de cultivo sin suplementar<sup>16</sup>, se dejó incubando las placas por 2 horas, o hasta que la tinción fuera incorporada a los lisosomas no excediendo las 4 horas<sup>17</sup>. Posteriormente, el medio fue removido y las placas lavadas 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X, para remover todo el rojo neutro que no fue incorporado. Luego de los lavados, se adicionaron 150  $\mu$ l de una solución 50:49:1 etanol:agua:ácido acético glacial, y se agitaron las placas por 25 minutos en un agitador orbital a 37 °C a 100 rpm. La incorporación del rojo neutro es medida por fluorescencia con longitudes de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 645 nm en un equipo Cytation<sup>TM</sup>5 de Biotek, USA.

Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes. Los valores de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) sobre la viabilidad celular<sup>18</sup> fueron calculados utilizando el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.)

---

<sup>16</sup>Esta solución se preparó a partir de una solución stock de rojo neutro 2 mg/ml en agua destilada

<sup>17</sup>En el rango de 2 a 4 horas se incorpora la totalidad de la sonda sin afectar la viabilidad [47]

<sup>18</sup>Definido como la concentración que inhibe el 50 % de la viabilidad celular

### 4.3.3. Ensayos de Generación de ERO Intracelular en Cultivos de Líneas HL-60 y Hep G2

El efecto de los 2-hidrazonilfurano derivados sobre la generación de ERO intracelular fue evaluado a través del uso de la sonda DCFDA, según la metodología descrita por Wolfe y Rui [48]. En breve, para las diferentes líneas:

1. HL-60: se incubaron  $5 \times 10^6$  células en una solución  $20 \mu\text{M}$  de la sonda DCFDA<sup>19</sup> en medio de cultivo RPMI no suplementado, por 45 min en una incubadora humidificada en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % a  $37^\circ\text{C}$ . Posterior al tiempo de incubación, las células fueron centrifugadas a  $120 \text{ g} \times 5 \text{ min}$ , y luego lavadas 2 veces con solución HBSS bajo las mismas condiciones. Luego, fueron resuspendidas en solución HBSS y sembradas en un volumen de  $50 \mu\text{l}$  por pocillo en placas blancas de fondo transparente.
2. Hep G2: se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placas blancas de fondo transparente, en medio DMEM suplementado al 10 % en FBS y se dejaron toda la noche para que éstas se adhirieran a la placa. Al día siguiente, se removió el medio y se añadió una solución  $20 \mu\text{M}$  de la sonda DCFDA en medio de cultivo DMEM no suplementado, donde las células fueron incubadas por 45 min en una incubadora humidificada en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, el

---

<sup>19</sup>Se preparó una solución stock 100 mM de DCFDA en DMSO, protegido de la luz

medio fue removido y las células fueron lavadas dos veces con solución HBSS. Posteriormente, fueron agregados 50  $\mu\text{l}$  de HBSS a cada pocillo.

Desde aquí el protocolo fue idéntico para ambas líneas celulares. Los derivados sintetizados fueron disueltos en solución HBSS a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , asegurando un volumen máximo de DMSO equivalente al 0,4% v/v. Se realizó un control positivo utilizando peróxido de hidrógeno a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , para asegurar la incorporación de la sonda a las células. Los derivados disueltos en HBSS fueron agregados rápidamente a cada pocillo en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de manera de obtener una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  en cada pocillo.

La generación de fluorescencia fue medida en intervalos de 2 min durante 1 hora a 37°C, con longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 555 nm, respectivamente, en un equipo Cytation<sup>TM</sup>5 de Biotek, USA. Se determinó el incremento en la fluorescencia en el tiempo utilizando el software GraphPad Prism 7.0, donde fue calculada la pendiente de cada curva y comparada de esta forma con la del control.

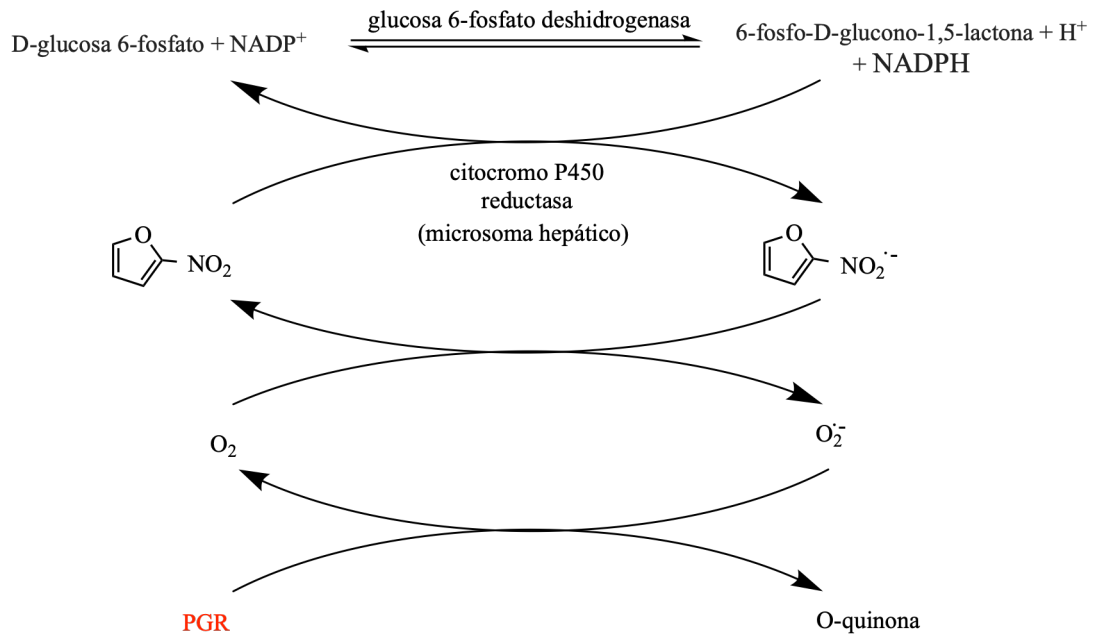
Los resultados se expresan como el cociente entre el promedio de las pendientes obtenidas para los compuestos y el promedio obtenido para los respectivos controles (ambos expresados en unidades relativas de fluorescencia por minuto, URF/min). Los resultados fueron obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

El detalle de los cálculos realizados se exhibe en el anexo A.4 ecuaciones 1-6 (páginas 106-107)

#### **4.3.4. Ensayos de Generación de Anión Superóxido Inducido por Reciclaje Redox de Nitrofuranos**

El efecto de los 2-hidrazonilfuranos sintetizados en la generación de anión superóxido en microsomas hepáticos de rata, fue evaluado a través del uso de la sonda PGR según lo descrito por Faúndez et al. [49]. En breve, se utiliza un sistema microsómico el cual contiene proteína microsómica de hígado de rata (entre 10-150  $\mu\text{g}$  de proteína/ml en tampón fosfato), KCN (1 mM), glucosa-6-fosfato (6 mM),  $\beta\text{-NADP}^+$  (600  $\mu\text{M}$ ) y el derivado sintetizado a una concentración final de 200  $\mu\text{M}$  (asegurando una concentración de DMSO no mayor a 1 %) en tampón fosfato 50 mM pH 7,4. La reacción se inicia al agregar la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y es cuantificada a través del blanqueamiento de la sonda PGR a 540 nm en un espectrofotómetro Jenway 4670 UV/VIS (figura 6).

Cada resultado obtenido fue normalizado por cantidad de proteína microsómica y se expresan en términos de generación de anión superóxido considerando que el PGR reacciona en proporción 1 es a 2 con anión superóxido, siendo el coeficiente de extinción molar de PGR a pH 7,4  $\epsilon_{540} = 2,39 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [50].

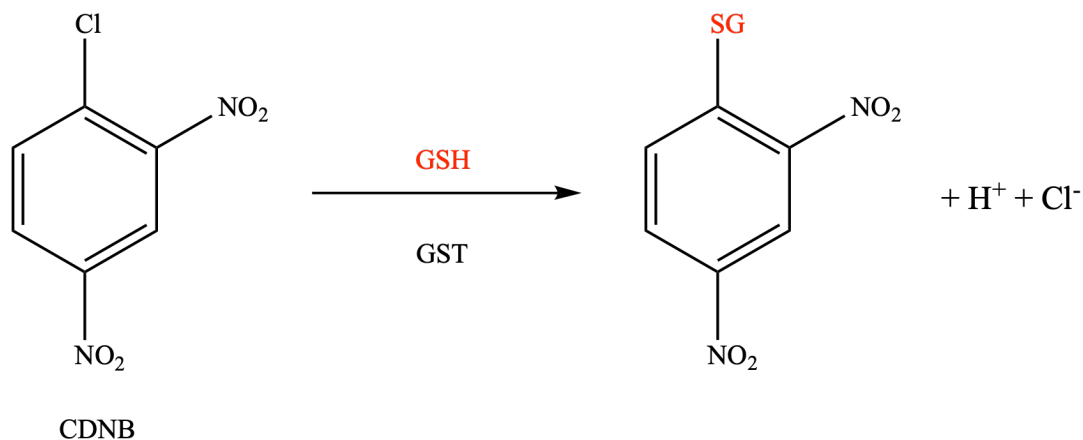


**Figura 6.** Sistema microsómico para generación de NADPH  
 La enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa permite una rápida generación de  $\beta$ -NADPH, el cual es utilizado como sustrato por la citocromo P450 reductasa presente en los microsomas.

#### 4.3.5. Ensayos de Actividad Glutatión *S*-Transferasa Citosólica de Hígado de Rata

Estos ensayos se basan en la conjugación del compuesto CDNB con GSH en una reacción catalizada por la enzima GST (figura 7) [51]. En breve, 10  $\mu\text{g}$  de proteína citosólica y CDNB a concentración final 1mM en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 6,5 son utilizados como blanco, para posteriormente adicionar GSH a concentración final 4 mM. La conjugación de CDNB con GSH genera un compuesto coloreado, el

cual es cuantificado a 340 nm ( $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 2 minutos a 20 °C. Todos los ensayos de actividad GST se realizaron en condiciones de velocidad inicial asegurando la linealidad.



**Figura 7.** Ensayo de actividad GST

Las enzimas de la familia de las GSTs catalizan la reacción de sustitución nucleofílica aromática del átomo de cloro presente en el CDNB para generar un conjugado el cual puede ser detectado a 340 nm.

#### 4.3.6. Efecto de los 2-Hidrazonilfurano Derivados Sobre la Actividad Glutación *S*-transferasa

Para determinar el efecto de los derivados sobre la actividad GST se incubó la proteína citosólica con los diferentes compuestos por 1 hora a 20 °C. Los compuestos disueltos en DMSO fueron evaluados en diluciones seriadas, asegurando un volumen final de estos a 1% v/v. Toda la actividad GST fue determinada en condiciones de velocidad inicial, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente (sección

4.3.6). Los valores de  $CI_{50}$  de inhibición sobre la actividad GST<sup>20</sup> fueron calculados utilizando el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

#### 4.3.7. Determinación de Proteínas Totales

La cantidad de proteína microsómica y citosólica se determinó mediante el método de Lowry et al. [52], utilizando como estándar albúmina de bovino fracción IV.

#### 4.3.8. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de los 2-Hidrazonilfurano Derivados sobre Cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

La concentración inhibitoria mínima (CIM) los derivados 2-hidrazonilfuranos sintetizados fue determinada a través de ensayos para la determinación de la CIM por microdilución en caldo frente a *Escherichia coli* (gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* (gram-positiva). Estos experimentos se realizaron de acuerdo de los protocolos recomendados por estándares clínicos y de laboratorio [53].

Las bacterias *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 29213) fueron obtenidas a partir del cepario del Servicio de Laboratorio Clínico, Unidad de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Éstas se conservaron congeladas en

---

<sup>20</sup>Concentración que inhibe el 50 % de la actividad glutatión *S*-transferásica máxima

leche descremada estéril a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para la obtención de las cepas puras se realizaron cultivos bacterianos en placas de agar sangre incubando las bacterias por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, y en forma independiente para cada cepa, se preparó un inóculo bacteriano en caldo Mueller Hinton con una concentración bacteriana de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml<sup>21</sup> (Es decir, 0,5 unidades de McFarland<sup>22</sup>). La concentración bacteriana se midió a través de turbidimetría en un nefelómetro Grant-Bio DEN-1. Se utilizaron como control interno los antibióticos gentamicina para *E. coli* y vancomicina para *S. aureus*, respectivamente.

Los 2-hidrazonilfurano derivados fueron masados en triplicado para su posterior dilución en DMSO, de manera de preparar una solución  $128 \mu\text{g}/\text{ml}$  al 2 % de DMSO de cada compuesto en agua estéril. Luego, se realiza una dilución seriada de los compuestos en la placa de 96 pocillo en caldo de cultivo asegurando concentraciones desde  $128 \mu\text{g}/\text{ml}$  a  $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$  con  $100 \mu\text{l}$  de caldo de cultivo por pocillo. Finalmente, se adicionan  $100 \mu\text{l}$  de suspensión bacteriana con aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a  $20^{\circ}\text{C}$ .

Luego del tratamiento, las placas son observadas a contraluz para evaluar el crecimiento de las colonias en cada pocillo. Se determina que un compuesto tiene actividad antibiótica si en un pocillo no se observa crecimiento bacteriano, es decir,

---

<sup>21</sup>Unidad Formadora de Colonias (UFC)

<sup>22</sup>Es decir, una absorbancia entre 0,08-0,10 a 625 nm [53]



no se observa turbidez en el medio, o bien, no se observa un sedimento de bacterias en el fondo del pocillo. La CIM corresponde al último pocillo donde no se observa crecimiento bacteriano.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

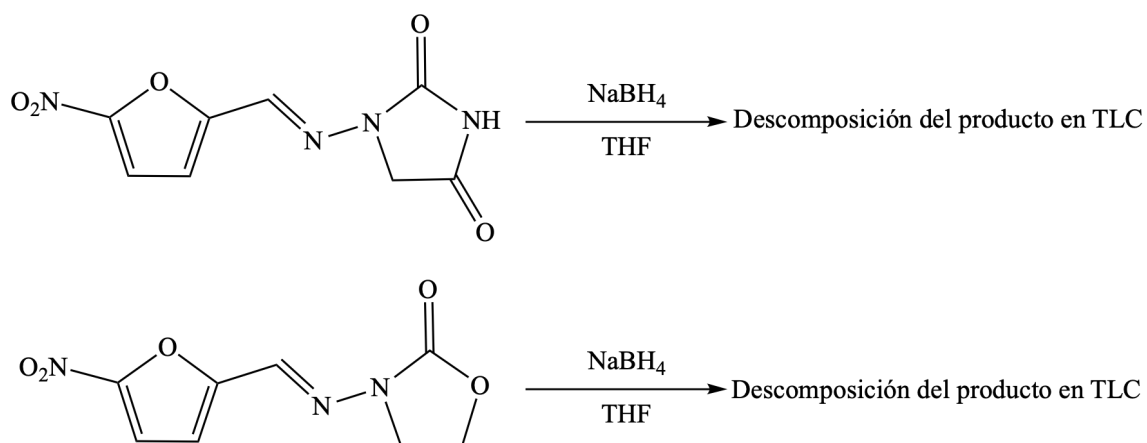
### 5.1. ENSAYOS DE NITROREDUCCIÓN DE NITROFURANTOÍNA Y FURAZOLIDONA

#### 5.1.1. Ensayos de Reducción por Hidruros Metálicos y Metales en Medio Ácido

Inicialmente, con el objetivo de modificar las características electrónicas del farmacóforo 2-hidrazonilfurano se procedió a estudiar el comportamiento reductivo de la función hidrazona  $-C=N-NH-$  presente en nitrofurantoína y furazolidona, los que corresponden a dos reconocidos fármacos con acción antibacteriana. De esta forma, al reducir la función imina adyacente al carbono 2 del anillo furano, y así eliminar el doble enlace conjugado al furano aromático ( $-CH=N-N- \longrightarrow -CH_2-NH-NH-$ ), se alterarían las propiedades electrónicas de esta porción, disminuyendo así sus características electrofílicas.

Se intentaron ensayos de reducción con borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ) en tetrahidrofurano (THF) anhidro, los cuales no llevaron a un producto aislable (figura 8). A raíz de lo anterior, se abordó una nueva estrategia, en la cual, en lugar de reducir

la hidrazona, se reduciría el grupo 5-nitro electroatractor a su derivado aminado con características electrodonoras. Estos nuevos derivados 5-aminofuranos permitirían determinar la influencia electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano en la toxicidad celular de los derivados, puesto que se eliminaría la capacidad de estos de entrar en reciclaje redox por reducción del grupo 5-nitro, y además se modificaría la densidad electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano.



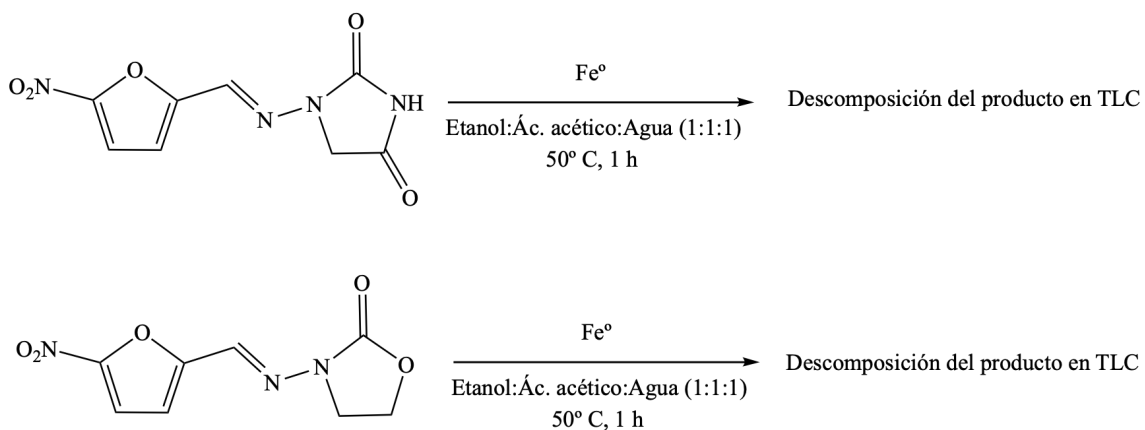
**Figura 8.** Ensayos de reducción con hidruros metálicos  
 Los ensayos de reducción con NaBH<sub>4</sub> en THF anhidro condujeron a la descomposición de los productos, evidenciado en TLC.

En un primer intento de reducción del grupo nitroaromático se llevó a cabo el ensayo de estos dos compuestos con dos reconocidos agentes reductores: i) borohidruro de sodio efectuado en THF y ii) hierro metálico (Fe<sup>0</sup> en medio acético-agua-etanol (figura 9)<sup>23</sup>. Ambos ensayos no condujeron a los amino derivados, comprobándose

<sup>23</sup>Las reacciones se realizaron en diferentes condiciones de temperatura y de concentración de solventes

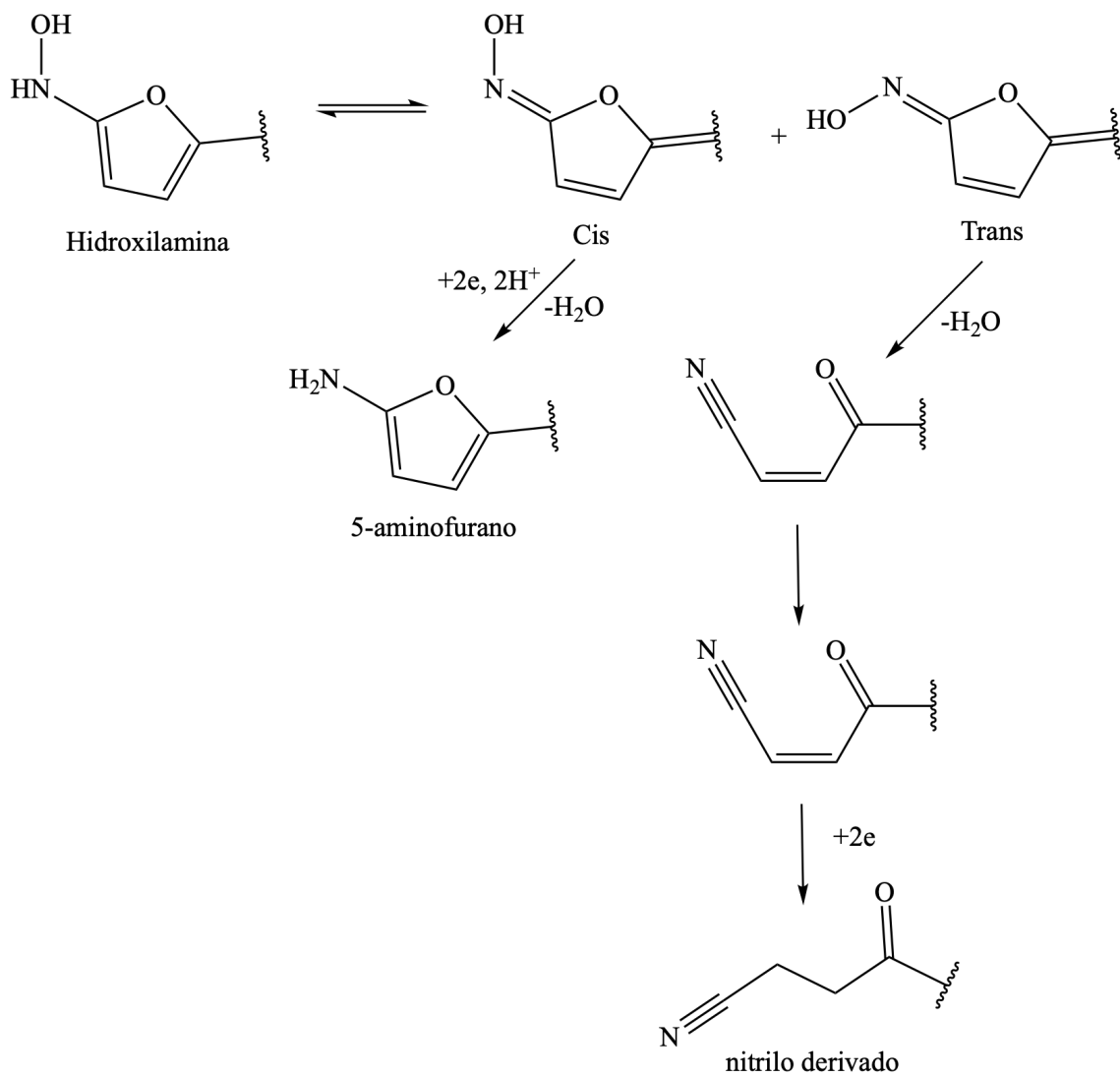
también una descomposición de los productos por generación de variadas manchas en cromatografía en capa fina (TLC) (por su sigla en inglés, *Thin Layer Chromatography*).

Se intentó, no obstante, la purificación por cromatografía en columna, enviándose a  $^1\text{H}$ -RMN uno de los productos obtenidos. Los espectros de resonancia magnética nuclear obtenidos confirmaron la descomposición<sup>24</sup>. En tal sentido, los productos de reducción no fueron re-purificados. Esta inestabilidad del núcleo de nitrofurano a los procesos reductivos, podrían corresponder a productos de apertura del anillo furano cuya formación se vería favorecida en los ambientes reductivos ensayados (figura 10) [29, 54].



**Figura 9.** Ensayos de reducción con metales en medio ácido  
En la literatura está reportada la reducción de nitroaromáticos con hierro en medio ácido. No obstante, estos ensayos condujeron a la degradación del producto. Se ensayaron otros metales y diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

<sup>24</sup>Datos no mostrados

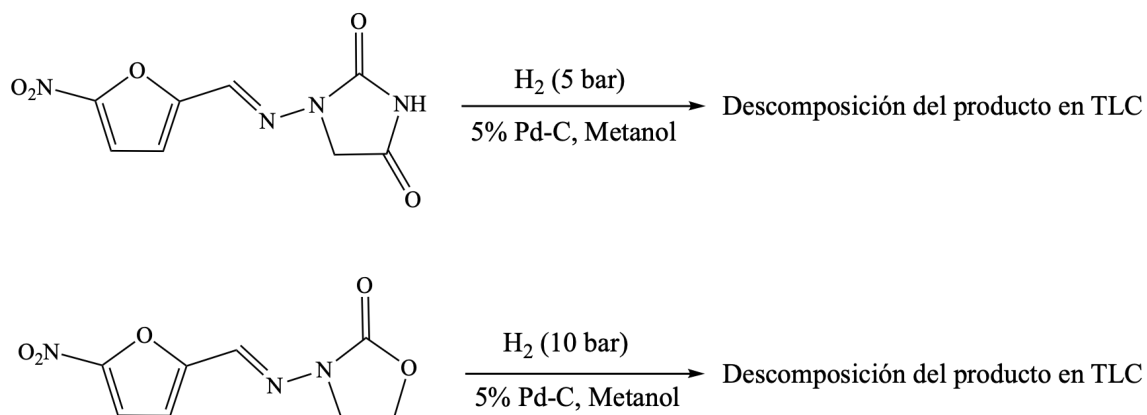


**Figura 10.** Apertura del anillo furano por tautomerismo del intermediario. En la reducción del grupo 5-nitro, la hidroxilamina intermediaria puede adoptar las conformaciones *cis* o *trans*, donde la apertura del anillo furano se ve favorecida en esta última.

Al estudiar la reducción de ambos fármacos con hierro metálico en medio ácido, se consideró el uso de otros metales reductores como zinc polvo ( $\text{Zn}^0$ )<sup>25</sup> y estaño (en sus formas  $\text{Sn}^0$ ,  $\text{SnCl}_2$  y  $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Las reacciones no procedieron, o bien, en el caso del ensayo de reducción de furazolidona con zinc polvo, se descompuso el producto evidenciado por múltiples manchas en la TLC<sup>26</sup>.

### 5.1.2. Ensayos de Reducción por Hidrogenación Catalítica

Dado que los ensayos previos no condujeron a la obtención de productos aislables, o simplemente no procedieron las reacciones, y en relación con lo encontrado en literatura, se decidió intentar la reducción por hidrogenación catalítica [56].



**Figura 11.** Ensayos de reducción mediante hidrogenación catalítica. Este ensayo se realizó basado en lo descrito por Ebetino et al. [56]. Las condiciones en las cuales se llevaron a cabo los ensayos, condujeron a la descomposición del producto.

<sup>25</sup>Este fue previamente activado utilizando HCl [55]

<sup>26</sup>Datos no mostrados

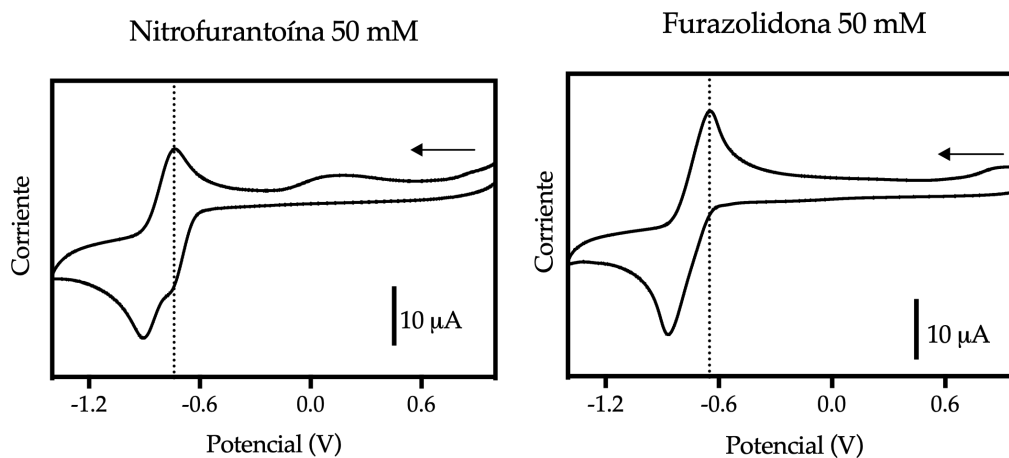
Estos ensayos se realizaron en metanol anhidro con 5 % de Pd-C a 5 o 10 bar de presión de hidrógeno (para nitrofurantoína y furazolidona, respectivamente), lo que condujo a la desaparición de los productos de partida, con aparición de múltiples manchas en las TLC (figura 11). Uno de los productos de la reacción con nitrofurantoína, dada su polaridad quedó retenido en el origen de la placa cromatográfica. No fue posible purificarlo, de manera que no se procedió a la purificación de los productos obtenidos. Es probable que el producto se haya descompuesto en un mecanismo similar a lo descrito anteriormente (figura 10).

### 5.1.3. Ensayos de Reducción Electroquímica

Debido a que los intentos de reducción del grupo nitroaromático con agentes reductores clásicos no procedieron, se intentó abordar la reducción electroquímica de los dos fármacos nitrofuranos. En un reporte previo, el fármaco nifuroxazida y un derivado metilado<sup>27</sup>, fueron evaluados a través de una voltametría cíclica que indicaba picos de reducción a -350 mV y -1350 mV. Posteriormente, estas moléculas fueron sometidas a un potencial fijo de reducción de -1350 mV donde se obtuvo tanto la reducción del grupo 5-nitrofurano a 5-aminofurano como del puente azometino [57].

---

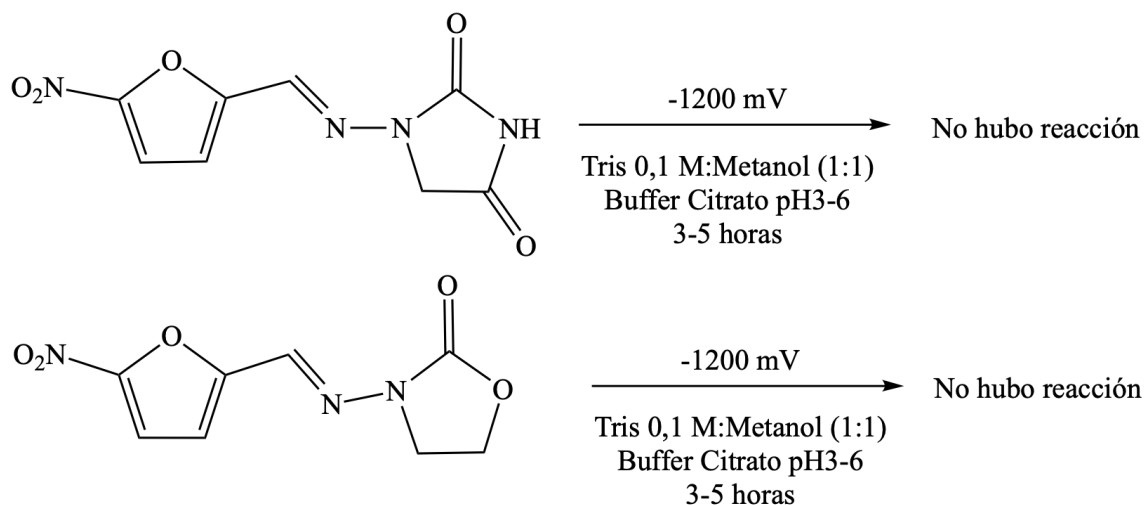
<sup>27</sup>El compuesto en cuestión es un derivado metilado en el hidroxilo de la benzohidrazida (4-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzohidrazida)



**Figura 12.** Voltametría cíclica de nitrofurantoína y furazolidona. Las voltametrías cíclicas se realizaron en DMSO burbujeado con gas inerte y luego en atmósfera inerte (Ar o N<sub>2</sub>), con TBAP como electrolito con una corriente de barrido de 500 mV/s. Se indican con una línea punteada vertical, los picos de reducción observados para ambos nitrofuranos.

Con este antecedente, mediante voltametría cíclica utilizando un electrodo de carbón vítreo en DMSO en atmósfera inerte (en N<sub>2</sub> o Ar), con perclorato de tetrabutamonio (TBAP) como electrolito, se observó que ambos nitrofuranos presentaban picos de reducción y oxidación (figura 12), por lo que se ensayó la reducción a potencial fijo (-1200 mV), tomando como referencia el pico de reducción observado a -900 mV bajo las condiciones en las que fue realizada el ensayo (figura 12). Sin embargo, la reducción electroquímica tanto para nitrofurantoína como furazolidona, no procedió en ambos casos (figura 13).





**Figura 13.** Ensayos de reducción electroquímica

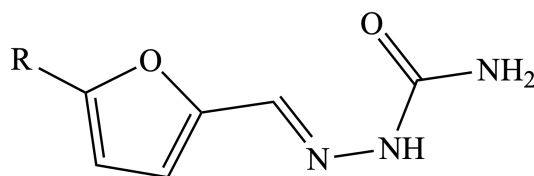
Los ensayos se realizaron basados en lo descrito por Largeron y Fleury [57]. Se consideraron los resultados previos obtenidos por las voltametrías cíclicas (figura 12), manteniendo un potencial de reducción fijo superior a los picos de reducción de nitrofurantoína y furazolidona.

## 5.2. SÍNTESIS DE 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS C-5 SUSTITUIDOS

Dado que los ensayos de reducción del grupo 5-nitro no llevaron a productos aislables, se procedió a sintetizar cinco pequeñas familias (**1-5**) de nuevos 2-hidrazonilfuranos derivados sustituidos con  $-H$ ,  $-CH_3$ ,  $-Br$  y  $-NO_2$  en la posición 5 del anillo furano. Los grupos escogidos son electrónicamente neutros ( $-H$ ), electrodonor débil ( $-CH_3$ ) y electroattractores ( $-Br$  y  $-Cl$ ). Estas moléculas conservan la porción 2-hidrazonilfuranos, pero presentan distintos grupos sustituyentes a la hidrazona que modifican sus características electrónicas y de solubilidad.

Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando 2-furaldehídos C-5 funcionalizados, en presencia de las hidrazinas comerciales semicarbazida, fenilhidrazina, 1-aminohidantoína, hidrazida benzoica e hidrazida *p*-hidroxibenzoica (ver sección 4.2.1, figura 5).

### 5.2.1. Síntesis de Familia 1. Obtención de Derivados de Semicarbazida: 1a-1d y NFZ



La primera familia sintetizada corresponde a análogos del fármaco nitrofurazona (NFZ), el cual es utilizado como agente antibacteriano tópico. Estos derivados sintetizados, presentan un grupo carbonilo electroatractor adyacente a la hidrazona el cual permite el desplazamiento de la nube electrónica en las moléculas, disminuyendo la densidad electrónica en la porción 2-hidrazonilfuranio. Además, el sustituyente de semicarbazida, confiere a estos derivados una disminución en la lipofilia evidenciado por sus valores de *consensus* LogP menores a 1 (tabla 2).

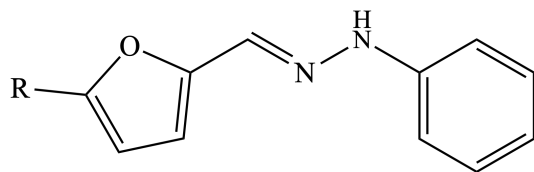
Las reacciones se llevaron a cabo basándose en lo descrito por Leite et al. [45], con algunas modificaciones. En breve, en tubos de ensayo se pesaron cantidades equimo-

lares de semicarbazida clorhidrato y se adicionaron 5 ml de agua destilada y 100  $\mu$ l de ácido acético glacial (AcOH) aplicando ultrasonido por 5 minutos de manera de solubilizar las hidrazinas. Luego, se adicionaron por goteo los 2-furaldehídos, con lo que procede la reacción ya que inmediatamente se obtienen precipitados. La adición de AcOH instala un equilibrio ácido-base que permite la neutralización de la sal cuaternaria de semicarbazida a su base libre. Ésta, posterior ataque nucleofílico al sistema aldehídico, conduce al proceso de adición-condensación con eliminación de agua y formación de la semicarbazona. Una vez terminada la reacción, se apreció un precipitado de diferentes colores para los productos obtenidos (blanco para **1a-1d**, y amarillo para **NFZ**). La solución, con el sólido presente, fue filtrada y el sólido colectado en el filtro, lavado con porciones de agua fría (3 x 15 ml) y posteriormente los filtrados secados en horno al vacío a 50 °C toda la noche.

Los compuestos obtenidos fueron estructuralmente caracterizados por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, FT-IR, p.f. y EMAR (ver anexo B, páginas 110–130).

### 5.2.2. Síntesis de Familia 2. Obtención de Derivados de Fenilhidrazina:

#### 2a-2c



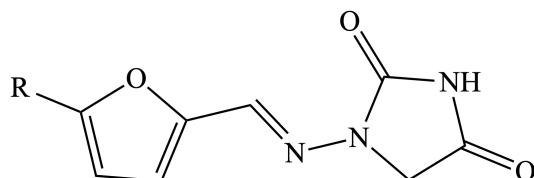
Para la síntesis de esta familia se consideró la incorporación de un grupo electrodonor y que además otorga lipofilia a las moléculas. Es por ello por lo que se consideró el uso del grupo fenilo como sustituyente para las moléculas de esta familia, y así obtener derivados 2-hidrazonilfurano lipofílicos y electrónicamente enriquecidos.

Para la síntesis de estos derivados se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente (ver figura 5).

En tubos de ensayo se pesaron cantidades equimolares de fenilhidrazina clorhidrato y se adicionaron 5 ml de agua destilada y 100  $\mu$ l de ácido acético glacial (AcOH) aplicando ultrasonido por 5 minutos de manera de solubilizar las hidrazinas. Luego, se adicionaron por goteo los 2-furaldehídos y procedió la reacción. Una vez terminada la reacción, se apreció un precipitado de diferentes colores para los productos obtenidos (marrón para **2a** y **2b**, y rojo para **2c**). La solución, con el sólido presente, fue filtrada y el sólido colectado en el filtro, lavado con porciones de agua (3 x 15 ml). Posteriormente, el filtrado se secó en estufa de vacío a 50 °C durante toda la noche.

Los compuestos obtenidos fueron estructuralmente caracterizados por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, FT-IR, p.f. y EMAR (ver anexo B, páginas 135–145).

### 5.2.3. Síntesis de Familia 3. Obtención de Derivados de 1-aminohidantoína: 3a-3d y NHT



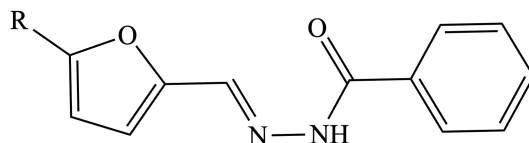
La familia **3** toma como base la estructura del fármaco nitrofurantoína (**NHT**), antibacteriano utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. La presencia del grupo hidantoína, como sustituyente en la hidrazona, que contiene un grupo carbonilo electroatractor, contribuye al desplazamiento de la densidad electrónica del puente hidrazona favoreciendo una disminución de ésta.

La síntesis de estos derivados se realizó según lo descrito anteriormente (ver figura 5). Cabe destacar que este es el primer reporte de síntesis de nitrofurantoína a través de esta metodología. En un tubo de ensayo se pesaron cantidades equimolares de 1-aminohidantoína clorhidrato y se adicionaron 5 ml de agua destilada y 100  $\mu$ l de ácido clorhídrico 1 M (o ácido acético glacial 100  $\mu$ l) aplicando ultrasonido por 5 minutos de manera de solubilizar las hidrazinas. Luego, se adicionaron por goteo los 2-furaldehídos (0,100 mmol) y procedió la reacción. Una vez terminada la reacción, se apreció un precipitado de diferentes colores para los productos obtenidos (blanco

para **3a-3d** y amarillo para **NHT**). La solución, con el sólido presente, fue filtrada y el sólido colectado en el filtro, lavado con porciones de agua (3 x 15 ml). Posteriormente, el filtrado se secó en estufa de vacío a 50 °C durante toda la noche.

Los compuestos obtenidos fueron estructuralmente caracterizados por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, FT-IR, p.f. y EMAR (ver anexo B, páginas 150–170).

#### 5.2.4. Síntesis de Familia 4. Obtención de Derivados de Hidrazida Benzoica: 4a-4e



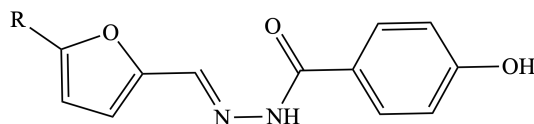
La síntesis de esta familia se basó en análogos no hidroxilados del fármaco nifuroxazida, utilizado para el tratamiento de trastornos gastrointestinales ocasionados por microorganismos. Por este motivo se consideró el uso de hidrazida benzoica como sustituyente, el cual al poseer un grupo carbonilo electroattractor disminuye la densidad electrónica del puente hidrazona, y al carecer del grupo hidroxilo en posición para en el anillo benceno incrementa moderadamente su lipofilia (tabla 2).

Para la síntesis de estos derivados se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente (ver figura 5).

En tubos de ensayo se pesaron cantidades equimolares de hidrazida benzoica y se solubilizaron en 5 ml de agua destilada aplicando ultrasonido por 5 minutos, añadiendo gotas de una solución de HCl 1 N hasta su total disolución. Luego, se adicionaron por goteo los 2-furaldehídos (1 equivalente) y procedió la reacción. Una vez terminada la reacción, se apreció un precipitado de diferentes colores para los productos obtenidos (blanco para **4a-4d** y amarillo para **4e**). La solución, con el sólido presente, fue filtrada y el sólido colectado en el filtro, lavado con porciones de agua fría (3x15 ml). Posteriormente, el filtrado se secó en estufa de vacío.

Los compuestos obtenidos fueron estructuralmente caracterizados por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, FT-IR, p.f. y EMAR (ver anexo B, páginas 175–195).

### 5.2.5. Síntesis de Familia 5. Obtención de Derivados de Hidrazida *p*-hidroxibenzoica: **5a-5d** y **NFX**



La síntesis de esta familia se basa en análogos del fármaco nifuroxazida (**NFX**). La presencia de un grupo donador hidroxilo en posición para en el anillo benceno disminuye discretamente la lipofilia de estos derivados en comparación a su contraparte

de la familia **4** (tabla 2).

Para la síntesis de estos derivados se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente (ver figura 5). Cabe destacar que este corresponde al primer reporte de síntesis de este fármaco a través de la metodología descrita.

En tubos de ensayo se pesaron cantidades equimolares de hidrazida *p*-hidroxibenzoica y se solubilizaron en 5 ml de agua destilada aplicando ultrasonido por 5 minutos, añadiendo gotas de una solución de HCl 1 N hasta su total disolución. Luego, se adicionaron por goteo los 2-furaldehídos (1 equivalente) y procedió la reacción. Una vez terminada la reacción, se apreció un precipitado de diferentes colores para los productos obtenidos (blanco para **5a-5d** y amarillo para **NFX**). La solución, con el sólido presente, fue filtrada y el sólido colectado en el filtro, lavado con porciones de agua fría (3 x 15 ml). Posteriormente, el filtrado se secó en estufa de vacío.

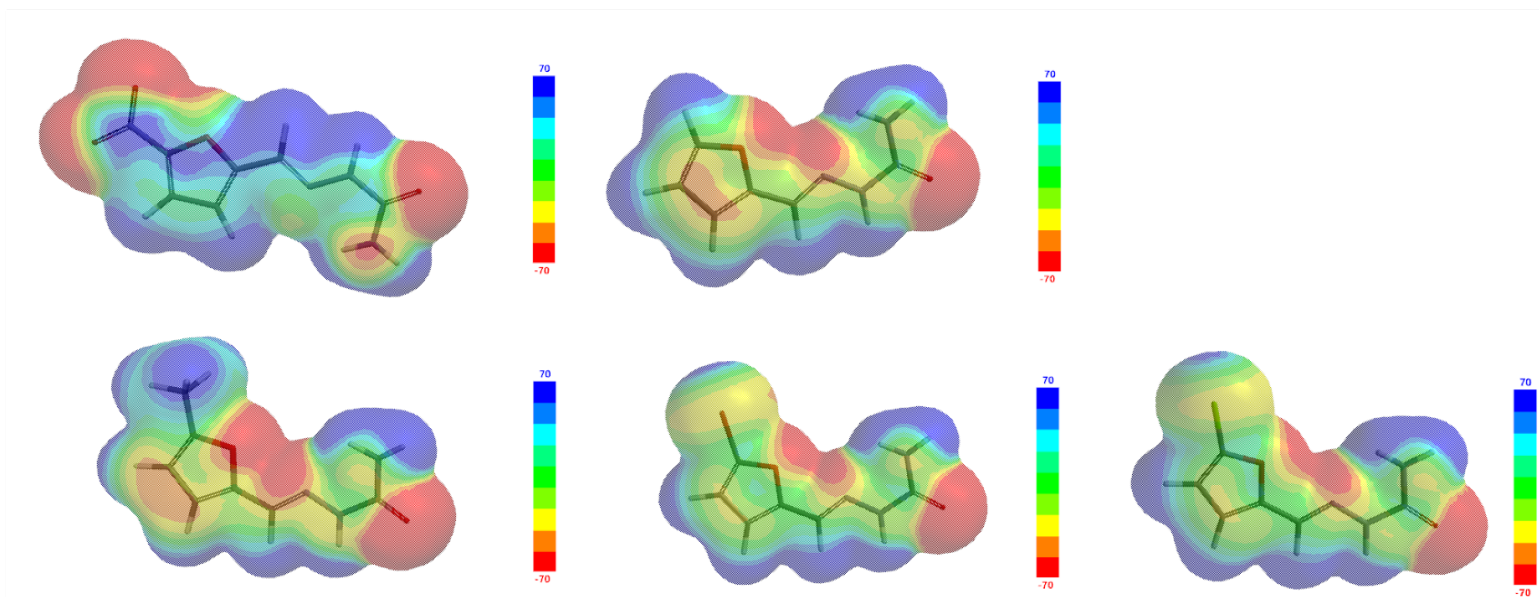
Los compuestos obtenidos fueron estructuralmente caracterizados por <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN, FT-IR, p.f. y EMAR (ver anexo B, páginas 200–220).



### 5.3. MAPAS DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS

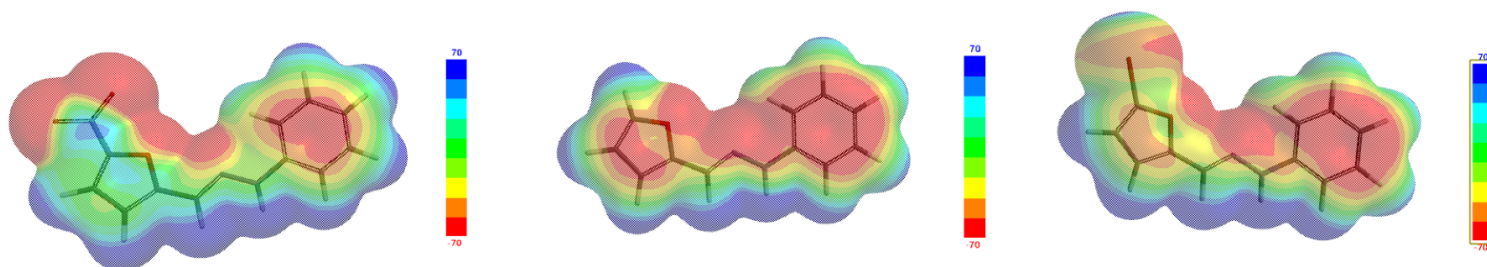
Con el objetivo de determinar el efecto de los sustituyentes en C-5 del anillo furano y en la hidrazona sobre la densidad electrónica de la porción de 2-hidrazonilfurano se calcularon los mapas de potencial electrostático de los derivados sintetizados.

La densidad electrónica sobre el anillo furano varía de acuerdo a los sustituyentes en C-5, donde la densidad electrónica en el anillo heterocíclico incrementa según  $\text{NO}_2 < \text{Cl} < \text{Br} < \text{H} < \text{CH}_3$  siendo el grupo nitro aquel que deja la menor densidad electrónica en este, y el metilo aquel que más la incrementa. Este patrón se observa entre todas las familias sintetizadas, y de hecho, el efecto electroattractor de los sustituyentes en C-5 se transmite a lo largo de la porción 2-hidrazonilfurano (figuras 14-18), pero de forma no tan evidente como en el anillo furano. Comparando los mapas entre familias, la densidad sobre el anillo furano es equiparable entre las diferentes familias, a excepción de la familia **2** que presenta una alta densidad electrónica en relación a las otras familias (figura 15).

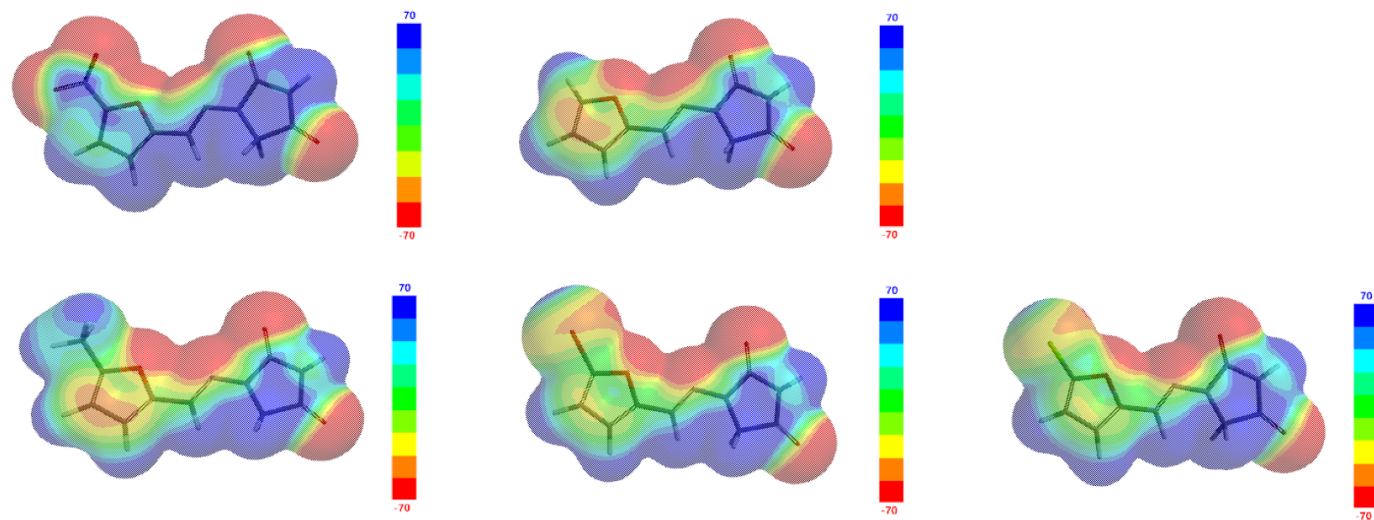


**Figura 14.** Mapas de potencial electrostático de derivados de familia **1**

Los potenciales electrostáticos se muestran en colores, indicando centros ricos en electrones de color rojo y centros pobres en electrones con color azul. Arriba (izq a der): **NFZ-1a**. Abajo (izq a der): **1b-1c-1d**.

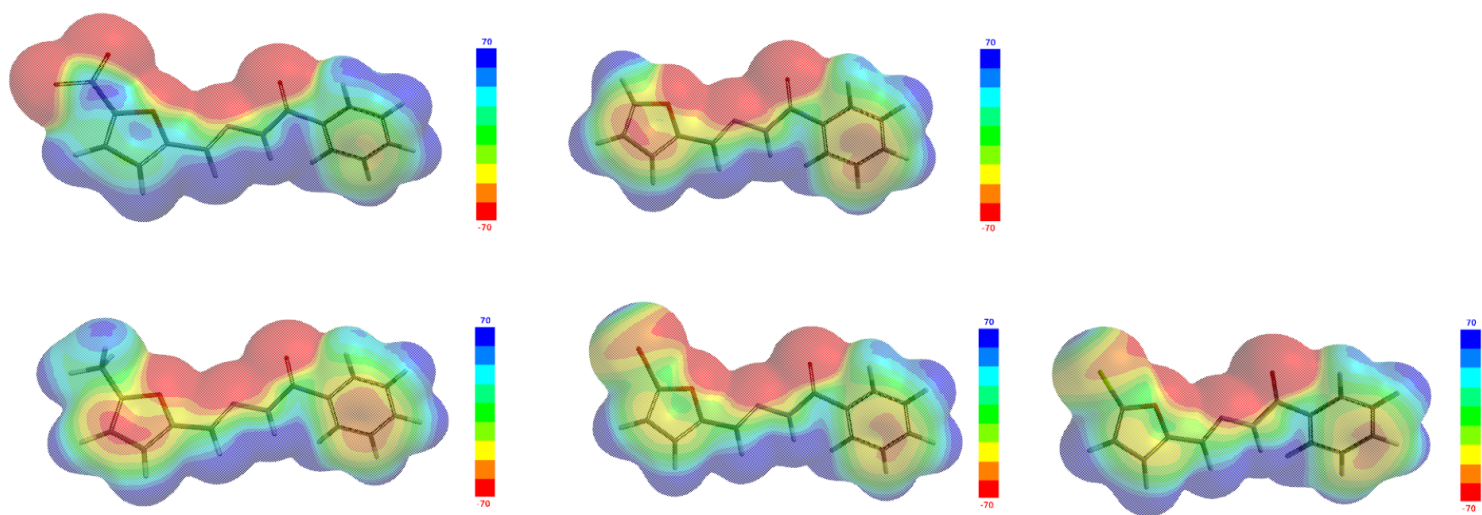


**Figura 15.** Mapas de potencial electrostático de derivados de familia **2**  
Los potenciales electrostáticos se muestran en colores, indicando centros ricos en electrones de color rojo y centros pobres en electrones con color azul. De izq a der: **2c-2a-2b**.



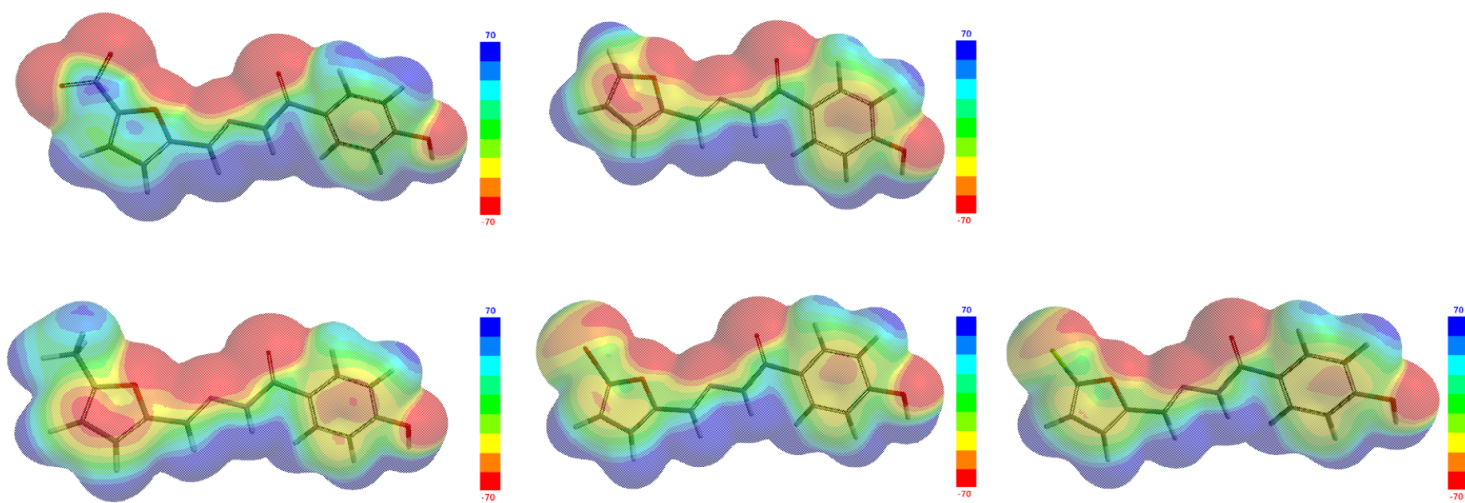
**Figura 16.** Mapas de potencial electrostático de derivados de familia **3**

Los potenciales electrostáticos se muestran en colores, indicando centros ricos en electrones de color rojo y centros pobres en electrones con color azul. Arriba (de izq a der): **NHT-3a**. Abajo (de izq a der): **3b-3c-3d**.



**Figura 17.** Mapas de potencial electrostático de derivados de familia 4

Los potenciales electrostáticos se muestran en colores, indicando centros ricos en electrones de color rojo y centros pobres en electrones con color azul. Arriba (de izq a der): **4c-4a**. Abajo (de izq a der): **4b-4c-4d**.



**Figura 18.** Mapas de potencial electrostático de derivados de familia **5**

Los potenciales electrostáticos se muestran en colores, indicando centros ricos en electrones de color rojo y centros pobres en electrones con color azul. Arriba (de izq a der): **NFX-5a**. Abajo (de izq a der): **5b-5c-5d**.

Los resultados de los cálculos de los potenciales electrostáticos nos sugieren que la presencia de grupos electroattractores como NO<sub>2</sub>, Cl y Br son capaces de disminuir la densidad electrónica en la porción 2-hidrazonilfurano. Cabe destacar que los tres grupos electroattractores escogidos, exhiben efectos diferenciales sobre la disminución de la densidad electrónica del anillo furano, y la porción de hidrazona, posiblemente debido a las propiedades intrínsecas de cada grupo sustituyente.

En general, las características electroattractoras de un grupo se relacionan a las propiedades electronegativas de este, donde el grupo NO<sub>2</sub> y los halógenos Cl y Br, corresponden a grupos electroattractores con características electronegativas similares entre ellos. No obstante, el efecto de estos sustituyentes sobre el desplazamiento electrónico no dependerá únicamente de su electronegatividad, sino también de otra propiedad intrínseca denominada *dureza*. Este parámetro hace referencia a las características que permiten la facilidad de distorsión de la distribución de la densidad electrónica en un átomo o grupo de átomos [58]. Un incremento en la dureza de un sustituyente está relacionada a una disminución del radio atómico, una alta carga nuclear efectiva, y una disminución en la polarizabilidad<sup>28</sup> de este [59, 60].

En particular, los grupos electroattractores escogidos presentan diferentes grados de dureza<sup>29</sup>, donde ésta incrementa según NO<sub>2</sub> < Br < Cl [60]. Este efecto de la du-

---

<sup>28</sup>La polarizabilidad mide la respuesta de un ión o molécula a un campo eléctrico, la cual está determinada por los valores de dureza del átomo o ión

<sup>29</sup>En particular, los halógenos incrementan su dureza en el orden I < Br < Cl < F

reza de los sustituyentes permite explicar las diferencias observadas en los mapas de potencial electrostáticos calculados, donde el grupo NO<sub>2</sub> al ser electronegativo pero blando, permite una mayor polarizabilidad, lo que favorece la distorsión electrónica en la molécula; efecto que se pierde notablemente en la presencia del grupo electroatractor Cl, que a pesar de ser más electronegativo que los otros dos grupos, al ser más duro, pierde su polarizabilidad y por lo tanto su capacidad de distorsionar la densidad electrónica en la porción 2-hidrazonilfurano.

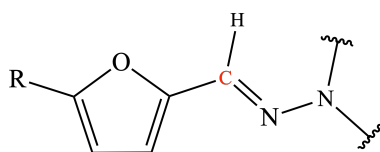
Además, la densidad electrónica en la porción 2-hidrazonilfurano también se ve influenciada por los grupos sustituyentes a la hidrazona, incrementando en la presencia del sustituyente fenilo (familia **2**, figura 15) y disminuyendo en presencia de los sustituyentes electroattractores. Cuando se comparan los sustituyentes a la hidrazona, opuestos al anillo furano, la densidad electrónica varía desde: bajo (hidantoína, familia **3**), neutro (carboxamida, familia **1**) y alta (fenilhidrazina, familia **2**; benzohidrazidas familias **4** y **5**), lo que indica la presencia de grupo pobres y ricos en electrones (ver mapas de potencial electrostáticos, figuras 14-18). Estos efectos se pueden evidenciar empíricamente al comparar los valores de desplazamiento químico obtenido a través de la resonancia magnética nuclear de carbono-13 a la cual fueron sometidos los derivados sintetizados durante su caracterización.

El desplazamiento químico de un átomo está influenciado por el ambiente químico



de éste, donde ambientes pobres en electrones desprotegen al átomo en cuestión, manifestado como un desapantallamiento de la señal hacia campo bajo (mayores valores de ppm).

**Tabla 1.** Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) del carbono imínico de la hidrazona



Familia	Desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm del carbono imínico				
	Sustituyentes en C-5				
	H	CH <sub>3</sub>	Br	Cl	NO <sub>2</sub>
1	130 (1a)	130,7 (1b)	128,8 (1c)	129,3 (1d)	127,9 (NFZ)
2	127,7 (2a)	-	126 (2b)	-	124,4 (2c)
3	133,3 (3a)	133,7 (3b)	132,1 (3c)	132,6 (3d)	131,6 (NHT)
4	133,4 (4a)	133,4 (4b)	133,2 (4c)	133,7 (4d)	132,8 (4e)
5	136,7 (5a)	136,7 (5b)	135,4 (5c)	136 (5d)	134,5 (NFX)

Los valores de desplazamiento químicos fueron asignados al carbono imínico (destacado en rojo) respecto al TMS, los cuales se encuentran en detalle en la caracterización de los derivados sintetizados (ver Anexo B, páginas 110-220).

En la tabla 1, se indican los valores de desplazamiento químico  $\delta$  (en ppm) de <sup>13</sup>C-RMN del carbono imínico presente en la hidrazona (ver figura en la tabla 1). Este valor entrega un resultado empírico que permite la comparación del ambiente químico del carbono imínico entre los derivados sintetizados.

El desplazamiento químico del carbono imínico se desapantalla conforme incrementan las características electroattractoras del sustituyente en la hidrazona, donde se aprecia el marcado efecto electrodonor del fenilo sustituyente (familia **2**), comparado al efecto electroattractor del sustituyente de hidrazida benzoica (familia **4**). Estos valores empíricos de resonancia magnética nuclear se relacionan a los cálculos obtenidos para los mapas de potencial electrostático.

Los cálculos realizados sugieren entonces que la densidad electrónica sobre la porción 2-hidrazonilfurano dependerá de la electronegatividad y dureza del sustituyente en C-5 del anillo furano y del grupo sustituyente a la hidrazona.

#### **5.4. VALORES DE *CONSENSUS* LogP DE LOS DERIVADOS de 2-HIDRAZONILFURANO SINTETIZADOS**

El valor del coeficiente de partición octanol-agua (LogP) ha sido ampliamente descrito como un indicador de lipofilia. Este parámetro es importante en la predicción del perfil farmacocinético de fármacos, o de nuevas moléculas sintetizadas, donde moléculas con LogP elevados (mayores a 5) presentarán una mala absorción, o bien una mala permeación celular o tisular [61].

Los cálculos realizados sobre los derivados sintetizados indican que estos presentan diferentes perfiles de lipofilia. En particular, la familia **1** presenta los coeficientes

LogP más pequeños, mientras que las familias **2** y **4** los valores más altos (tabla 2).

**Tabla 2.** Valores de *consensus* LogP calculados para derivados sintetizados

Familia	Sustituyente en C-5 del anillo furano				
	H	CH <sub>3</sub>	Br	Cl	NO <sub>2</sub>
1	0,13 ( <b>1a</b> )	0,27 ( <b>1b</b> )	0,65 ( <b>1c</b> )	0,57 ( <b>1d</b> )	-0,59 ( <b>NFZ</b> )
2	2,22 ( <b>2a</b> )	-	2,9 ( <b>2b</b> )	-	1,65 ( <b>2c</b> )
3	-0,2 ( <b>3a</b> )	0,32 ( <b>3b</b> )	0,48 ( <b>3c</b> )	0,41 ( <b>3d</b> )	-0,74 ( <b>NHT</b> )
4	2,03 ( <b>4a</b> )	2,31 ( <b>4b</b> )	2,6 ( <b>4c</b> )	2,57 ( <b>4d</b> )	1,39 ( <b>4e</b> )
5	1,64 ( <b>5a</b> )	1,77 ( <b>5b</b> )	2,11 ( <b>5c</b> )	2,03 ( <b>5d</b> )	0,9 ( <b>NFX</b> )

Los valores mostrados corresponden al promedio aritmético obtenido entre 5 cálculos independientes de LogP, a través del *software* de uso libre *SwissADME*.

En el caso de los nitrofuranos evaluados en este trabajo (**NFZ**, **2c**, **NHT**, **4e** y **NFX**), todos resultaron ser las moléculas más insolubles de cada familia, a pesar de que en los *consensus* LogP estos aparecen con una menor lipofilia en comparación a sus contrapartes no nitradas (ver tabla 2). Este hecho puede deberse a que el grupo nitro es altamente polar disminuyendo la lipofilia de las moléculas en los cálculos teóricos, lo que se ve de manifiesto en la disminución de los valores de *consensus* LogP.

Los cálculos teóricos sugieren que en términos farmacocinéticos todas las moléculas sintetizadas, al menos en lo que refiere a la lipofilia, serían capaces de ingresar a

la célula<sup>30</sup>.

## 5.5. EFECTO DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Con el objetivo de determinar el efecto de la porción de 2-hidrazonilfurano sobre la toxicidad celular, se determinó el efecto de los derivados sintetizados sobre la viabilidad de diversas líneas celulares humanas. Estas líneas celulares fueron escogidas tomando en consideración los diferentes efectos adversos observados en pacientes luego del consumo oral de nitrofuranos, razón por la cual se escogieron líneas representativas de tejido renal, hepático, sanguíneo, pulmonar y gastrointestinal.

Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular, se llevaron a cabo dos técnicas: i) reducción de sales de tetrazolio (MTT) e ii) incorporación de rojo neutro. Ambas técnicas son ampliamente utilizadas en la literatura para determinar viabilidad celular. La primera comprende el metabolismo de una sal de tetrazolio, la cual es reducida a un compuesto insoluble. La segunda, en cambio, se basa en la incorporación de la sonda a los lisosomas de las células viables, los cuales dado su ambiente ácido permiten la protonación de la sonda, quedando esta retenida.

---

<sup>30</sup>El *software SwissADME* realiza múltiples cálculos farmacocinéticos aparte del LogP. Todas las moléculas sintetizadas cumplen las reglas de Lipinski: no más de 5 enlaces donores de H, no más de 10 enlaces aceptores de H, masa molecular menor a 500 Da, LogP menor a 5

Los resultados obtenidos a través de ambas técnicas muestran que la sustitución del grupo nitro disminuye la toxicidad de los derivados, pero no la suprime por completo. En el caso de los derivados sustituidos en C-5 del anillo furano con grupos electrónicamente neutros o donores como H y CH<sub>3</sub>, la toxicidad disminuye considerablemente en la mayoría de los derivados; mientras que la presencia del grupo halógeno Br en C-5 permite que los derivados mantengan un perfil de toxicidad, al menos evidenciado en las líneas celulares Hep G2, HL-60 y A549 (tablas 3-7).

Por otra parte, la sustitución en la hidrazona pareciera ejercer un efecto diferencial sobre la toxicidad de los derivados sintetizados. En el caso de las familias con sustituyentes electroattractores (familia **1**, **3**, **4** y **5**), la toxicidad incrementa conforme incrementa el perfil electroattractor del sustituyente a la hidrazona (ver mapas de potencial electrostático, figuras 14-18); efecto evidenciado en la familia **5** siendo la más citotóxica entre las previamente mencionadas (tabla 7).

Particularmente, cada sustituyente confiere características fisicoquímicas diferentes a los derivados sintetizados. Los derivados de la familia **1** tienen un grupo sustituyente (semicarbazida) cuyas propiedades electroattractoras son las más débiles dentro de todas las familias previamente mencionadas, siendo además la familia con la mayor solubilidad, siendo esta la familia con un menor perfil de toxicidad (tabla 3).

En este mismo sentido, en la familia **3** el sustituyente de hidantoína se presenta como un mejor grupo electroattractor en comparación al de semicarbazida de la familia **1**, presentando propiedades de solubilidad intermedias en comparación a los otros derivados. Sumado a lo anterior, los derivados de la familia **4** y **5** presentan mejores características electroattractoras en comparación a las dos familias previamente descritas, lo que, sumado a sus propiedades de solubilidad, contribuirían en mayor grado a la toxicidad ejercida por estos derivados.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la familia **2** muestran una elevada toxicidad en todos los derivados sintetizados (tabla 4). En el caso de los resultados obtenidos con la técnica de MTT se observa que estos no se relacionan a sus contrapartes en rojo neutro. Al momento de realizar los ensayos de viabilidad, las células fueron observadas al microscopio donde se veía que a altas concentraciones no había células adheridas, o células presentes, en el pocillo del experimento, pero que al momento de cuantificar la reducción de la sal de tetrazolio el pocillo se tornaba de azul intenso, incrementando la absorbancia a 570 nm.

Además, aquellos pocillos que sí tenían células, a concentraciones menores de los derivados de la familia **2**, las células se apreciaban con una gran cantidad de cristales de formazán. Lo anterior nos sugiere que estos derivados, de alguna forma inducen la reducción intracelular de las sales de tetrazolio.

De hecho, para descartar la reducción directa por parte de estos derivados, se incubaron los derivados de la familia **2** en medio de cultivo bajo las mismas condiciones de la técnica de MTT en ausencia de células, y no se observó la reducción de las sales de tetrazolio, evidenciado en la permanencia del color amarillo característico de la sal de tetrazolio oxidada (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos a través de la técnica de rojo neutro indican que, en el caso de estos derivados sintetizados, la sustitución del grupo nitro no suprime la toxicidad celular. De hecho, tal como queda de manifiesto en la tabla 4 estos derivados exhiben una elevada toxicidad aún con la presencia de un H o Br en C-5 (compuesto **2a** y **2b**, respectivamente).

En el caso de la familia **2**, la presencia de un grupo fenilo electrodonor, contribuye al incremento de la densidad electrónica en el puente de hidrazona (figura 15, a la vez que genera un incremento de la lipofilia de estos derivados (figura 2), lo que podría contribuir en la toxicidad observada en estos.

Los resultados obtenidos sugieren que la citotoxicidad de nitrofuranos no está determinada por la presencia del grupo 5-nitro, sino que sería más bien la sumatoria entre las propiedades electrónicas propias de este grupo (es decir, su capacidad de ser reducido) junto con las características electrónicas del esqueleto de 2-hidrazonilfurano, lo que estaría influenciado por el grupo sustituyente a la hidrazona.

En los anexos A.1, A.2 y A.3 se muestran algunos resultados experimentales obtenidos con MTT y rojo neutro (páginas 99-103)



**Tabla 3.** Efecto de derivados de la familia **1** sobre la viabilidad celular

Linea celular	Sustituyente en C-5 del anillo furano									
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFZ</b> )		H ( <b>1a</b> )		CH <sub>3</sub> ( <b>1b</b> )		Br ( <b>1c</b> )		Cl ( <b>1d</b> )	
	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro
HEK-293	30,9 ± 2,8	51,8 ± 1,8	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HCT 116	44,8 ± 6,5	60,4 ± 3,2	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HL-60	4,3 ± 0,4	23,2 ± 0,5	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Hep G2	45,0 ± 4,2	71,2 ± 10,5	>500	375,0 ± 60,4	>500	211,3 ± 19,5	327,3 ± 63,9	104,5 ± 11,61	>500	>500
A549	40,9 ± 1,4	58,5 ± 3,1	>500	>500	>500	471,1 ± 16,7	>500	433,7 ± 26,1	>500	>500

En la tabla se muestran los resultados obtenidos a través de la técnica de MTT (a la izquierda) y rojo neutro (a la derecha). Cada valor corresponde al promedio más desviación estándar del resultado obtenido en 3 experimentos independientes. Los valores > indican que no fue posible calcular una CI<sub>50</sub> en las concentraciones evaluadas.

**Tabla 4.** Efecto de derivados de la familia **2** sobre la viabilidad celular

Linea celular	Sustituyente en C-5 del anillo furano					
	NO <sub>2</sub> ( <b>2c</b> )		H ( <b>2a</b> )		Br ( <b>2b</b> )	
	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro
HEK-293	22,4 ± 2,6	6,4 ± 0,7	12,9 ± 1,6	24,3 ± 3,8	>250	37,1 ± 1,2
HCT 116	21,8 ± 4,2	21,8 ± 4,2	53,3 ± 13,5	53,3 ± 13,5	>250	50,1 ± 1,8
HL-60	>250	11,4 ± 0,9	>500	47,3 ± 2,5	>250	134,3 ± 9,3
Hep G2	13,0 ± 0,6	20,6 ± 2,6	143,7 ± 10,4	62,9 ± 3,5	28,6 ± 1,7	13,2 ± 0,9
A549	23,7 ± 0,6	4,2 ± 0,1	>500	30,1 ± 2,0	262,4 ± 7,4	110,6 ± 7,3

En la tabla se muestran los resultados obtenidos a través de la técnica de MTT (a la izquierda) y rojo neutro (a la derecha). Cada valor corresponde al promedio más desviación estándar del resultado obtenido en 3 experimentos independientes. Los valores > indican que no fue posible calcular una CI<sub>50</sub> en las concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.** Efecto de derivados de la familia **3** sobre la viabilidad celular

Linea celular	Sustituyente en C-5 del anillo furano									
	NO <sub>2</sub> ( <b>NHT</b> )		H ( <b>3a</b> )		CH <sub>3</sub> ( <b>3b</b> )		Br ( <b>3c</b> )		Cl ( <b>3d</b> )	
	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro
HEK-293	37,7 ± 1,5	40,4 ± 2,7	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HCT 116	83,7 ± 6,5	105,2 ± 7,9	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
HL-60	81,1 ± 5,6	40,0 ± 1,8	>500	>500	>500	>500	>500	388,4 ± 25,7	>500	>500
Hep G2	28,6 ± 2,1	43,4 ± 3,1	>500	285,1 ± 57,3	>500	243,2 ± 21,1	>500	158,9 ± 34,5	>500	>500
A549	29,8 ± 0,9	59,9 ± 3,1	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

En la tabla se muestran los resultados obtenidos a través de la técnica de MTT (a la izquierda) y rojo neutro (a la derecha). Cada valor corresponde al promedio más desviación estándar del resultado obtenido en 3 experimentos independientes. Los valores > indican que no fue posible calcular una CI<sub>50</sub> en las concentraciones evaluadas.

**Tabla 6.** Efecto de derivados de la familia **4** sobre la viabilidad celular

Linea celular	Sustituyente en C-5 del anillo furano									
	NO <sub>2</sub> ( <b>4e</b> )		H ( <b>4a</b> )		CH <sub>3</sub> ( <b>4b</b> )		Br ( <b>4c</b> )		Cl ( <b>4d</b> )	
	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro
HEK-293	10,6 ± 0,3	14,6 ± 0,8	>500	>500	>500	>500	117,1 ± 7,4	214,1 ± 5,1	>500	>500
HCT 116	13,4 ± 0,3	13,4 ± 0,6	>500	>500	>500	>500	219,2 ± 15,1	148,7 ± 75,6	>500	>500
HL-60	10,0 ± 0,8	17,6 ± 0,5	>500	>500	>500	>500	211,0 ± 10,5	165,6 ± 4,4	>500	>500
Hep G2	18,7 ± 1,1	25,7 ± 6,5	>500	420,7 ± 25,9	>500	65,6 ± 4,7	162,5 ± 14,6	82,5 ± 8,7	>500	>500
A549	16,5 ± 0,5	46,7 ± 3,4	>500	380,3 ± 32,5	>500	356,7 ± 16,1	208,0 ± 22,2	150,3 ± 10,4	>500	>500

En la tabla se muestran los resultados obtenidos a través de la técnica de MTT (a la izquierda) y rojo neutro (a la derecha). Cada valor corresponde al promedio más desviación estándar del resultado obtenido en 3 experimentos independientes. Los valores > indican que no fue posible calcular una CI<sub>50</sub> en las concentraciones evaluadas.

**Tabla 7.** Efecto de derivados de la familia **5** sobre la viabilidad celular

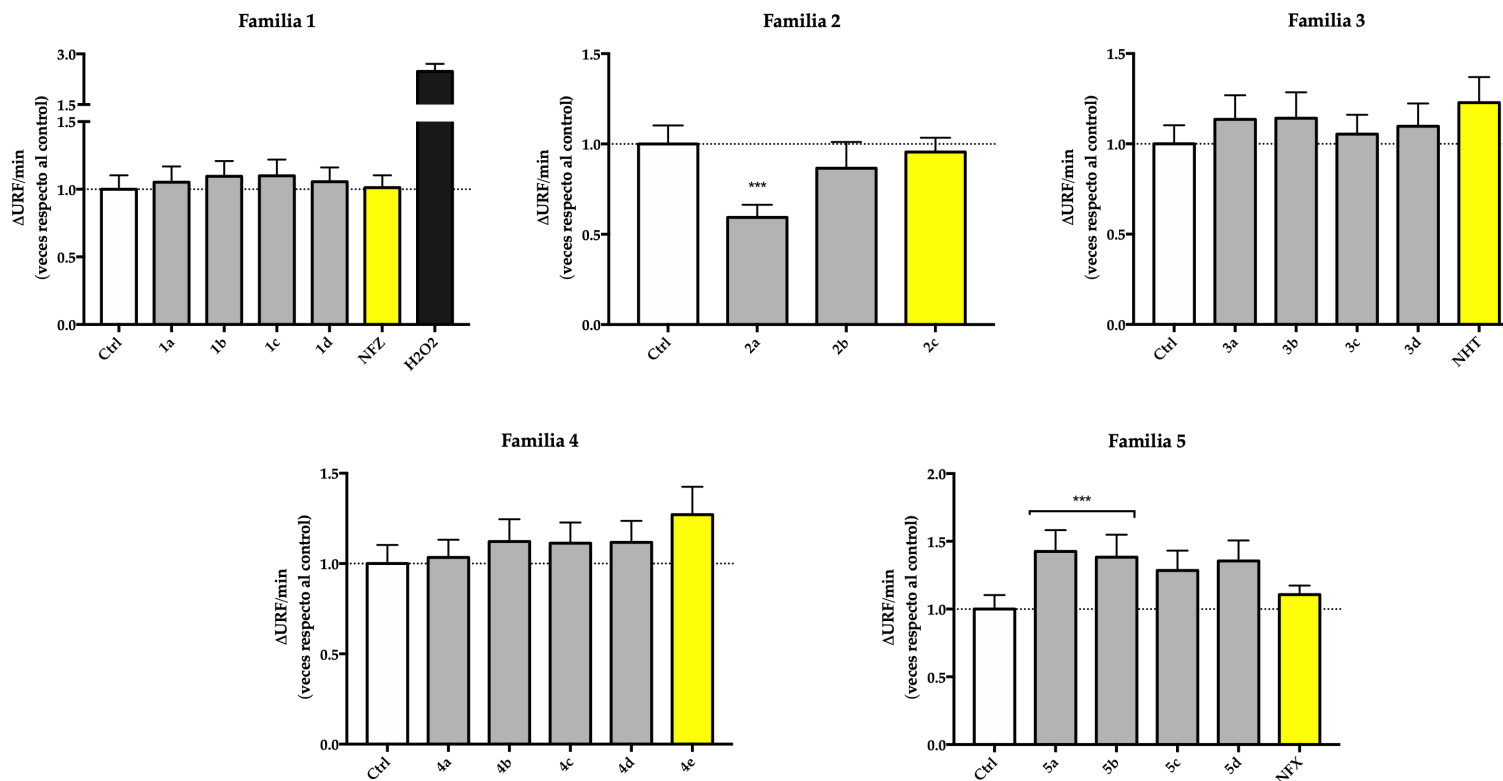
Linea celular	Sustituyente en C-5 del anillo furano									
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFX</b> )		H ( <b>5a</b> )		CH <sub>3</sub> ( <b>5b</b> )		Br ( <b>5c</b> )		Cl ( <b>5d</b> )	
	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro	MTT	Rojo Neutro
HEK-293	7,4 ± 0,2	10,9 ± 0,7	>500	>500	>500	>500	168,5 ± 9,1	154,3 ± 9,1	>500	>500
HCT 116	8,0 ± 0,4	14,1 ± 0,7	>500	>500	>500	>500	166,1 ± 6,7	160,0 ± 7,8	>500	>500
HL-60	6,6 ± 0,2	7,4 ± 0,1	>500	213,3 ± 14,7	>500	307,9 ± 10,8	139,5 ± 10,5	9,4 ± 0,3	>500	>500
Hep G2	14,8 ± 1,0	23,5 ± 3,4	>500	>500	>500	>500	213,9 ± 19,2	102,0 ± 15,1	>500	>500
A549	9,0 ± 0,2	14,4 ± 0,7	>500	410,9 ± 27,5	398,1 ± 21,9	309,1 ± 26,8	138,9 ± 4,9	51,7 ± 0,7	>500	>500

En la tabla se muestran los resultados obtenidos a través de la técnica de MTT (a la izquierda) y rojo neutro (a la derecha). Cada valor corresponde al promedio más desviación estándar del resultado obtenido en 3 experimentos independientes. Los valores > indican que no fue posible calcular una CI<sub>50</sub> en las concentraciones evaluadas.

## 5.6. EFECTO DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS EN LA GENERACIÓN DE ERO INTRACELULAR EN LAS LÍNEAS HL-60 Y HEP G2

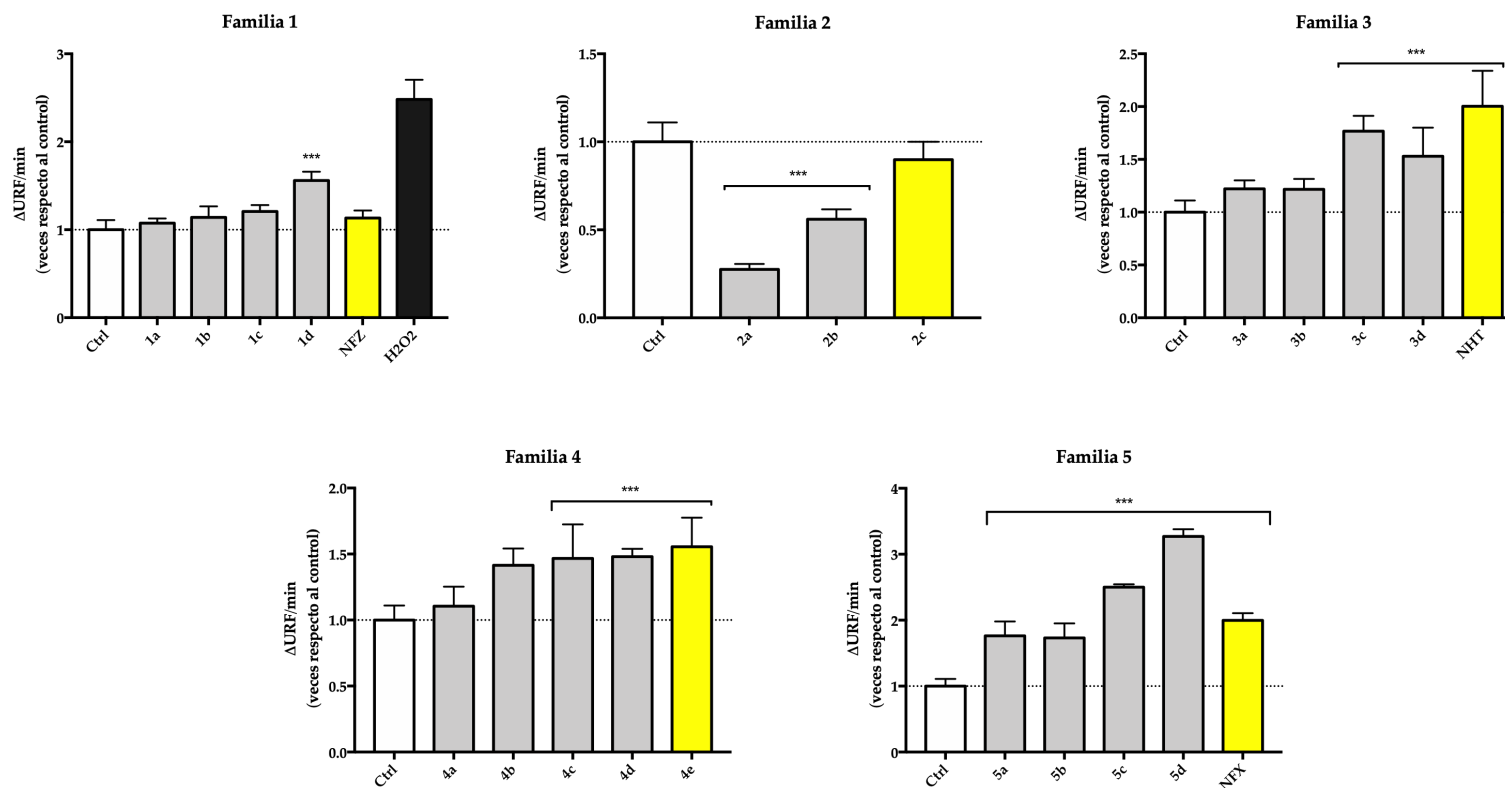
Uno de los mecanismos de toxicidad propuestos por los cuales actuarían los nitrofuranos es la generación de ERO intracelular producto del reciclaje redox del grupo 5-nitro. Es por ello, que se decidió evaluar el efecto de los derivados sintetizados en su capacidad de generación de ERO intracelular.

Para las células HL-60, se observó que ninguno de los derivados sintetizados, incluidos los nitrados, fue capaz de inducir la generación ERO intracelular comparado al control con DMSO, a excepción de los derivados **5a** y **5b** (figura 19). Estos resultados pueden explicarse tomando en consideración que las células HL-60 presentan una baja expresión de la enzima citocromo P450 reductasa, la cual es la principal responsable de la reducción monoelectrónica del grupo 5-nitro [19]. Por lo tanto, la incapacidad de generar ERO intracelular aún en presencia del grupo 5-nitro, se explicaría por sus niveles enzimáticos de citocromo P450 reductasa.



**Figura 19.** Generación de ERO intracelular en HL-60

La generación de fluorescencia fue medida durante 1 hora luego de la exposición de las células a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ . En blanco se indican los controles, en grafito los derivados no nitrados, en amarillo los derivados nitrados, y en negro el control positivo con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Los resultados son expresados calculados como la cinética de generación de fluorescencia normalizados respecto al control (ver ecuación 6 en sección A.4). (\*\*\*)  $p < 0,01$ .



**Figura 20.** Generación de ERO intracelular en Hep G2

La generación de fluorescencia fue medida durante 1 hora luego de la exposición de las células a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ . En blanco se indican los controles, en grafito los derivados no nitrados, en amarillo los derivados nitrados, y en negro el control positivo con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Los resultados son expresados calculados como la cinética de generación de fluorescencia normalizados respecto al control (ver ecuación 6 en sección A.4). (\*\*\*)  $p < 0,01$ .



Por otra parte, en los experimentos de viabilidad todos los derivados sintetizados exhibían un marcado perfil tóxico en las células HL-60 (ver resultados 5.5, páginas 62-66), no obstante, estos derivados no son capaces de inducir la generación de ERO en esta línea celular (figura 19). Esto sugiere que, al menos en esta línea celular, existen mecanismos de toxicidad no relacionados a la generación de ERO intracelular.

Para las células Hep G2, con origen hepático que presentan una alta expresión de citocromo P450 reductasa, se obtuvieron resultados inesperados: no sólo los derivados nitrados fueron capaces de inducir la generación de ERO intracelular, sino que también los derivados halogenados. A pesar de carecer del grupo 5-nitro susceptible de entrar en reciclaje redox, estos derivados fueron capaces de inducir la generación de ERO intracelular en niveles comparables, e incluso superiores a sus contrapartes nitradas (ver compuestos **5c** y **5d**, figura 20).

Sumado a lo anterior, otros resultados inesperados fueron los obtenidos con los derivados de la familia **2**. En particular, estos compuestos que exhibieron una alta toxicidad en todas las líneas celulares evaluadas (ver resultados 5.5, páginas 62-66), no fueron capaces de inducir la generación de ERO intracelular, aún cuando estuviera el grupo 5-nitro presente en el compuesto **2c**. Es más, el efecto observado con estos compuestos muestra una menor pendiente en los niveles de fluorescencia generada en el tiempo en comparación al control (figuras 19 y 20). Esto último sugiere que

estos compuestos podrían estar inhibiendo la respiración celular.

Los resultados obtenidos sugieren que la generación de ERO intracelular no depende de la presencia del grupo 5-nitro, sino más bien las propiedades electrónicas de la porción 2-hidrazonilfurano, donde la presencia de grupo electroattractores sustituyentes en C-5 y en la hidrazona incrementan la capacidad de generación de ERO intracelular. Al respecto, tal cual se observa en los mapas de potencial electrostático (figuras 14-18), y sumado a lo evidenciado en los desplazamientos químicos del carbono imínico (tabla 1), la capacidad de generación de ERO intracelular incrementa conforme disminuye la densidad electrónica en la porción de 2-hidrazonilfurano. De hecho, la presencia del sustituyente fenilo electrodonor en la hidrazona (familia **2**), a pesar de incrementar la toxicidad de los derivados, suprime la capacidad de estos de generar ERO intracelular.

En el anexo A.4 se muestran algunos experimentos representativos obtenidos para las líneas celulares HL-60 y Hep G2 (página 104)

## 5.7. EFECTO DE DERIVADOS DE 2-HIDRAZONILFURANO EN LA GENERACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO INDUCIDO POR RECICLAJE REDOX

Tal y como ha sido mencionado, la enzima citocromo P450 reductasa es la principal responsable de la reducción monoelectrónica de compuestos nitrados en el organismo, por lo que su papel en el reciclaje redox de nitrofuranos está ampliamente documentado (ver figura 3). En los experimentos anteriores de generación de ERO intracelular, se obtuvieron resultados inesperados con los derivados no nitrados, en particular los derivados halogenados. Producto de lo anterior, se decidió evaluar la capacidad de los derivados sintetizados de generar anión superóxido a través de la reducción enzimática por la enzima citocromo P450 reductasa.

Con esta finalidad, se consideró el uso de la sonda PGR, capaz de interactuar de forma estequiométrica con anión superóxido<sup>31</sup>, lo que permitiría la cuantificación de generación de este radical inducido por reciclaje redox. La enzima citocromo P450 reductasa se obtuvo a partir de microsomas hepáticos de rata, y el sustrato NADPH a través de un sistema generador utilizando la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. De esta forma, es posible mantener niveles constantes de NADPH

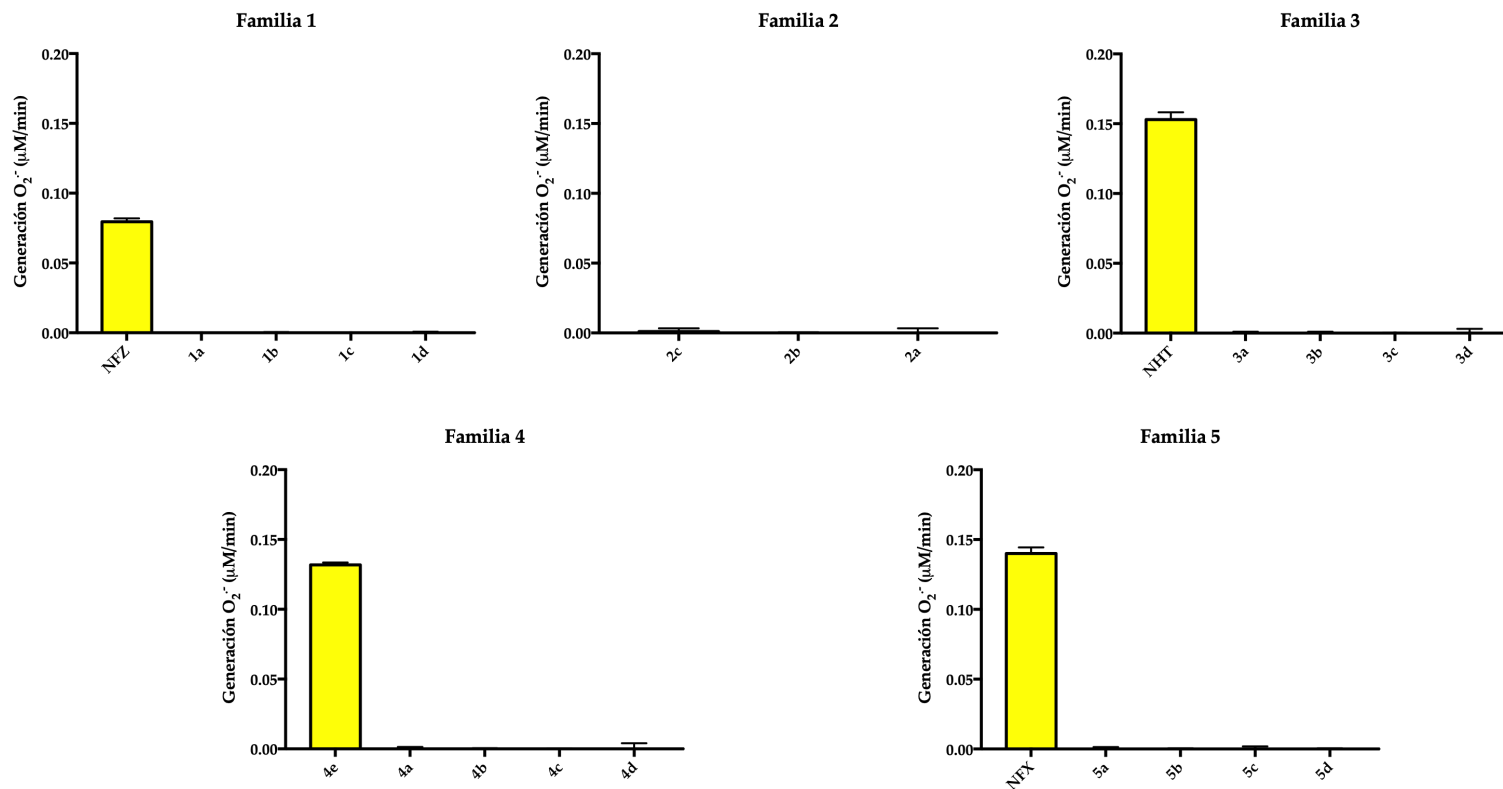
---

<sup>31</sup>La sonda PGR puede interactuar con diferentes radicales libres [62]. En el sistema empleado en este trabajo se ve favorecida la generación de anión superóxido, por lo que la interacción de PGR con otros posibles radicales que se formaran se considera insignificante

en el medio, asegurando un ambiente reductor que permita la posterior reducción enzimática de los derivados sintetizados (ver sección 4.3.4, figura 6).

Los derivados no nitrados no fueron capaces de inducir la generación de anión superóxido a través de reducción enzimática, lo que sugiere que la generación de ERO intracelular no se debe únicamente a la capacidad de los derivados de ser reducidos a través de la enzima citocromo P450 reductasa.

En particular, únicamente los derivados nitrados fueron capaces de entrar en reciclaje redox en diferentes magnitudes, a excepción del compuesto **2c** el cual a pesar de ser nitrado no fue capaz de generar anión superóxido a través del sistema enzimático evaluado. Este derivado, a pesar de ser uno de los derivados más citotóxicos evaluados, no fue capaz de inducir la generación de ERO intracelular y tampoco fue capaz de entrar en reciclaje redox incluso a altas concentraciones (200  $\mu\text{M}$ ), lo que sugiere que su toxicidad no se debe únicamente a la presencia del grupo 5-nitro.



**Figura 21.** Generación de anión superóxido inducido por reciclaje redox

La generación de anión superóxido fue cuantificada a través del blanqueamiento de la sonda PGR, de acuerdo a lo descrito en métodos (ver sección 4.3.4). En amarillo se muestran los derivados nitrados. Los valores se expresan en generación de anión superóxido en  $\mu M$  por min, normalizados por cantidad de proteína microsómica.

Los resultados se expresan como promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Estos resultados, pueden ser explicados en términos de la densidad electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano. Está descrito que los potenciales de reducción del grupo 5-nitro se correlacionan con el efecto citotóxico asociado a estos [63–66]. En efecto, mientras menor sea la densidad electrónica en la porción de 2-hidrazonilfurano mayor es la susceptibilidad del grupo 5-nitro de ser reducido; efecto que se ve evidenciado en los mapas de potencial electrostáticos (figuras 14-18).

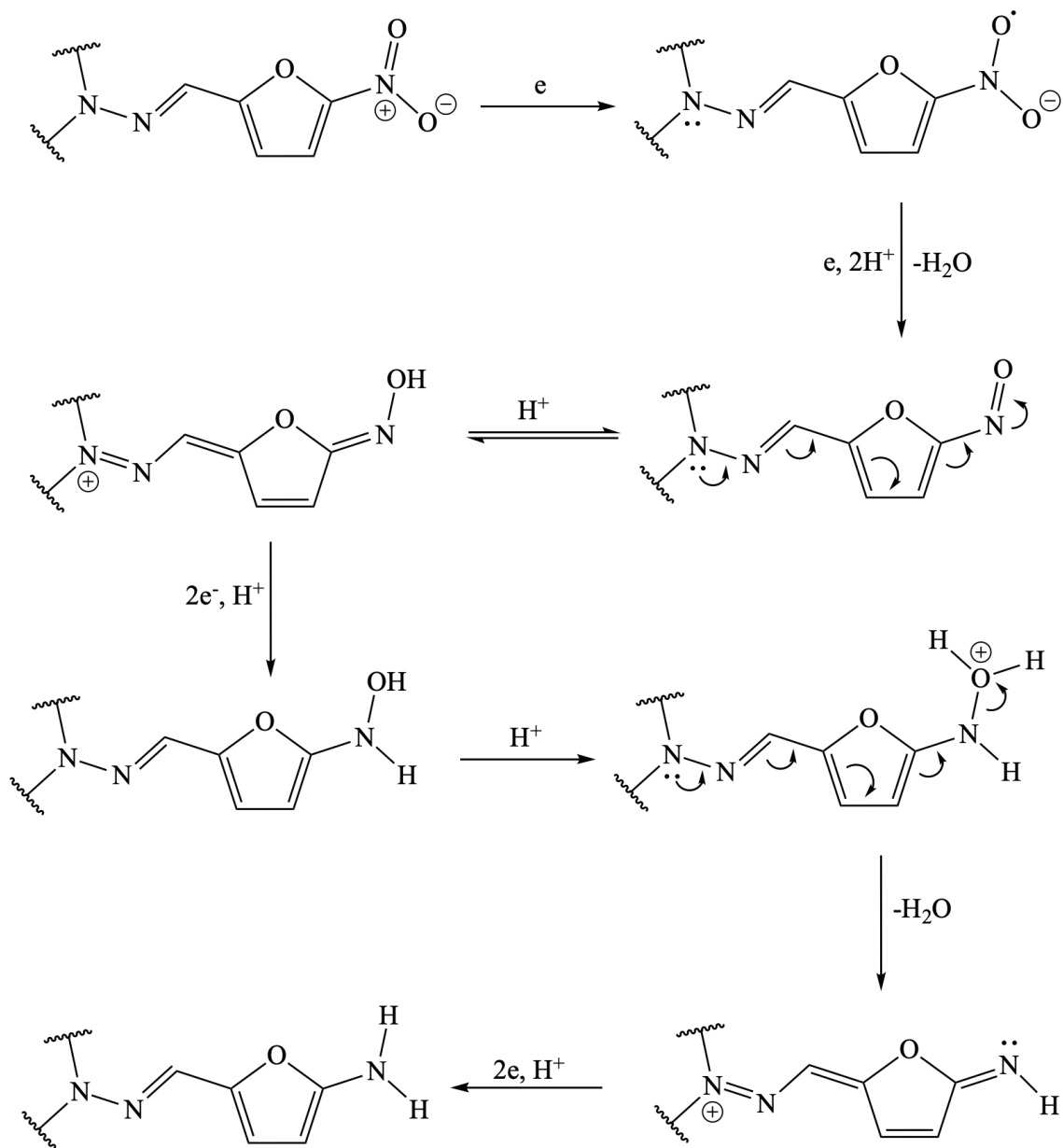
Sumado a lo anterior, una reciente publicación sugiere que la deficiencia electrónica en el nitrógeno del grupo 5-nitro del fármaco nitrofurantoína, favorece su reducción, lo que contribuiría a su toxicidad hepática [67]. Por el contrario, la presencia del grupo electrodonor fenilo en la hidrazona desfavorece la reducción del grupo 5-nitro aún enzimáticamente, probablemente debido a una desestabilización de la estructura resonante del intermediario radicalario [64].

Además, la presencia de los grupos electroattractores ejerce un efecto diferencial sobre el reciclaje redox. Ciertamente, en términos de comparación de los sustituyentes a la hidrazona el grupo semicarbazida tiene la menor capacidad electroattractora, hidantoína es intermedio y las benzohidrazidas tienen una alta capacidad electroattractora (ver 5.3, figuras 14-18). Esto permite explicar porqué, a la misma concentración, **NFZ** genera cuantitativamente menos anión superóxido que **NHT** y ésta menos que el fármaco **NFX** (figura 21). Sumado a lo anterior, está descrito que ni-

furtimeox tiene una capacidad de entrar en reciclaje redox aún menor en comparación a nitrofurantoína y furazolidona, lo que podría estar explicado por la presencia del sustituyente donador de tiomorfolina en la hidrazona [49].

La reducción monoelectrónica del grupo 5-nitro se verá favorecida conforme disminuye la densidad electrónica en el nitrógeno de este grupo [67]. La citocromo P450 reductasa ejerce un mecanismo reductivo de tipo ping-pong, por lo que el radical nitroanión puede reaccionar con oxígeno, o bien, ser reducido nuevamente por esta enzima. De esta forma, se generará el intermediario nitroso, y con ello la posterior generación de la hidroxilamina, los cuales si pueden ser reducidos por otras enzimas como la monooxigenasa citocromo P450 [68–70].

Si bien, el primer paso reductivo dependerá de la disminución en la densidad electrónica de la molécula, los pasos siguientes se verán favorecidos con la presencia de electrones  $\pi$  disponibles para el nitrógeno terminal de la hidrazona [64]. El mecanismo de reducción propuesto en la figura 22, permite comprender de mejor manera la influencia de las sustituciones en la hidrazona sobre el carácter reductivo del grupo 5-nitro, y así explicar los fenómenos observados en los experimentos de generación de anión superóxido.



**Figura 22.** Mecanismo propuesto para la reducción del grupo 5-nitro  
 En mamíferos la reducción del grupo 5-nitro es principalmente monoeléctrica, pero dado el mecanismo tipo ping-pong de la citocromo P450 reductasa, los intermediarios nitroso e hidroxilamina pueden ser metabolizados por otras enzimas como la monooxigenasa citocromo P450.



Los resultados obtenidos muestran que la sola presencia del grupo 5-nitro no es suficiente para inducir la generación de anión superóxido, sino que su ambiente electrónico está directamente relacionado a la capacidad de ser reducido; por lo que el efecto de densidad electrónica en la molécula no sólo influirá en la capacidad del nitrofurano de generar ERO, sino también en la toxicidad relativa a éste.

En el anexo A.5 se muestra un experimento representativo obtenido para los compuestos **5c** y **NFX** (página 108)

## **5.8. EFECTO DE LOS DERIVADOS DE 2-HIDRAZONILFURANO SINTETIZADOS SOBRE LA ACTIVIDAD GST CITOSÓLICA HEPÁTICA**

Las enzimas de la familia de GST catalizan la conjugación de GSH con sustratos lipofílicos y con centros electrofílicos, conformando el primero de los cuatro pasos en la biotransformación de xenobióticos en la ruta de los ácidos mercaptúricos [71]. En particular, los nitrofuranos no son metabolizados a través de esta vía, y de hecho, no existen reportes de conjugados entre GSH y nitrofuranos [42].

Previamente se ha discutido sobre las propiedades electrónicas y lipofílicas de los derivados sintetizados. A pesar de no ser sustratos de estas enzimas, se decidió evaluar el efecto inhibitorio de las moléculas sintetizadas sobre la actividad glutatión

*S*-transferasa de citosol de hígado de rata.

En la tabla se muestra el perfil inhibitorio de los derivados sintetizados sobre la actividad GST. Todos los nitrofuranos fueron capaces de inhibir la actividad GST, pero sólo fue posible calcular una  $CI_{50}$  para **NFZ** y **NHT**, con valores de 157  $\mu\text{M}$  y 136  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

En particular, los derivados no nitrados de la familia **1** no fueron capaces de inhibir la actividad enzimática, probablemente debido a la notoria disminución de la lipofilia de estos al sustituir el grupo nitro, sumado al incremento en la densidad electrónica de estos derivados (ver figuras 14-18 y valores de LogP en tabla 2).

En la familia **2**, sólo fue posible obtener el valor de  $CI_{50}$  para el derivado **2a** (168  $\mu\text{M}$ ), ya que por problemas de solubilidad en las condiciones que se llevó a cabo el experimento, los derivados **2b** y **2c** precipitaban a concentraciones superiores a 150  $\mu\text{M}$ . El efecto inhibitorio de esta molécula sobre la actividad GST se puede explicar en función de la marcada lipofilia de los derivados de la familia **2** (tabla 2). A pesar de poseer un grupo fenilo electrodonor, la lipofilia de estos derivados les permitiría interactuar con las enzimas de esta familia.

**Tabla 8.** Efecto de derivados de 2-hidrazonilfurano sobre la actividad GST de citosol de hígado de rata

Familia	Sustituyente en C-5	CI <sub>50</sub> sobre actividad GST ( $\mu$ M)
1	H ( <b>1a</b> )	n.i.
	CH <sub>3</sub> ( <b>1b</b> )	n.i.
	Br ( <b>1c</b> )	n.i.
	Cl ( <b>1d</b> )	n.i.
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFZ</b> )	157,0 $\pm$ 7, 4
2	H ( <b>2a</b> )	168,0 $\pm$ 23, 9
	Br ( <b>2b</b> )	n.d.
	NO <sub>2</sub> ( <b>2c</b> )	n.d.
3	H ( <b>3a</b> )	n.i.
	CH <sub>3</sub> ( <b>3b</b> )	n.i.
	Br ( <b>3c</b> )	n.i.
	Cl ( <b>3d</b> )	n.i.
	NO <sub>2</sub> ( <b>NHT</b> )	136,4 $\pm$ 6, 1
4	H ( <b>4a</b> )	n.i.
	CH <sub>3</sub> ( <b>4b</b> )	128,4 $\pm$ 10, 0
	Br ( <b>4c</b> )	197,8 $\pm$ 18, 8
	Cl ( <b>4d</b> )	98,7 $\pm$ 10, 1
	NO <sub>2</sub> ( <b>4e</b> )	n.d.
5	H ( <b>5a</b> )	n.i.
	CH <sub>3</sub> ( <b>5b</b> )	n.i.
	Br ( <b>5c</b> )	153,6 $\pm$ 19, 7
	Cl ( <b>5d</b> )	n.i.
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFX</b> )	n.d.

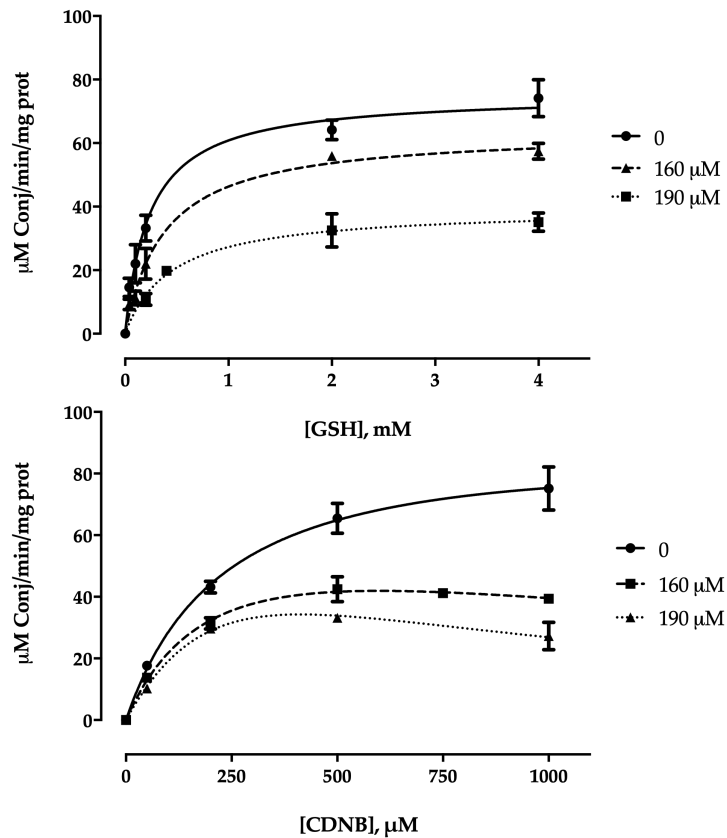
Los valores son expresados como CI<sub>50</sub> sobre la actividad GST evaluada según lo descrito anteriormente (sección 4.3.6). Todos los resultados están expresados como promedio y desviación estándar como el resultado de 3 experimentos independientes. (n.i.: no inhibe en el rango de concentraciones evaluados; n.d.: no determinado por problemas de solubilidad).

Respecto de la familia **3**, sólo el fármaco nitrofurantoína (**NHT**) fue capaz de inhibir la actividad GST. La pérdida en la capacidad inhibitoria por los derivados no nitrados, puede deberse a lo descrito previamente para la familia **1**: pérdida de

lipofilia e incremento de la densidad electrónica en el esqueleto farmacofórico. En particular para **NHT**, se procedió a determinar el mecanismo de inhibición que este fármaco ejerce sobre las GST (figura 23). Esta familia de enzimas se caracteriza por poseer dos sustratos, lo que implicó la determinación del mecanismo de inhibición para cada sustrato en particular (GSH y CDNB). Los resultados indican que **NHT** disminuye los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para ambos sustratos, lo que sugiere un sitio de unión alostérico (o sitios) en las enzimas, lo que provocaría cambios conformacionales tales que se inhibiría la actividad enzimática.

Los derivados de la familia **4**, todos fueron capaces de inhibir la actividad GST. Esto se deberá al perfil lipofílico asociado a esta familia (todas las moléculas presentan un *consensus* LogP mayor a 2, ver tabla 2), sumado a la deficiencia electrónica en la porción de 2-hidrazonilfurano, evidenciada en los mapas de potencial electrostático.

Para los derivados de la familia **5**, sólo los derivados con grupos electroattractores **5c** y **NFX** fueron capaces de inhibir la actividad GST, pudiendo obtener un valor de  $CI_{50}$  únicamente para el derivado **5c** por problemas de solubilidad con **NFX**. Los cambios en la densidad electrónica y en el perfil lipofílico de estos derivados, sugieren la pérdida en la capacidad inhibitoria de esta familia, efectos explicados con anterioridad.



**Figura 23.** Mecanismo de inhibición de nitrofurantoína sobre la actividad GST citosólica

El mecanismo de inhibición de la actividad GST se determinó con dos concentraciones de **NHT** superiores al  $CI_{50}$  sobre la actividad GST (160 y 190  $\mu M$ ). Arriba: curva para GSH a una concentración de CDNB constante (1 mM), Abajo: curva para CDNB a una concentración de GSH constante (4 mM). Cada punto expresa el promedio y desviación estándar de al menos dos experimentos independientes

Tal y como se mencionó anteriormente, un estudio sobre la enzima glutatión *S*-transferasa B-1 (GSTB-1) de la bacteria gram-negativa *Proteus mirabilis* determinó que esta enzima es inhibida por una gran cantidad de antibióticos, entre los cuales

se encuentra nitrofurantoína [41]. Este estudio no profundiza mayormente en la interacción de nitrofurantoína con GST, sin embargo, se destaca que los cambios en los parámetros enzimáticos de la enzima (disminución de la  $k_{cat}$  y de la  $K_m$  para CDNB y GSH) sugieren la unión de este fármaco a un sitio (o sitios) diferente al de sitio de unión a GSH (sitio catalítico) y al del sustrato CDNB (sitio hidrofóbico, denominado sitio H), y que esta unión produciría un cambio conformacional que inhibiría así la actividad GST. Los autores del mencionado estudio destacan que esta isoforma de la enzima bacteriana, a pesar de ser secuencialmente diferente, es similar estructuralmente a las enzimas de mamífero.

Sumado a lo anterior, un estudio sobre los efectos de la biotransformación de nitrofurantoína y nifurtimox en microsomas hepáticos de rata mostró que estos fármacos inhiben la actividad GST microsómica hepática [72].

Los resultados obtenidos demuestran que los nitrofuranos inhiben la actividad GST de citosol hepático de rata de una forma concentración dependiente. Además, los resultados obtenidos con nitrofurantoína sobre la actividad GST sugieren que este antibiótico inhibiría la actividad enzimática a través de la unión a sitios alostéricos de la enzima, de una manera similar a lo descrito por Perito et al. [41].

## 5.9. EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS 2-HIDRAZONILFURANO DERIVADOS DE SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Los nitrofuranos corresponden a una familia de fármacos con conocidas propiedades antibacterianas y antiparasitarias. El efecto antibacteriano ha sido atribuido a la reducción dielectrónica del grupo 5-nitro a través de enzimas nitroreductasas de tipo I. Debido a que los derivados 2-hidrazonilfurano presentan diferentes sustituyentes en la posición 5 del anillo furano se decidió evaluar el efecto de estos sobre cultivos bacterianos.

Con este propósito, se escogió una cepa gram-negativa (*E. coli*) y una cepa gram-positiva (*S. aureus*). Los ensayos indican que la actividad antibacteriana, en las condiciones evaluadas, se pierde cuando el grupo 5-nitro ha sido reemplazado (tabla 9).

Interesantemente, el derivado nitrado **2c** no exhibe actividad antibacteriana en todo el rango de concentraciones evaluadas, a pesar de ser este el más citotóxico de los derivados sintetizados. Estos resultados, pueden explicarse en base a lo descrito previamente respecto de la densidad electrónica de este y su incapacidad de ser reducido (ver secciones 5.3 y 5.7, figuras 15 y 21, respectivamente).

**Tabla 9.** Determinación de la CIM bacteriana de los 2-hidrazonilfurano derivados

Familia	Sustituyente en C-5 (compuesto)	CIM sobre cepas bacterianas ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	H ( <b>1a</b> )	>64	>64
	CH <sub>3</sub> ( <b>1b</b> )	>64	>64
	Br ( <b>1c</b> )	>64	>64
	Cl ( <b>1d</b> )	>64	>64
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFZ</b> )	8	16
2	H ( <b>2a</b> )	>64	>64
	Br ( <b>2b</b> )	>64	>64
	NO <sub>2</sub> ( <b>2c</b> )	>32	>32
3	H ( <b>3a</b> )	>64	>64
	CH <sub>3</sub> ( <b>3b</b> )	>64	>64
	Br ( <b>3c</b> )	>64	>64
	Cl ( <b>3d</b> )	>64	>64
	NO <sub>2</sub> ( <b>NHT</b> )	8	16
4	H ( <b>4a</b> )	>64	>64
	CH <sub>3</sub> ( <b>4b</b> )	>64	>64
	Br ( <b>4c</b> )	>64	>64
	Cl ( <b>4d</b> )	>64	>64
	NO <sub>2</sub> ( <b>4e</b> )	>32	>32
5	H ( <b>5a</b> )	>64	>64
	CH <sub>3</sub> ( <b>5b</b> )	>64	>64
	Br ( <b>5c</b> )	>64	>64
	Cl ( <b>5d</b> )	>64	>64
	NO <sub>2</sub> ( <b>NFX</b> )	32	8

Los resultados se expresan como el valor de la concentración de la molécula que inhibió el crecimiento bacteriano observado en tres experimentos independientes.

Los controles internos gentamicina y vancomicina exhibieron una CIM de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$  para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, en todos los experimentos realizados.

El incremento en la densidad electrónica producto de la sustitución de la hidrazona con un fenilo donador de electrones, desfavorece las estructuras resonantes que ocurren durante el proceso reductivo del grupo 5-nitro, impidiendo de esta forma



la reducción de éste. De esta forma, para el caso de microorganismos que reducen grupos nitros principalmente a través de un mecanismo dielectrónico, la reducción se vería igualmente desfavorecida que para las enzimas de mamíferos.

Estos resultados sugieren, que la actividad antibacteriana de nitrofuranos no depende únicamente de la presencia del grupo 5-nitro, sino de la capacidad de este de ser reducido, lo que viene determinado por la densidad electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano de acuerdo al grupo presente en la hidrazona.

En el anexo A.6 se muestra un experimento representativo obtenido para derivados de la familia **3** (figura 32, página 109)

## 6. CONCLUSIONES

1. La citotoxicidad de 2-hidrazonilfuranos no es dependiente de la presencia del grupo 5-nitro.
2. La capacidad de generación de ERO intracelular es dependiente de la disminución en la densidad electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano.
3. La capacidad de generación de ERO intracelular no depende de la presencia del grupo 5-nitro.
4. La capacidad de nitrofuranos de ser reducidos a través de la enzima citocromo P450 reductasa depende de la densidad electrónica en la porción 2-hidrazonilfurano.
5. Los nitrofuranos son inhibidores de la actividad GST de citosol hepático de rata.
6. El efecto antibacteriano de nitrofuranos está influenciado por la densidad electrónica de la porción 2-hidrazonilfurano

## 7. REFERENCIAS

- [1] Thomas J. Schwan and Frank H. Ebetino. Antibacterial Agents, Nitrofurans. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 65(11):1043–1081, 2000.
- [2] William B. Stillman, Albert B. Scott, and J. Marion Clampita. Antiseptic. US Patent 2,319,481, may -18” 1943.
- [3] M. C. Dodd, W. B. Still, Martha Roys, and Catherine Crosby. The In Vitro Bacteriostatic Action of Some Simple Furan Derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82(1):11–18, 1944.
- [4] José A Castro, María Montalto de Mecca, Laura C Bartel, María Montalto De Mecca, Laura C Bartel, María Montalto de Mecca, and Laura C Bartel. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas’ Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25(8):471–479, 2006.
- [5] Natascha NT Goemaere, Karin Grijm, Peter Th W van Hal, and Michael A Den Bakker. Nitrofurantoin-induced pulmonary fibrosis: a case report. *Journal of medical case reports*, 2(1):169, 2008.
- [6] Ik Lin Tan, Michael J Polydefkis, Gigi J Ebenezer, Peter Hauer, and Justin C McArthur. Peripheral nerve toxic effects of nitrofurantoin. *Archives of neurology*, 69(2):265–268, 2012.
- [7] Satyavan Sharma and Nitya Anand. Nitroheterocycles. In *Pharmacochemistry Library*, volume 25, pages 421–438. Elsevier, 1997.
- [8] María Dolores Roldán, Eva Pérez-Reinado, Francisco Castillo, and Conrado Moreno-Vivián. Reduction of polynitroaromatic compounds: The bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3):474–500, 2008.

- [9] J Peterson and P Mason. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(151):4009–4014, 1979.
- [10] Ali Ryan, Elise Kaplan, Nicola Laurieri, Edward Lowe, and Edith Sim. Activation of nitrofurazone by azoreductases: Multiple activities in one enzyme. *Scientific Reports*, 1:1–5, 2011.
- [11] Shane R. Wilkinson, Martin C. Taylor, David Horn, John M. Kelly, and Ian Cheeseman. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13):5022–5027, 2008.
- [12] Michael R. Boyd, Ann W. Stiko, and Henry A. Sasame. Metabolic activation of nitrofurantoin-possible implications for carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 28(5):601–606, 1979.
- [13] A. J. Streeter, T. R. Krueger, and B. A. Hoener. Oxidative metabolites of 5-nitrofurans. *Pharmacology*, 36(4):283–288, 1988.
- [14] Linus Sandegren, Anton Lindqvist, Gunnar Kahlmeter, and Dan I. Andersson. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3):495–503, 2008.
- [15] CC McOsker and PM Fitzpatrick. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(suppl A):23–30, 1994.
- [16] S. Danson, T.H Ward, J. Butler, and M. Ranson. DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30(5):437–449, 2004.

- [17] R. Kato, A. Takahashi, and T. Oshima. Characteristics of nitro reduction of the carcinogenic agent, 4-nitroquinolone N-oxide. *Biochemical Pharmacology*, 19(1):45–55, 1970.
- [18] W.B. Jakoby, J.R. Bend, and J. Caldwell. *Metabolic basis of detoxication: metabolism of functional groups*. Biochemical pharmacology and toxicology. Academic Press, 1982.
- [19] Yun Wang, Joshua P Gray, Vladimir Mishin, Diane E Heck, Debra L. Laskin, and Jeffrey D Laskin. Role of cytochrome P450 reductase in nitrofurantoin-induced redox cycling and cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6):1169–1179, 2008.
- [20] Tsutomu Shimada, Raymond L. Mernaugh, and F. Peter Guengerich. Interactions of mammalian cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5 enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(1):207–216, 2005.
- [21] Ronald L. Koder, Chad A. Haynes, Michael E. Rodgers, David W. Rodgers, and Anne Frances Miller. Flavin thermodynamics explain the oxygen insensitivity of enteric nitroreductases. *Biochemistry*, 41(48):14197–14205, 2002.
- [22] ME Letelier, F Hidalgo-Castro, Miguel López-Valladares, N Ibacache, C Pérez, J Brunner, J González, R Gutmann, C Lazo-Henríquez, C Gallardo-Garrido, et al. Bg126® phytodrug improves urinary tract infection treatment with nitrofurantoin in adult women in a double-blind randomized clinical trial. *Journal of herbal medicine*, 9:60–67, 2017.
- [23] Nonkululeko H Zuma, Janine Aucamp, and DN'Da David. An update on de-

- rivatisation and repurposing of clinical nitrofurans drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 140(August):105092, 2019.
- [24] Narimantas K. Čėnas, Daiva A. Bironaitė, Juozas J. Kulys, and Nina M. Sukhova. Interaction of nitrofurans with glutathione reductase. *BBA - General Subjects*, 1073(1):195–199, 1991.
- [25] J. Meng, S.S. Mangat, I.P. Grudzinski, and F.C.P. Law. Evidence of 14C-Furazolidone Metabolite Binding to the Hepatic DNA of Trout. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 14(4), 1998.
- [26] P. L. Olive. Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles. II. Mechanisms of cytotoxicity. *British Journal of Cancer*, 40(1):94–104, 1979.
- [27] Laura Cecilia Bartel, M Montalto de Mecca, and Jose Alberto Castro. Nitroreductive metabolic activation of some carcinogenic nitro heterocyclic food contaminants in rat mammary tissue cellular fractions. *Food and chemical toxicology*, 47(1):140–144, 2009.
- [28] Mohammed H. Daba, Kamal E. El-Tahir, Mohammed N. Al-Arifi, and Othman A. Gubara. Drug-induced pulmonary fibrosis. *Saudi Medical Journal*, 25(6):700–706, 2004.
- [29] Louis H.M. Vroomen, John P Groten, Kees van Muiswinkel, Albertus van Velhuizen, and Peter J. van Bladeren. Identification of a reactive intermediate of furazolidone formed by swine liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 64(1-2):167–179, 1987.
- [30] Christopher Bot, Belinda S. Hall, Guzmán Álvarez, Rossanna Di Maio, Mercedes González, Hugo Cerecetto, and Shane R. Wilkinson. Evaluating 5-nitrofurans

- as trypanocidal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4):1638–1647, 2013.
- [31] John J Gavin, Frank F Ebetino, R Freedman, and WE Waterbury. The aerobic degradation of 1-(5-nitrofurfurylideneamino)-2-imidazolidinone (nf-246) by escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics*, 113(2):399–404, 1966.
- [32] D. R. McCalla. Mutagenicity of nitrofurans derivatives: Review. *Environmental Mutagenesis*, 5(5):745–765, 1983.
- [33] Sana Sarvi, Richard Crispin, Yuting Lu, Lifan Zeng, Thomas D. Hurley, Douglas R. Houston, Alex von Kriegsheim, Che Hong Chen, Daria Mochly-Rosen, Marco Ranzani, Marie E. Mathers, Xiaowei Xu, Wei Xu, David J. Adams, Neil O. Carragher, Mayumi Fujita, Lynn Schuchter, Asier Unciti-Broceta, Valerie G. Brunton, and E. Elizabeth Patton. ALDH1 Bio-activates Nifuroxazide to Eradicate ALDH High Melanoma-Initiating Cells. *Cell Chemical Biology*, 25(12):1456–1469.e6, 2018.
- [34] Linna Zhou, Hironori Ishizaki, Michaela Spitzer, Kerrie L. Taylor, Nicholas D. Temperley, Stephen L. Johnson, Paul Brear, Philippe Gautier, Zhiqiang Zeng, Amy Mitchell, Vikram Narayan, Ewan M. McNeil, David W. Melton, Terry K. Smith, Mike Tyers, Nicholas J. Westwood, and E. Elizabeth Patton. ALDH2 mediates 5-nitrofurans activity in multiple species. *Chemistry and Biology*, 19(7):883–892, 2012.
- [35] Irene Ma and Alison L. Allan. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2):292–306, 2011.
- [36] Eman Said, Sawsan A. Zaitone, Mohamed Eldosoky, and Nehal M. Elsherbiny.

- Nifuroxazide, a STAT3 inhibitor, mitigates inflammatory burden and protects against diabetes-induced nephropathy in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 281:111–120, 2018.
- [37] F. Yang, M. Hu, Q. Lei, Y. Xia, Y. Zhu, X. Song, Y. Li, H. Jie, C. Liu, Y. Xiong, Z. Zuo, A. Zeng, L. Yu, G. Shen, D. Wang, Y. Xie, T. Ye, and Y. Wei. Nifuroxazide induces apoptosis and impairs pulmonary metastasis in breast cancer model. *Cell death & disease*, 6(3):e1701, 2015.
- [38] Yi Luo, Anqi Zeng, Aiping Fang, Linjiang Song, Chen Fan, Chenjuan Zeng, Tinghong Ye, Hao Chen, Chongqi Tu, and Yongmei Xie. Nifuroxazide induces apoptosis, inhibits cell migration and invasion in osteosarcoma. *Investigational New Drugs*, 37(5):1006–10013, 2019.
- [39] Yongxia Zhu, Tinghong Ye, Xi Yu, Qian Lei, Fangfang Yang, Yong Xia, Xuejiao Song, Li Liu, Hongxia Deng, Tiantao Gao, Cuiting Peng, Weiqiong Zuo, Ying Xiong, Lidan Zhang, Ningyu Wang, Lifeng Zhao, Yongmei Xie, Luoting Yu, and Yuquan Wei. Nifuroxazide exerts potent anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma. *Scientific Reports*, 6(February):1–13, 2016.
- [40] Randall T. Peterson. 5-Nitrofurans and Cancer: Teaching an Old Drug New Tricks. *Cell Chemical Biology*, 25(12):1439–1440, 2018.
- [41] Brunella Perito, Nerino Allocati, Enrico Casalone, Michele Masulli, Beatrice Dragani, Mario Polsinelli, Antonio Aceto, and Carmine D I Ilio. Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. *Biochemical Journal*, 318(1):157–162, 1996.
- [42] Kazuo Asaoka and Kenji Takahashi. Glutathione conjugation of nitro com-



- pounds by monkey glutathione S-transferases. *Biochemical Pharmacology*, 38 (18):2977–2983, 1989.
- [43] Sevim Rollas and S. Güniz Küçükgülzel. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*, 12(8):1910–1939, 2007.
- [44] ME Letelier, CA Gallardo-Garrido, CL Villar-Bustamante, and G Díaz-Véliz. Relationship between antioxidant and anxiolytic activity of standardized extracts of melissa officinalis and rosmarinus officinalis. *Int J Phytomedicine doi*, 7(3):343–354, 2015.
- [45] Ana Cristina Lima Leite, Diogo Rodrigo de M. Moreira, Lucas Cunha Duarte Coelho, Frederico Duarte de Menezes, and Dalci José Brondani. Synthesis of aryl-hydrazones via ultrasound irradiation in aqueous medium. *Tetrahedron Letters*, 49(9):1538–1541, 2008.
- [46] Antoine Daina, Olivier Michielin, and Vincent Zoete. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7:1–13, 2017.
- [47] Guillermo Repetto, Ana del Peso, and Jorge L. Zurita. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7): 1125–1131, 2008.
- [48] Kelly L. Wolfe and Hai Liu Rui. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22):8896–8907, 2007.
- [49] M. Faúndez, M. Rojas, P. Bohle, C. Reyes, M. E. Letelier, M. E. Aliaga, H. Speisky, E. Lissi, and C. López-Alarcón. Pyrogallol red oxidation induced by

- superoxide radicals: Application to evaluate redox cycling of nitro compounds. *Analytical Biochemistry*, 419(2):284–291, 2011.
- [50] J. Cortés-Ríos, M.J. Torres, M.P. Campos-Bustamante, J. Romero-Parra, M.E. Letelier, D. Pessoa-Mahana, H. Chung, and M. Faúndez. NADPH oxidase activity: Spectrophotometric determination of superoxide using pyrogallol red. *Analytical Biochemistry*, 536:96–100, 2017.
- [51] William H. Habig and William B. Jakoby. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in Enzymology*, volume 77, pages 398–405. Elsevier, 1981.
- [52] Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, Rose J Randall, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193: 265–275, 1951.
- [53] EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9): 509–515, 2000.
- [54] Belinda S. Hall, Christopher Bot, and Shane R. Wilkinson. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15):13088–13095, 2011.
- [55] Hossen Mahdavi and Bahman Tamami. Reduction of nitro-aryl compounds with zinc in the presence of poly [n-(2-aminoethyl) acrylamido] trimethylammonium chloride as a phase-transfer catalyst. *Synthetic communications*, 35(8):1121–1127, 2005.
- [56] Frank F. Ebetino, James J. Carroll, and Gabriel Gever. Reduction of Nitrofu-

- rans. I. Aminofurans. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 5 (3):513–524, 1962.
- [57] Martine Largeron and Maurice-Bernard Fleury. Electrochemical synthesis of 2-substituted 5-aminofurans. *Tetrahedron Letters*, 32(5):631–634, 1991.
- [58] Francis A Carey and Richard J Sundberg. *Advanced organic chemistry: part A: structure and mechanisms*, pages 95 – 103. Springer Science & Business Media, 2007.
- [59] Tse Lok Ho. The Hard Soft Acids Bases (HSAB) Principle and Organic Chemistry. *Chemical Reviews*, 75(1):1–20, 1975.
- [60] Ludwik Kómorowski, Józef Lipiński, and Maciej J. Pyka. Electronegativity and hardness of chemical groups. *Journal of Physical Chemistry*, 97(13):3166–3170, 1993.
- [61] Christopher A. Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W. Dominy, and Paul J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3):3–25, 1997.
- [62] E. Atala, G. Velásquez, C. Vergara, C. Mardones, J. Reyes, R. A. Tapia, F. Quina, M. A. Mendes, H. Speisky, E. Lissi, M. S. Ureta-Zañartu, A. Aspée, and C. López-Alarcón. Mechanism of pyrogallol red oxidation induced by free radicals and reactive oxidant species. A kinetic and spectroelectrochemistry study. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(17):4870–4879, 2013.
- [63] Audronė Marozienė, Mindaugas Lesanavičius, Elisabeth Davioud-Charvet, Alessandro Aliverti, Philippe Grellier, Jonas Šarlauskas, and Narimantas Čėnas. Antiplasmodial Activity of Nitroaromatic Compounds: Correlation with Their Re-

- duction Potential and Inhibitory Action on Plasmodium falciparum Glutathione Reductase. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(24):1–15, 2019.
- [64] Alfonso Morales, Pablo Richter, and M.és Toral@. Voltammetric behaviour of nitrofurazone, furazolidone and other nitro derivatives of biological importance. *The Analyst*, 112(7):965–970, 1987.
- [65] Robert A. Newman, Michael J Strauss, and Richard Renfrow. Correlation of antitumor activity and electron deficiency of nitrofuranylhydrazone compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(7):831–832, 1982.
- [66] P. L. Olive. Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles I. Correlation with half-wave reduction potential. *British Journal of Cancer*, 40(1):89–93, 1979.
- [67] Hui Li, Zhengyu Zhang, Xiaojing Yang, Xu Mao, Ying Wang, Jian Wang, Ying Peng, and Jiang Zheng. Electron Deficiency of Nitro Group Determines Hepatic Cytotoxicity of Nitrofurantoin. *Chemical Research in Toxicology*, 32(4):681–690, 2019.
- [68] Narimantas Cenas, Zilvinas Anusevicius, Daiva Bironaite, Galina I Bachmanova, Alexander I Archakov, and Karin Ollinger. The electron-transfer reactions of nadph-cytochrome p450 reductase with nonphysiological oxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(2):400–406, 1994.
- [69] Nobuhiro Harada and Tsuneo Omura. Participation of cytochrome p-450 in the reduction of nitro compounds by rat liver microsomes. *The Journal of Biochemistry*, 87(5):1539–1554, 1980.
- [70] Arnold R Goeptar, Heleen Scheerens, and Nico PE Vermeulen. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome p450. *Critical reviews in toxicology*, 25(1):25–65, 1995.

- [71] Roberta Masella and Giuseppe Mazza. *Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease*. John Wiley & Sons, 2009.
- [72] ME Letelier, P Iturra-Montecinos, and CA Gallardo-Garrido. Herbal extracts differentially inhibit oxidative effects caused by the biotransformation of nifurtimox , nitrofurantoin and acetaminophen on rat liver microsomes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(2):88–98, 2017.

# A. EXPERIMENTOS REPRESENTATIVOS

## A.1. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular A549

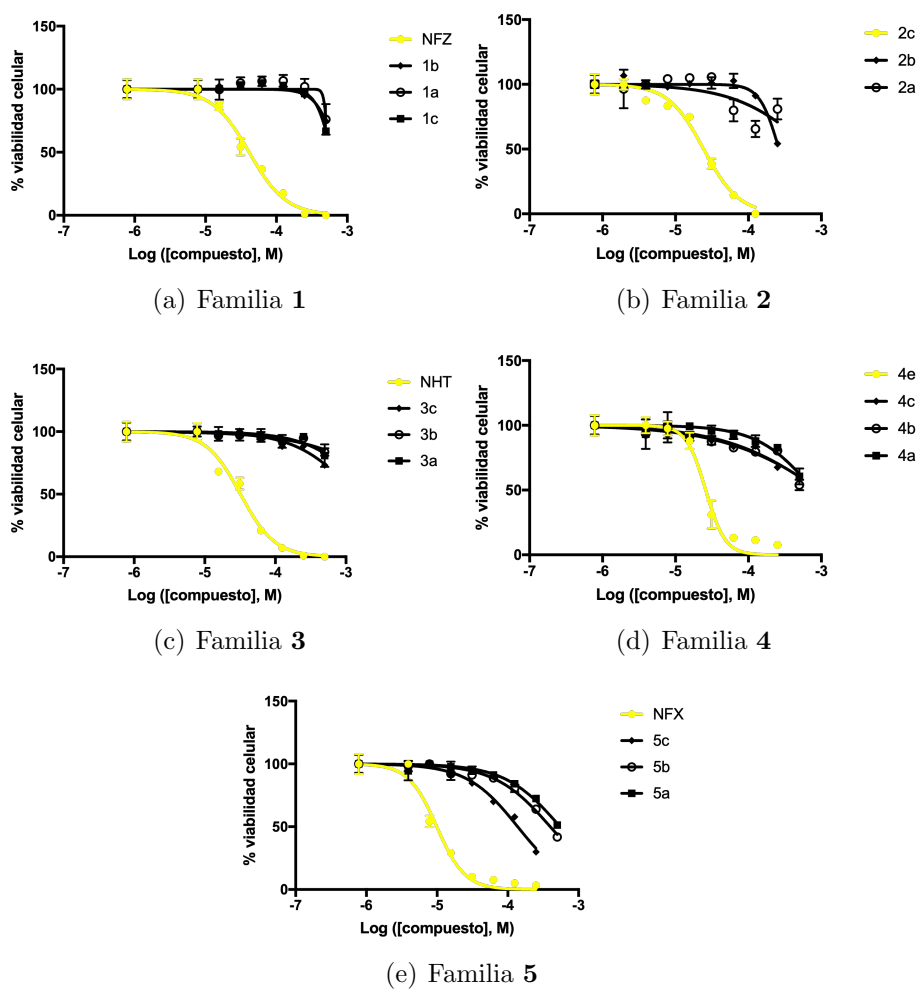
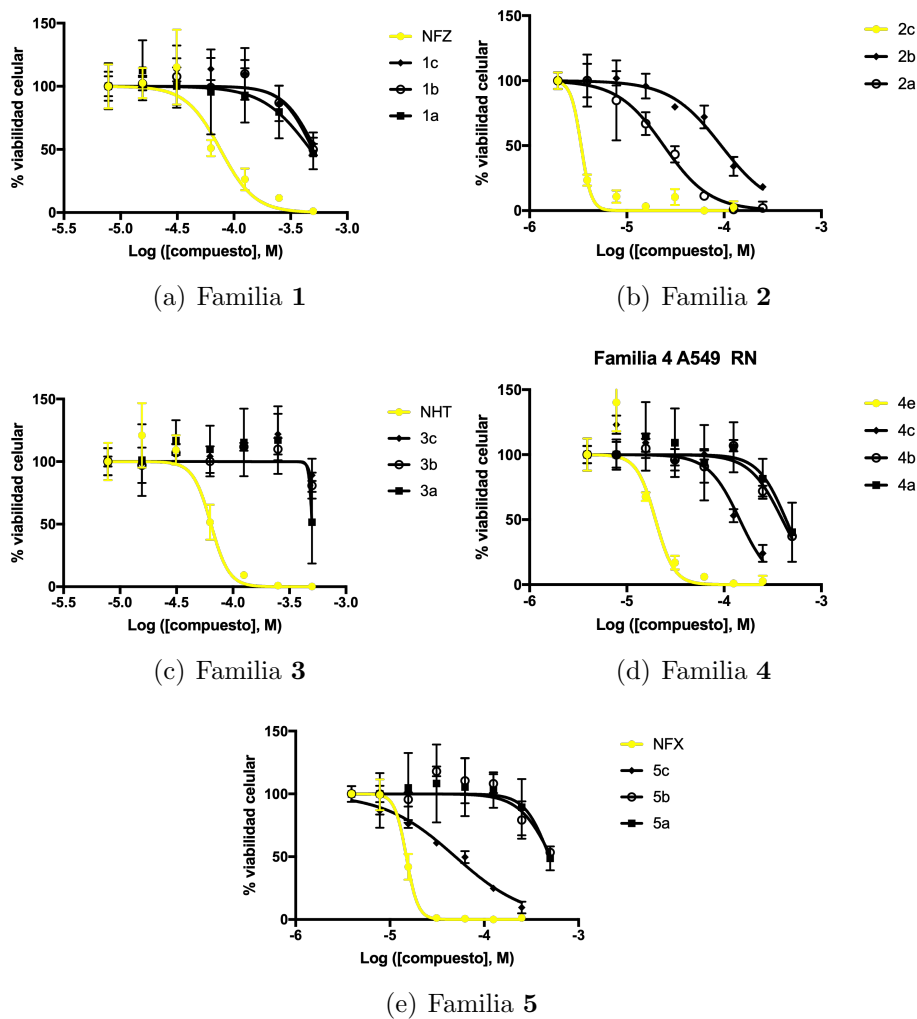


Figura 24. Experimentos Viabilidad por MTT en Línea Celular A549  
Cada condición fue evaluada en triplicado.



**Figura 25.** Experimentos Viabilidad por RN en Línea Celular A549  
Cada condición fue evaluada en triplicado.

A.2. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular Hep G2

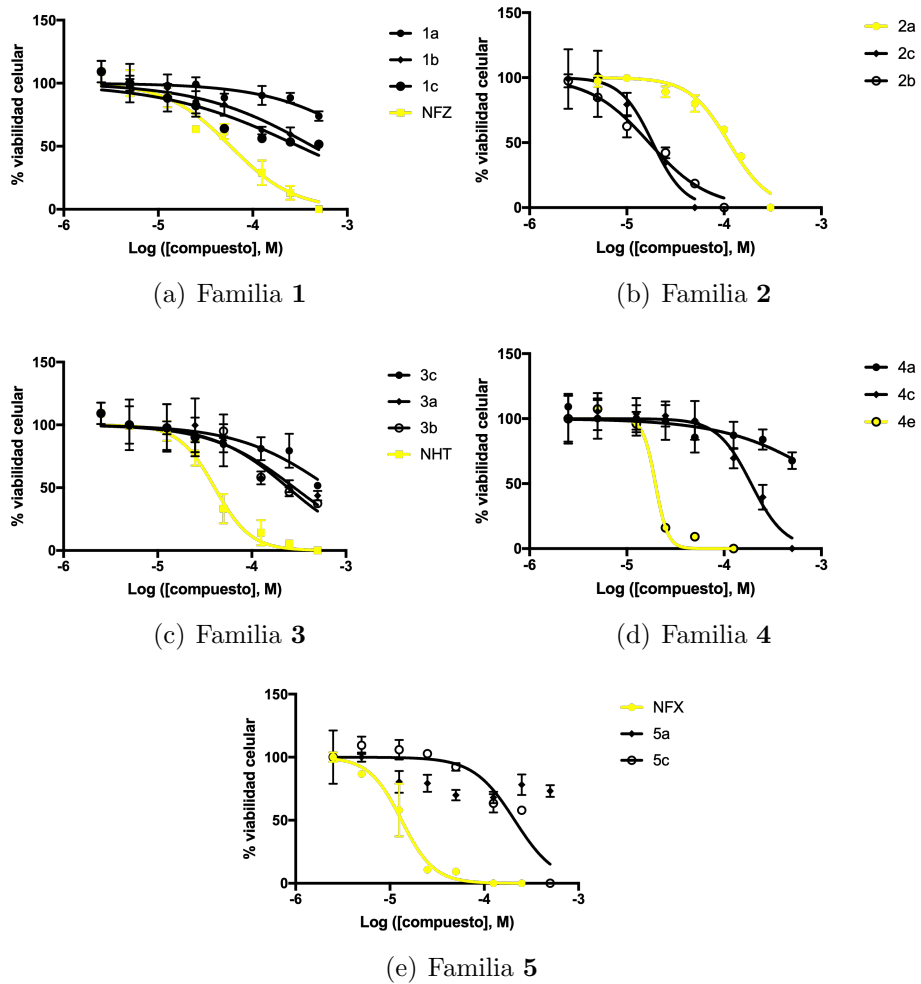
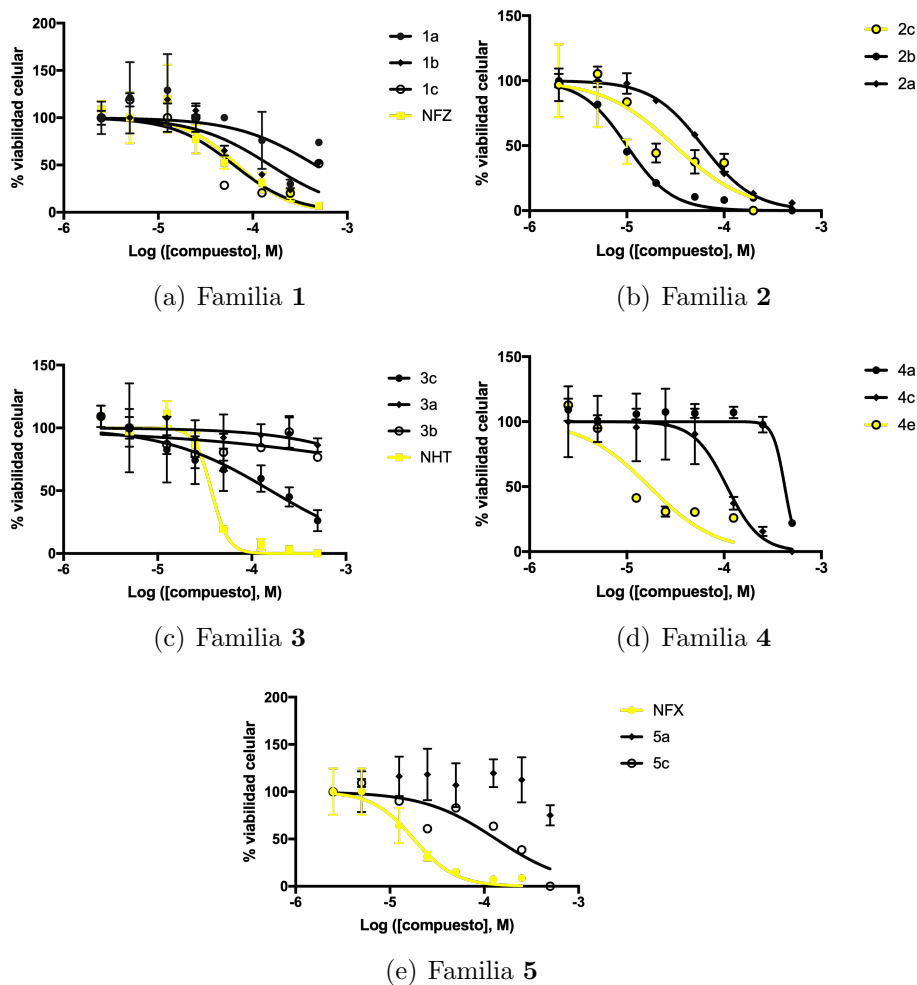


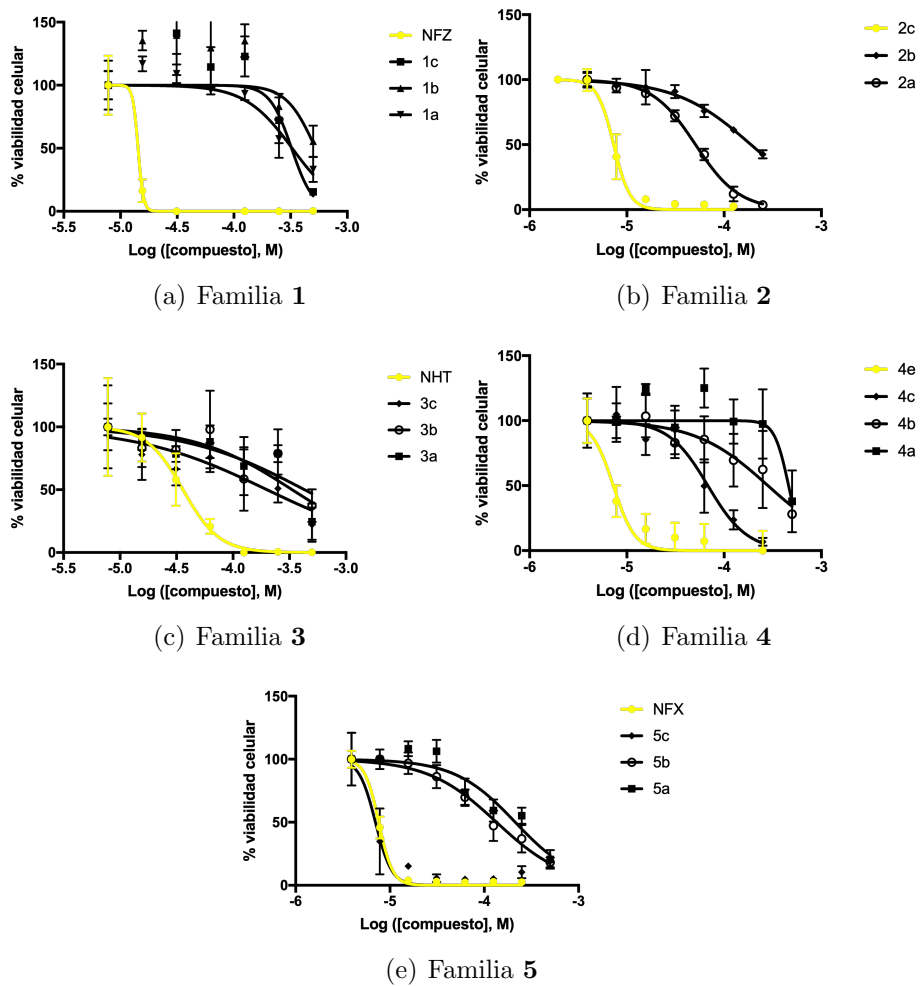
Figura 26. Experimentos Viabilidad por MTT en Línea Celular Hep G2  
Cada condición fue evaluada en triplicado.





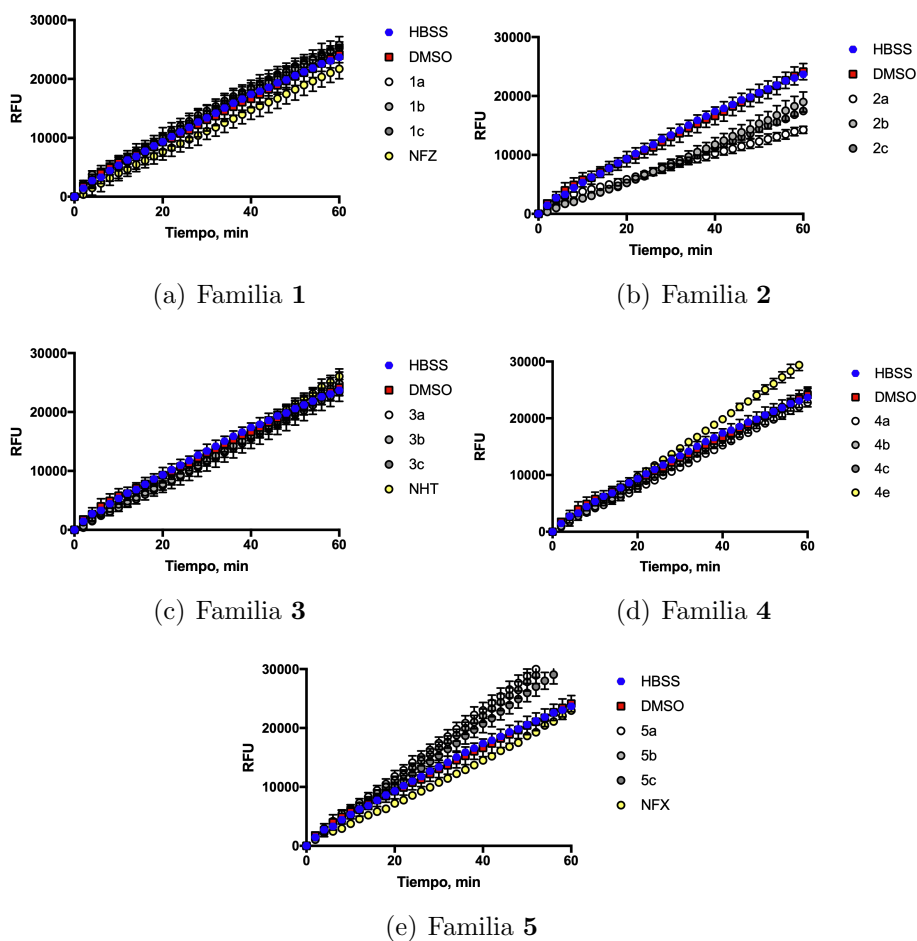
**Figura 27.** Experimentos Viabilidad por RN en Línea Celular Hep G2  
Cada condición fue evaluada en triplicado.

### A.3. Experimentos Representativos de Viabilidad Obtenidos en la Línea Celular HL-60



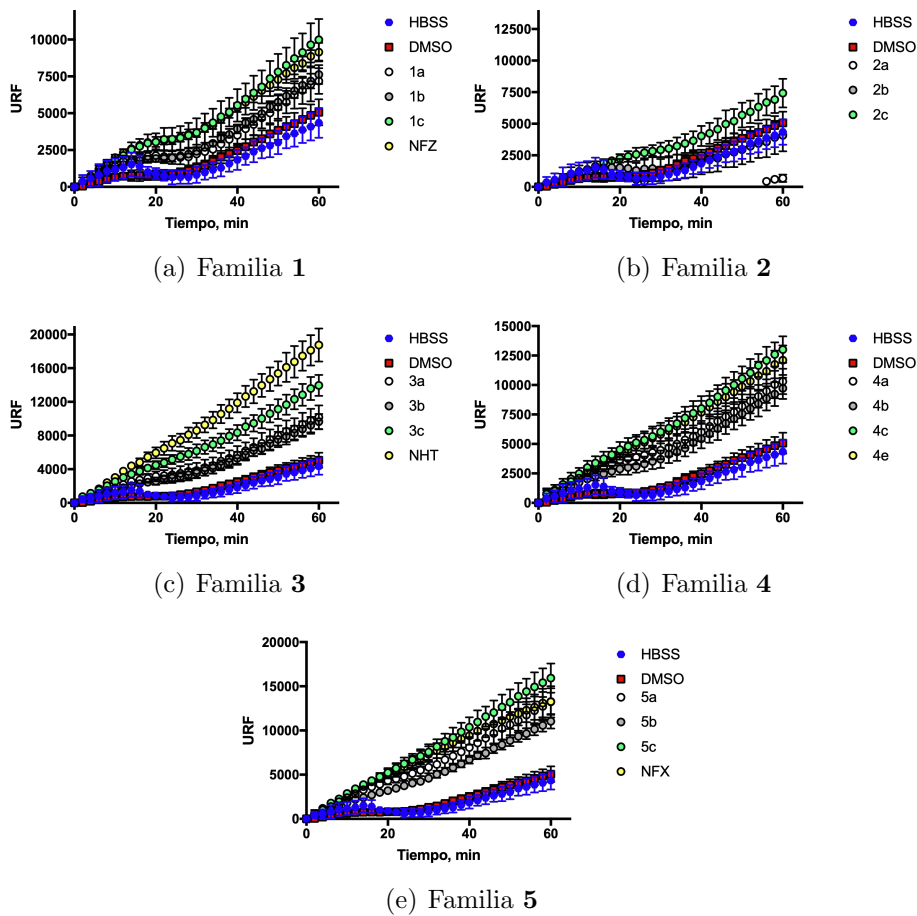
**Figura 28.** Experimentos Viabilidad por RN en Línea Celular HL-60  
Cada condición fue evaluada en triplicado.

#### A.4. Experimentos Representativos de Generación de ERO intracelular



**Figura 29.** Experimentos representativos de generación de ERO intracelular en la Línea HL-60

Resultados normalizados. No se incluyó en los gráficos la condición  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100 \mu\text{M}$ .  
Cada condición fue evaluada con 4 réplicas.



**Figura 30.** Experimentos representativos de generación de ERO intracelular en la Línea Hep G2  
 Resultados normalizados. No se incluyó en los gráficos la condición  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100 \mu\text{M}$ .  
 Cada condición fue evaluada con 4 réplicas.

Los resultados de la generación de ERO intracelular fueron calculados considerando la linealidad en la curva. Cada experimento  $n$  fue analizado en particular, y los cálculos fueron realizados de la siguiente forma:

Para cada curva fue sustraído el valor inicial donde la curva comenzara a ser lineal. Este valor de unidad relativa de fluorescencia será denominado  $URF_{normalizado}$ , el cual fue calculado de la siguiente forma:

$$URF_{normalizado} = URF_{experimento} - URF_{t=0} \quad (1)$$

donde  $URF_{experimento}$  corresponde al valor *crudo* obtenido experimentalmente, y  $URF_{T=0}$  corresponde al valor inicial de URF en el tiempo (ver figura (29)). Así, cada curva partiría desde un valor de  $URF_{normalizado,t=0} = 0$ .

Luego, fue calculada la regresión lineal para cada recta, con lo que se obtuvieron pendientes para cada experimento individual denominadas  $m_{experimento}^n$ , donde *experimento* corresponde a la condición evaluada (*e.g.* compuesto **2a**) y  $n$  a la réplica del experimento (*e.g.* pocillo C8 de la placa de 96 pocillos). Además, las pendiente del control se denominan  $m_{control}^n$  para diferenciarlas de las pendientes experimentales. Las pendientes fueron calculadas según:

$$m_{experimento}^n = \frac{\sum_{t=0}^T (URF_{experimento}^n - \overline{URF}_{experimento}^n)(t - \bar{t})}{\sum_{t=0}^T (t - \bar{t})^2} \quad (2)$$

Donde  $T$  corresponde al tiempo final considerado para el cálculo de la recta,  $\bar{t}$  al valor promedio de todos los tiempos considerados y  $\overline{URF}_{experimento}$  corresponde al valor promedio de los resultados de fluorescencia. Las pendientes de los controles fueron promediadas y consideradas como valor unitario, obteniendo para cada experimento un valor de  $\overline{m}_{control}^N = 1 \pm d.e.$ , según:

$$\overline{m}_{control}^N = \frac{\sum_{n=1}^{n_n} m_{control}^n}{n_n} \quad (3)$$

donde  $\overline{m}_{control}^N$  corresponde al valor promedio de los controles del experimento (definido en ecuación 3) y  $n_n$  al número de réplicas por experimento  $N$ .

Posteriormente, cada valor de  $m_{experimento}^n$  fue dividido por (3), obteniendo entonces un valor llamado  $ROS_{experimento}^n$  definido por:

$$ROS_{experimento}^n = \frac{m_{experimento}^n}{\overline{m}_{control}^N} \quad (4)$$

El cual corresponde al valor normalizado de generación de fluorescencia de cada réplica  $n$  en el experimento.

Posteriormente, se calculó el promedio y desviación estándar para cada condición *experimento* en cada experimento  $N$ , obteniendo el valor  $\overline{ROS}_{experimento}^N$ , definido por:

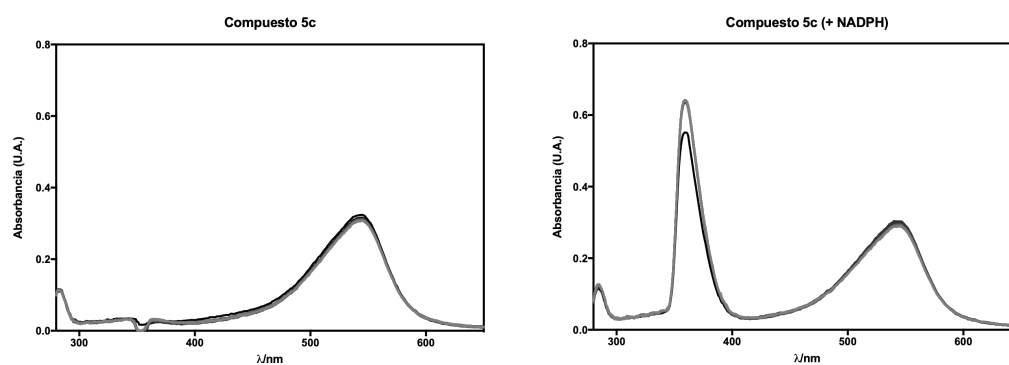
$$\overline{ROS}_{experimento}^N = \frac{m_{experimento}^n}{\overline{m}_{control}^N} \quad (5)$$

Luego, el resultado reportado en las figuras 19 y 20 (llamado  $\Delta URF/\min$  (veces respecto al control), ver sección 5.6), corresponde al promedio y desviación estándar de los valores obtenidos en (5), definido por:

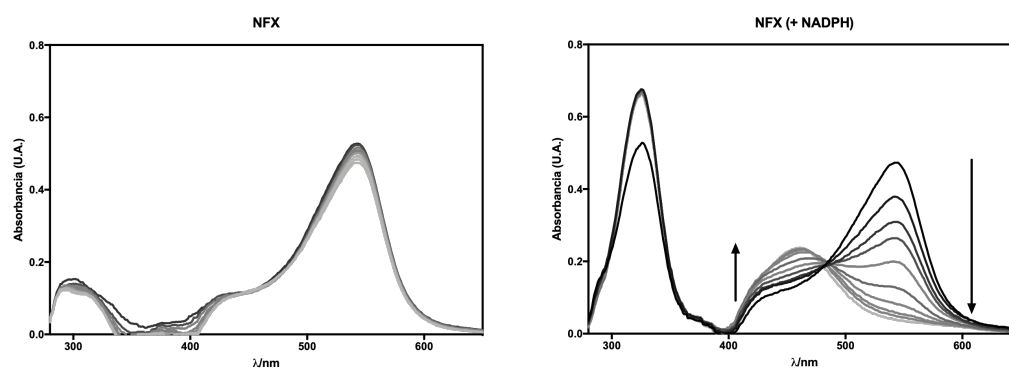
$$\overline{ROS}_{experimento}^{total} = \frac{\sum_{n=1}^N \overline{ROS}_{experimento}^N}{N} \quad (6)$$

donde  $N$  corresponde al número de experimentos independientes.

## A.5. Generación de Anión Superóxido Inducido por Reciclaje Redox



(a) Compuesto 5c

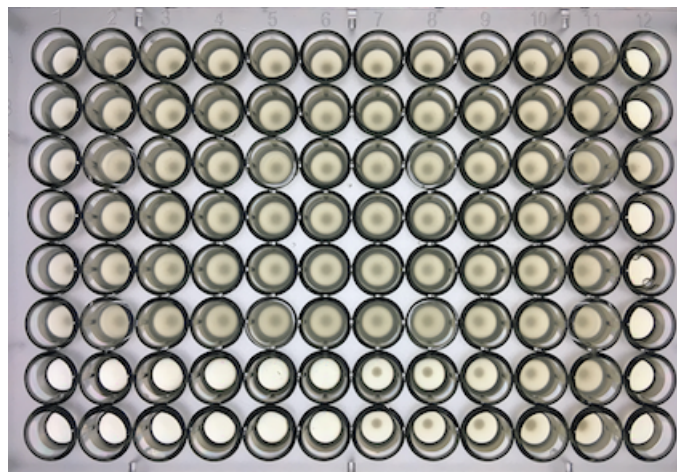


(b) Compuesto NFX

**Figura 31.** Cambios en el espectro de absorción de PGR

En la figura 31(a) se muestra que en presencia de NADPH no se generan radicales libres que reduzcan al PGR, en cambio, en la figura 31(b) se aprecia el punto isobéptico y los cambios isocrómicos característicos de la reducción de PGR (destacados con flechas). Cada línea, desde la negra a la más clara, corresponde a 1 min de reacción. Nótese el incremento en la absorbancia a 340 nm producto de la generación de NADPH gracias al sistema microsómico (figura 6).

#### A.6. Determinación de la CIM Bacteriana



(a) Compuestos **3a** y **3b**



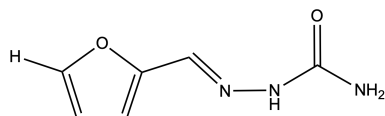
(b) Compuestos **3c** y **NHT**

**Figura 32.** Experimentos de determinación de CIM para *E. coli*. La columna 12 corresponde al control de esterilidad, y las filas G-H a los controles internos con gentamicina. Cada compuesto y cada concentración fue evaluada en triplicado (filas A-C y D-E). Nótese en la figura 32(b) la inhibición del crecimiento bacteriano con **NHT**.



## B. MARCHAS DE REACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN

### 2-(Furan-2-ilmetilen)hidrazina-1-carboxamida (**1a**)



Una solución de semicarbazida clorhidrato (1,1126 g; 9,976 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (828  $\mu$ l; 9,9967 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **1a** (1,4361 g; 94 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.25 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, H-6), 7.73 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-3), 6.79 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-5), 6.56 (dd,  $J = 3.5, 1.8$  Hz, 1H, H-4), 6.33 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 156.6, 149.9, 144.0, 130.0, 112.0, 110.9.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3456 (N-H), 3287 (N-H), 1698 (C=O), 1519 (C=C), 1435 (C=N).
- p.f. 203-208 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> calc 153.1390. Encontrado: 153.1382.

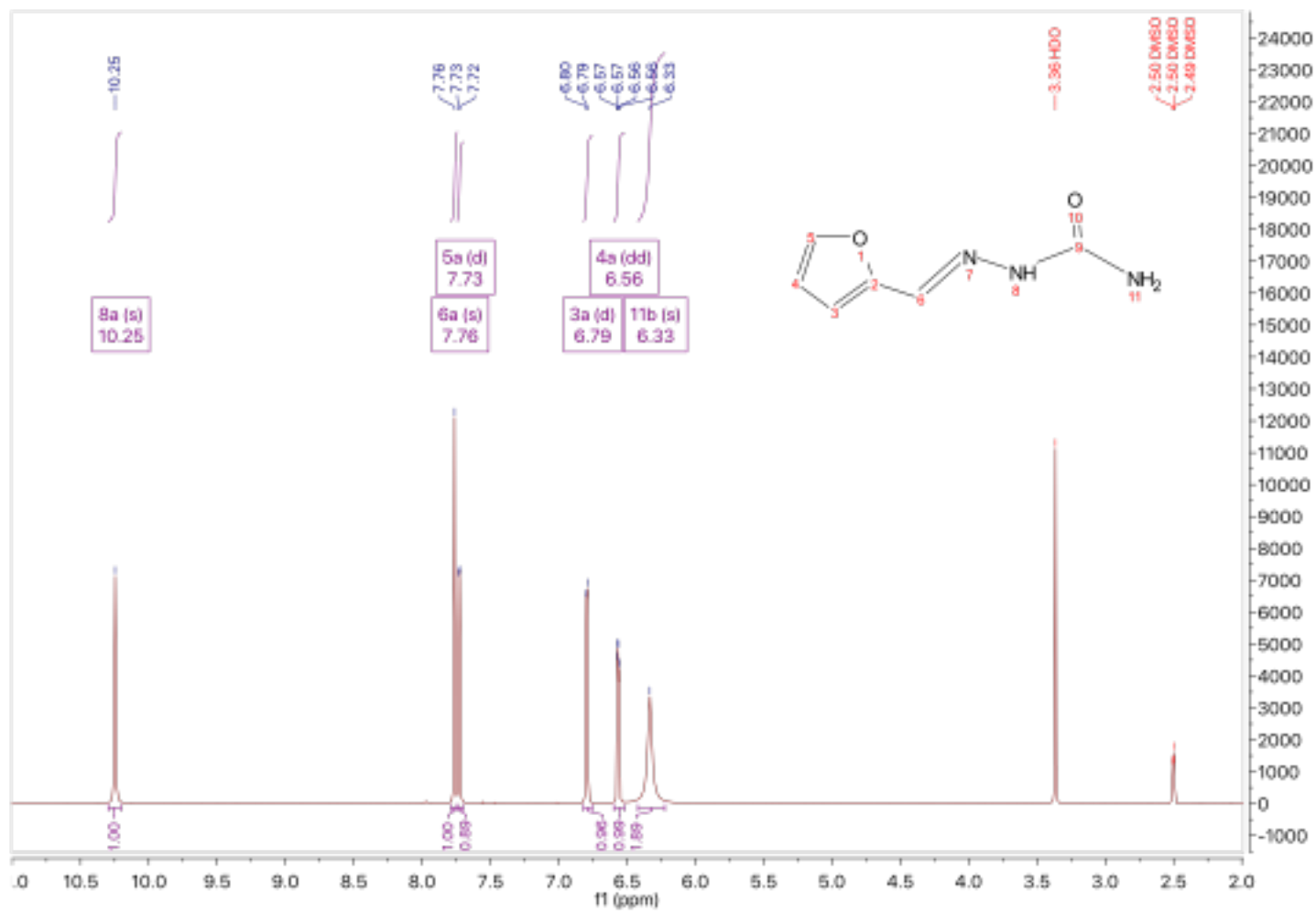


Figura 33. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 1a



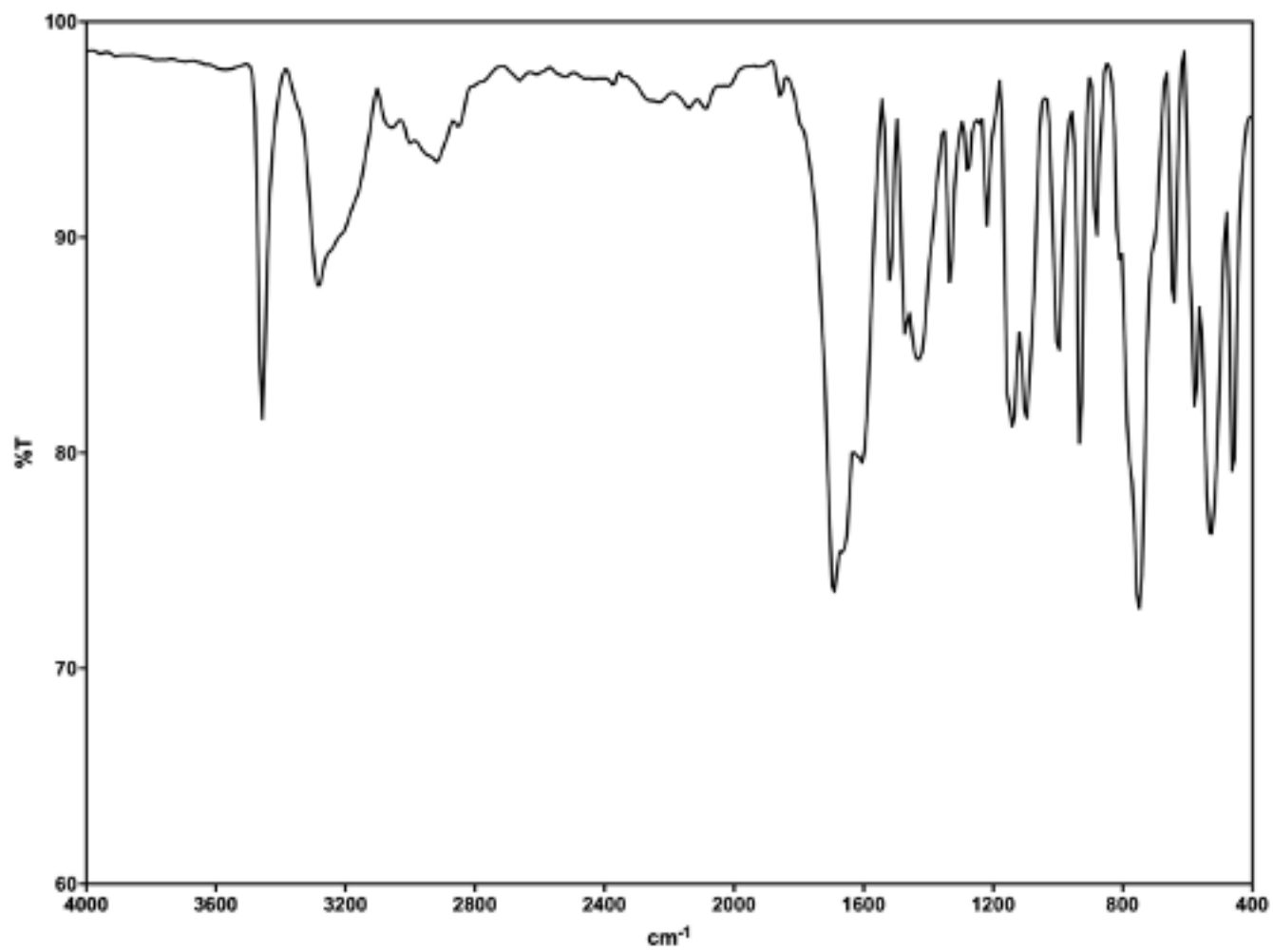


Figura 35. Espectro de FT-IR compuesto 1a

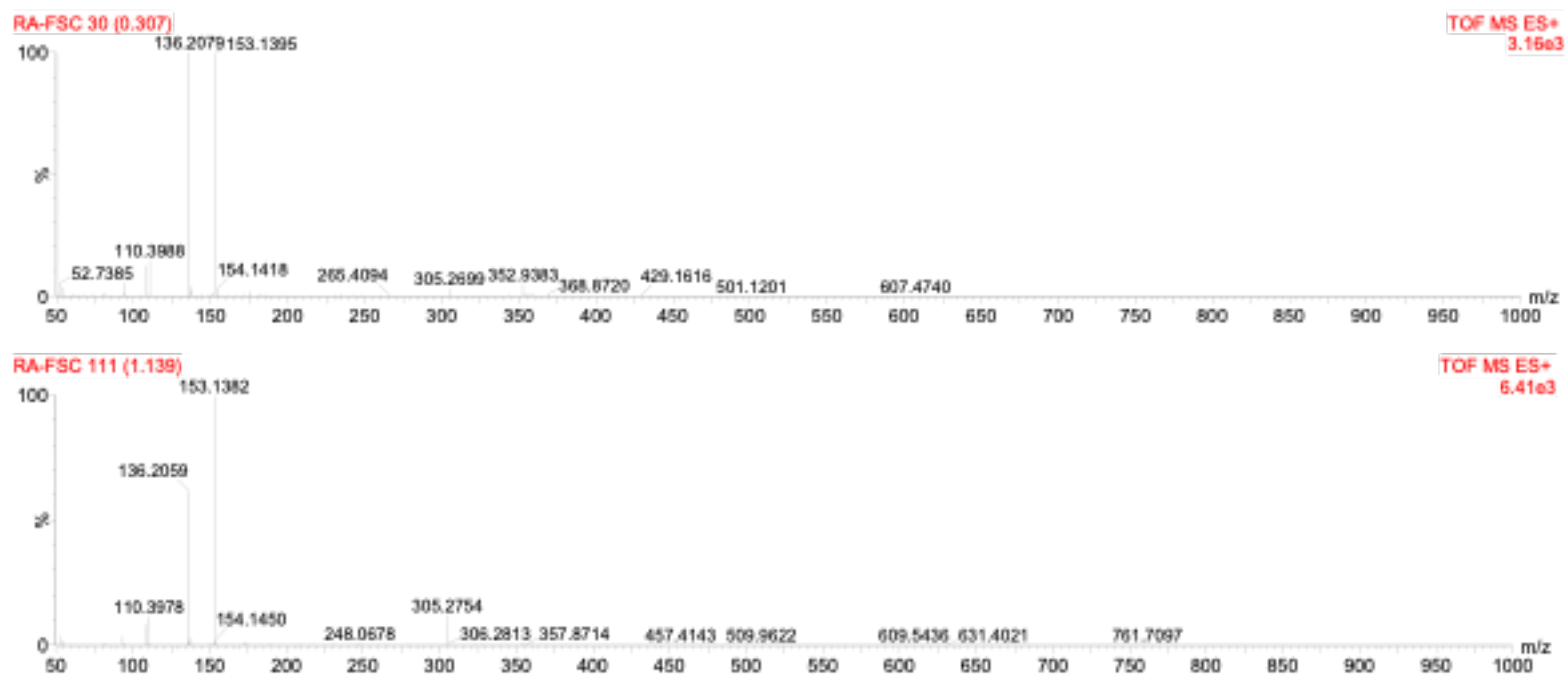
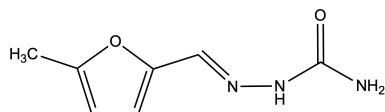


Figura 36. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 1a

## 2-((5-metilfuran-2-il)metilen)hidrazina-1-carboxamida (**1b**)



Una solución de semicarbazida (0,4320 g; mmol3,873 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-metil-2-furaldehído (385,3  $\mu$ l; 3,873 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **1b** (0,5827 g; 90 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.16 (s, 1H, NH), 7.68 (s, 1H, H-6), 6.65 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H, H-3), 6.28 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.18 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H, H-4), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm :157.0, 153.8, 148.7, 130.7, 113.1, 108.7, 13.9.  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3456 (N-H), 3220 (N-H), 1674 (C=O),1573 (N-H),1442 (C=N).
- p.f. 200-204 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> calc 167.1656. Encontrado: 167.1666.

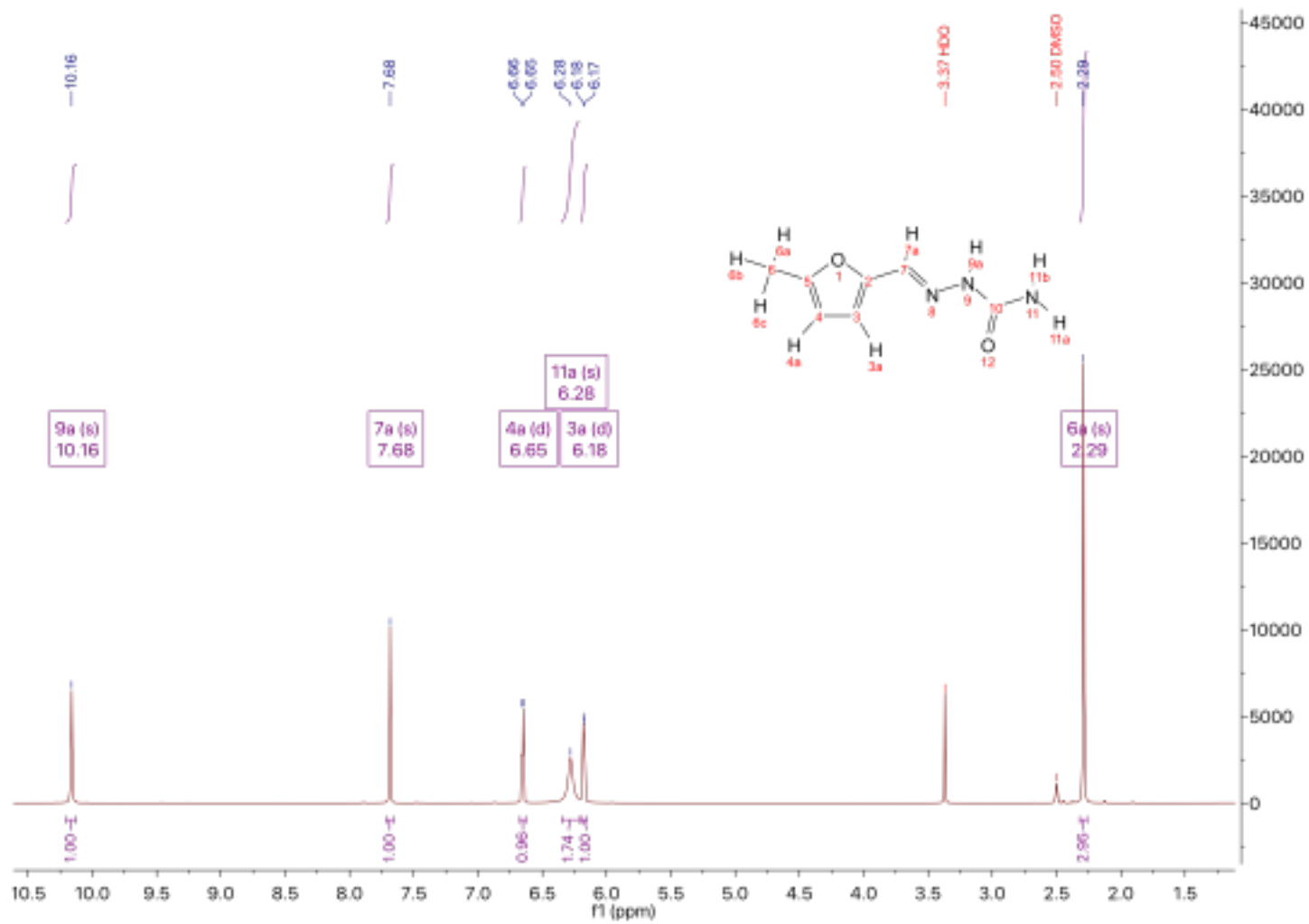


Figura 37. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 1b

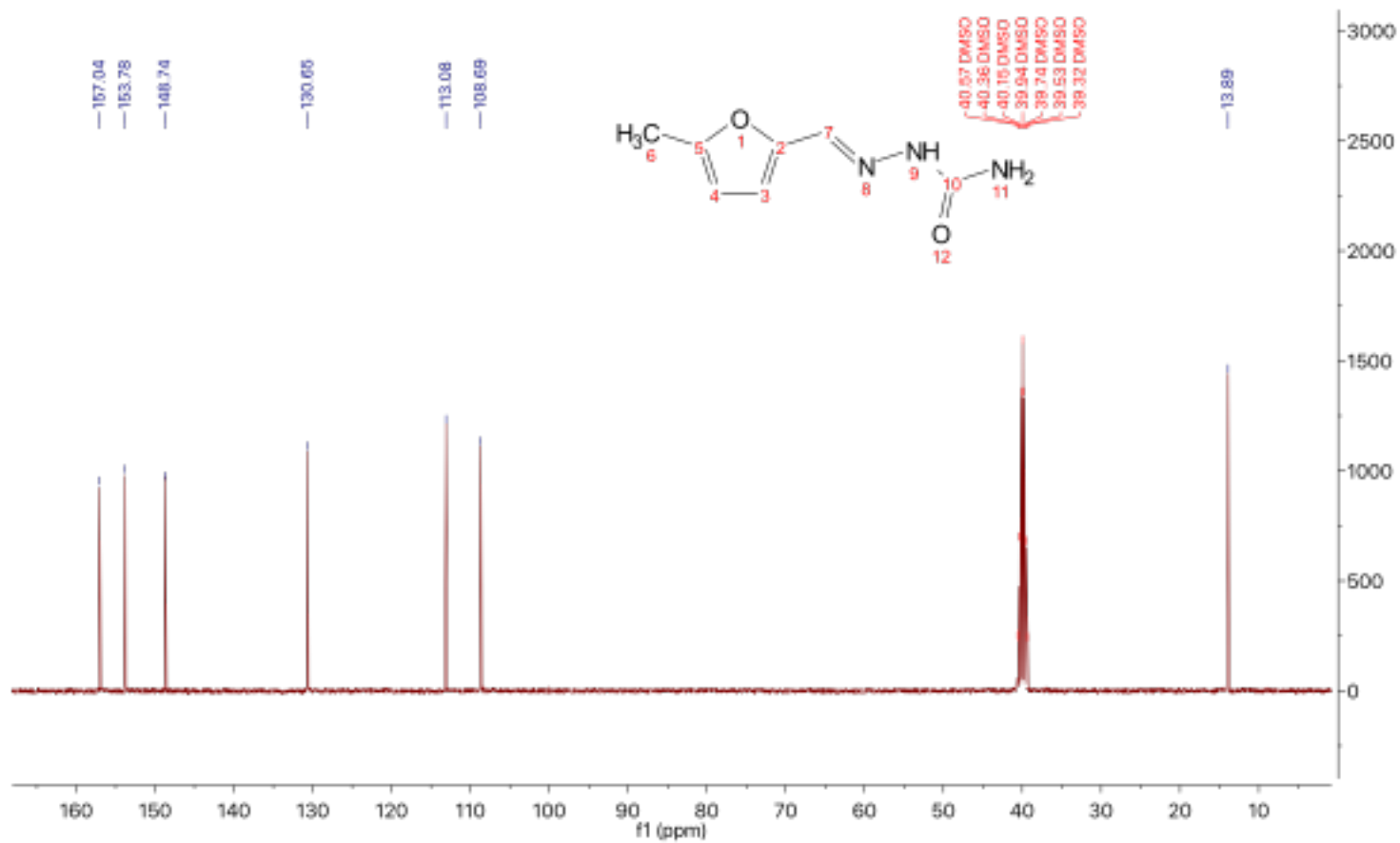


Figura 38. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 1b



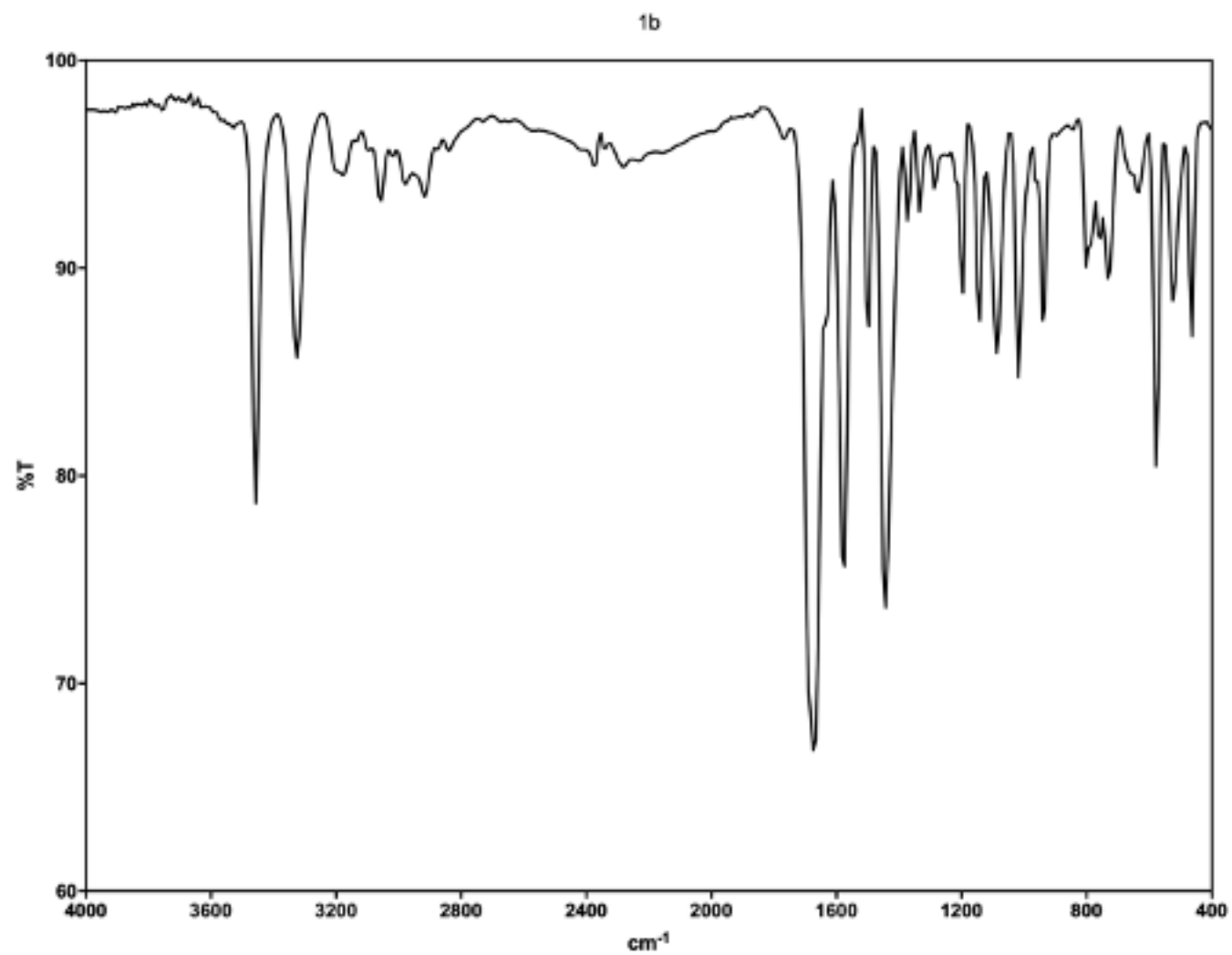


Figura 39. Espectro de FT-IR compuesto 1b

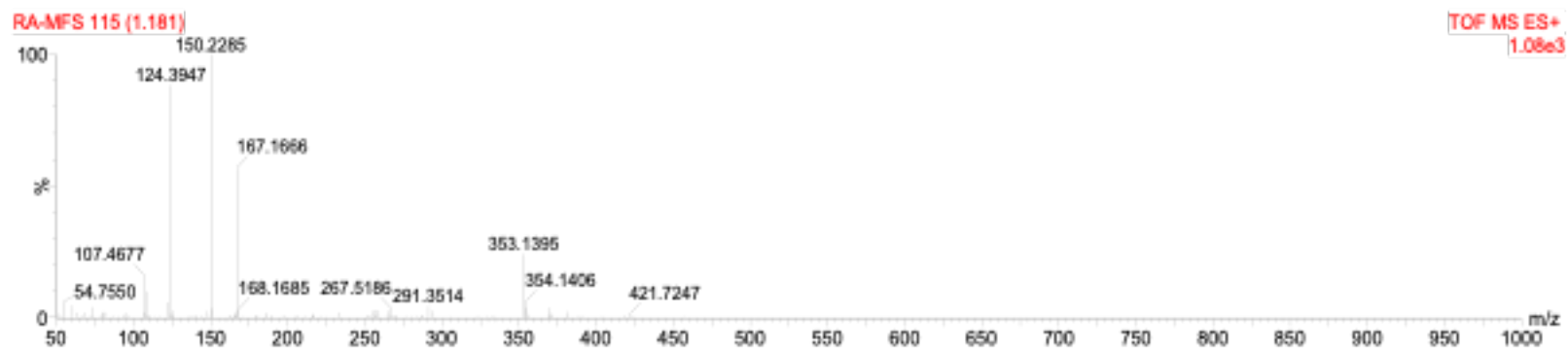
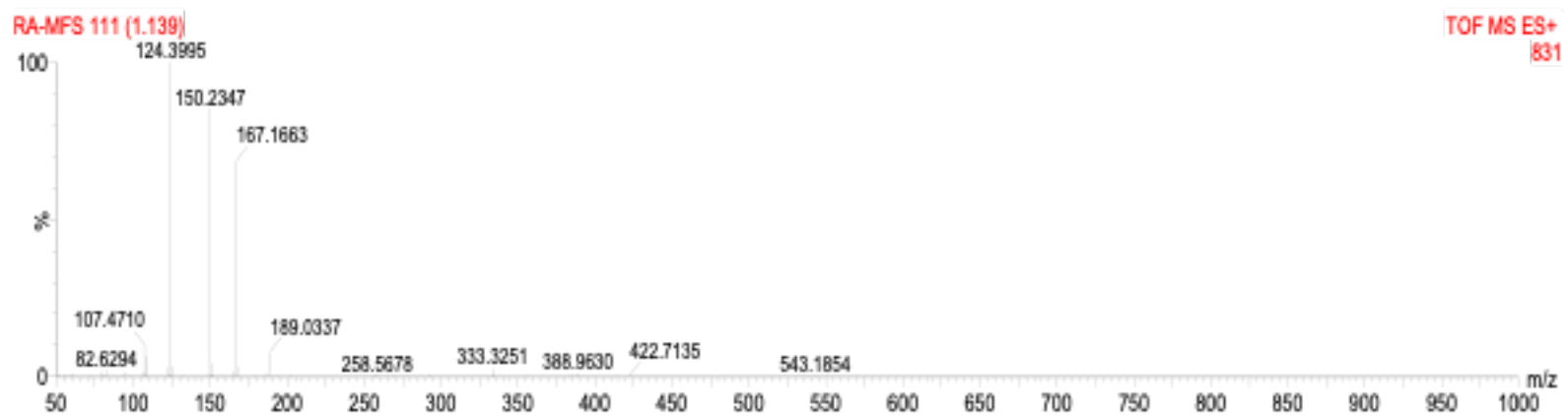
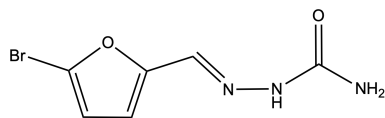


Figura 40. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **1b**

## 2-((5-bromofuran-2-il)metilen)hidrazino-1-carboxamida (**1c**)



Una solución de semicarbazida (0,0860 g; 0,5810 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-bromo-2-furaldehído (disuelto en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,0860 g; 0,5810 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **1c** (0,0790 g; 59 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.29 (s, 1H, NH), 7.68 (s, 1H, H-6), 6.84 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 6.68 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4), 6.34 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 156.3, 151.9, 128.8, 122.9, 114.0, 113.4.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3464 (N-H), 3325 (N-H), 1681 (C=O), 1573 (N-H), 1442 (C=N).
- p.f. dec. 210 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> calc 232.0346. Encontrado: 232.0350.

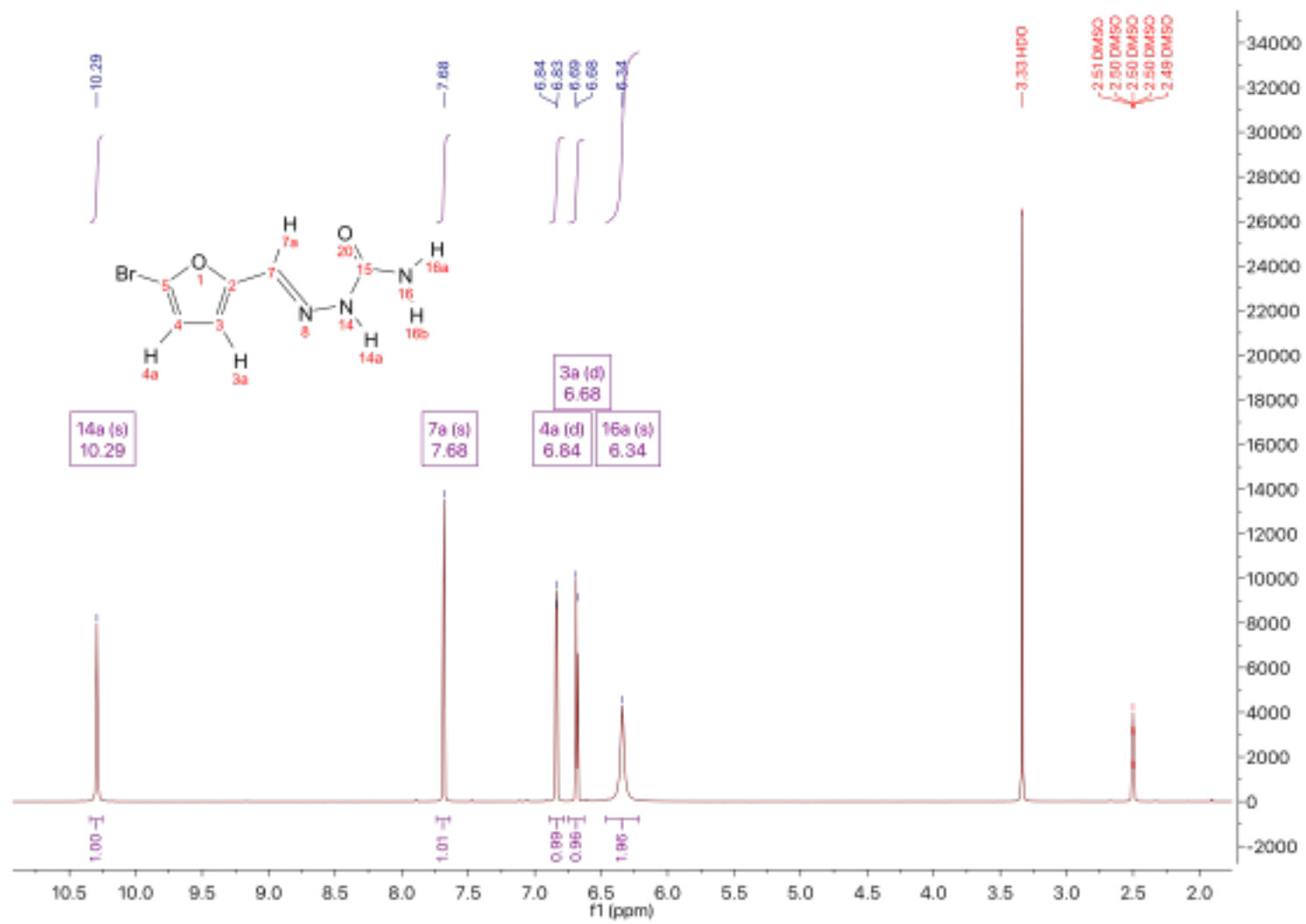


Figura 41. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 1c

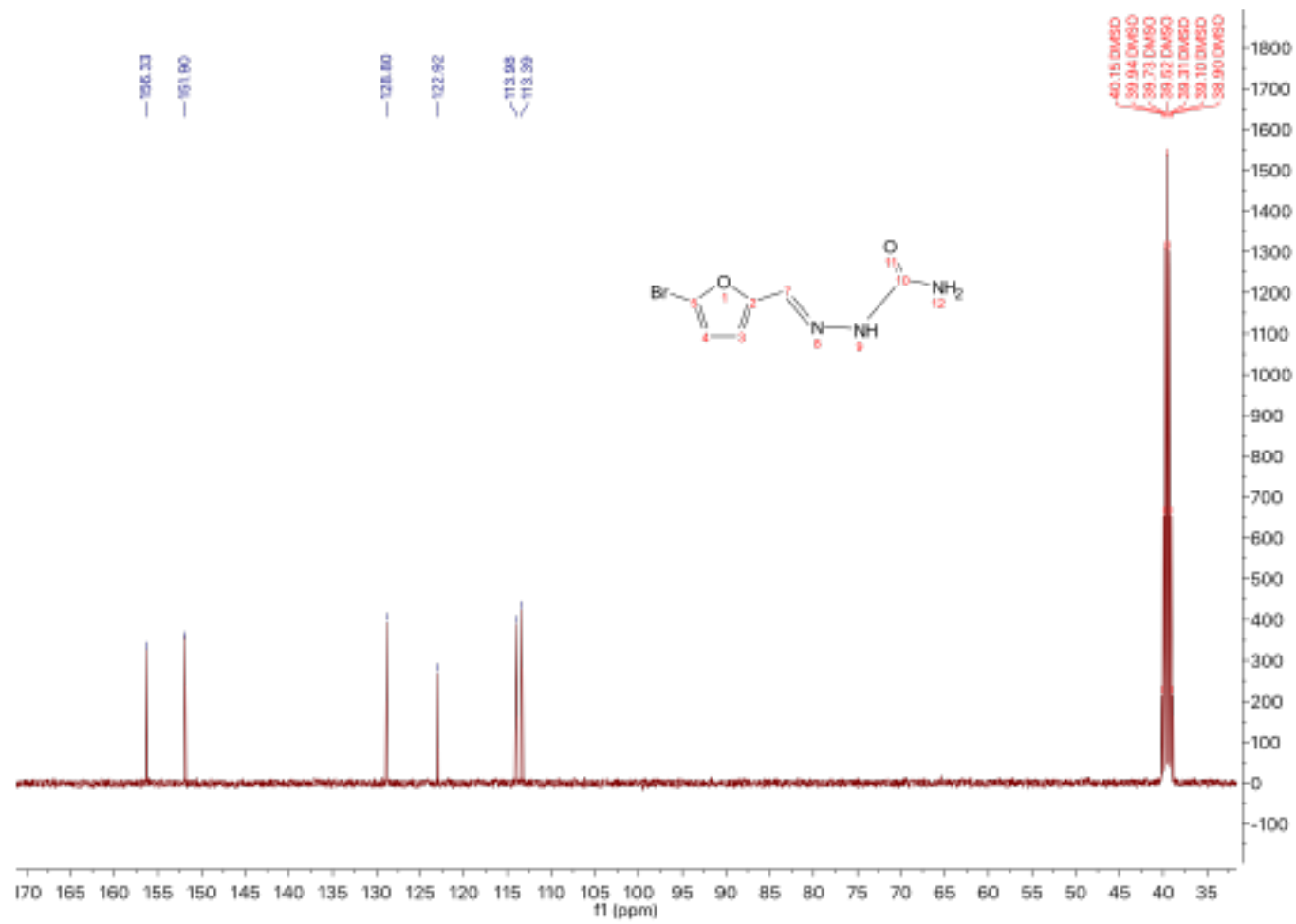


Figura 42. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto **1c**

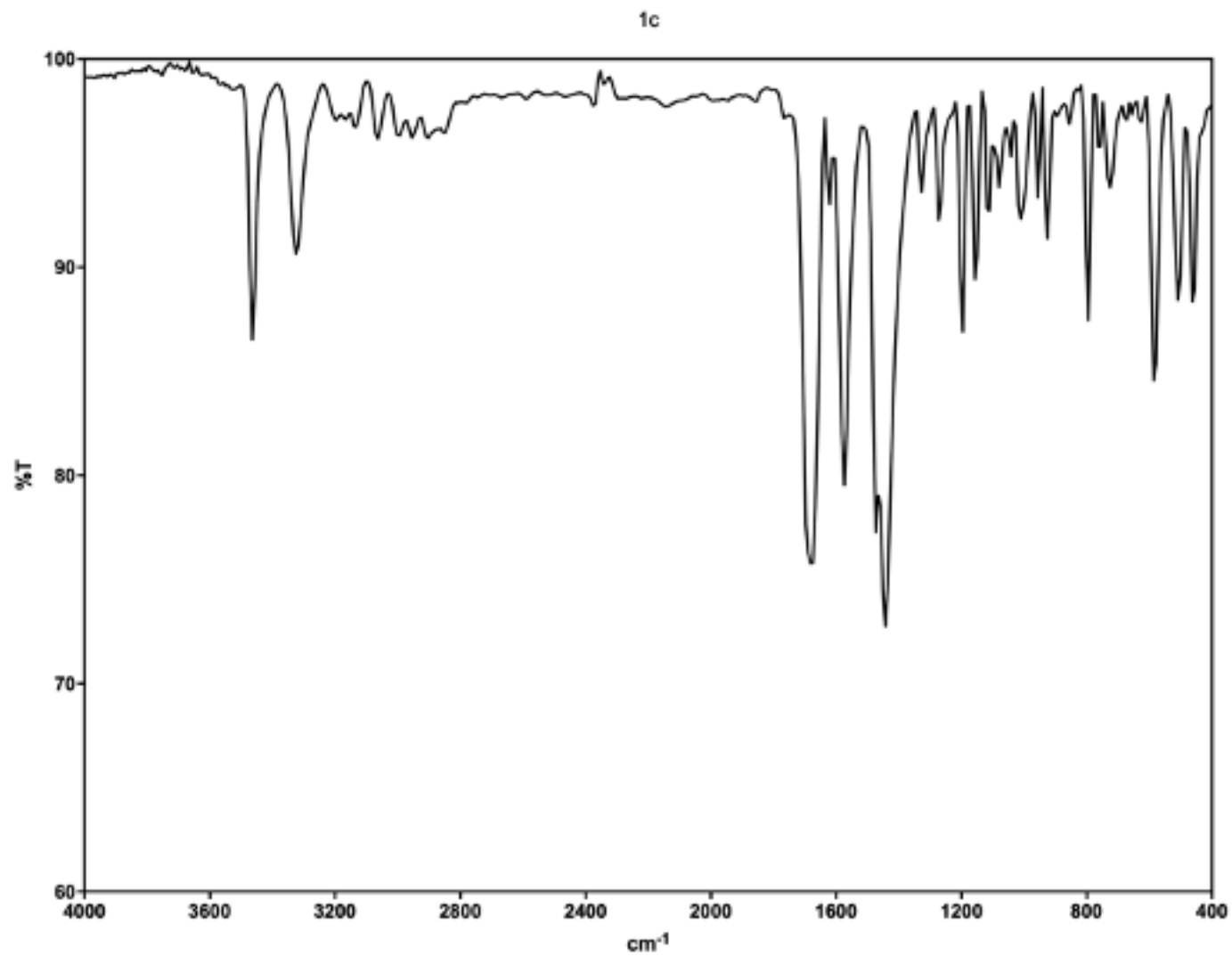


Figura 43. Espectro de FT-IR compuesto 1c

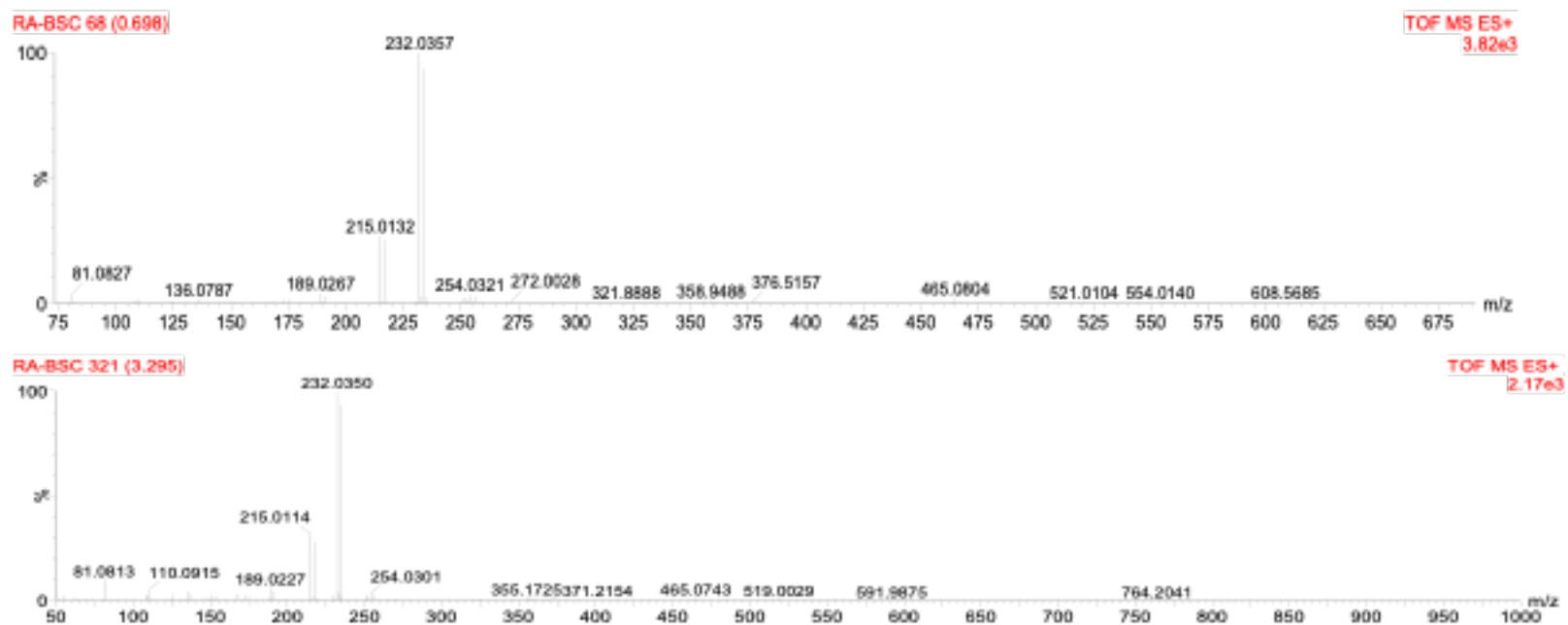
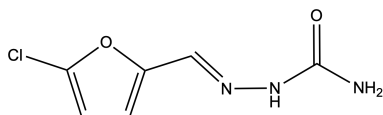


Figura 44. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 1c

## 2-((5-clorofuran-2-il)metilen)hidrazina-1-carboxamida (**1d**)



Una solución de semicarbazida (0,0813 g; 0,7293 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (0,0898 g en 100  $\mu$ l; 0,6876 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **1d** (0,1031 g; 80 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.31 (s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, H-6), 6.88 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3), 6.60 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H H-4), 6.35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 156.81, 150.21, 136.42, 129.25, 113.61, 109.64.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3456 (N-H), 3278 (N-H), 1705 (C=O), 1589 (N-H), 1427 (C=N).
- p.f. 186-188 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: calc 188.0227. Encontrado: 188.0229.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10.31 (s, 1H), 7.69 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 6.88 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.60 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.35 (s, 2H).

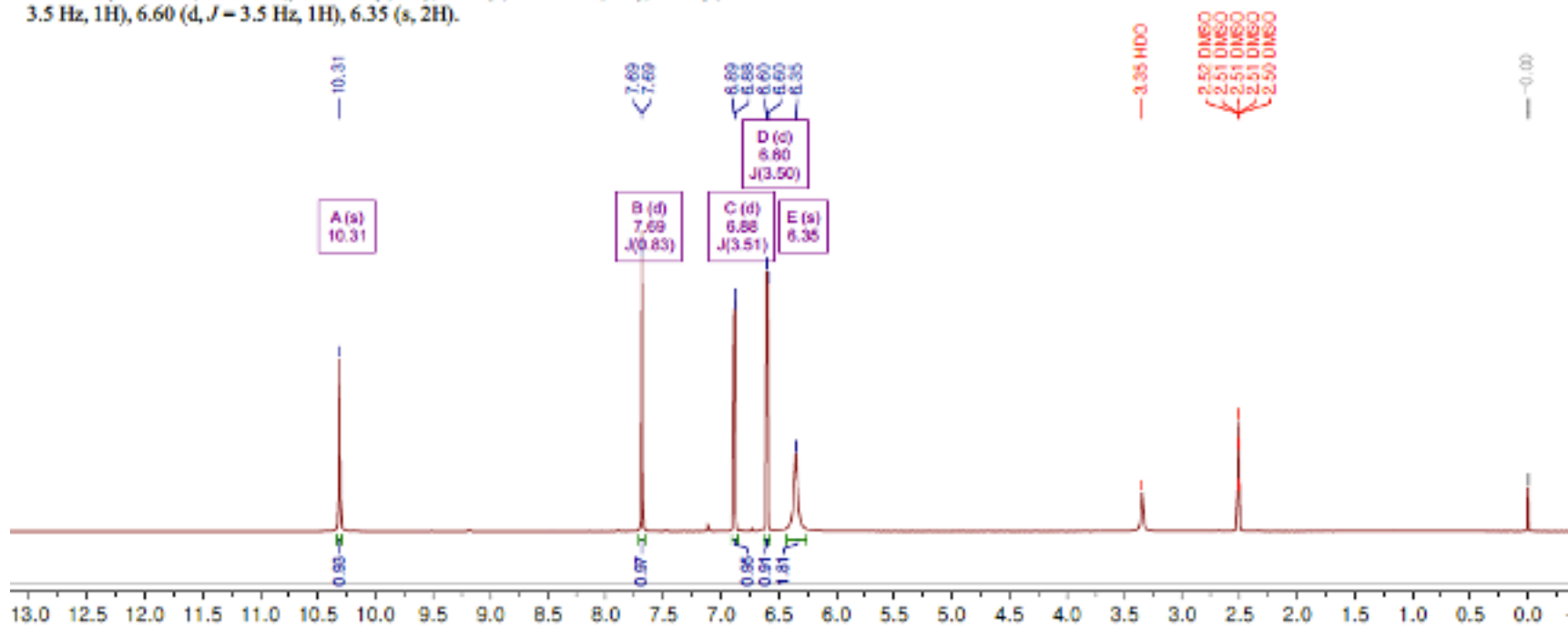


Figura 45. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 1d

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  156.81, 150.21, 136.42, 129.25, 113.61, 109.64.

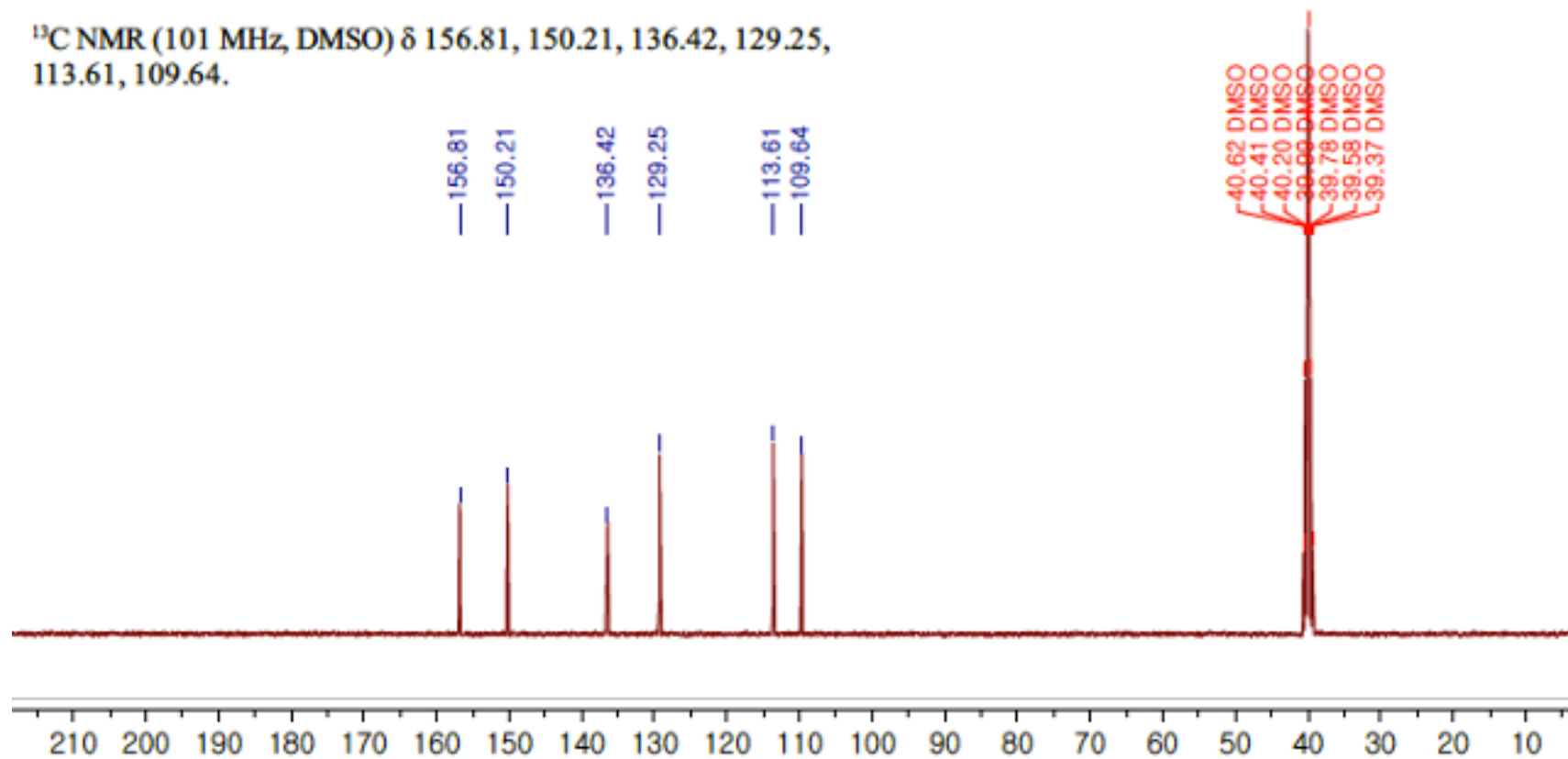


Figura 46. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 1d

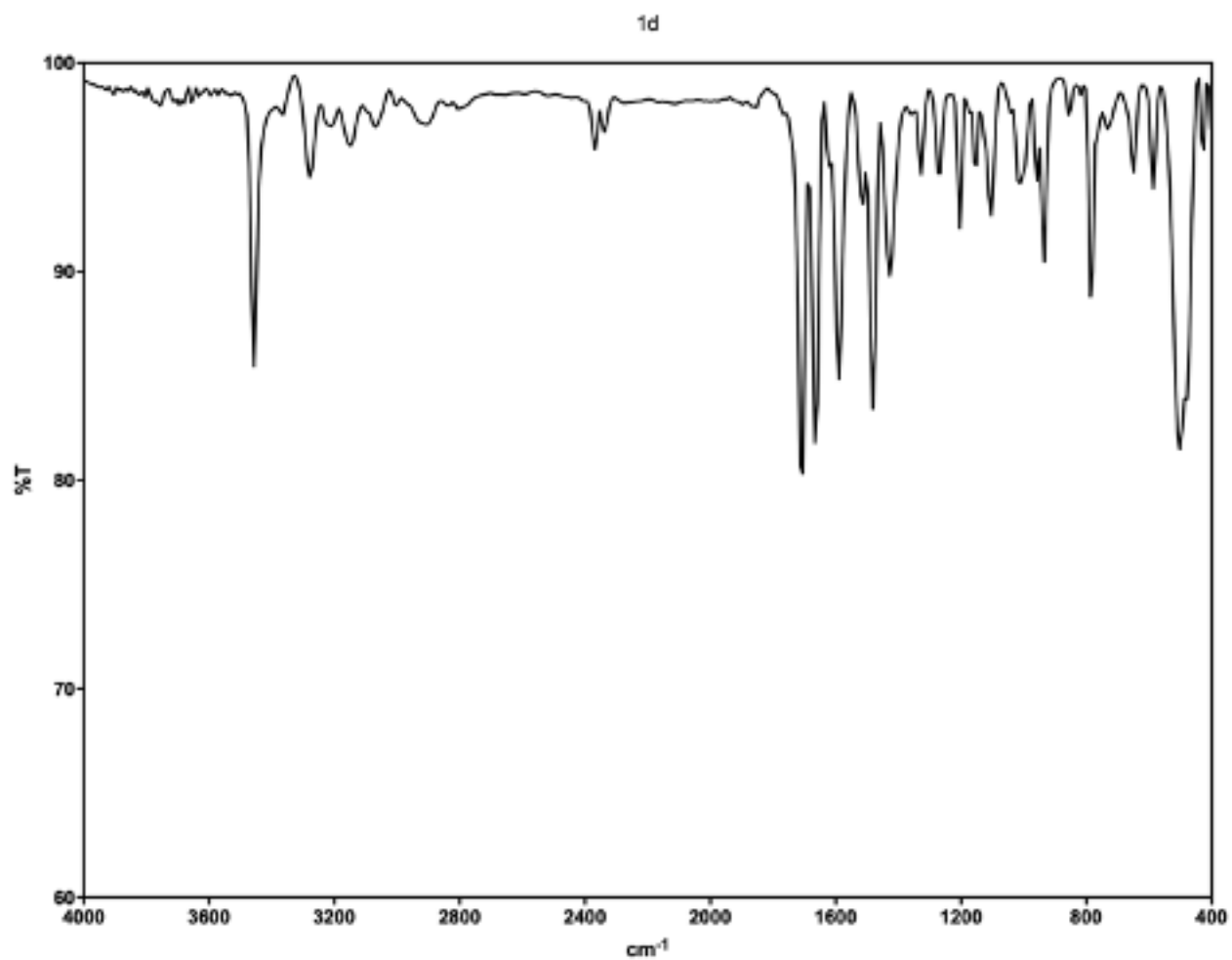


Figura 47. Espectro de FT-IR compuesto 1d

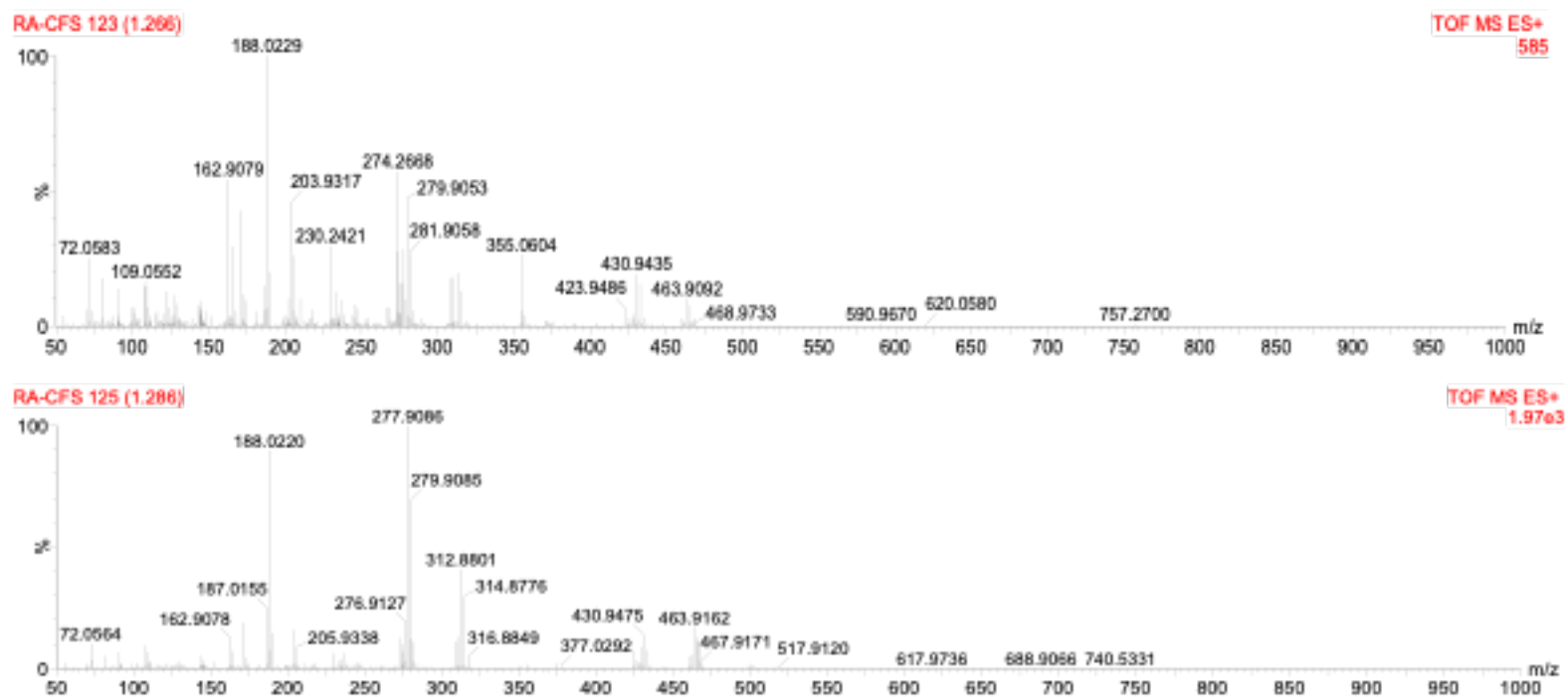
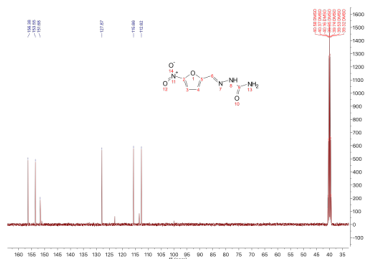


Figura 48. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 1d

## 2-((5-nitrofurán-2-il)metilén)hidrazina-1-carboxamida (nitrofurazona, NFZ)



Una solución de semicarbazida (0,1110 g; 0,9944 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-nitro-2-furaldehído (disuelto en 100  $\mu$ l de DM-SO; 0,1404 g, 0,0052 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado amarillo. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **1e** (nitrofurazona) (0,1796 g; 97 % rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 10.78 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, H-6), 7.76 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-3), 7.22 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-4), 6.61 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 156.4, 153.6, 151.7, 127.9, 115.7, 112.6.
- $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3464-3294 (N-H), 1720 (C=O), 1581(C=N), 1512 ((CH<sub>2</sub>)), 1388 (NO<sub>2</sub>).
- p.f. no determinado
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> calc 198.1366. Encontrado: 198.1366.

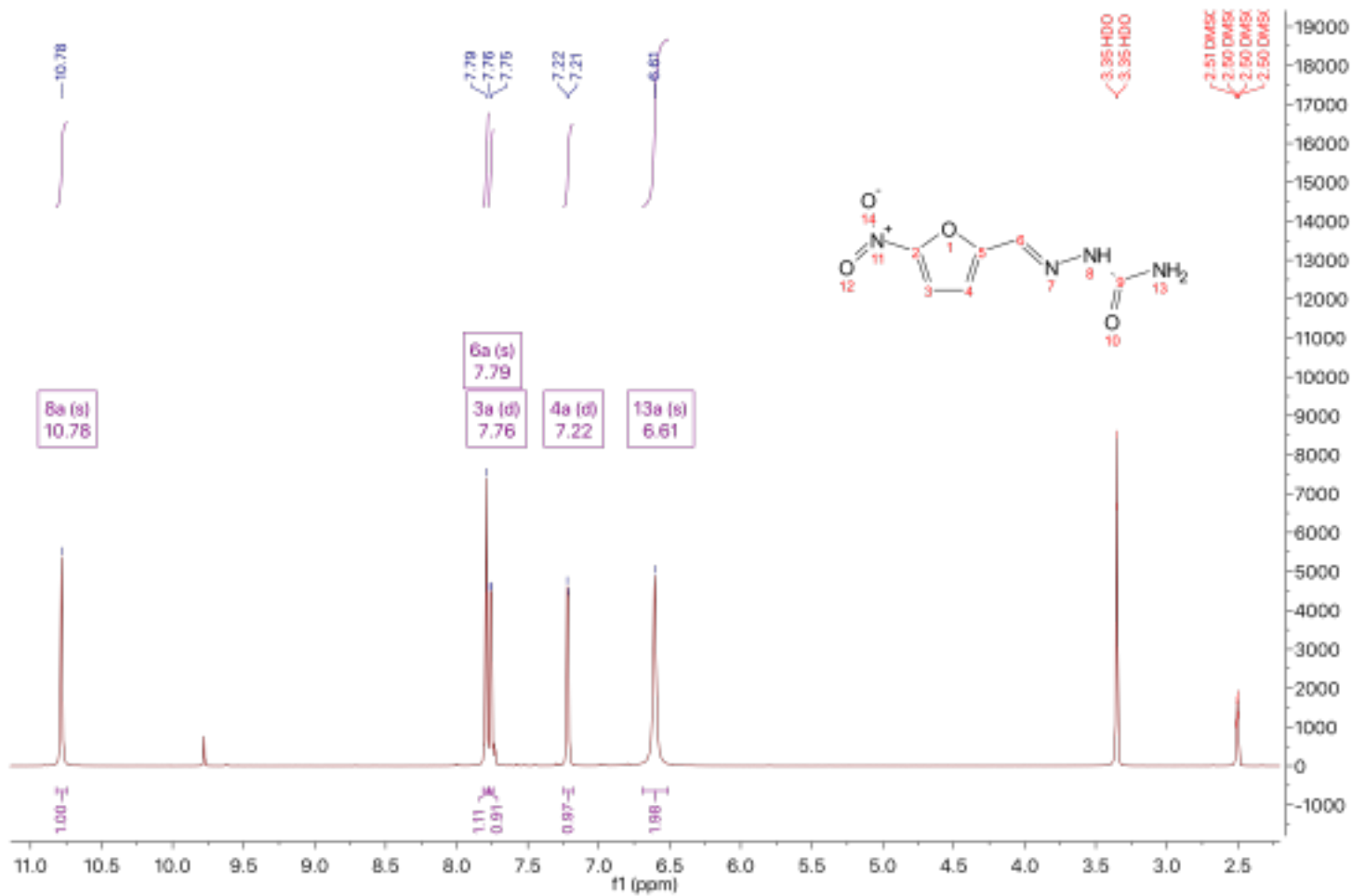


Figura 49. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 1e (nitrofurazona)

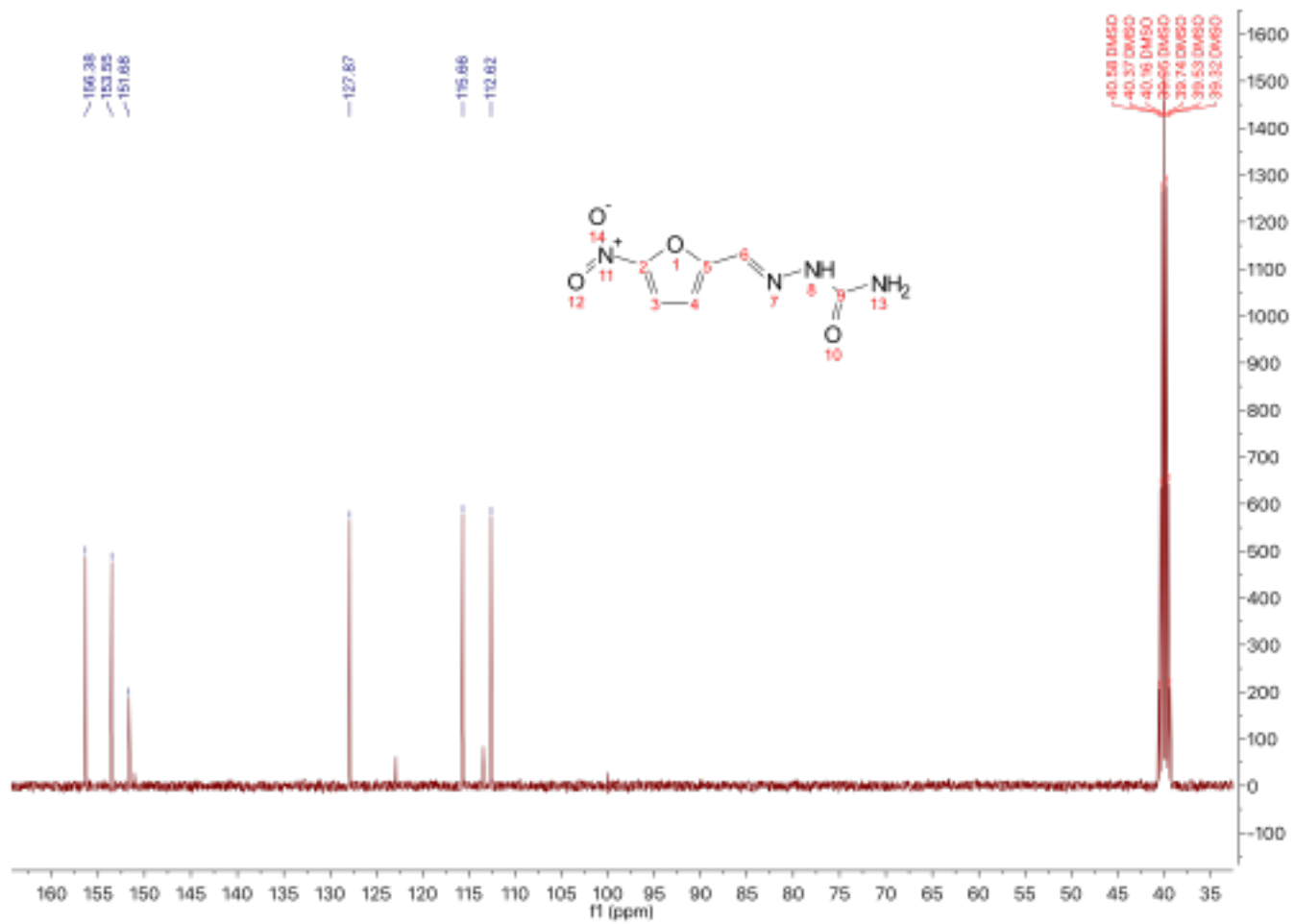


Figura 50. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 1e (nitrofurazona)

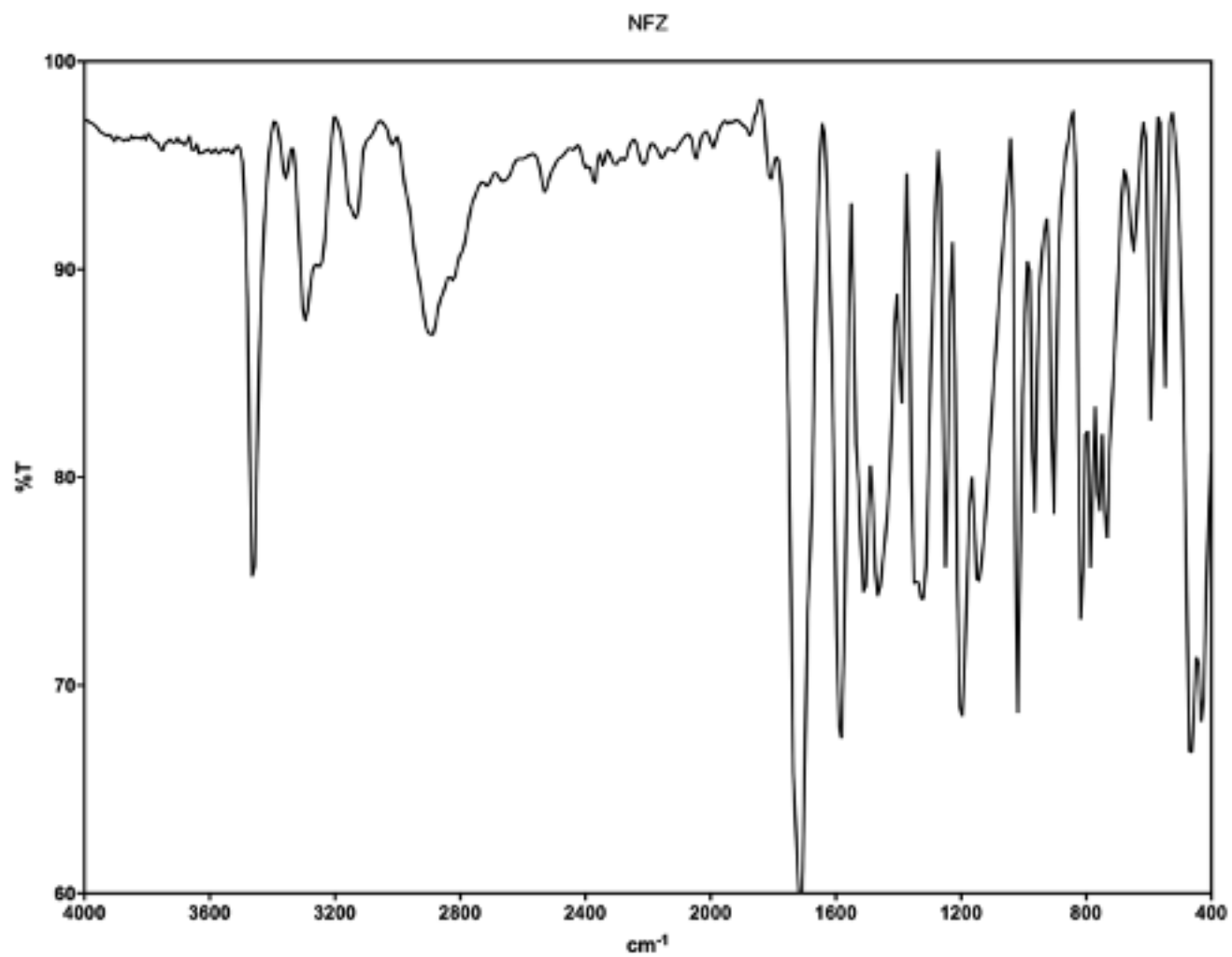


Figura 51. Espectro de FT-IR compuesto 1e (nitrofurazona)



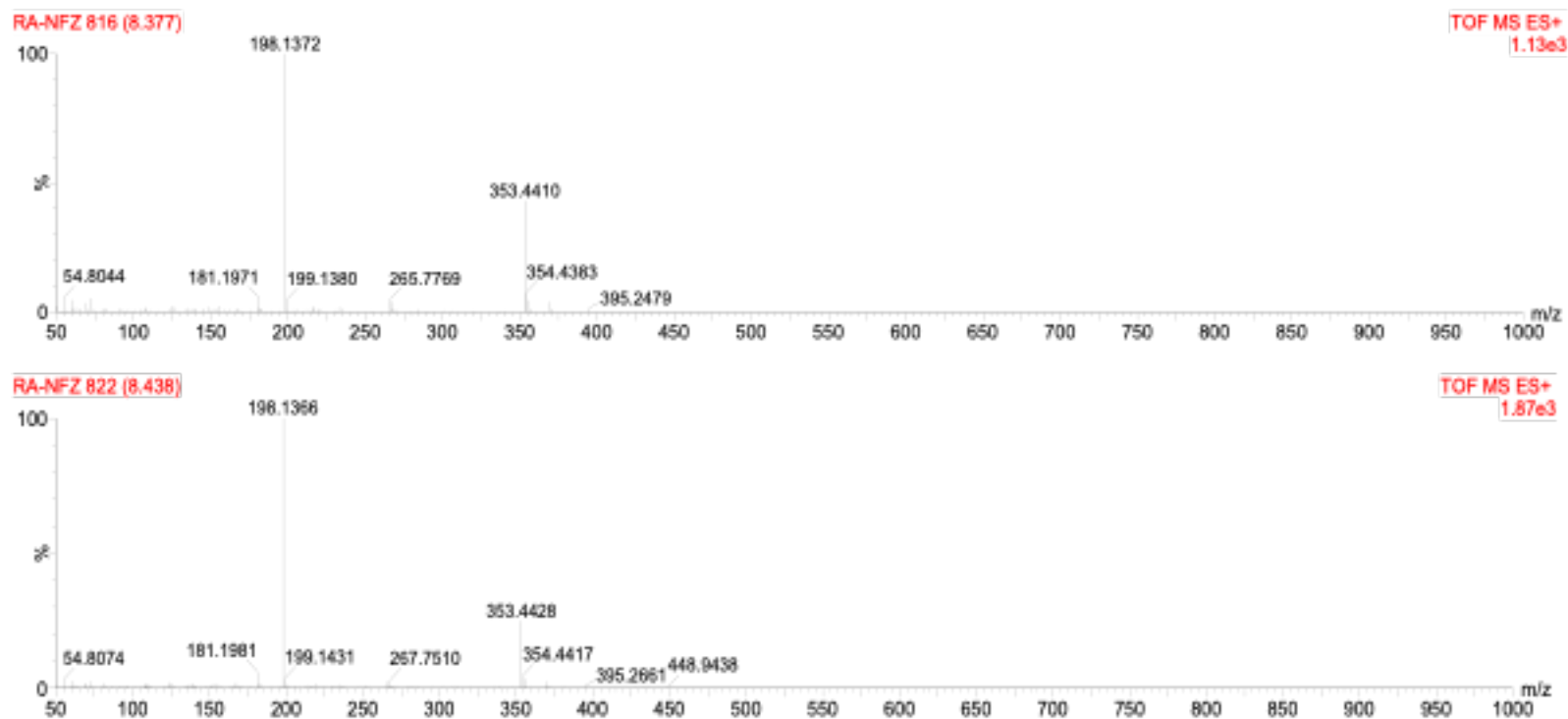
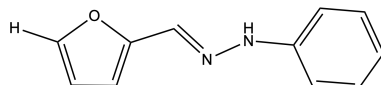


Figura 52. Espectroscopía de masas de alta resolución 1e (nitrofurazona)

### 1-(furan-2-ilmetilen)-2-fenilhidrazina (**2a**)



Una solución de fenilhidrazina (0,1458 g; 1,008 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (84  $\mu$ l; 1,010 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **2a** (0,1986 g; 97 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.31 (s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, H-6), 7.70 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.22 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-11), 7.02 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-10), 6.75 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-12), 6.64 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 6.55 (dd,  $J = 3.4, 1.8$  Hz, 1H, H-4).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 151.3, 145.5, 143.5, 129.6, 127.7, 119.3, 112.4, 112.3, 109.3, 60.2.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3317 (N-H), 1481 (C=N), 1512 (C=C), 1442 (C=C).
- p.f. dec. 86 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$  calc 186.2104. Encontrado: 186.2106.

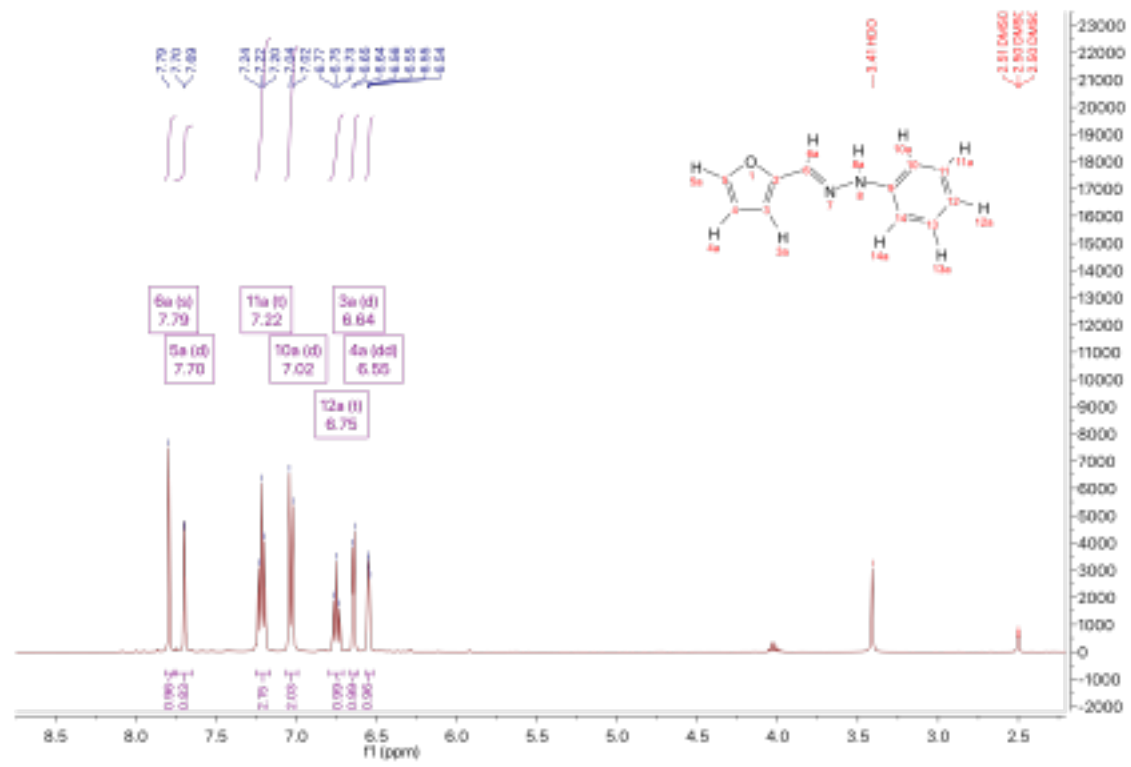


Figura 53. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 2a

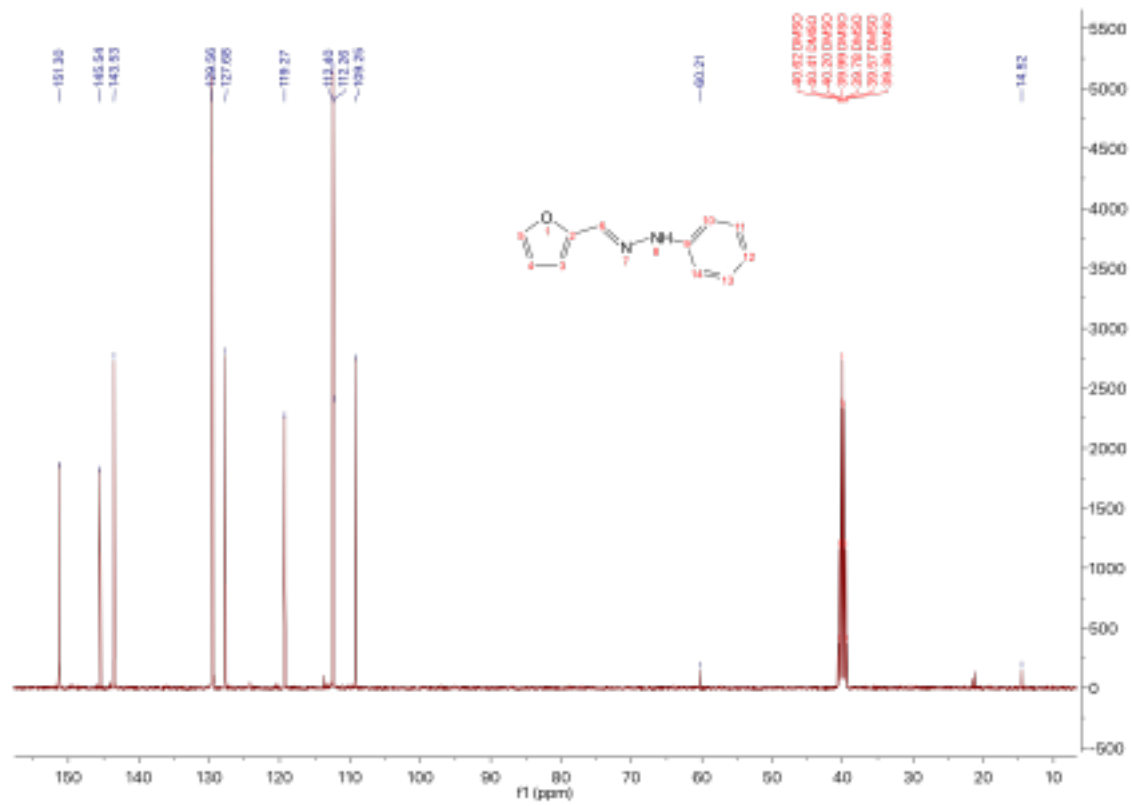


Figura 54. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 2a

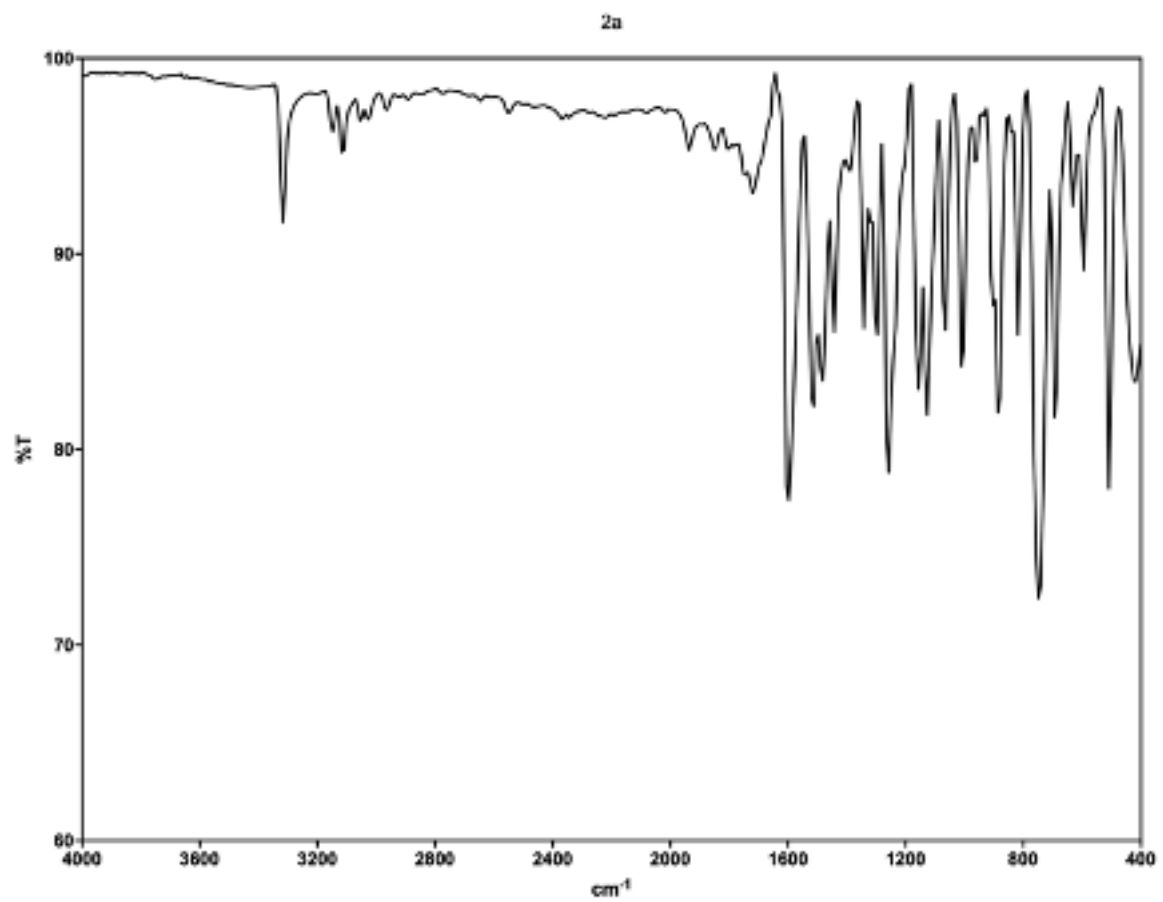


Figura 55. Espectro de FT-IR compuesto 2a

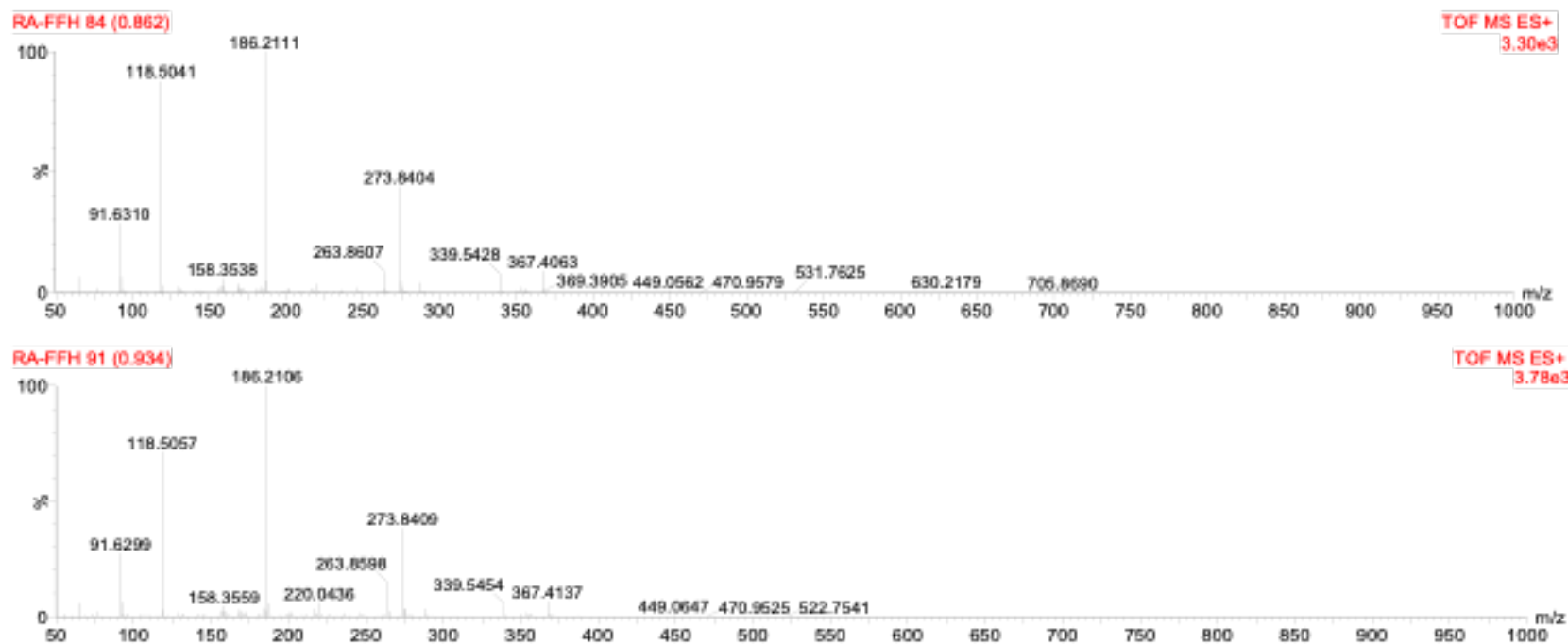
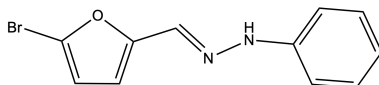


Figura 56. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 2a

### 1-((5-bromofuran-2-il)metilen)-2-fenilhidrazina (**2b**)



Una solución de fenilhidrazina (0,1646 g; 1,142 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-bromo-2-furaldehído (0,1646 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 1,142 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **2b** (0,0760 g; 50 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 10.39 (s, 1H, NH), 7.68 (s, 1H, H-6), 7.21 (t, 2H, H-11), 7.00 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-10), 6.76 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-12), 6.67 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3), 6.66 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-4).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 152.9, 144.8, 129.1, 126.0, 121.7, 119.1, 113.8, 112.0, 111.2.
- Ir  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3302 (N-H), 1442 (C=N).
- p.f.  $\approx$  300 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$  calc 265.1060. Calculado: 265.1066.

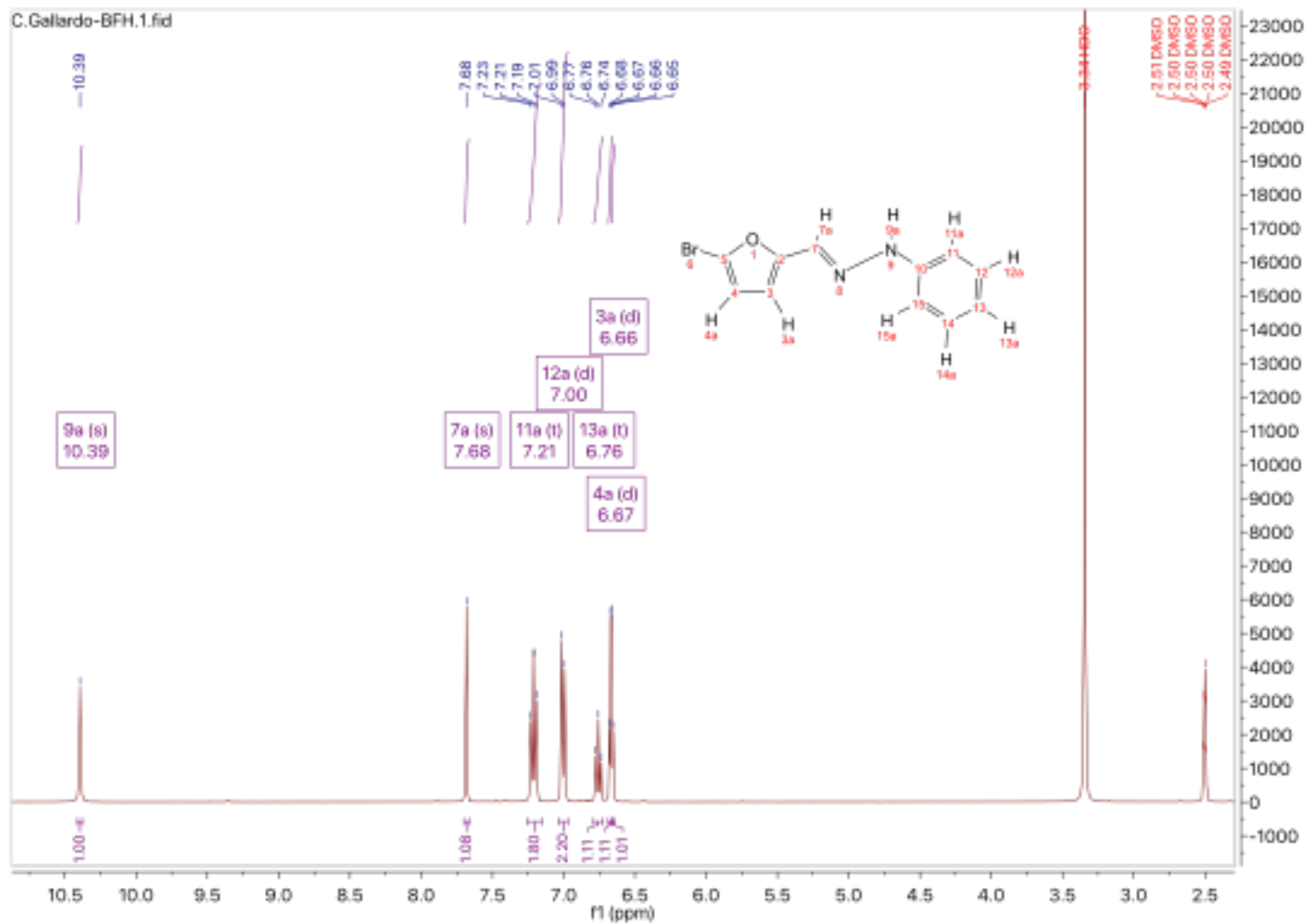


Figura 57. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto **2b**



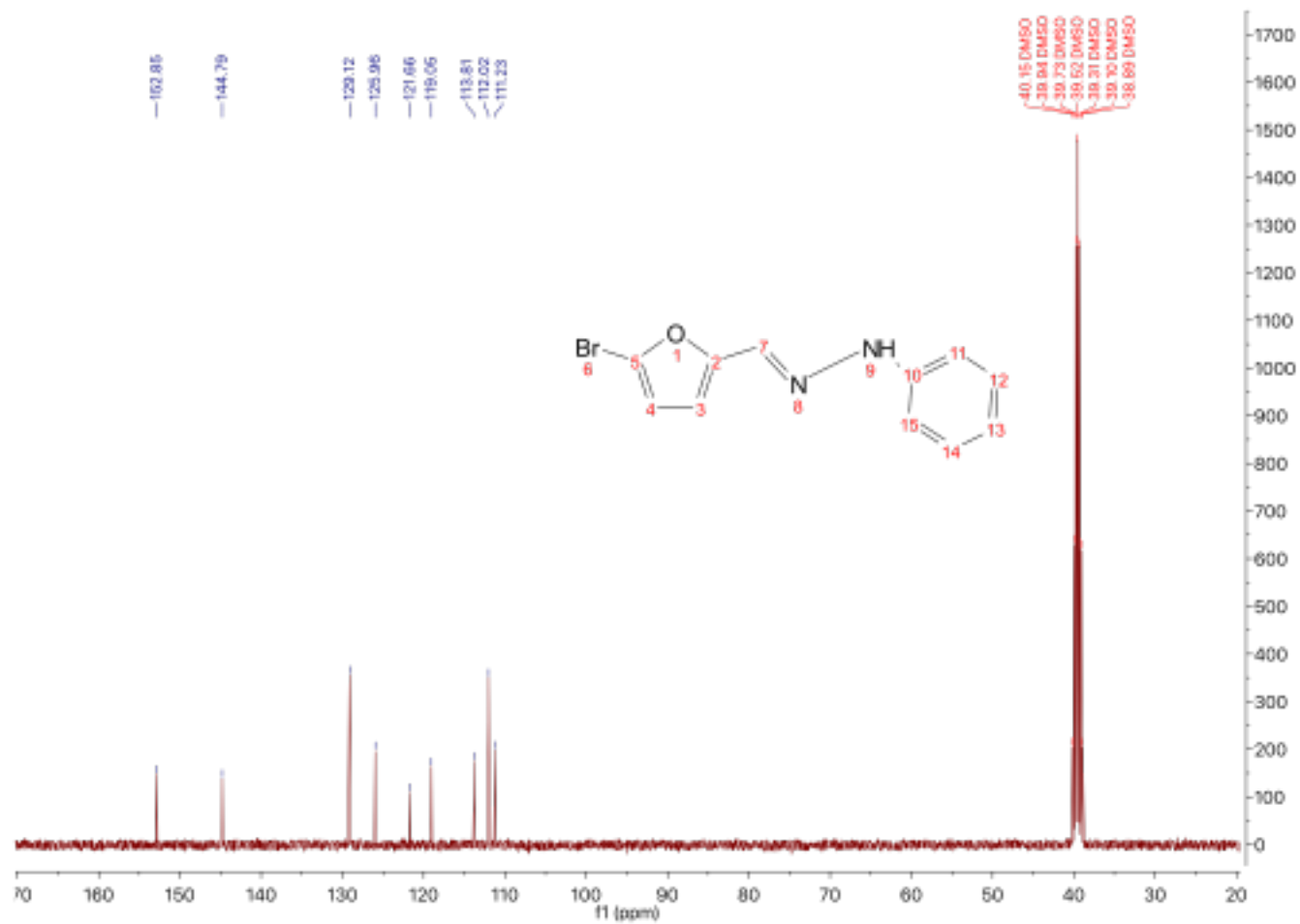


Figura 58. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 2b

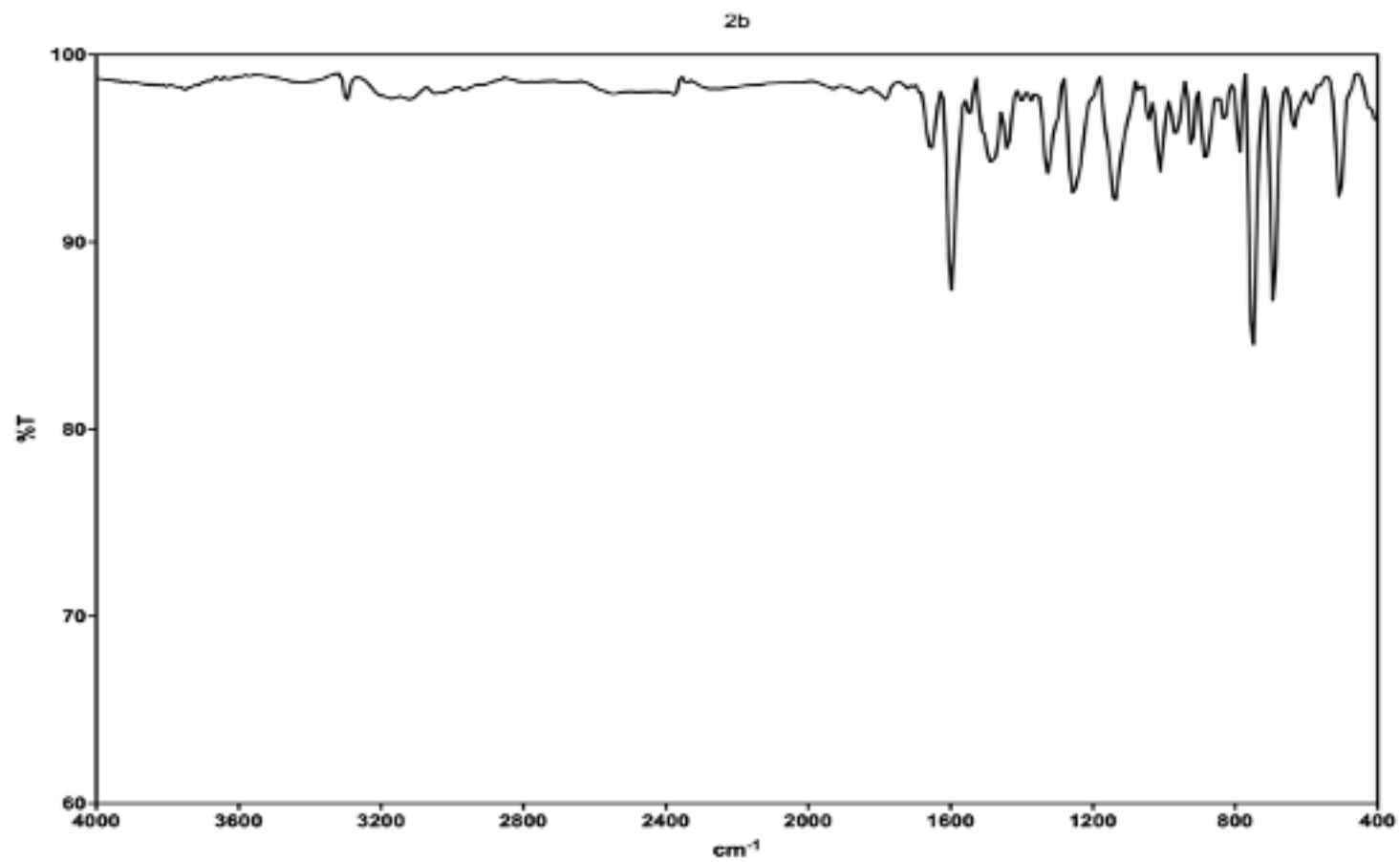


Figura 59. Espectro de FT-IR compuesto 2b

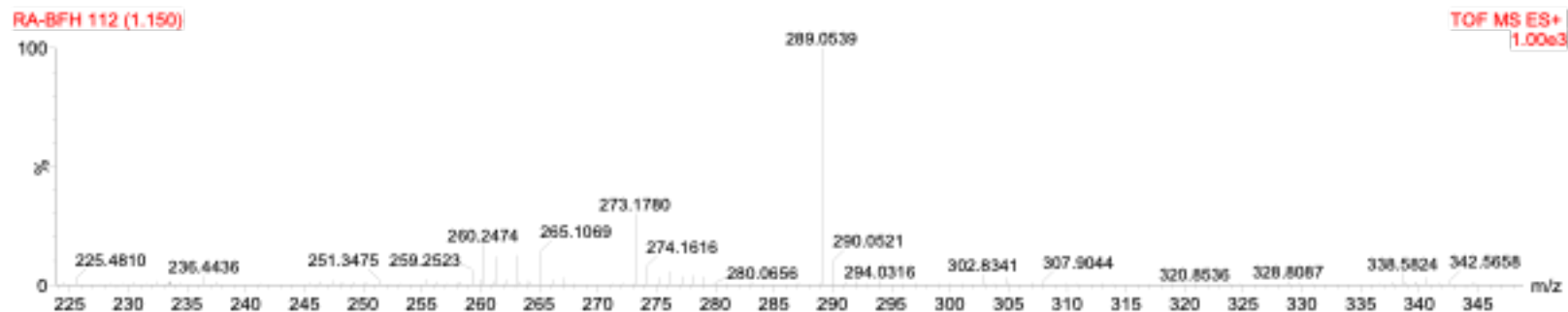
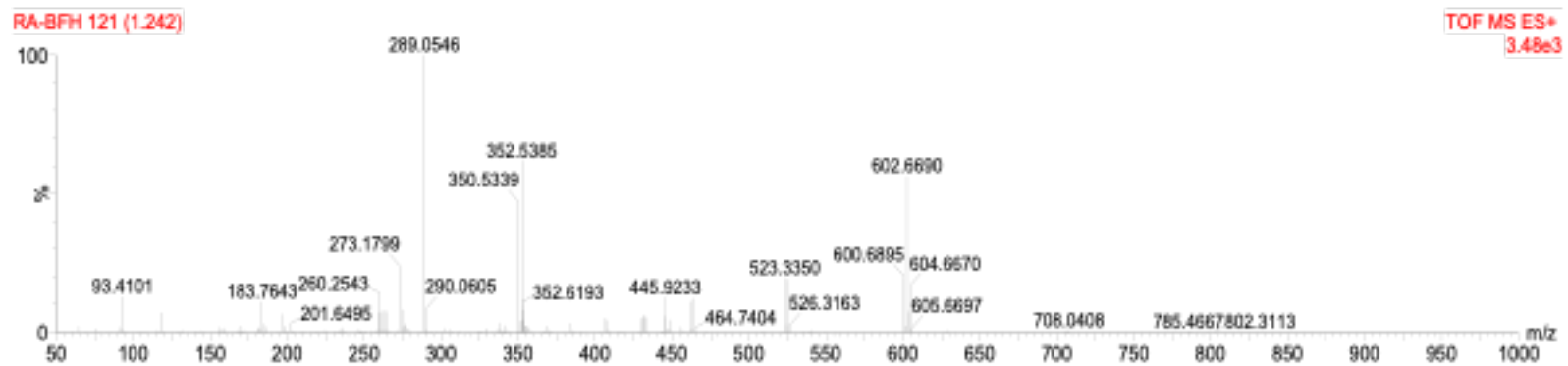
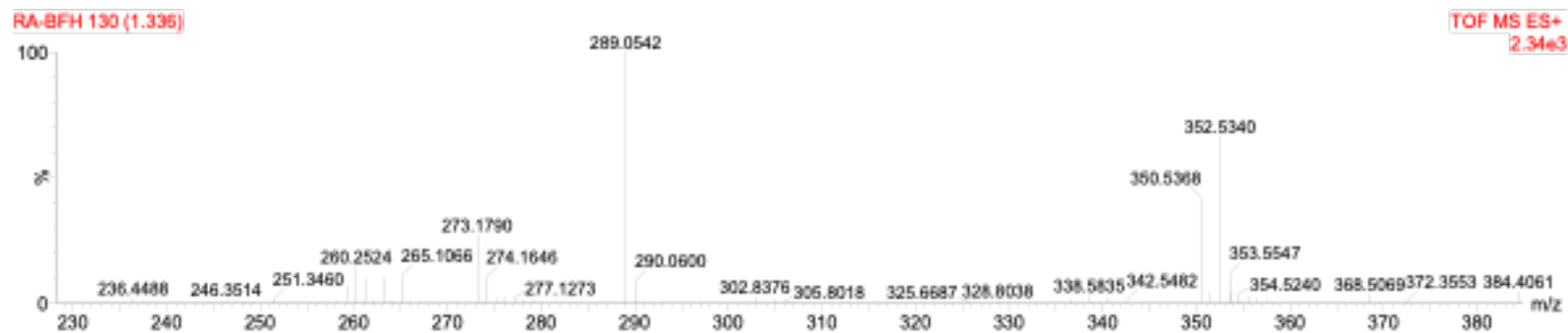
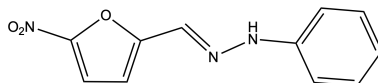


Figura 60. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **2b**

### 1-((5-nitro-2-furil)metilen)-2-fenilhidrazina (**2c**)



Una solución de 1,4578 g (10,08 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-nitro-2-furaldehído (1,4217 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 10,08 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado rojo. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C. Los cristales rojos filtrados corresponden al producto **2c** (2,2840 g; 98 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.12 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-6), 7.73 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-4), 7.27 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-11), 7.12 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-10), 6.98 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-3), 6.86 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-12).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 156.0, 151.4, 144.2, 129.7, 124.4, 121.0, 116.3, 113.3, 111.2.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3302 (N-H), 1597 (C=N), 1566 ( $\text{NO}_2$ ), 1365 ( $\text{NO}_2$ ), 1465 (C=C).
- p.f. 190-192 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$  Calculado: 231.2080. Encontrado: 231.2088.

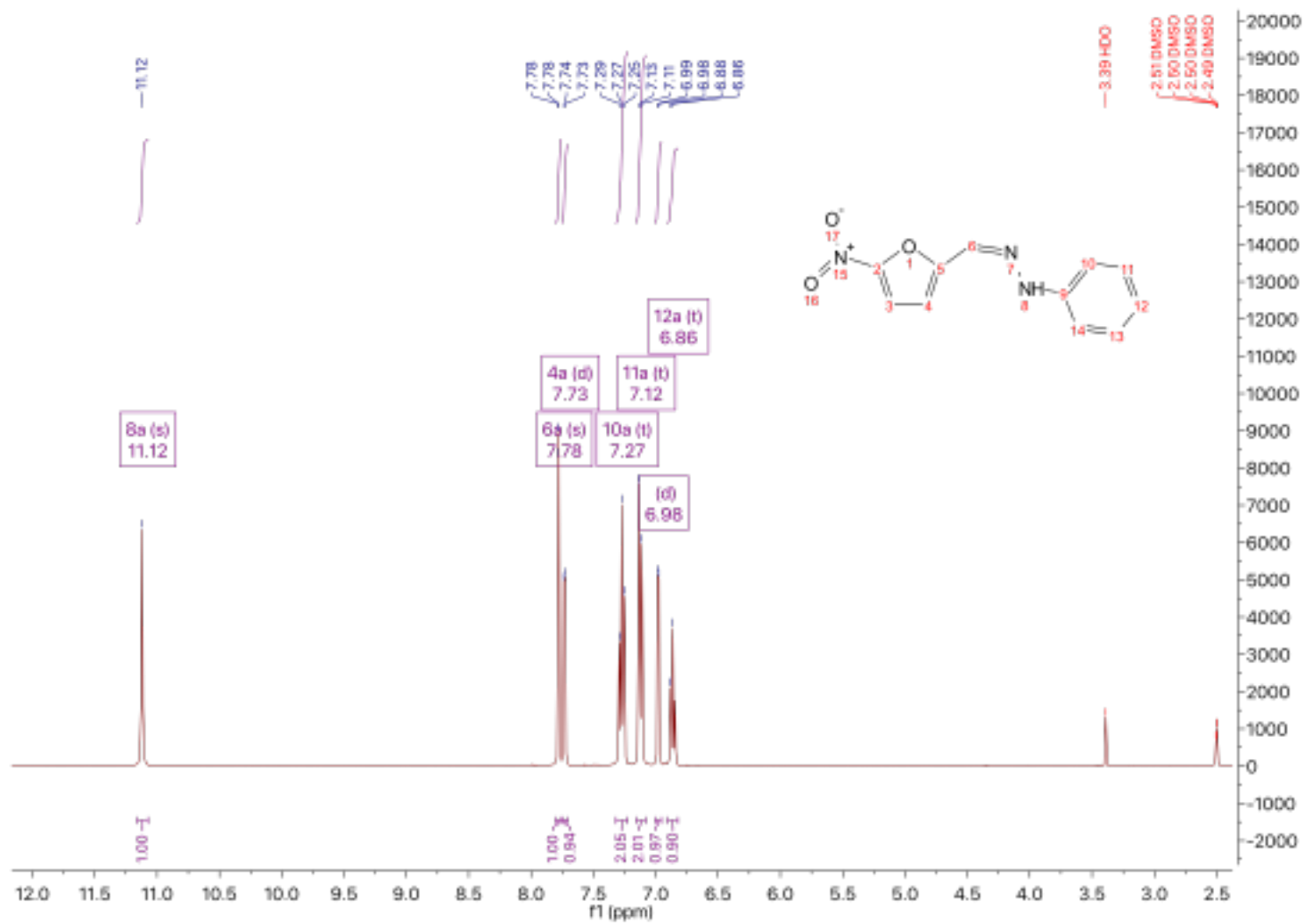


Figura 61. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto **2c**

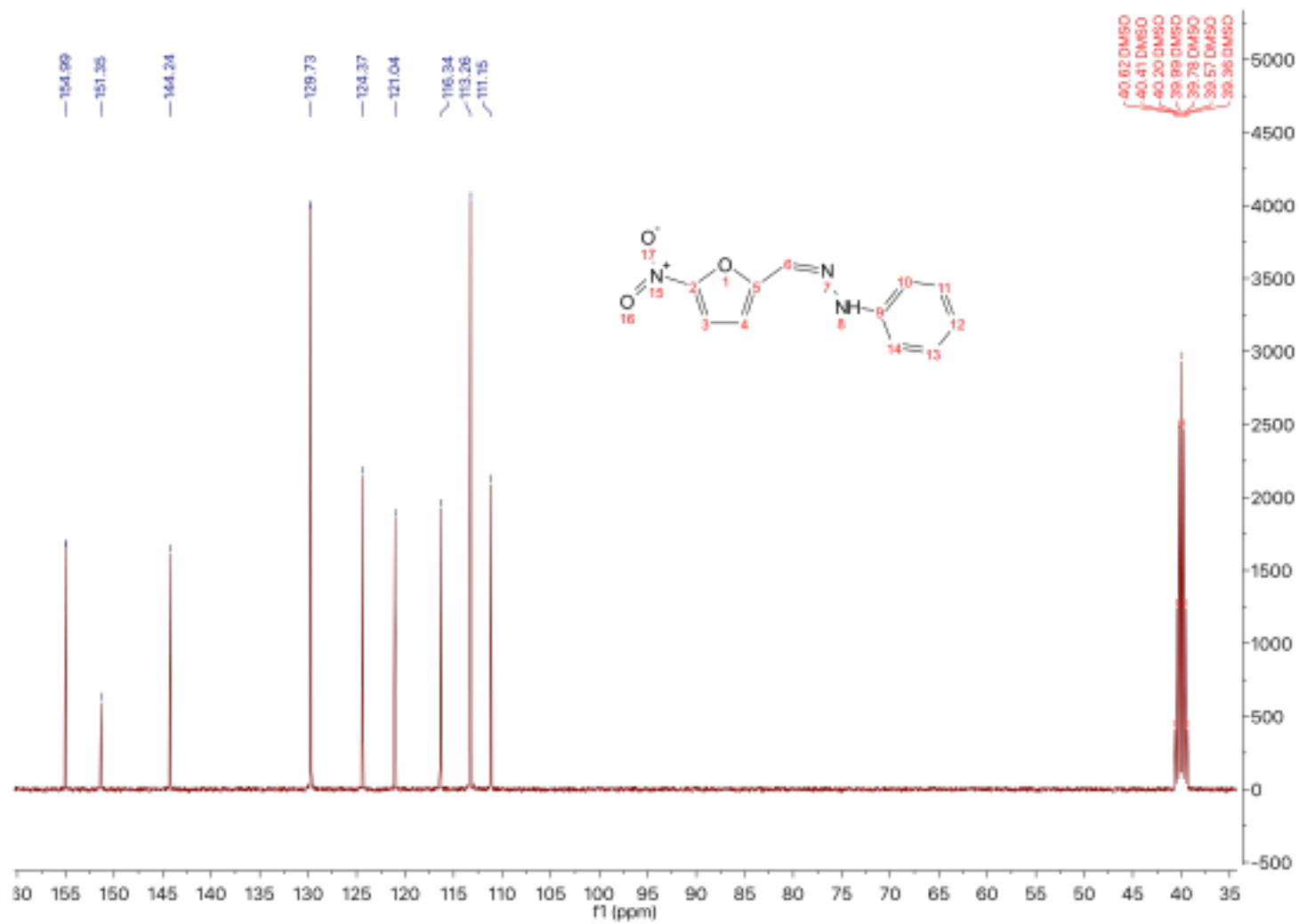


Figura 62. Espectro <sup>13</sup>C-RMN compuesto **2c**

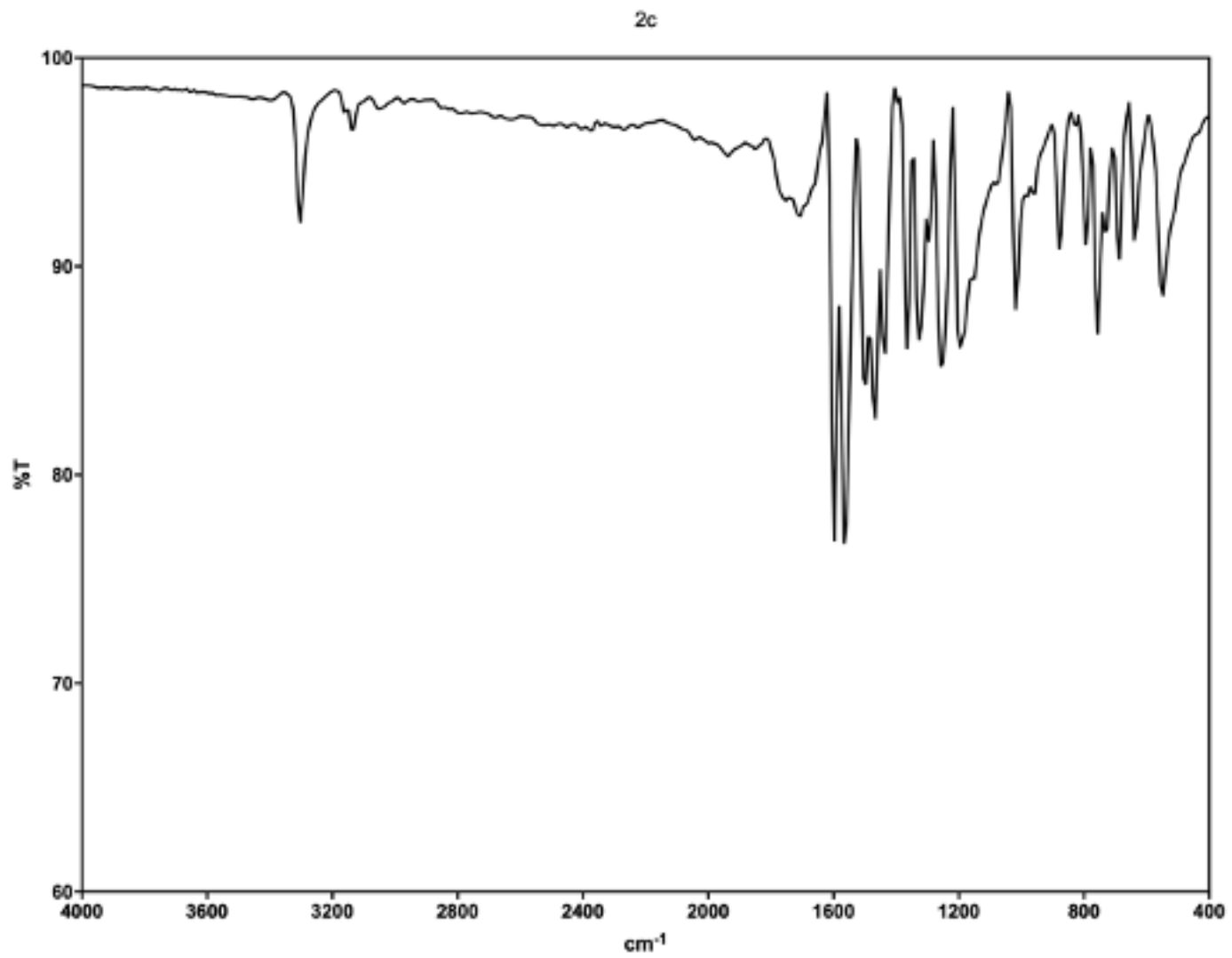


Figura 63. Espectro de FT-IR compuesto 2c

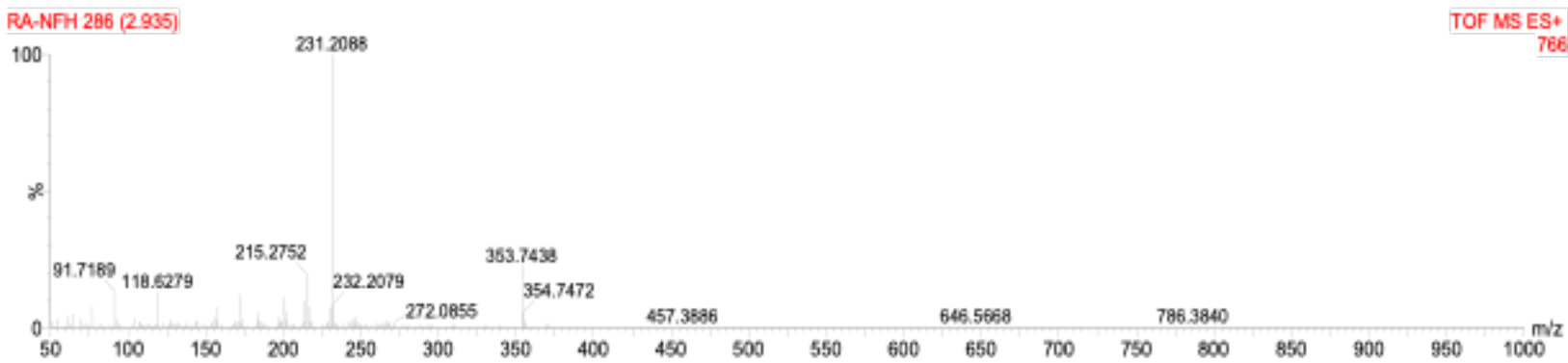
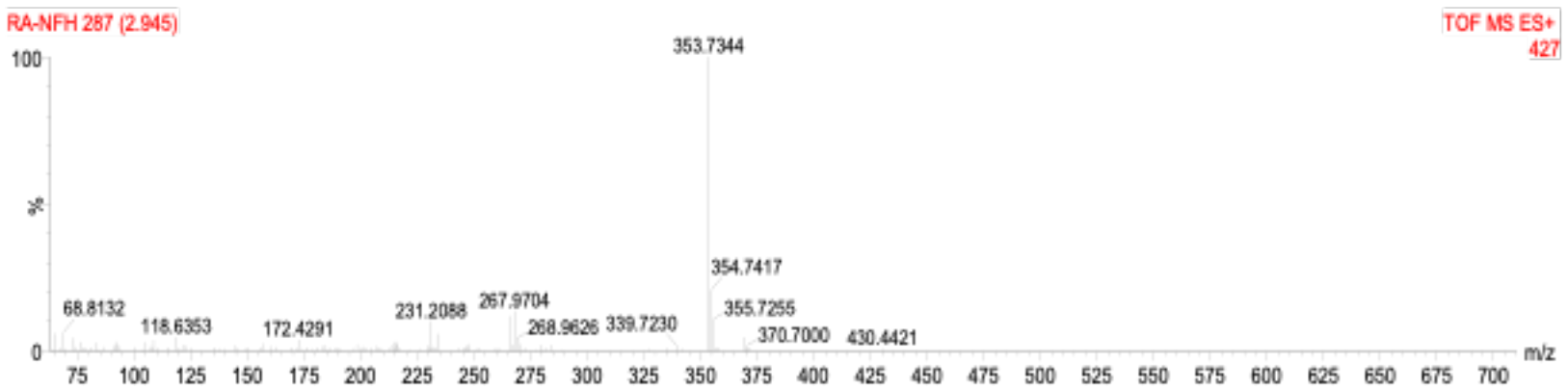
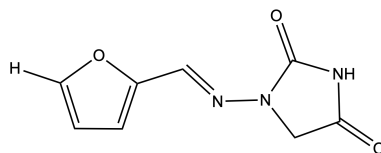


Figura 64. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **2c**



### 1-((furan-2-ilmetilen)amino)imidazolidin-2,4-diona (**3a**)



Una solución de 1-aminohidantoína (0,0768 g; 0,506 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (71  $\mu$ l; 0,862 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **3a** (0,0880 g; 90 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.23 (s, 1H, NH), 7.81 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.69 (s, 1H, H-6), 6.83 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 6.62 (dd,  $J = 3.4, 1.8$  Hz, 1H, H-4), 4.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 169.0, 153.4, 149.5, 144.9, 133.3, 113.0, 112.2, 48.9, 40.4, 40.2, 39.9, 39.7, 39.5, 39.3, 39.1, 38.9.
- Ir  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1782 (C=O), 1720 (C=O), 1481 (C=N), 1442 (CH<sub>2</sub>).
- p.f. dec. 220 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 194.0560. Encontrado: 194.1872

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.24 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H).



Figura 65. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 3a

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  169.40, 153.79, 149.95, 145.29, 133.68, 113.47, 112.58, 49.28.

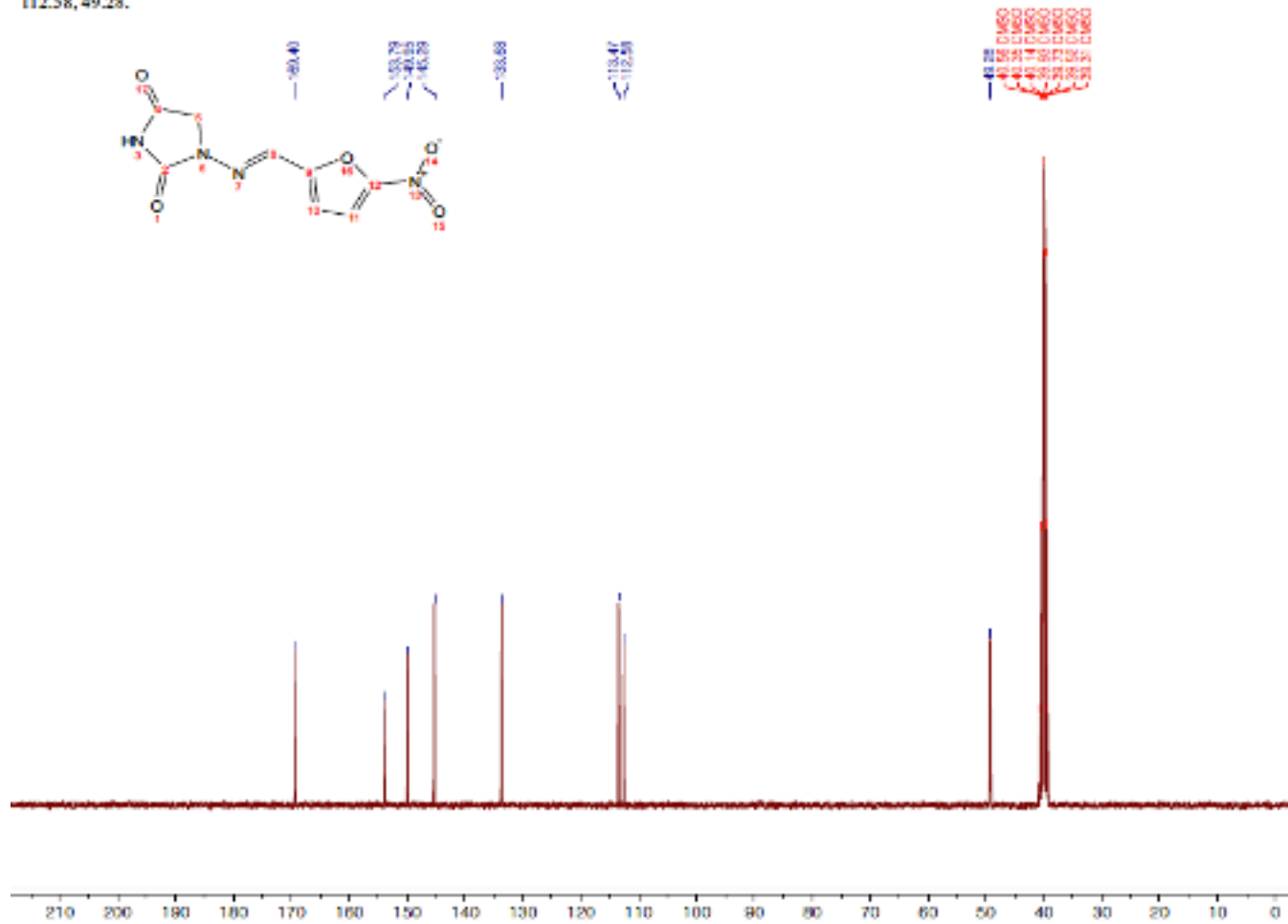


Figura 66. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 3a

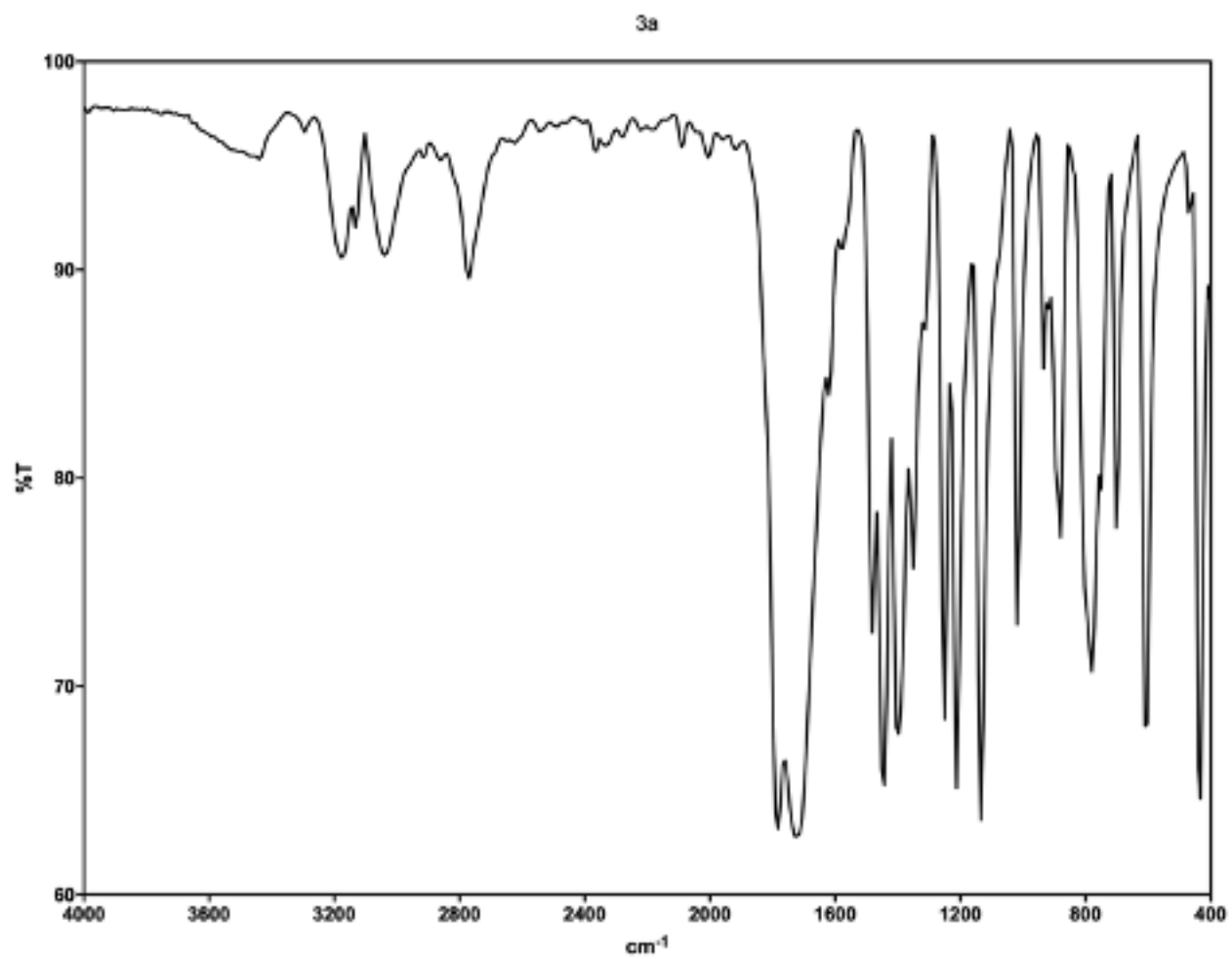


Figura 67. Espectro de FT-IR compuesto 3a

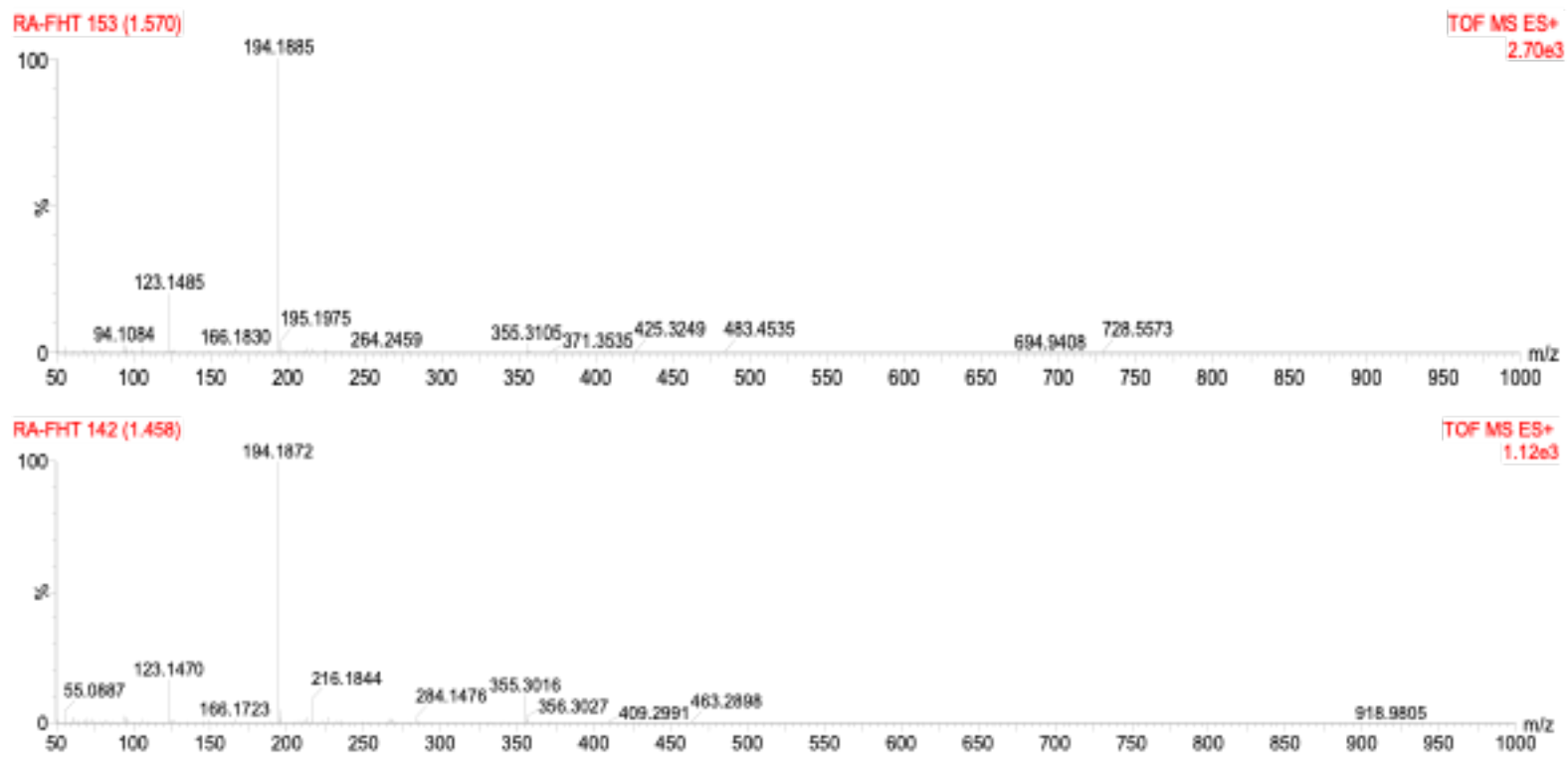
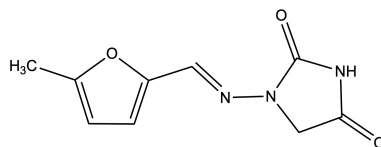


Figura 68. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **3a**

### 1-(((5-metilfuran-2-il)metilen)amino)imidazolidin-2,4-diona (**3b**)



Una solución de 1-aminohidantoína (0,1674 g; 1,104 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-metil-2-furaldehído (100  $\mu$ l; 1,005 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **3b** (0,1832 g; 88 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.20 (s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H, H-6), 6.70 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H-3), 6.23 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H-4), 4.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 169.4, 154.5, 153.7, 148.4, 133.7, 115.2, 108.9, 49.3, 13.9.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 11782 (C=O), 1720 (C=O), 1527 (C=N), 1442 (CH<sub>2</sub>).
- p.f. dec. 230 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 208.0717. Encontrado: 208.1800.

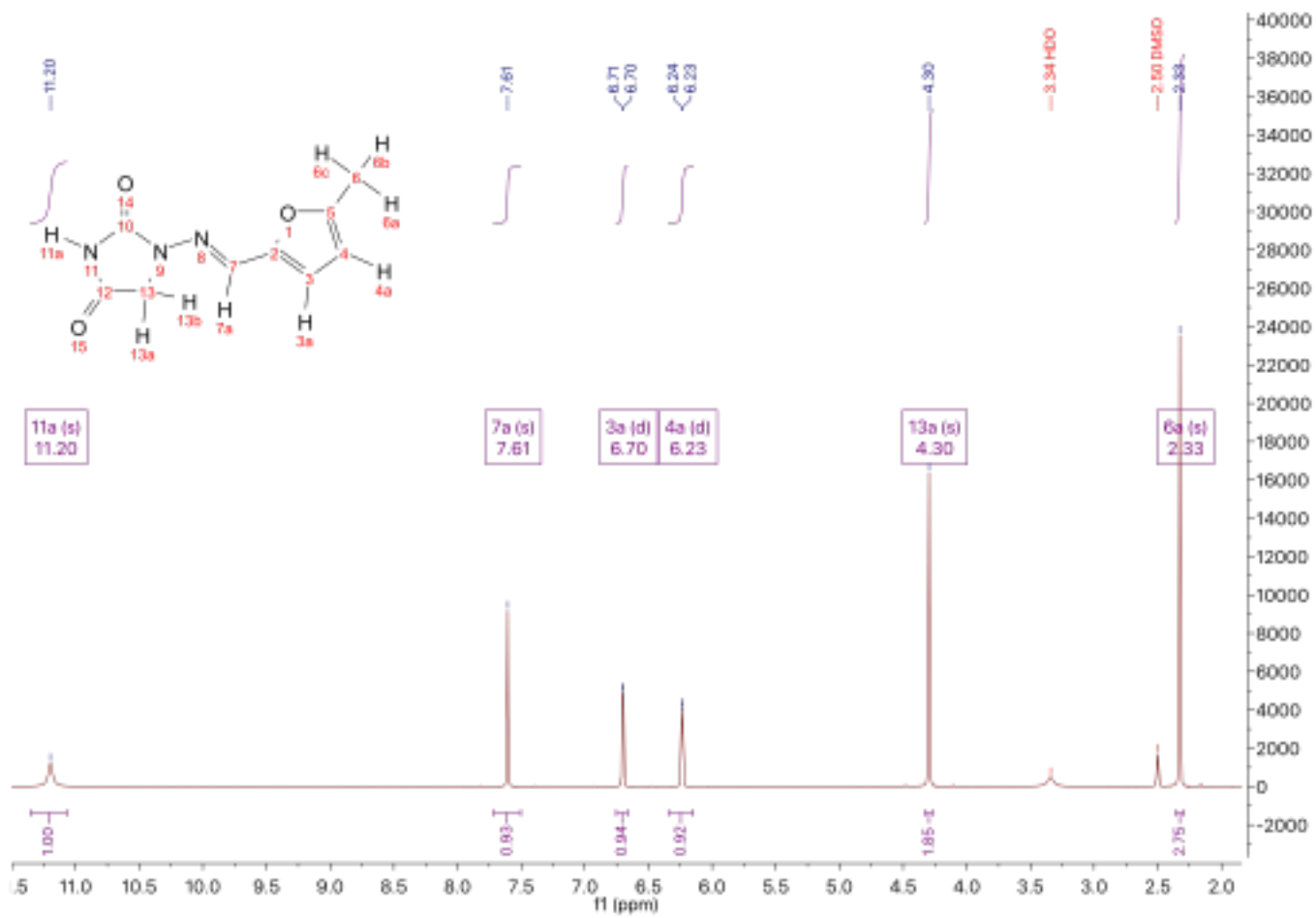


Figura 69. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto **3b**

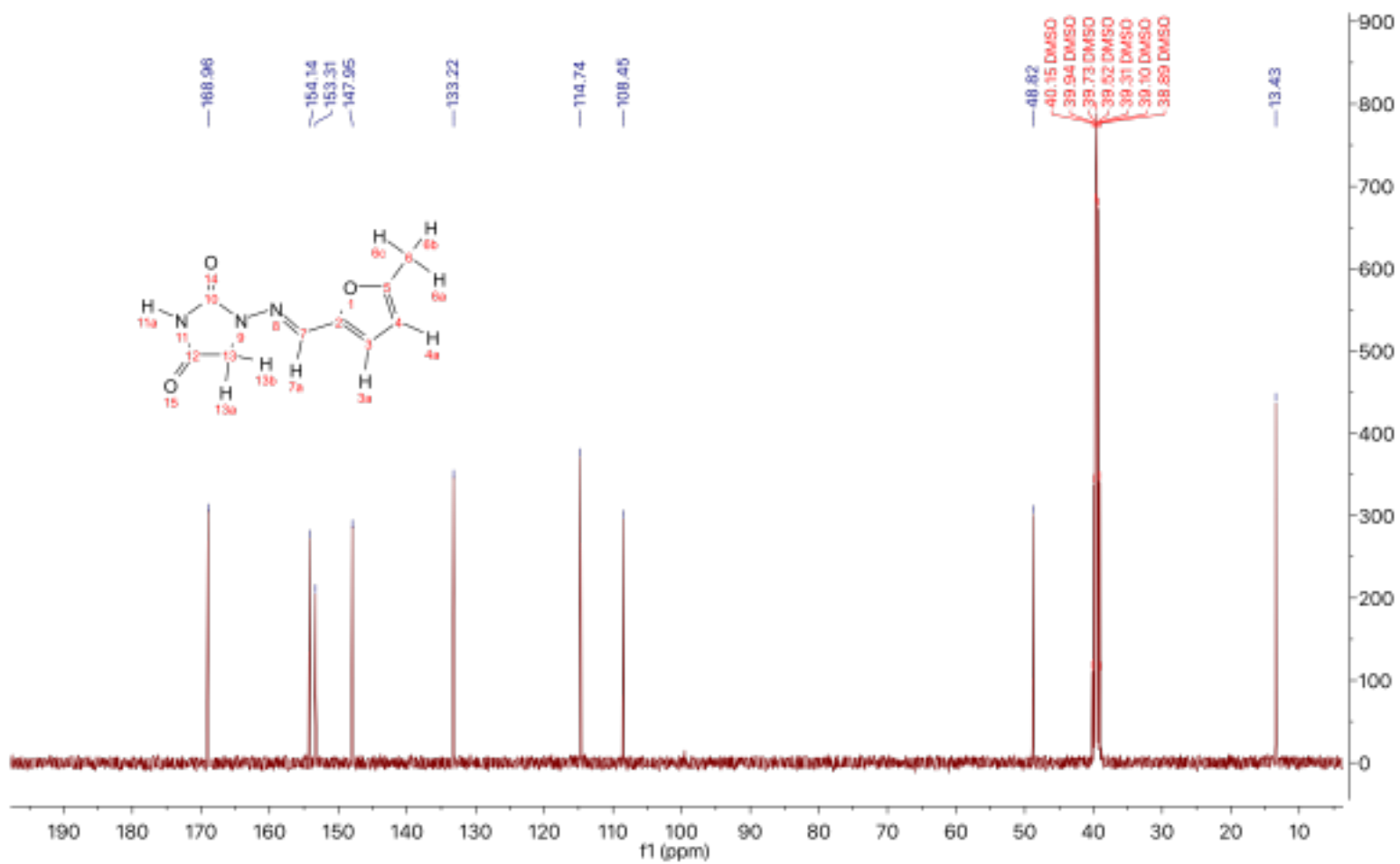


Figura 70. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 3b



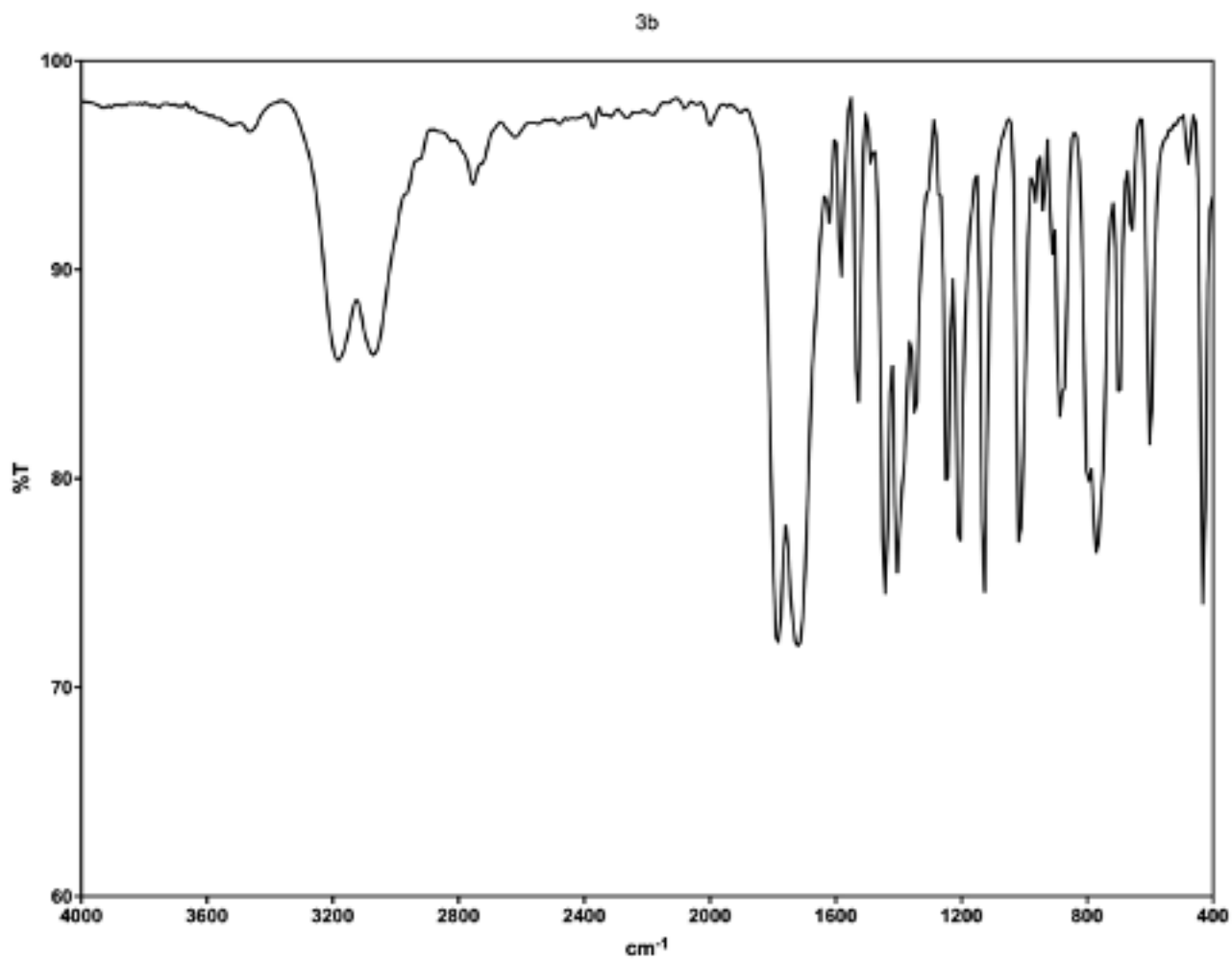


Figura 71. Espectro de FT-IR compuesto 3b

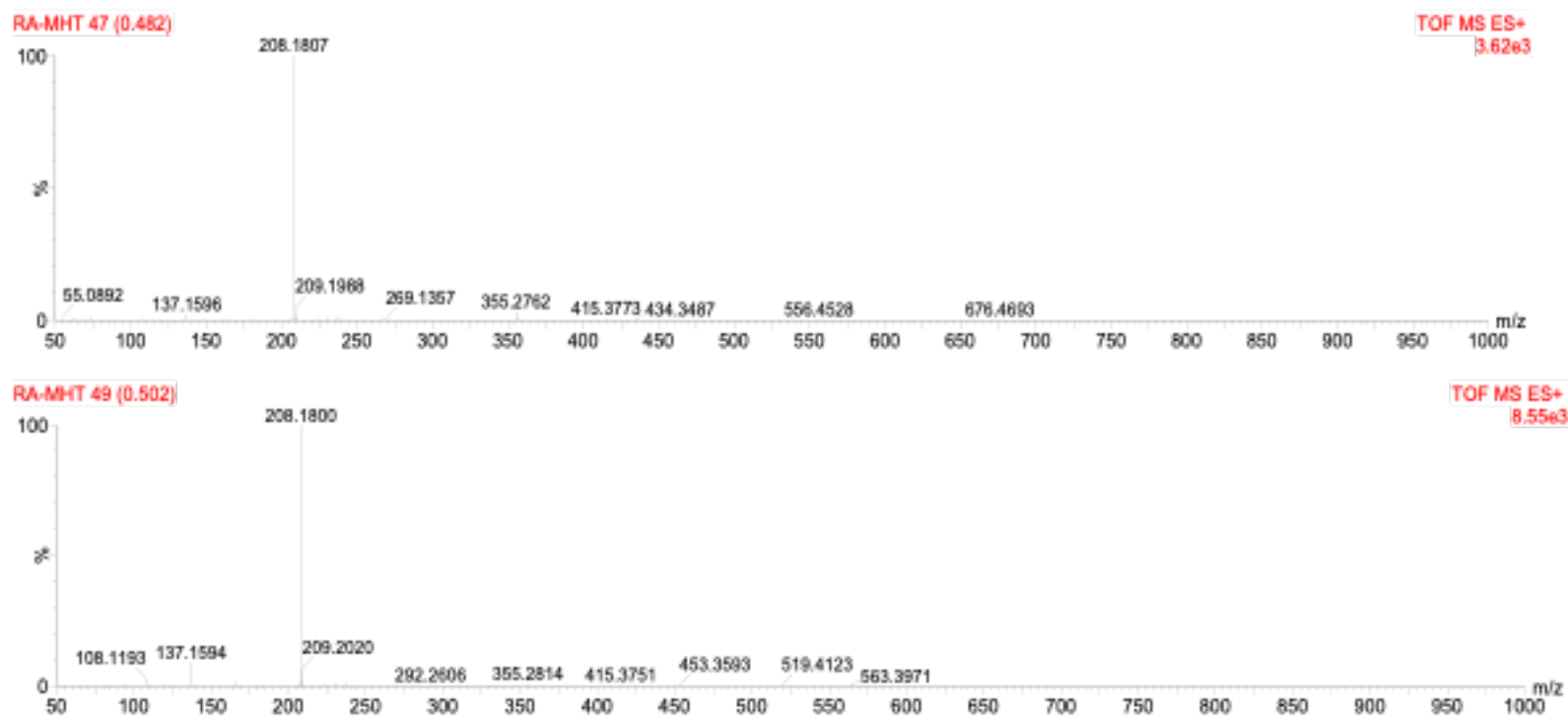
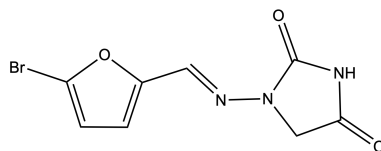


Figura 72. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **3b**

### 1-(((5-bromofuran-2-il)metilen)amino)imidazolidin-2,4-diona (**3c**)



Una solución de 1-aminohidantoína (0,0717 g; 0,4731 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-bromo-2-furaldehído (0,0828 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,4731 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **3c** (0,0636 g; 49 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.27 (s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, H-6), 6.85 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3), 6.74 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4), 4.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 168.8, 153.3, 151.4, 132.1, 124.1, 115.5, 114.2, 48.9.
- Ir  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1789 (C=O), 1712 (C=O), 1481 (C=N), 1442 (CH<sub>2</sub>).
- p.f. dec. 220 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 271.9665. Encontrado: 272.0049.

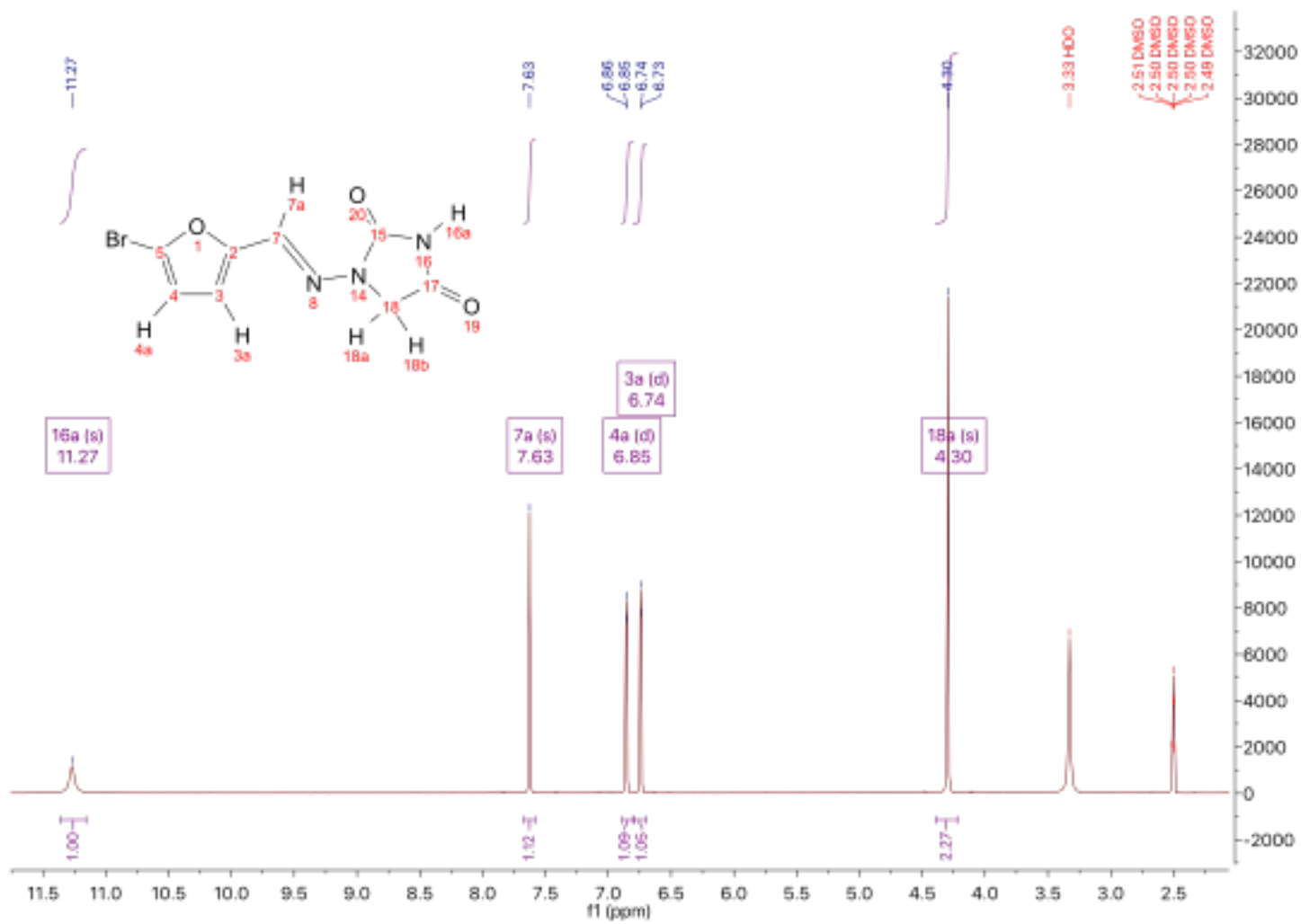


Figura 73. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 3c

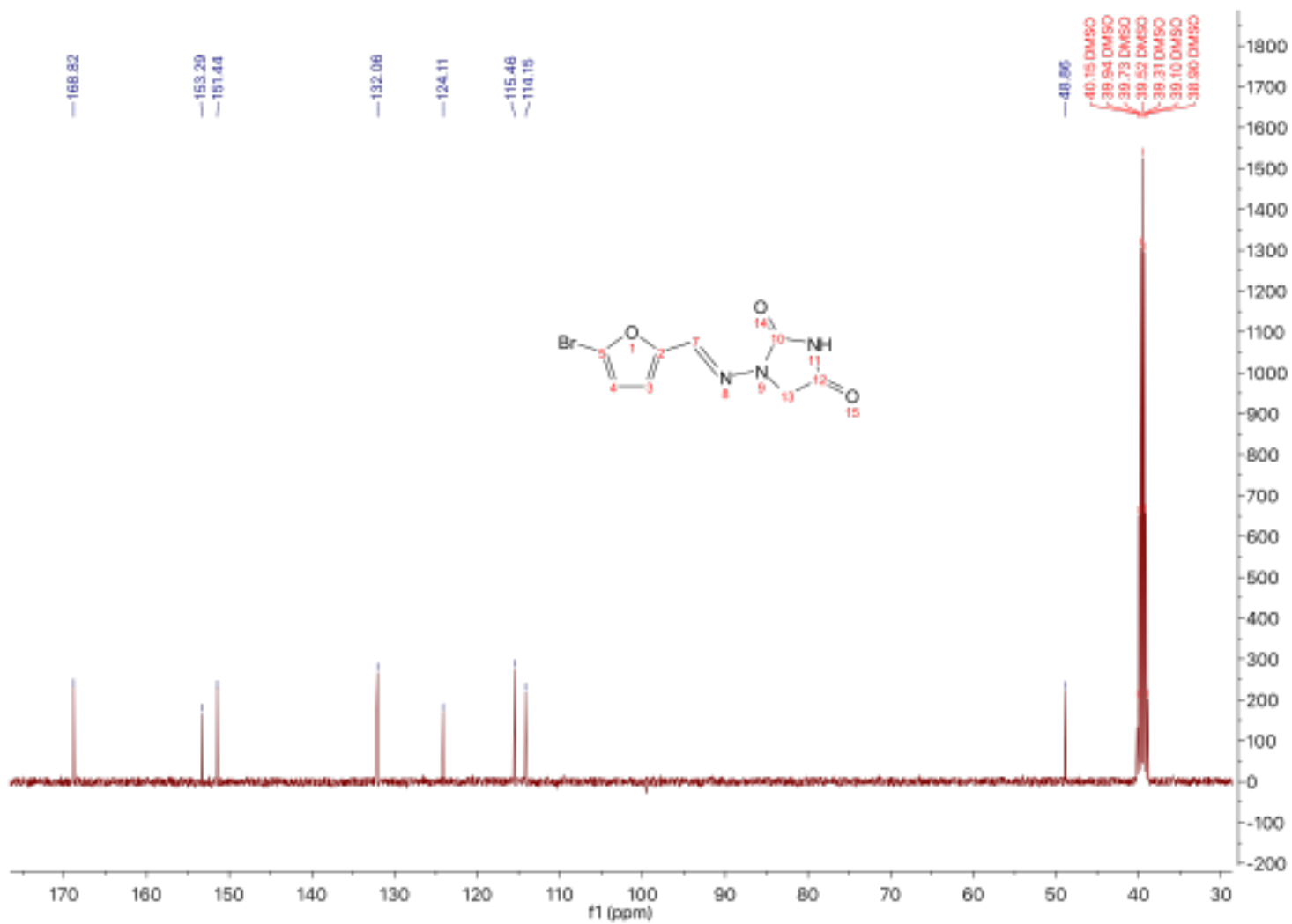


Figura 74. Espectro <sup>13</sup>C-RMN compuesto **3c**

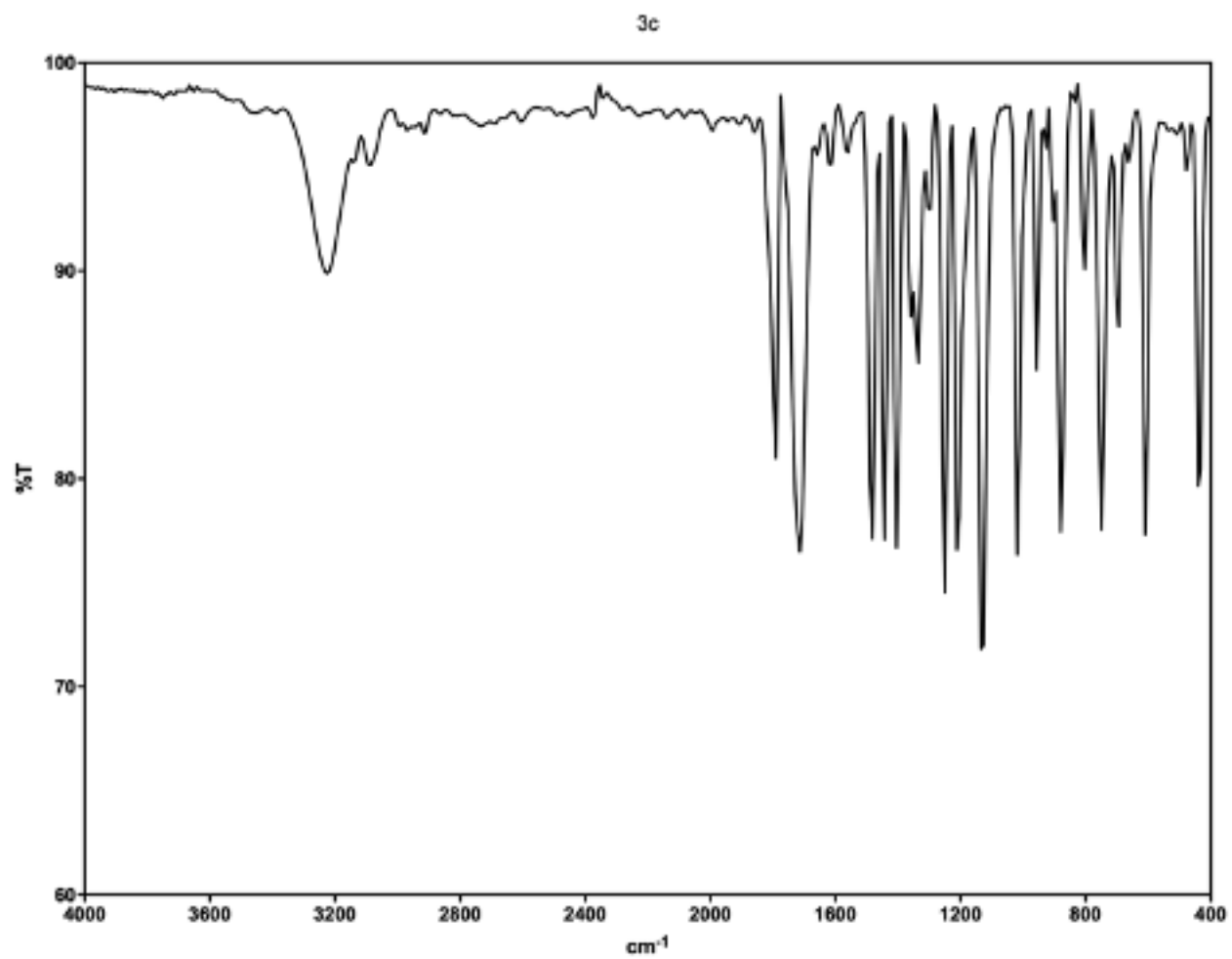


Figura 75. Espectro de FT-IR compuesto 3c

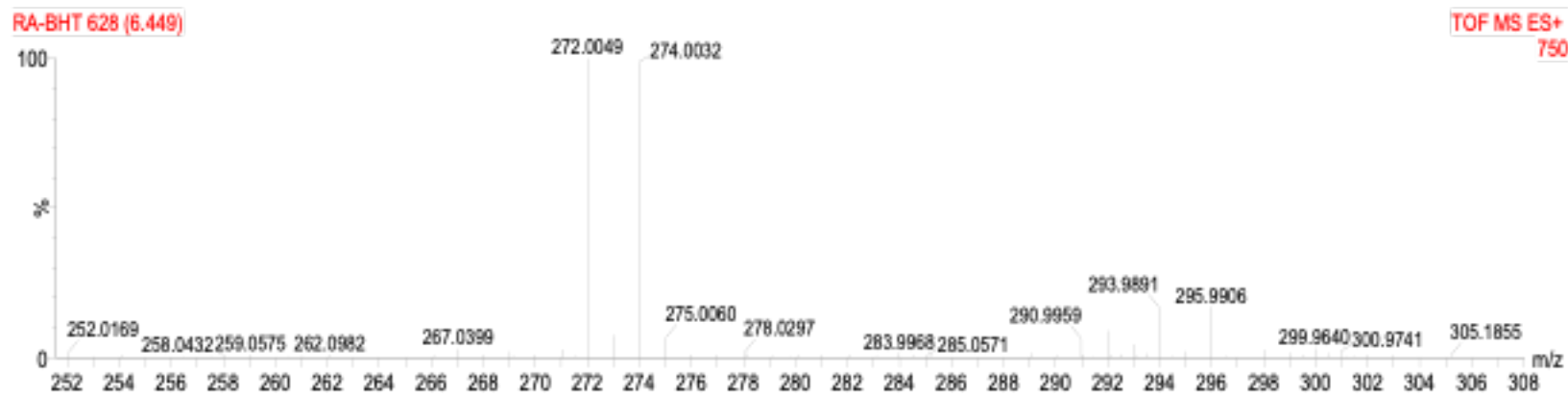
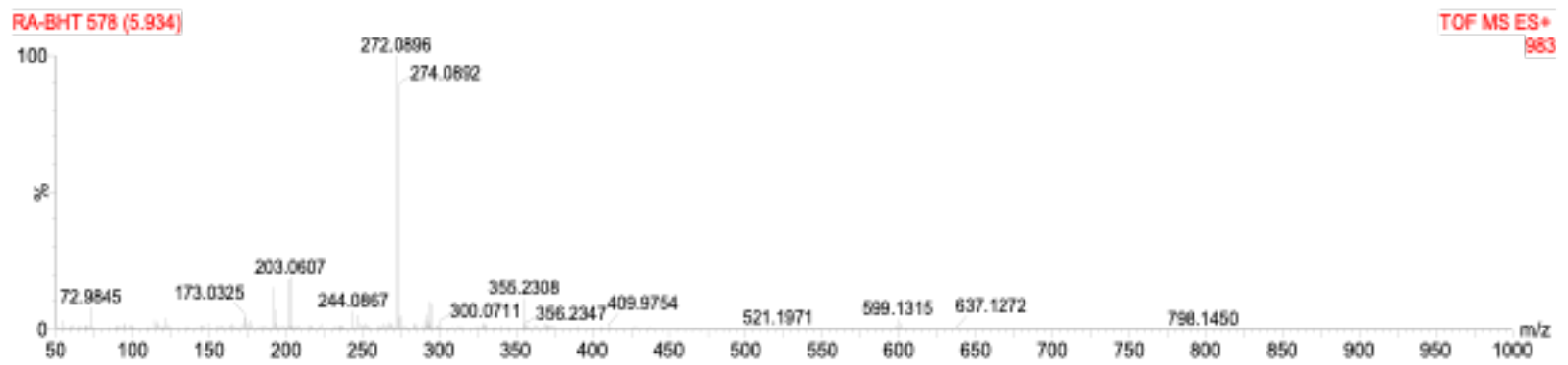
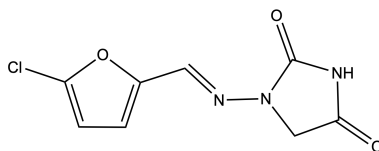


Figura 76. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **3c**

### 1-(((5-clorofuran-2-il)metilen)amino)imidazolidin-2,4-diona (**3d**)



Una solución de 1-aminohidantoína (0,1105 g; 0,7293 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (0,0898 g en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,6876 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **3d** (0,1393 g; 89 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.29 (s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, H-6), 6.90 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4), 6.65 (dd,  $J = 3.5, 1.2$  Hz, 1H, H-3), 4.31 (s, 2H).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 169.30, 153.77, 149.73, 137.43, 132.57, 115.76, 109.83, 49.30.
- Ir  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1813 (C=O), 1760 (C=O), 1442 (C=N), 1350 ( $\text{CH}_2$ ).
- p.f. 198-200 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}_3$  Calculado: 228.0176. Encontrado: 228.0179.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.29 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.90 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.65 (dd,  $J = 3.5, 1.2$  Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 3.43 (d,  $J = 2.2$  Hz, 3H).

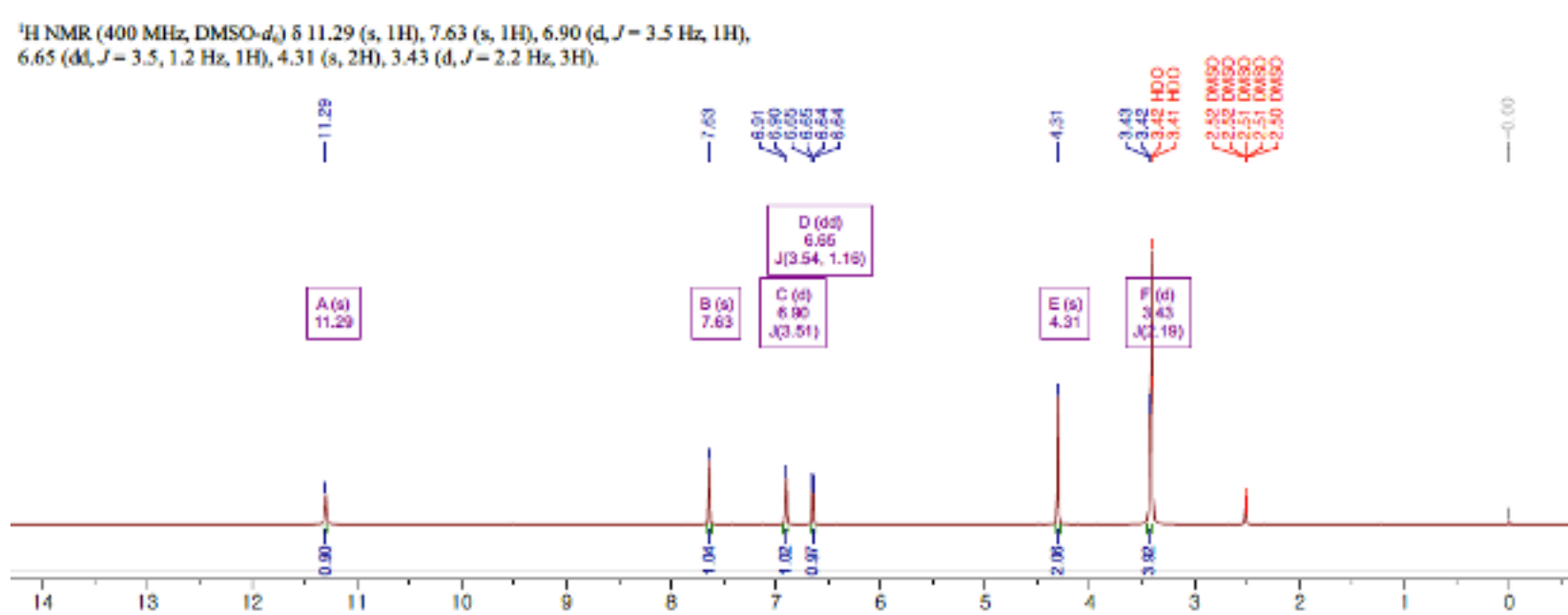


Figura 77. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 3d

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  169.30, 153.77, 149.73, 137.43, 132.57, 115.76, 109.83, 49.30.

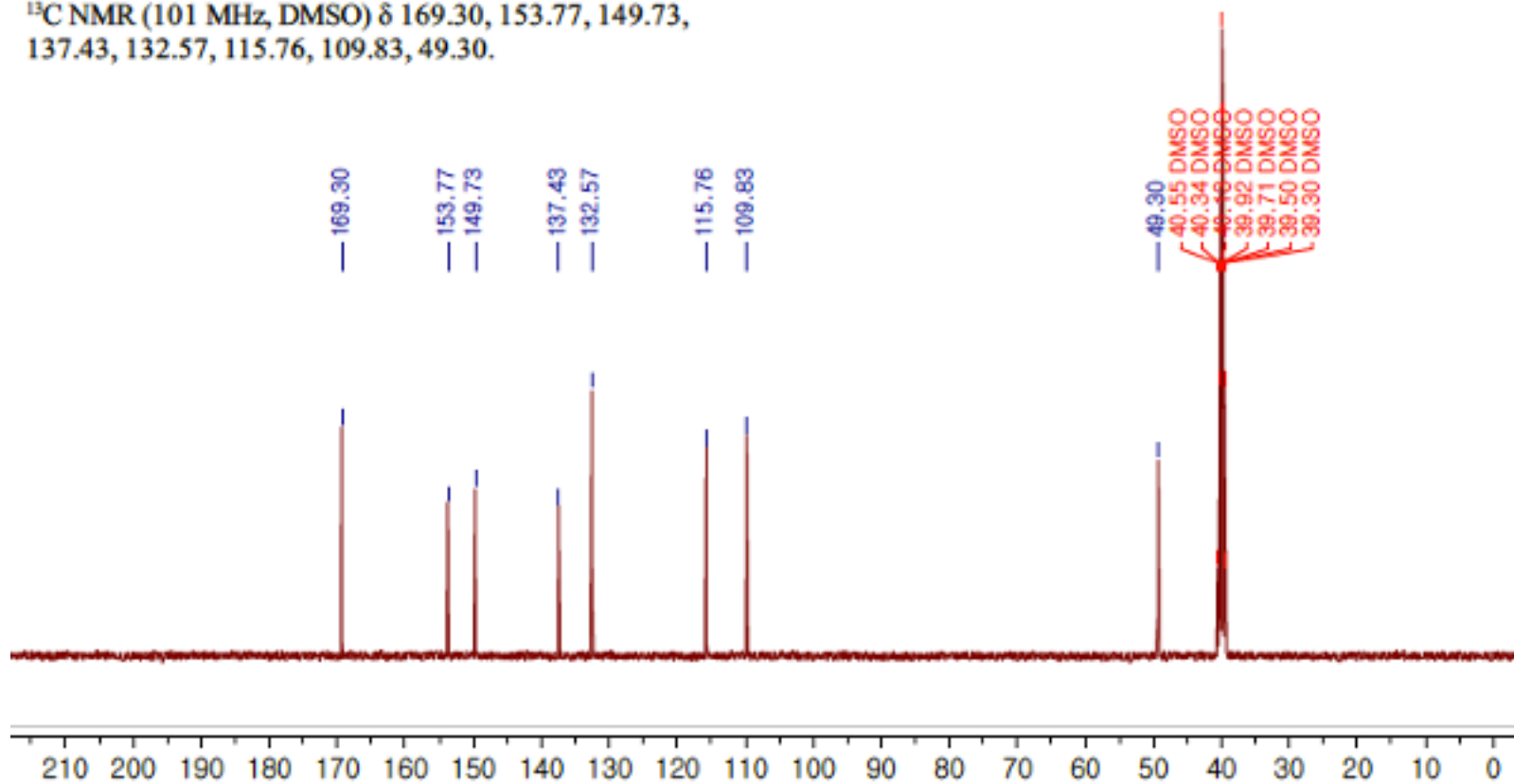


Figura 78. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 3d

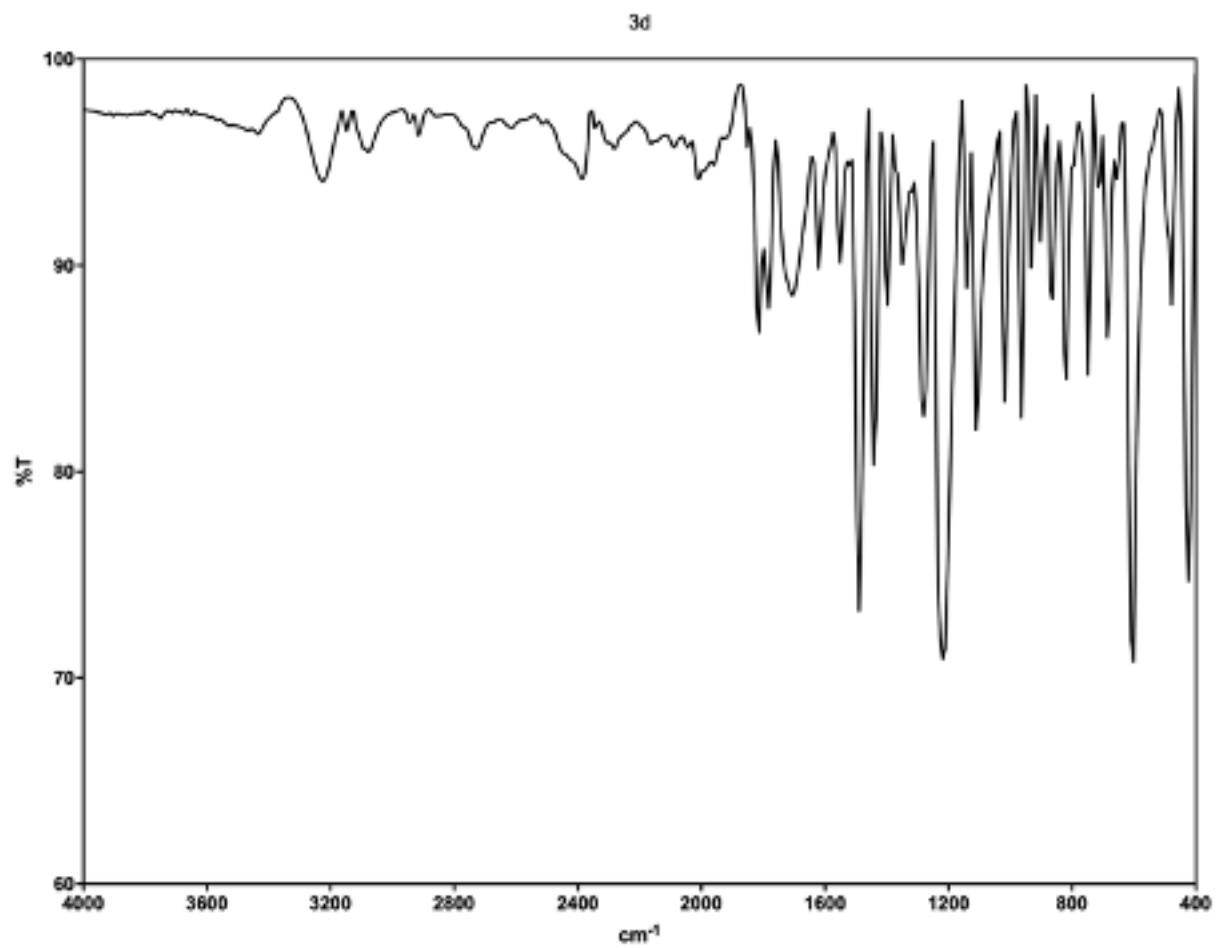


Figura 79. Espectro de FT-IR compuesto 3d

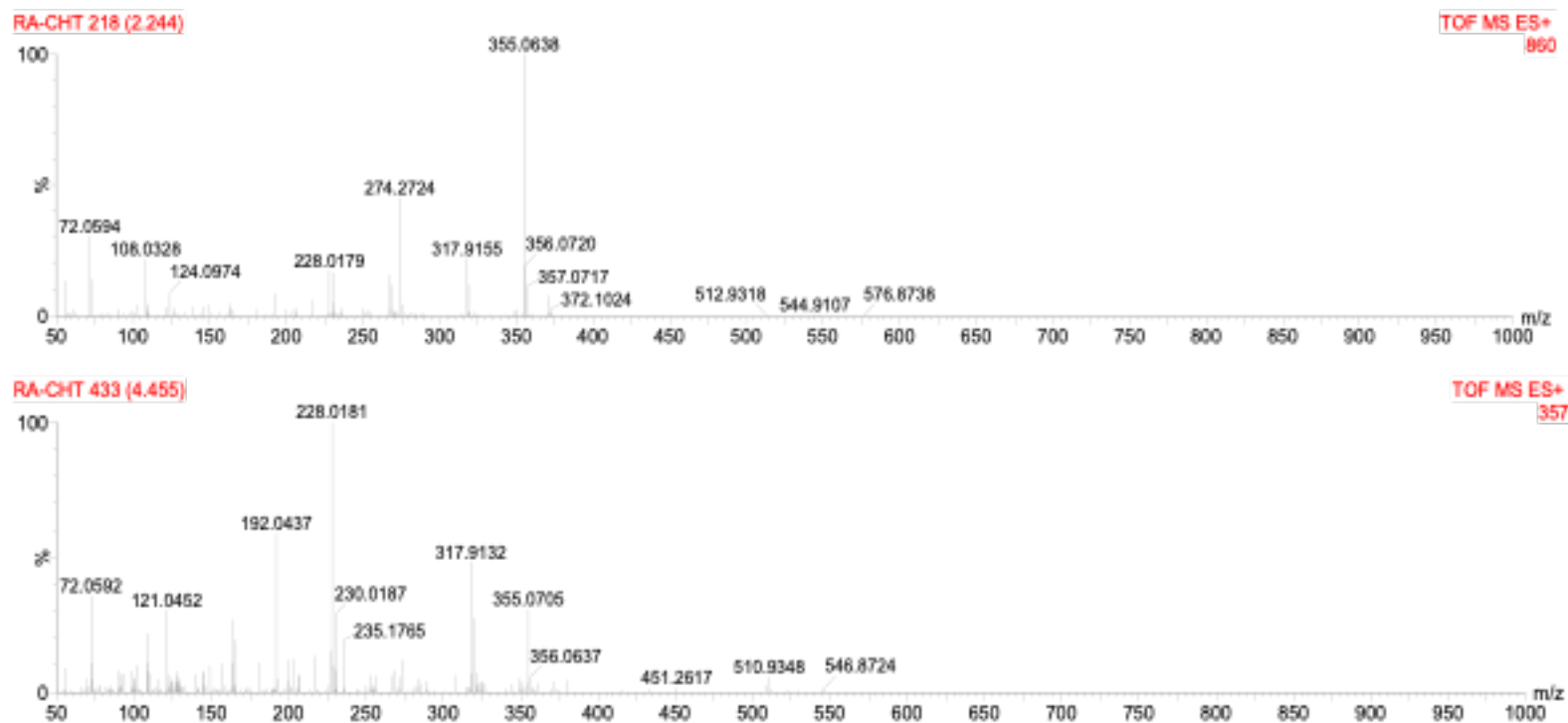
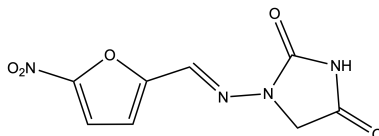


Figura 80. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **3d**

**1-(((5-nitrofurán-2-il)metilén)amino)imidazolidin-2,4-diona (nitrofurantoína, NHT)**



Una solución de 1-aminohidantoína (0,0970 g; 0,6401 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-nitro-2-furaldehído (0,0715 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,5068 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado amarillo. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **3e** (nitrofurantoína) (0,1183 g; 95 % rendimiento). Espectralmente la nitrofurantoína sintetizada (**3e**) es idéntica a la nitrofurantoína adquirida en Sigma-Aldrich.

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.46 (s, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-6), 7.77 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-4), 7.13 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-3), 4.35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 169.1, 153.7, 152.3, 152.2, 131.6, 115.2, 115.0, 49.5, 40.3, 39.6, 31.1.
- Ir no determinado
- p.f. no determinado
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> Calculado: 239.0411. Encontrado: 239.1626.

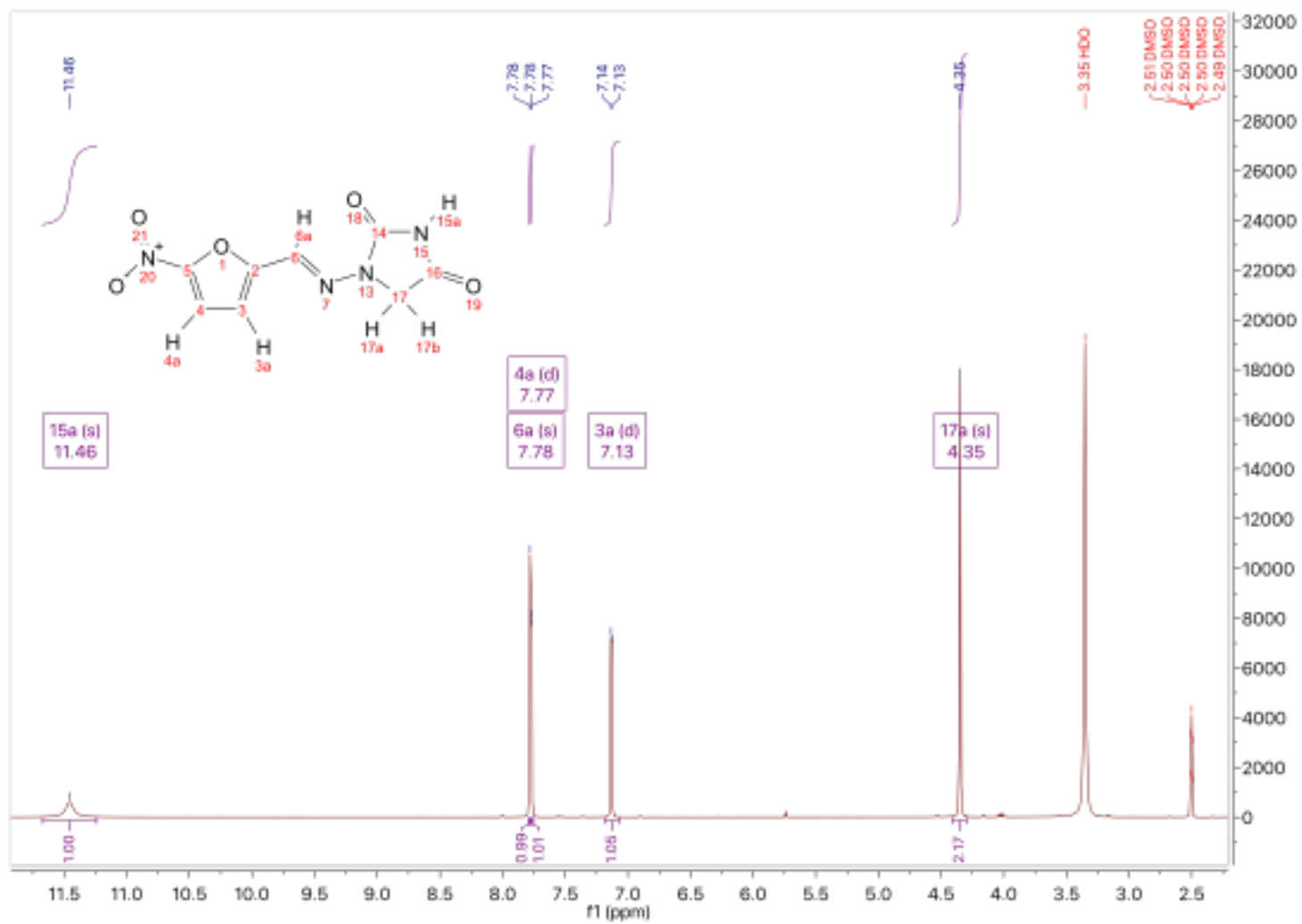


Figura 81. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto nitrofurantoina

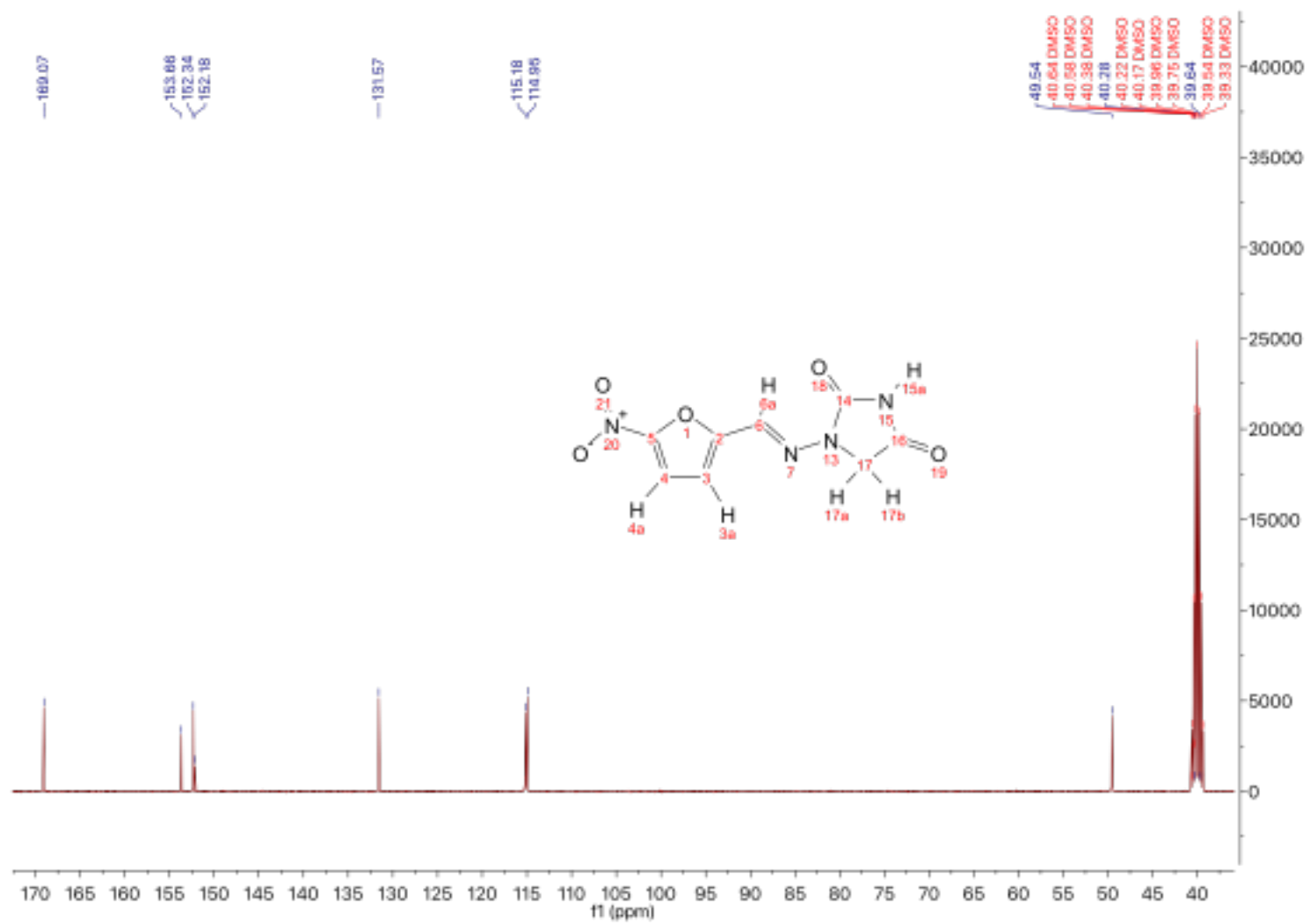


Figura 82. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto **nitrofurantoina**

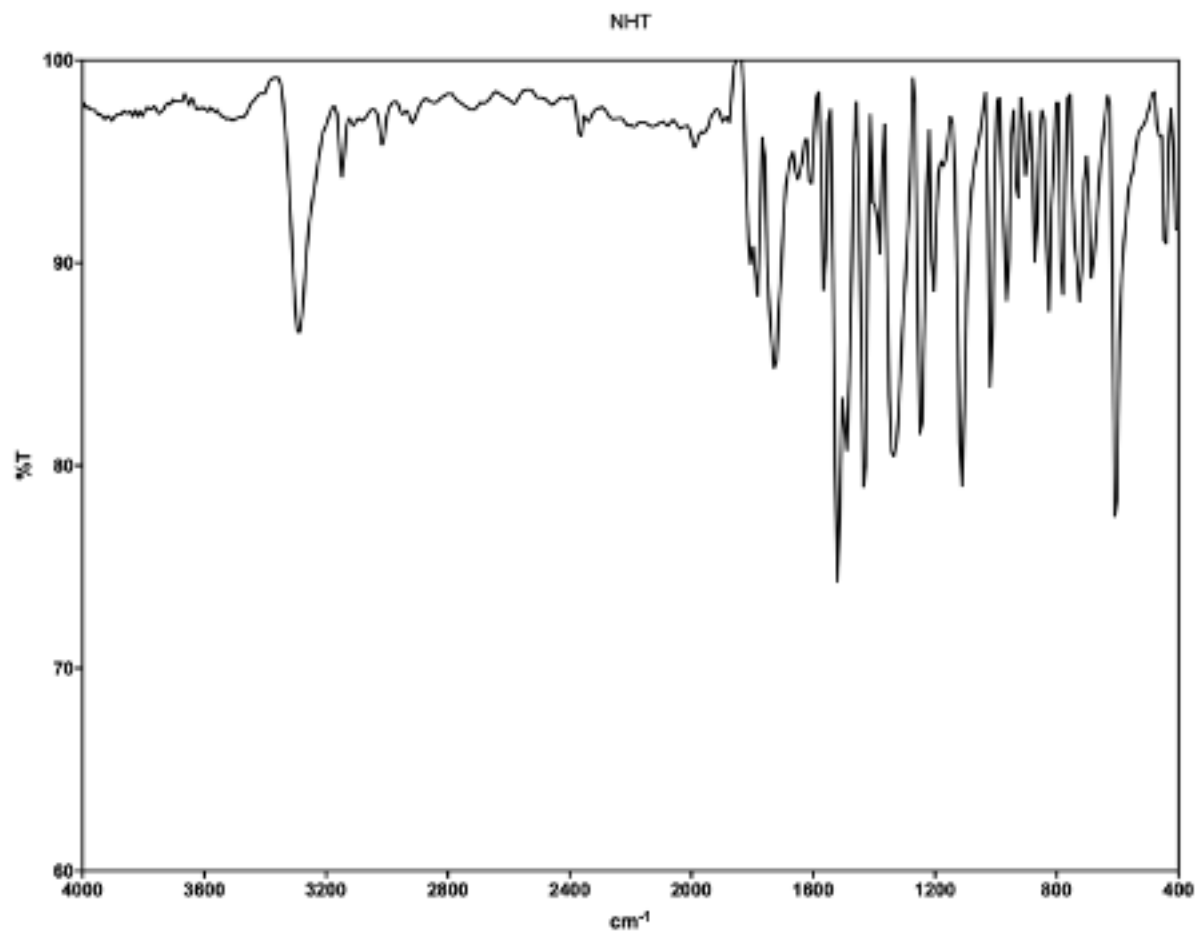


Figura 83. Espectro de FT-IR compuesto **nitrofurantoína**



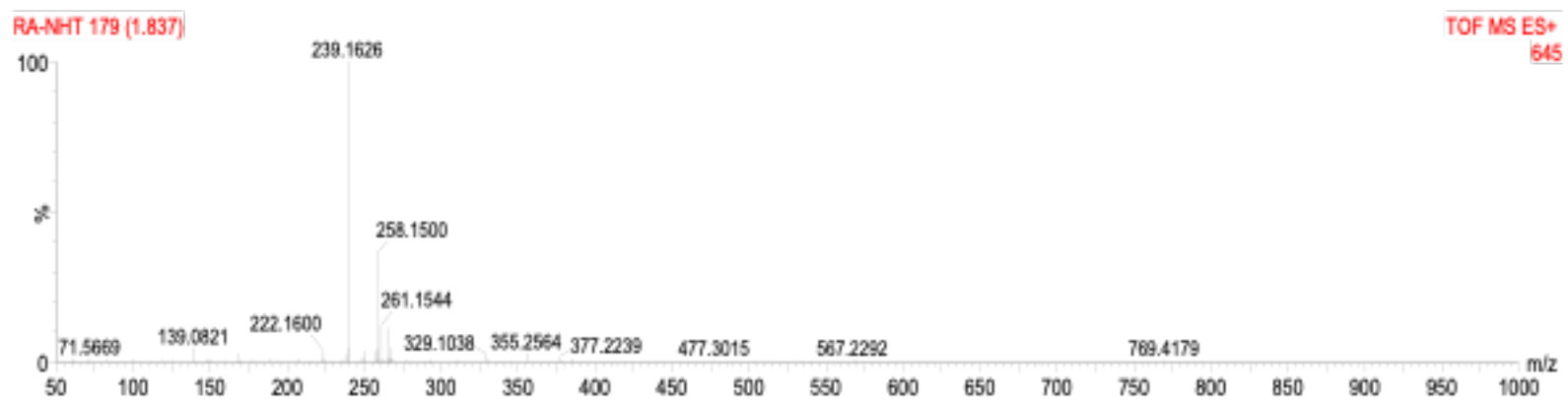
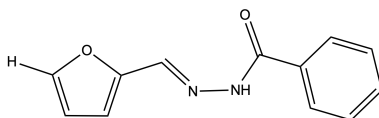


Figura 84. Espectroscopía de masas de alta resolución **nitrofurantoína**

### N<sup>2</sup>-(furan-2-ilmetilen)benzohidrazida (4a)



Una solución de hidrazida benzoica (0,1819 g; 1,336 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (110,7  $\mu$ l; 1,336 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **4a** (0,1349 g; 47 % rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 11.79 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H-6), 7.94 - 7.87 (m, 2H, H-11), 7.85 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H-5), 7.59 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H-13), 7.52 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, H-12), 6.93 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H, H-3), 6.64 (dd,  $J$  = 3.5, 1.8 Hz, 1H, C-4).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 163.1, 149.5, 145.2, 137.6, 133.4, 131.8, 128.5, 127.6, 113.5, 112.2.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3240 (N-H), 3055 (N-H), 1651 (C=O), 1473 (C=N).
- p.f. 180-182 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Calculado: 214.2205. Encontrado: 214.2215.

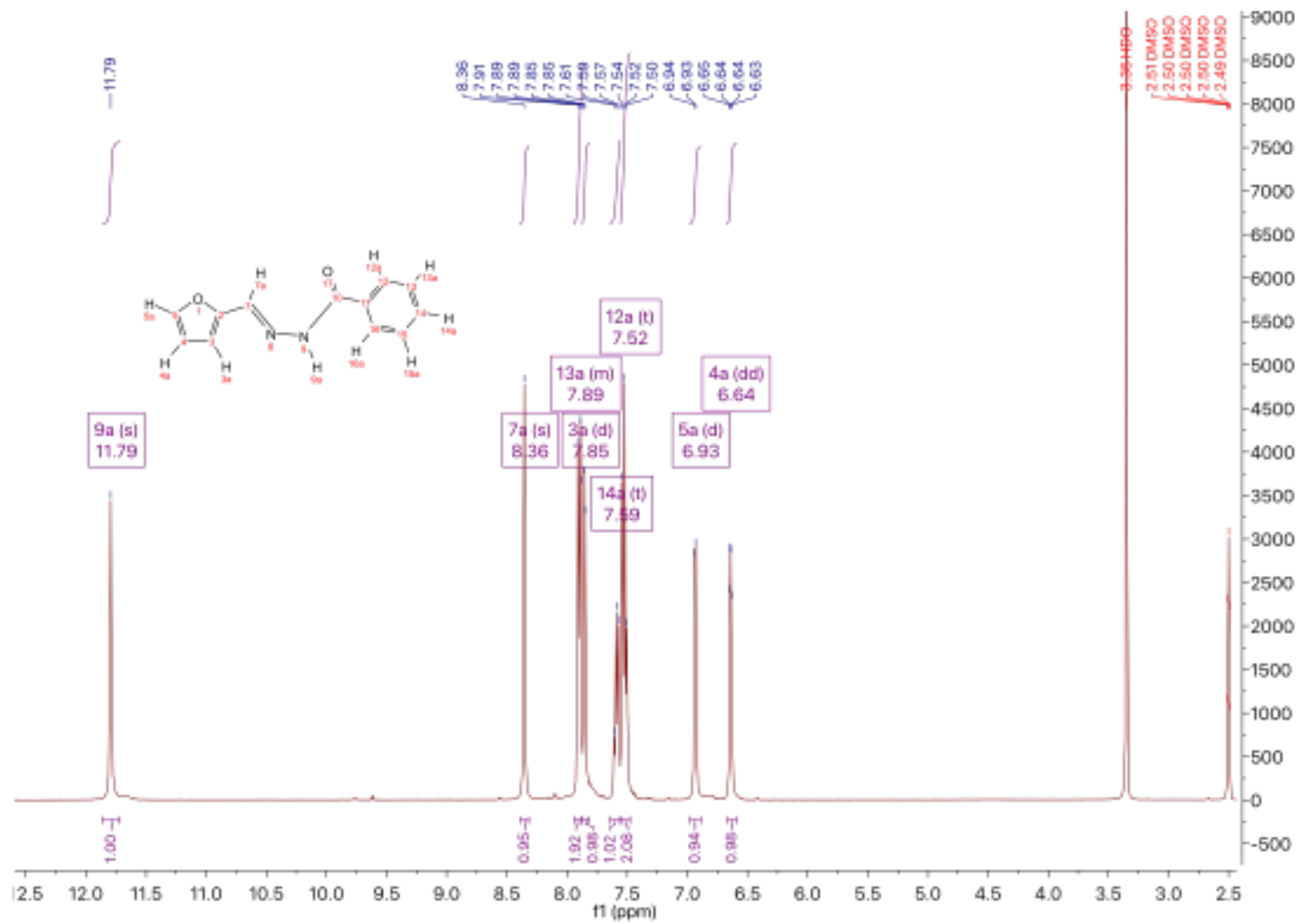


Figura 85. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 4a

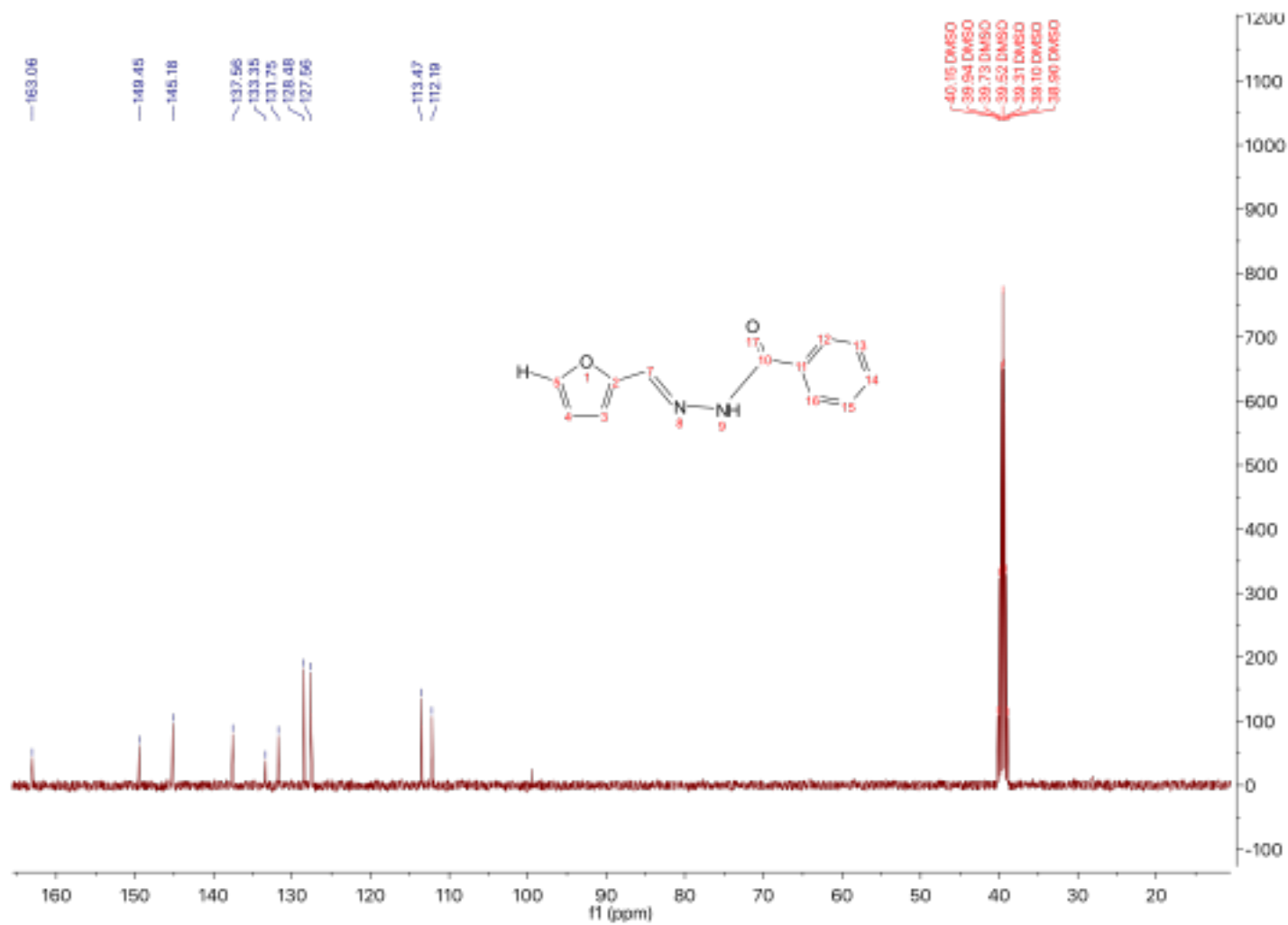


Figura 86. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 4a

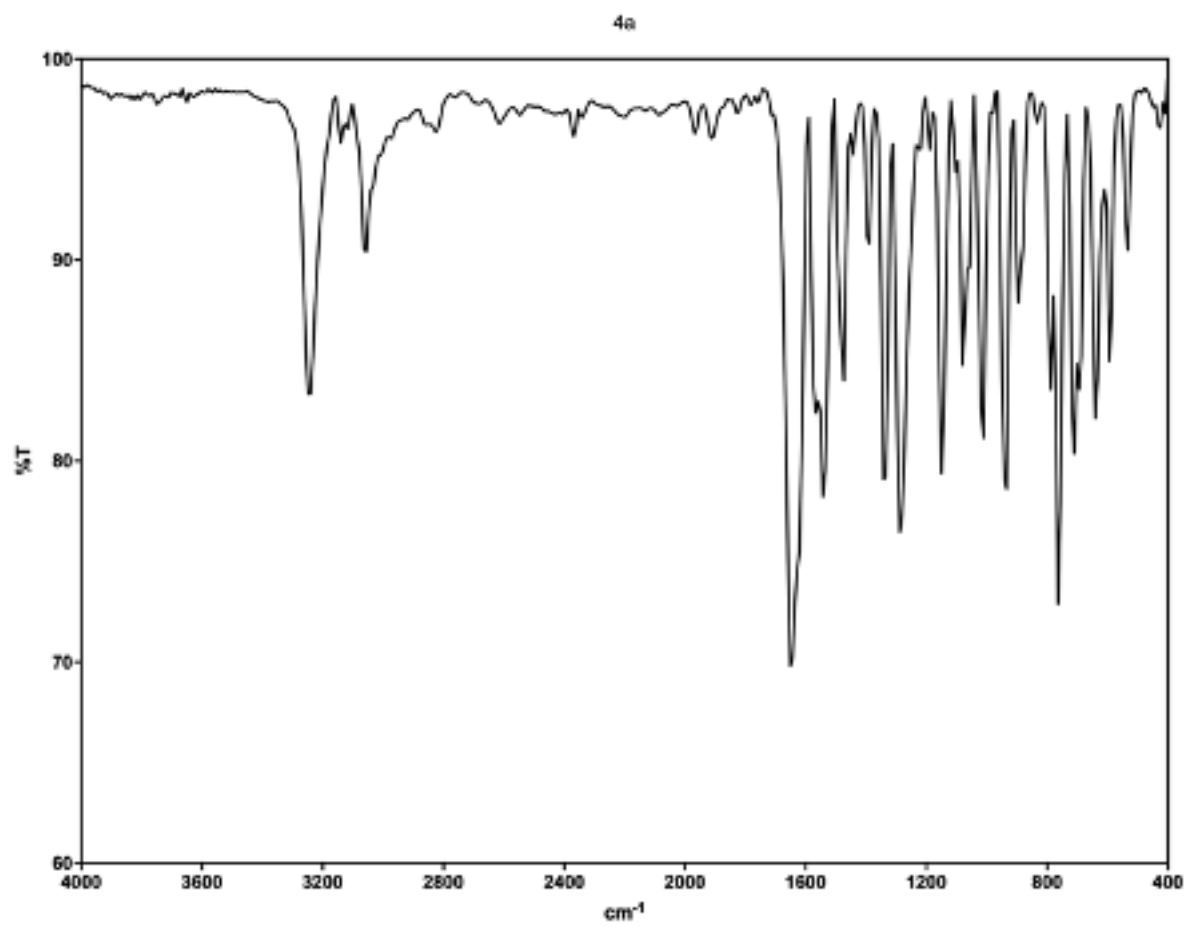


Figura 87. Espectro de FT-IR compuesto 4a

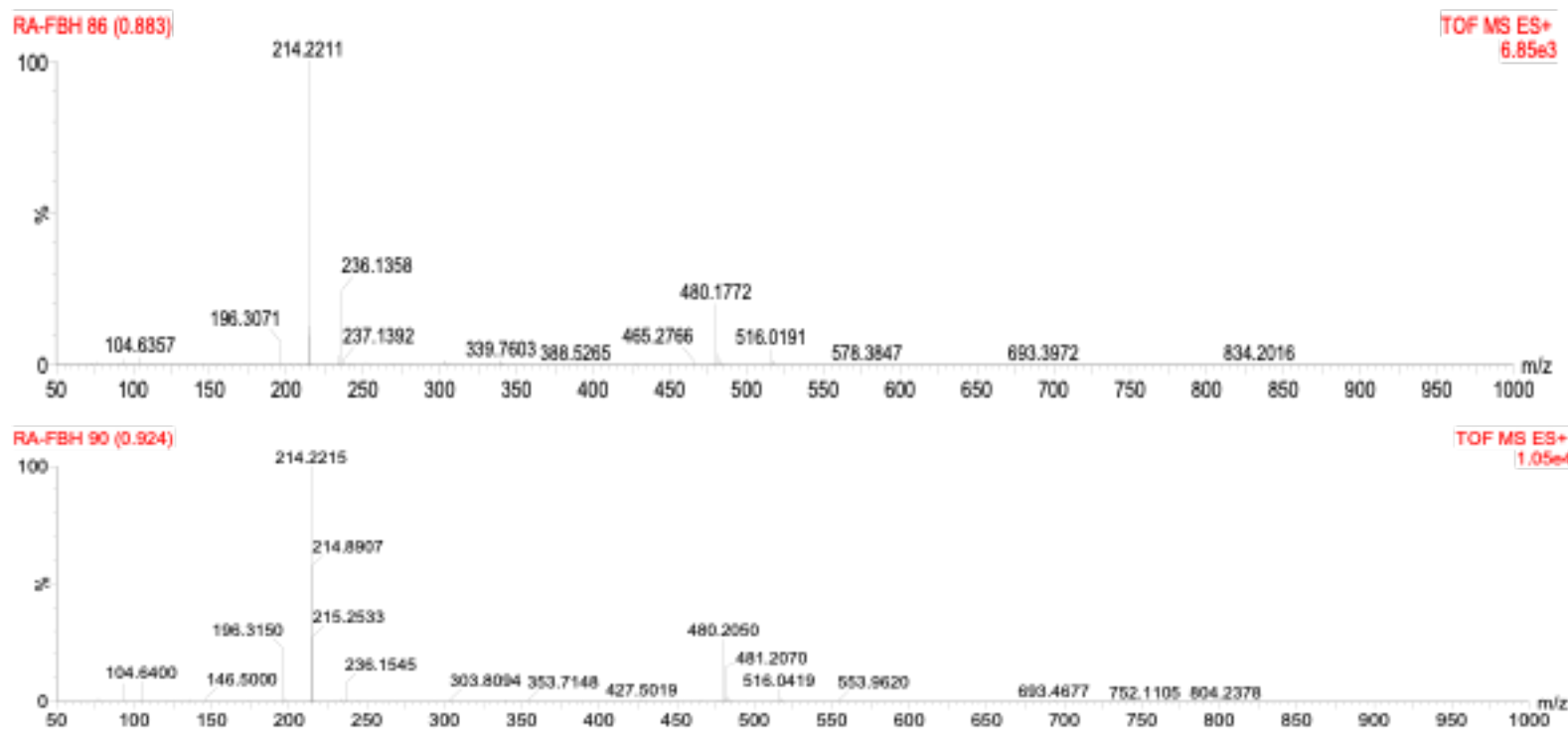
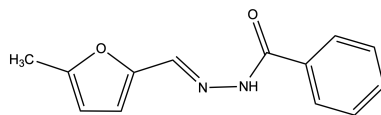


Figura 88. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 4a

### N'-(5-metilfuran-2-ilmetilen)benzohidrazida (**4b**)



Una solución de 0,4653 g (3,418 mmol en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-metil-2-furaldehído (340,0  $\mu$ l; 3,418 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **4b** (0,7646 g; 98 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.72 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-6), 7.89 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-11), 7.58 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-13), 7.51 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-12), 6.81 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H, H-3), 6.26 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H, H-4), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 163.0, 154.6, 147.9, 137.4, 133.4, 131.7, 128.4, 127.5, 115.3, 108.6, 40.2, 39.9, 39.7, 39.5, 39.3, 39.1, 38.9, 13.5.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3210 (N-H), 3051 (N-H), 1641 (C=O), 1485 (C=N).
- p.f. 161-163 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Calculado: 228.2472. Encontrado: 228.2477.

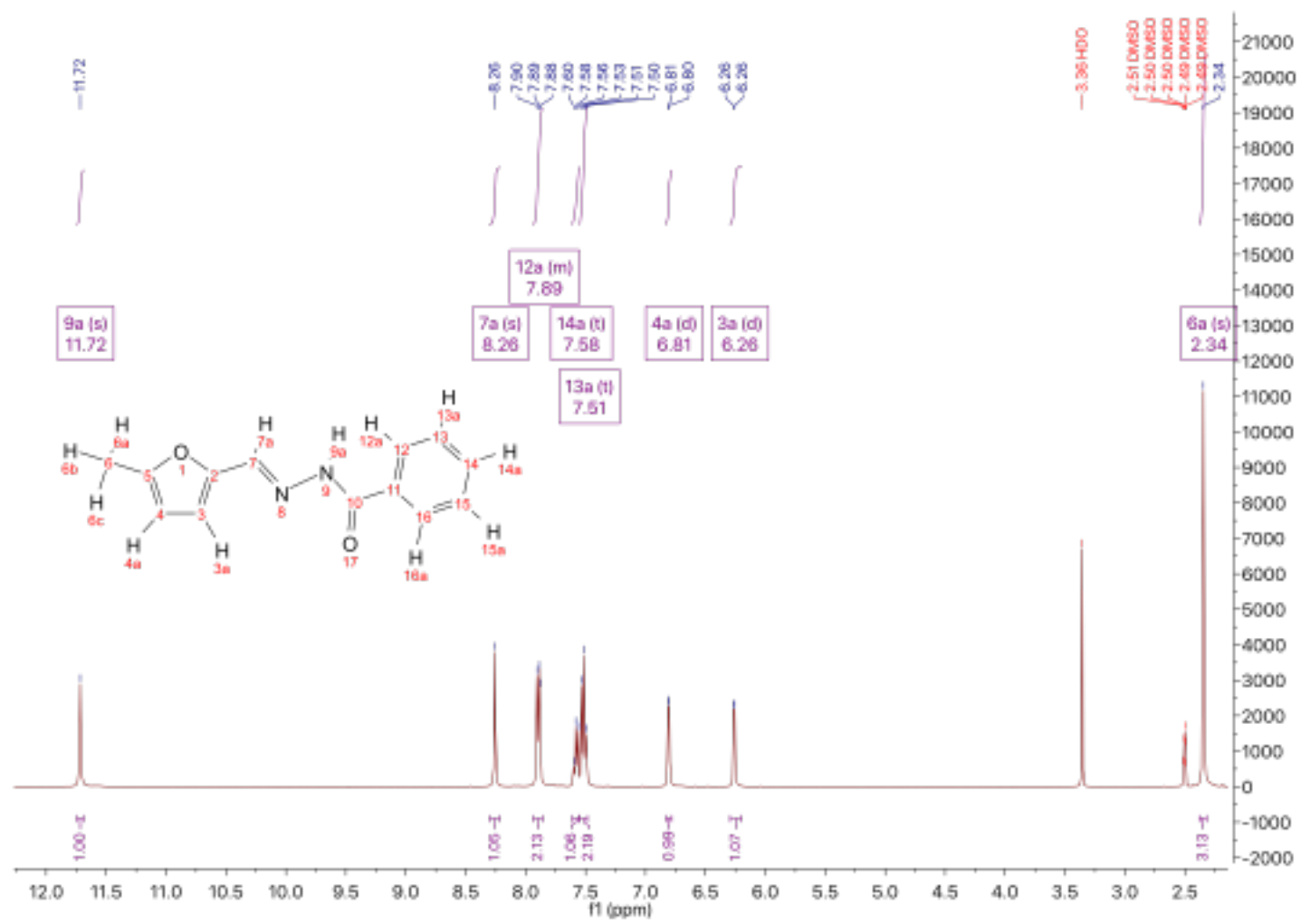


Figura 89. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 4b



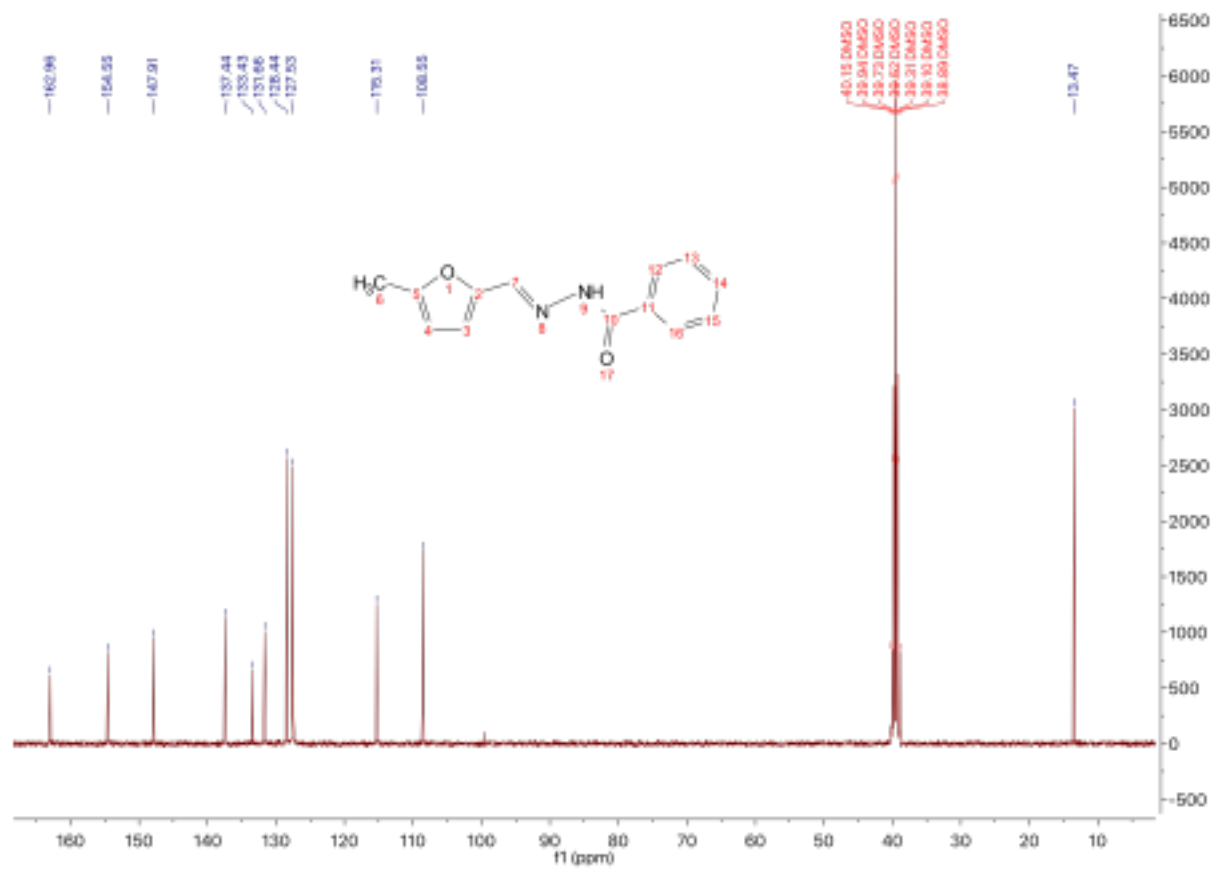


Figura 90. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 4b

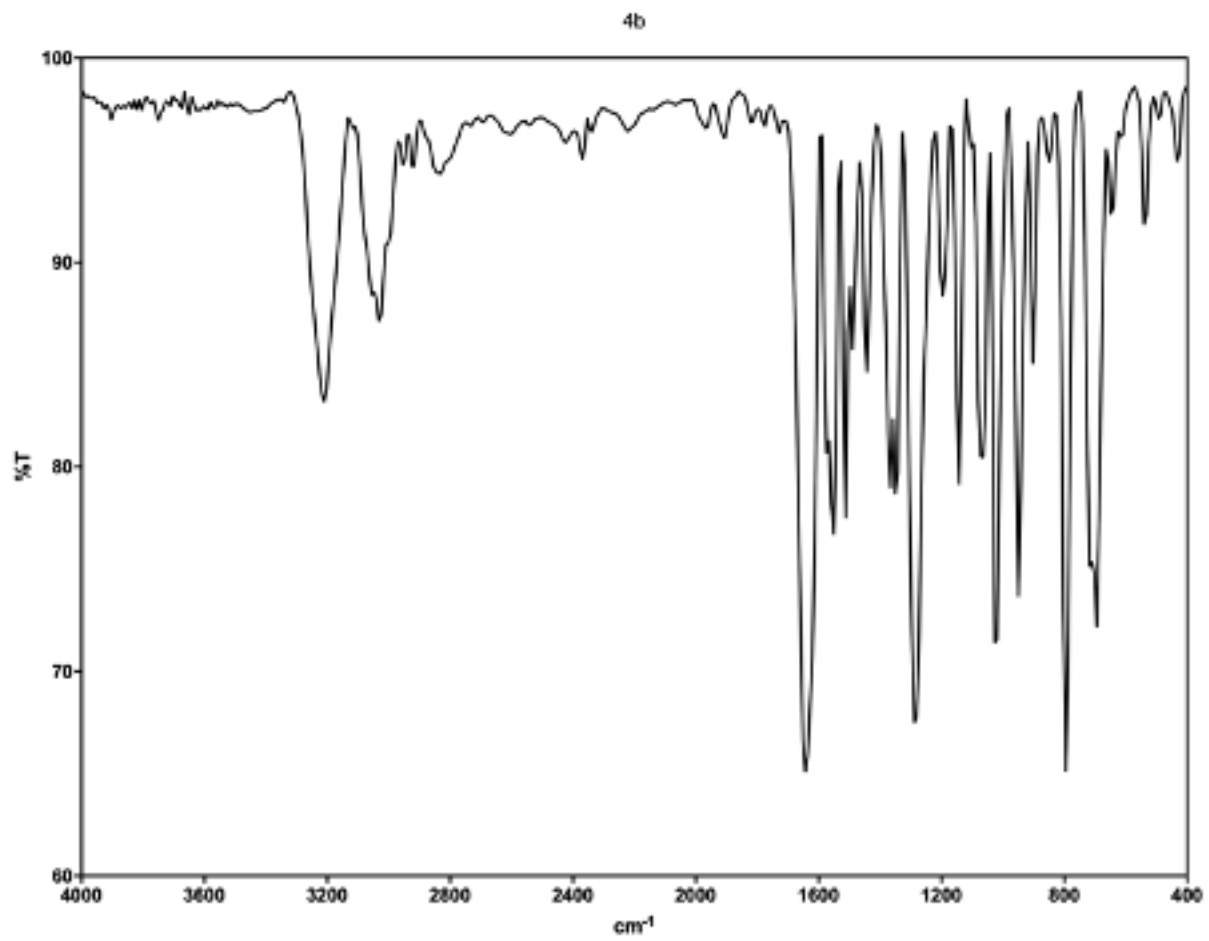


Figura 91. Espectro de FT-IR compuesto 4b

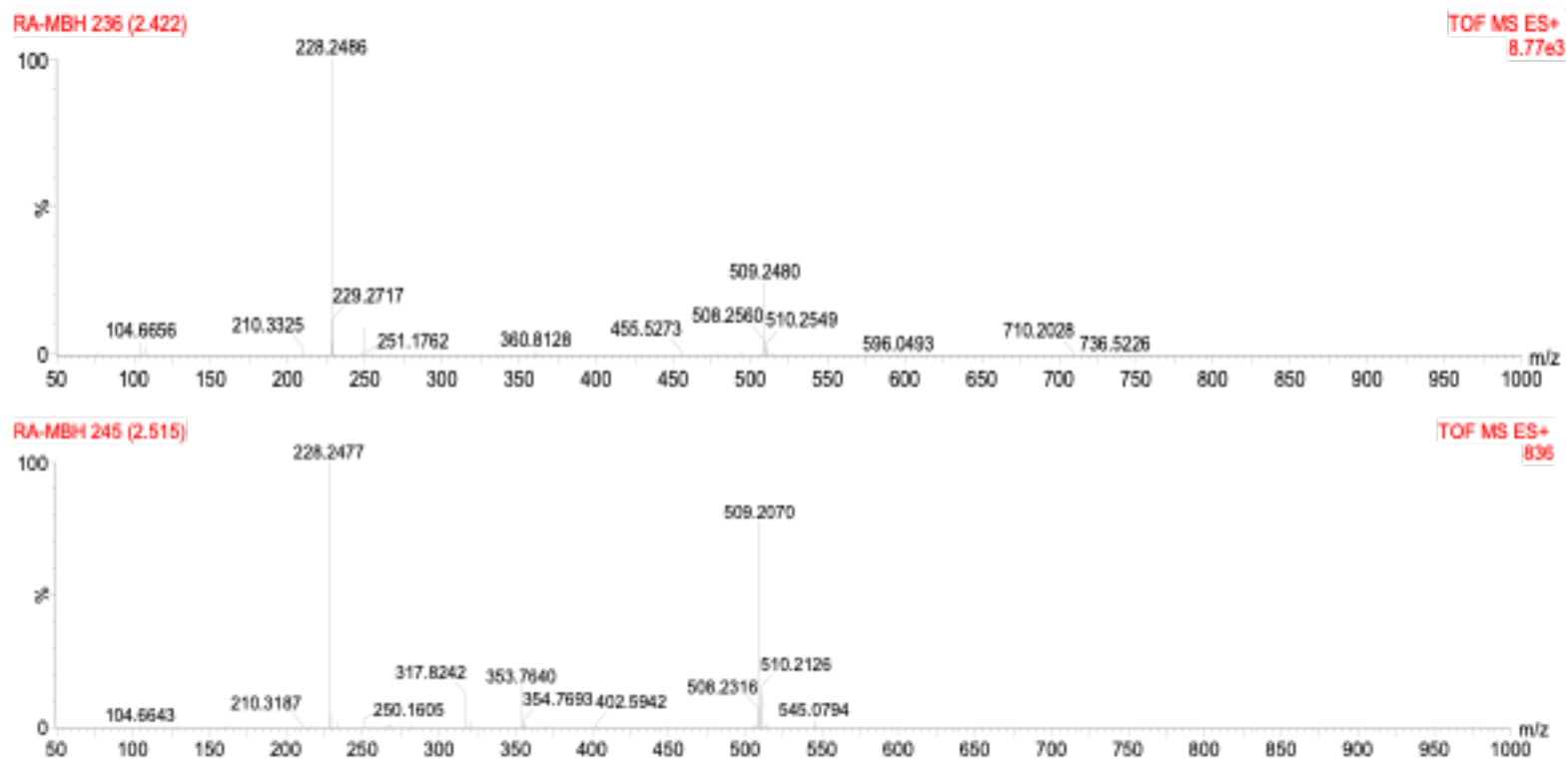
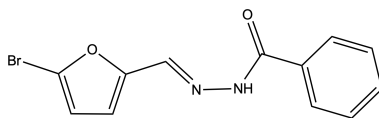


Figura 92. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 4b

### N'-((5-bromofuran-2-il)metilen)benzohidrazida (**4c**)



Una solución de hidrazida benzoica (0,0614 g; 0,4510 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-bromo-2-furaldehído (0,0789 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,4510 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **4c** g; 0,1204 g; 91 % rendimiento)

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.86 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H-6), 7.89 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-11), 7.59 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-13), 7.52 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H-12), 6.98 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4), 6.76 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 163.1, 151.4, 136.3, 133.2, 131.8, 128.5, 127.6, 124.6, 116.2, 114.2.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3240 (N-H), 3058 (N-H), 1649 (C=O), 1475 (C=N).
- p.f. dec. 164 °C.
- EMAR  $[\text{M}^+]$ :  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$  Calculado: 293.1161. Encontrado: 293.1156.

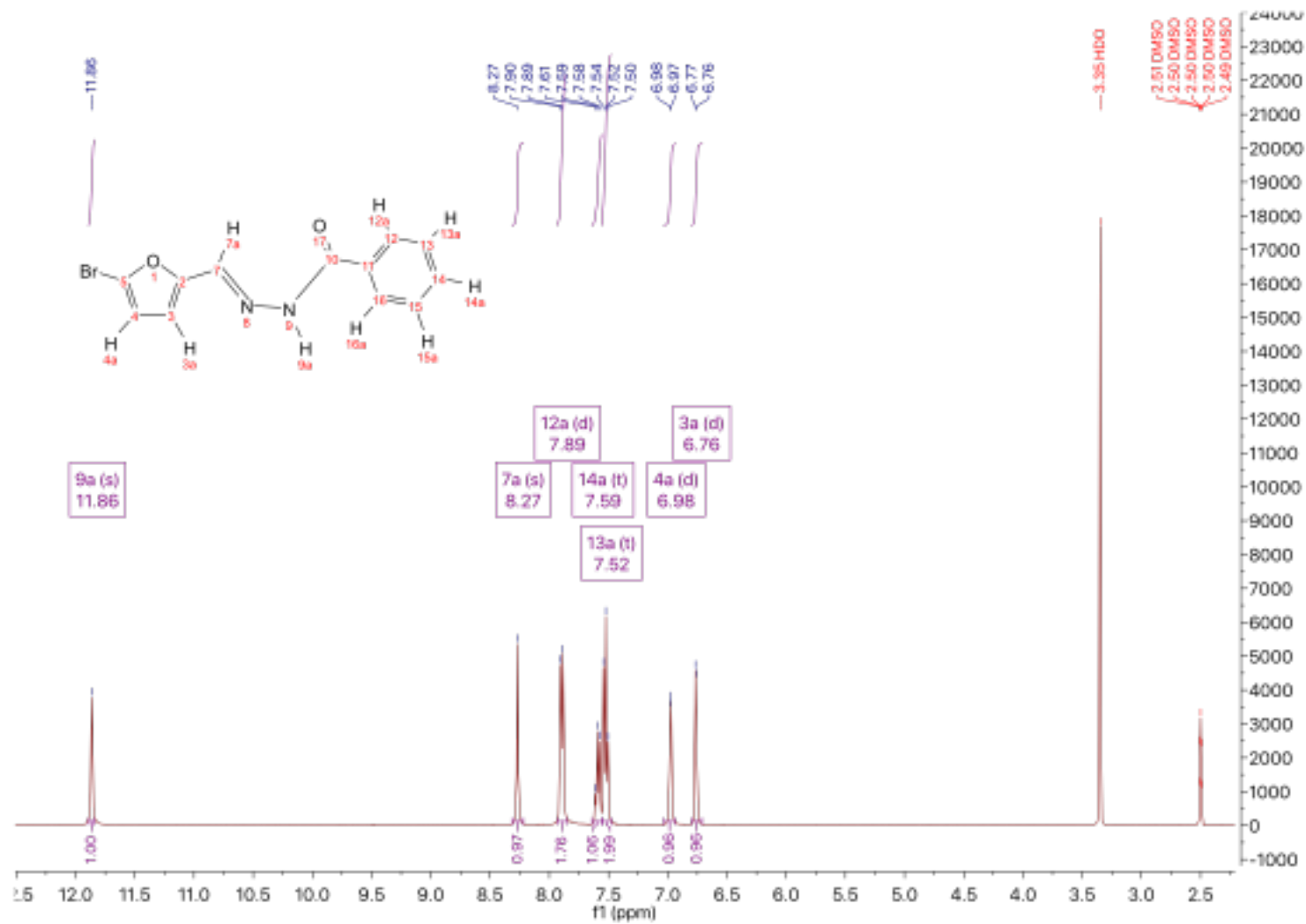


Figura 93. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 4c

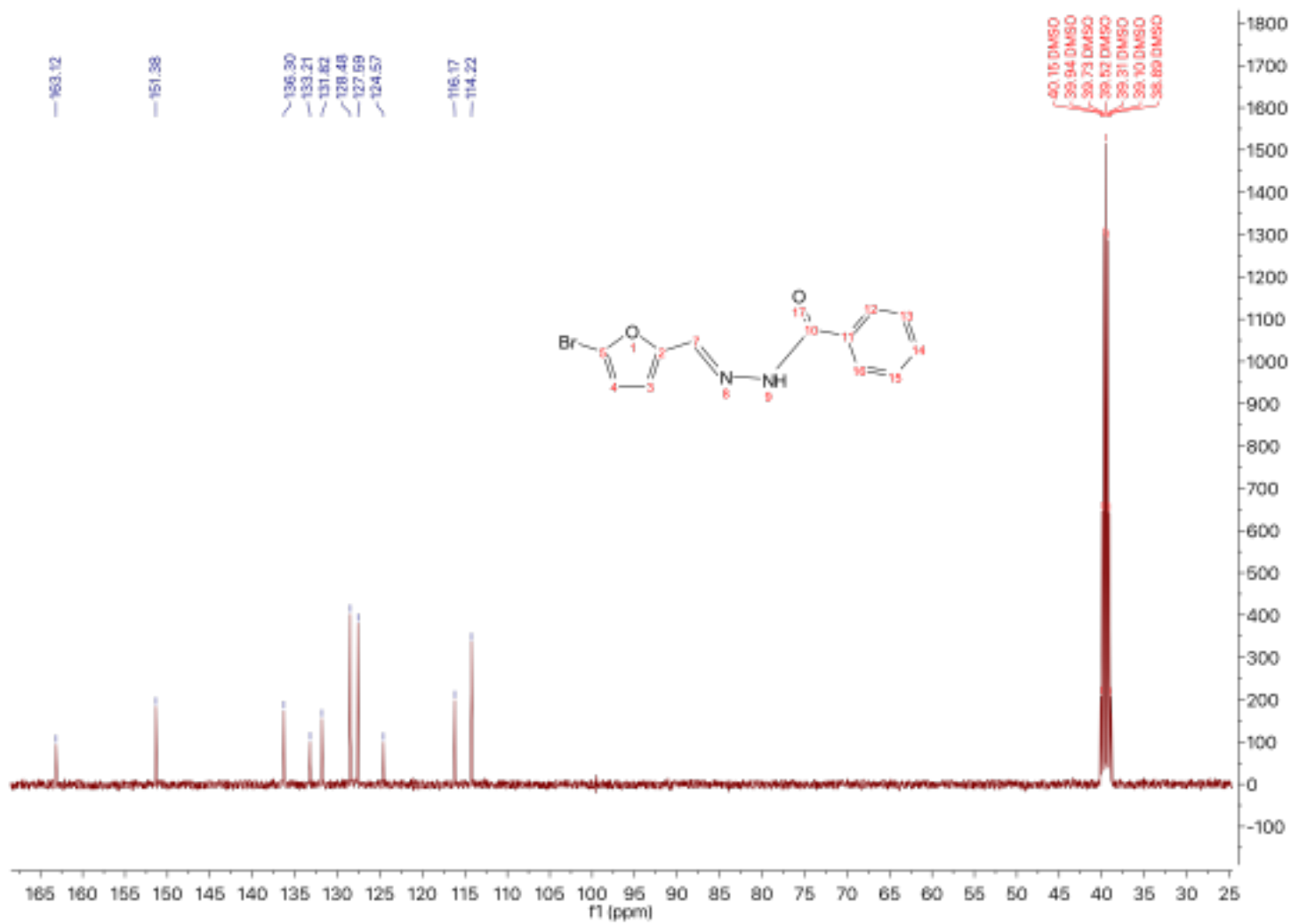


Figura 94. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 4c

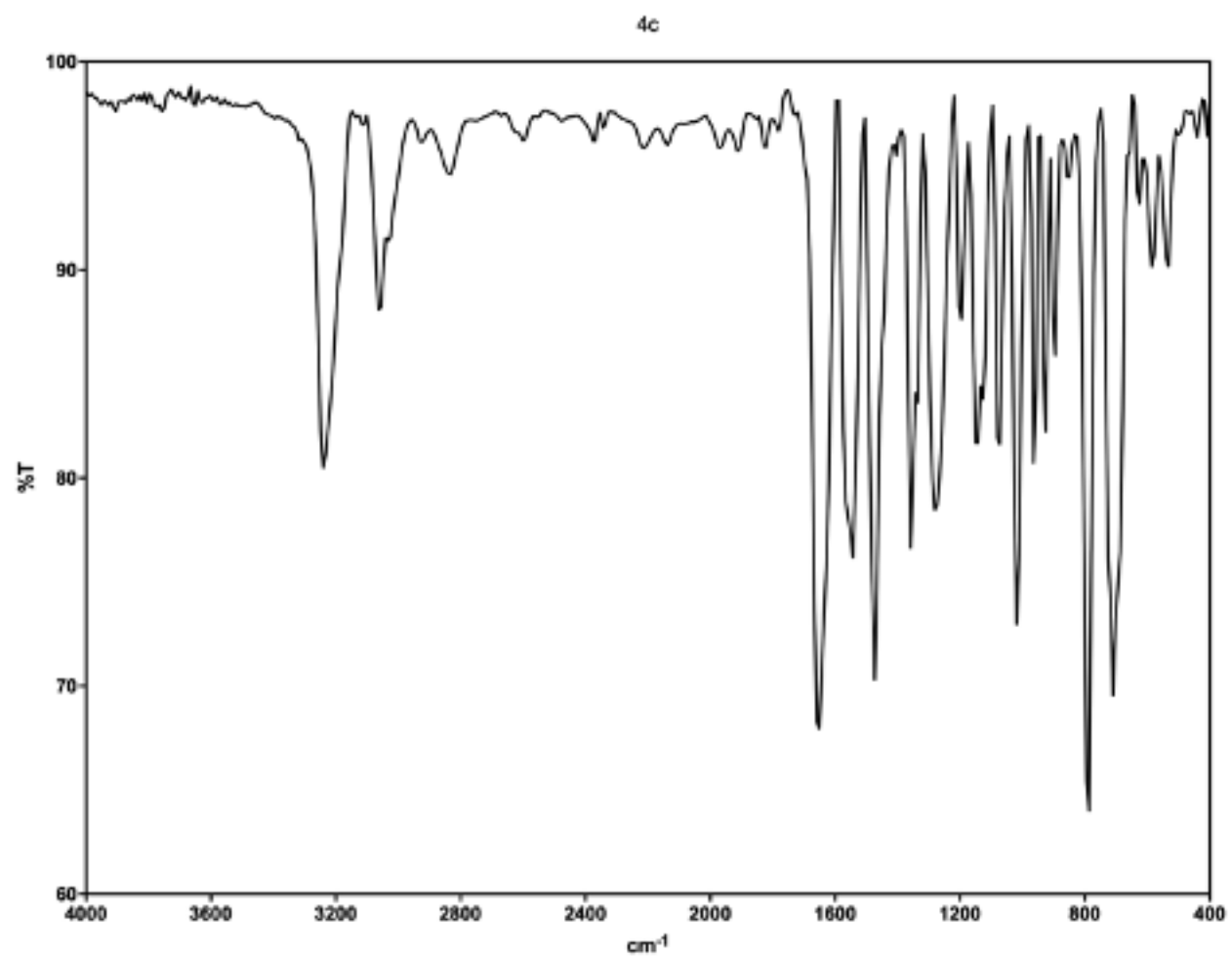


Figura 95. Espectro de FT-IR compuesto 4c

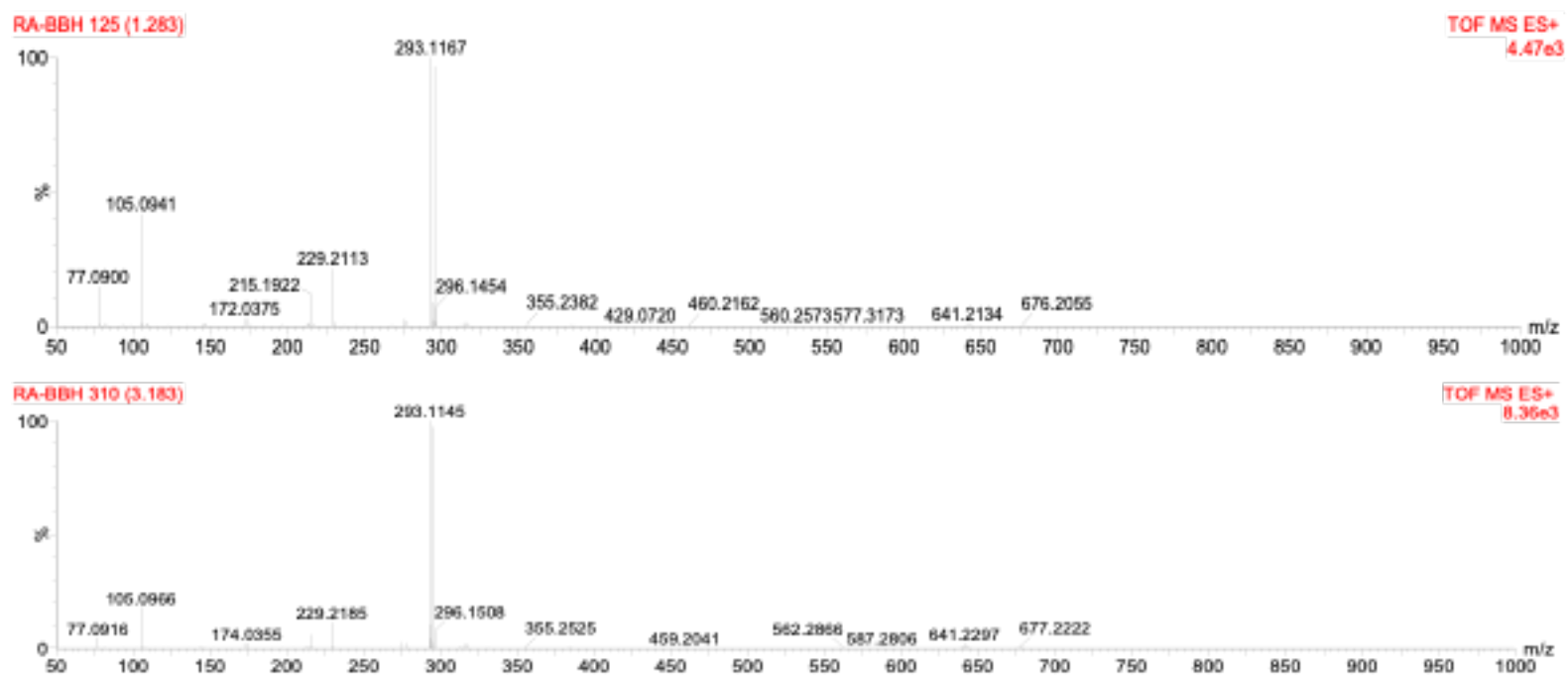
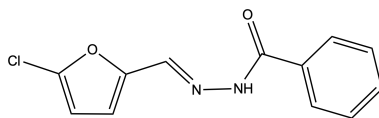


Figura 96. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 4c



### N'-((5-clorofuran-2-il)metilen)benzohidrazida (**4d**)



Una solución de hidrazida benzoica (0,7293 g; 0,0993 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (0,0898 g en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,6876 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C (**4d** (0,1624 g; 95 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.87 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, H-6), 7.90 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-11), 7.65-7.57 (m, 1H, H-13), 7.53 (dd,  $J = 8.2, 6.5$  Hz, 2H, H-12), 7.03 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4), 6.68 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 163.60, 149.71, 137.81, 136.83, 133.70, 132.32, 128.97, 128.07, 116.41, 109.92.
- Ir  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3425 (N-H), 3224 (N-H), 1650 (C=O), 1489 (C=N).
- p.f. 170-171 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2$  Calculado: 249.0431. Encontrado: 249.0435.

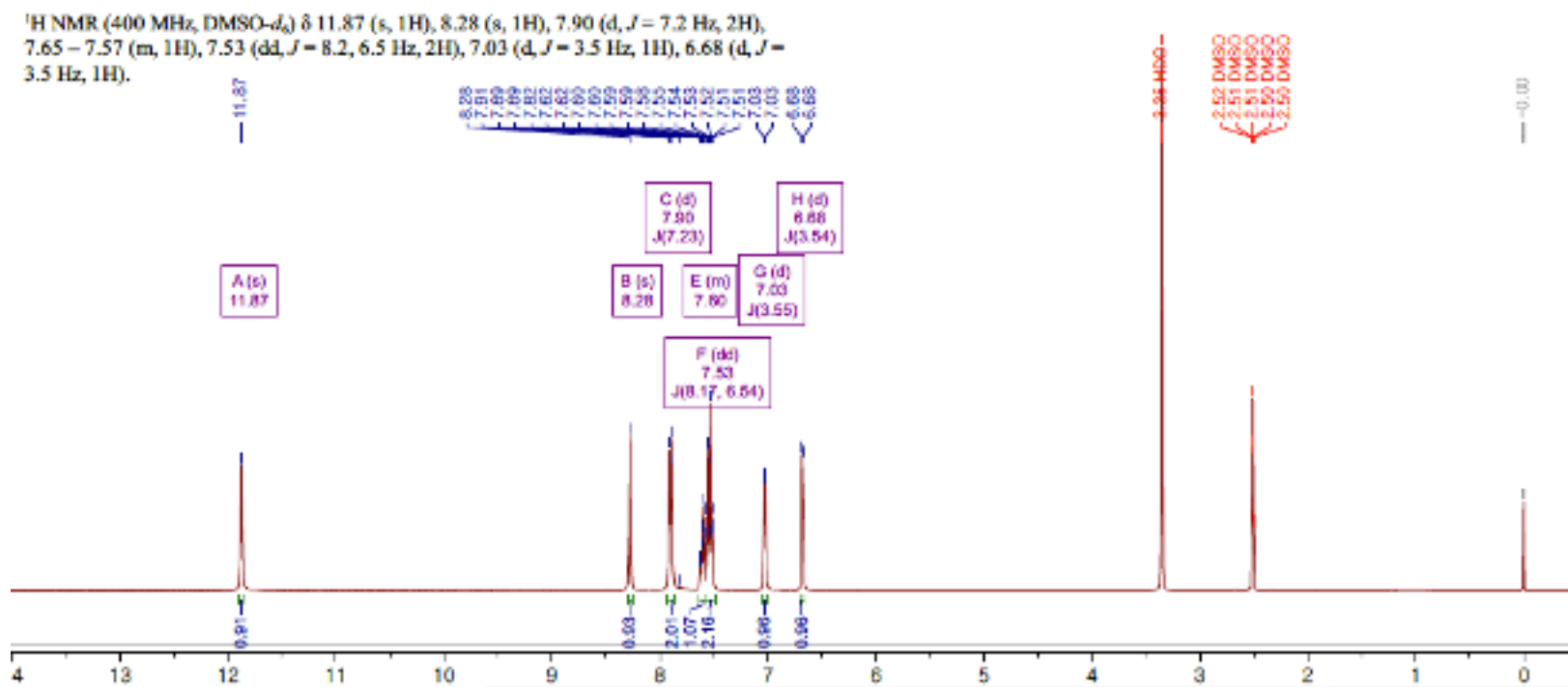


Figura 97. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto 4d

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  163.60, 149.71, 137.81,  
136.83, 133.70, 132.32, 128.97, 128.07, 116.41, 109.92.

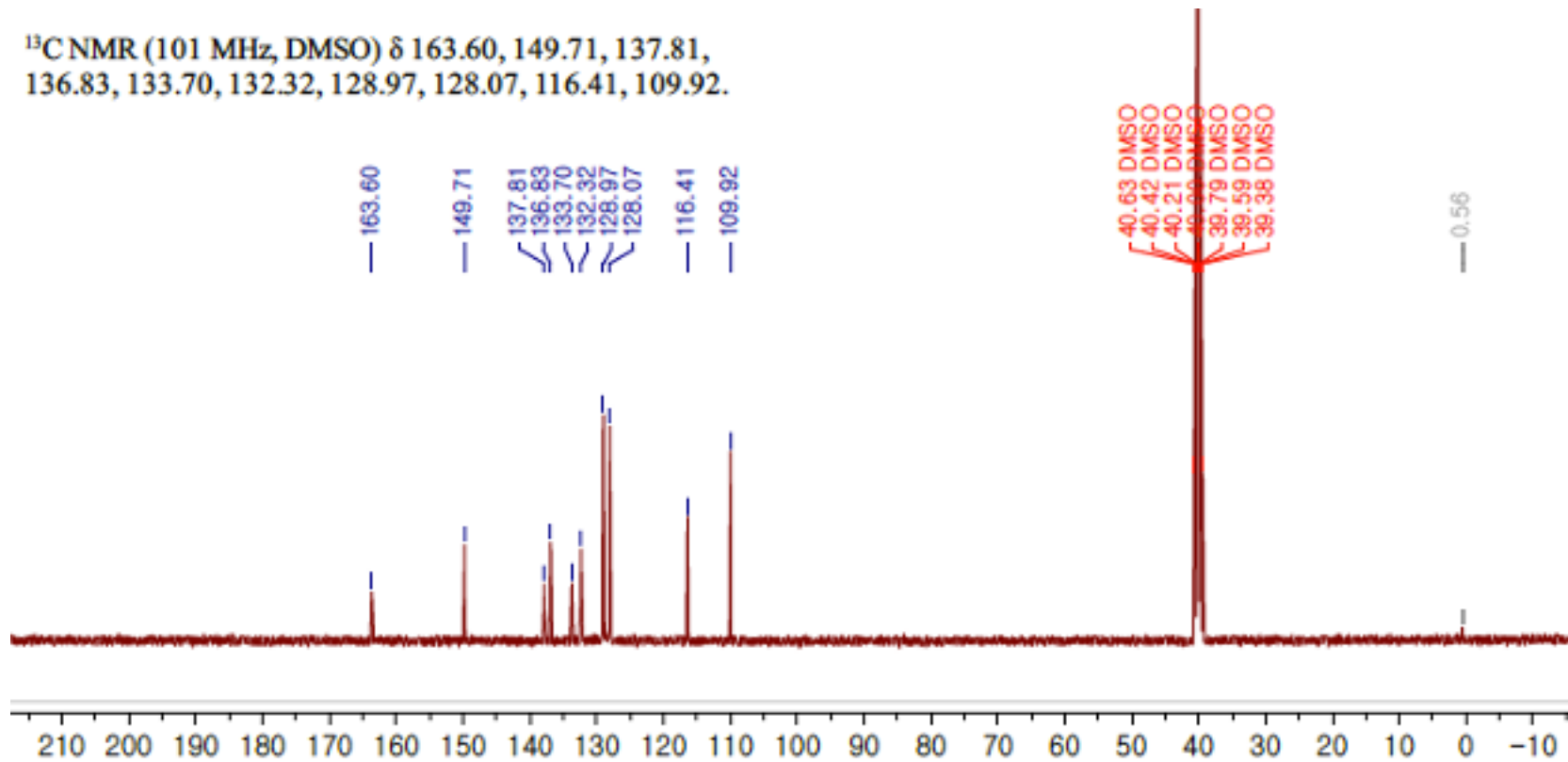


Figura 98. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 4d

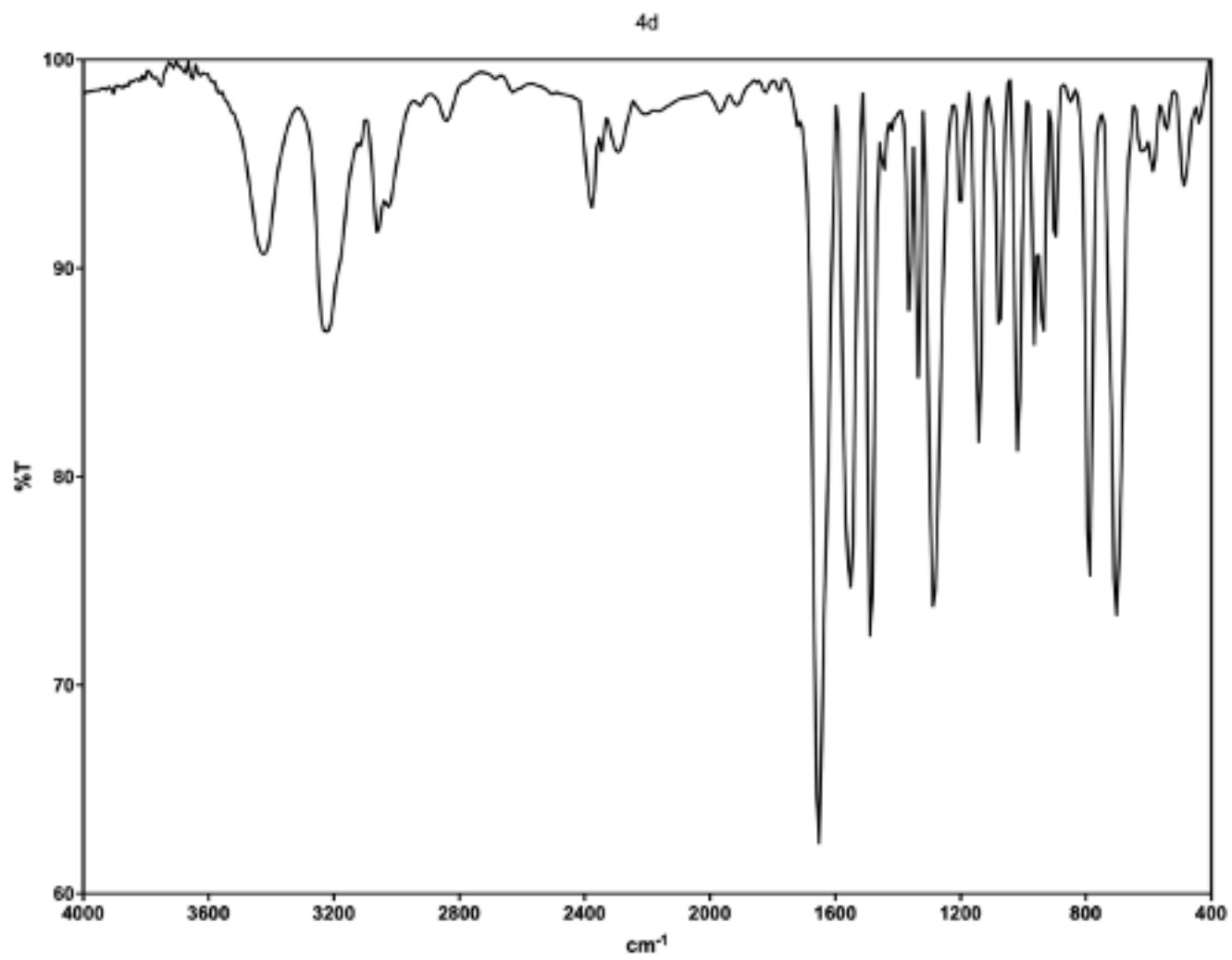


Figura 99. Espectro de FT-IR compuesto 4d

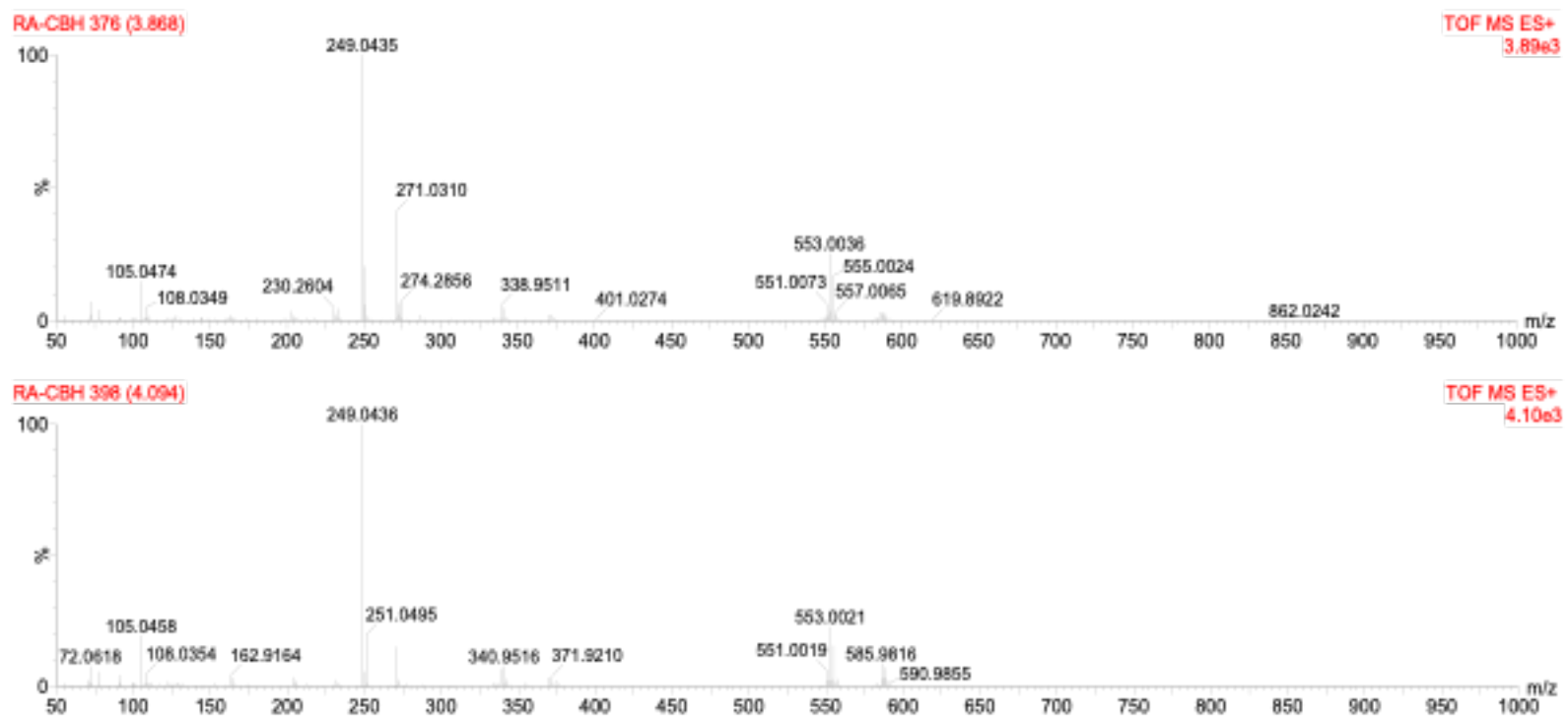
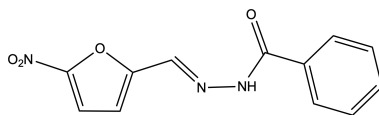


Figura 100. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 4d

### N<sup>2</sup>-((5-nitrofurano-2-il)metilen)benzohidrazida (4e)



Una solución de hidrazida benzoica (0,0993 g; 0,7293 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-nitro-2-furaldehído (0,0970 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,6876 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado amarillo. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **4e** (0,1379 g; 77 % rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 12.23 (s, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, H-6), 7.92 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-11), 7.79 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-4), 7.62 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-13), 7.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-12), 7.27 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-3).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 163.5, 151.9, 151.8, 135.5, 132.8, 132.2, 128.6, 127.8, 115.3, 114.7.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3248 (N-H), 3016 (N-H), 1654 (C=O), 1475 (C=N).
- p.f. 221-224 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Calculado: 259.2181. Encontrado: 259.2188.

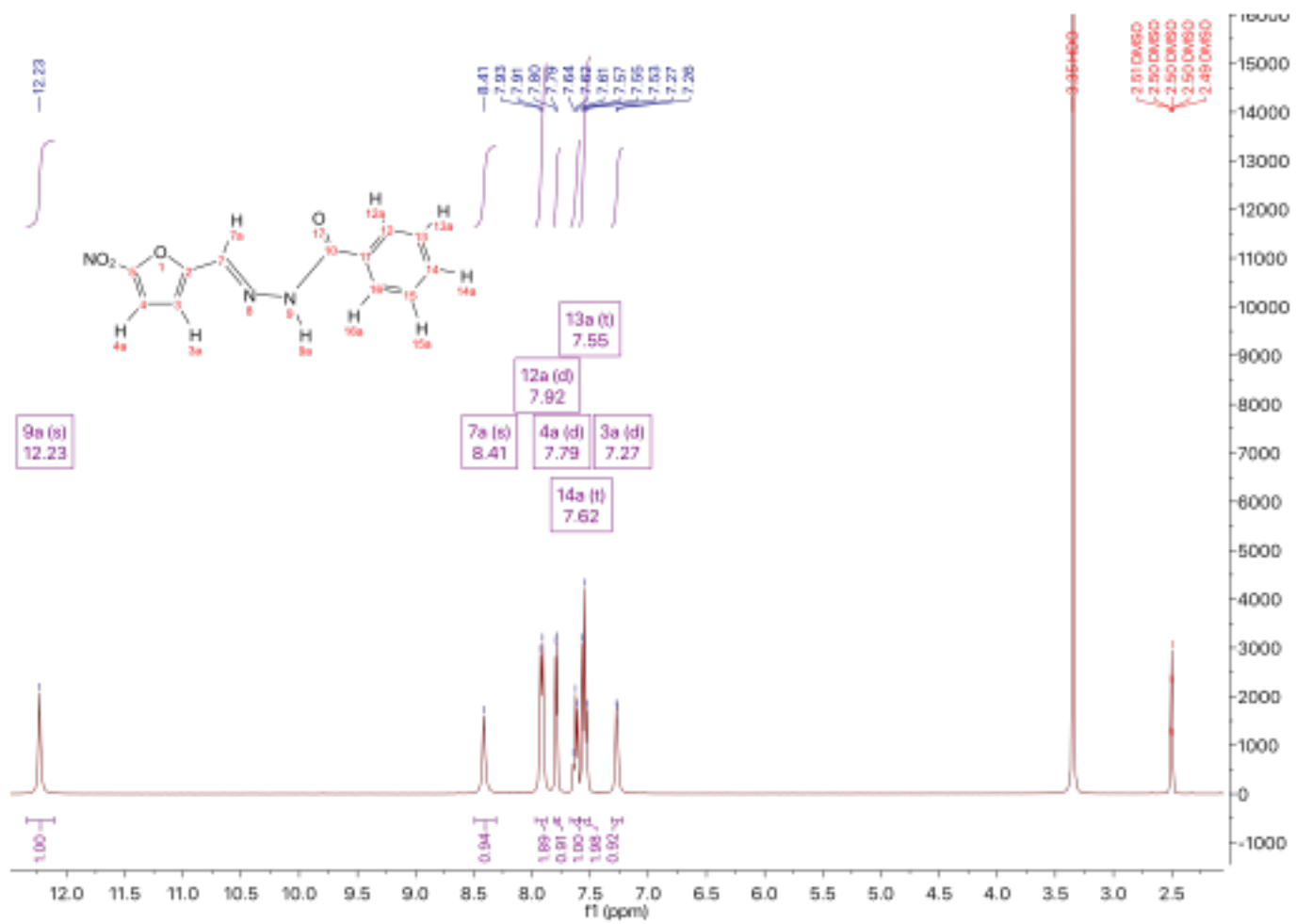


Figura 101. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 4e





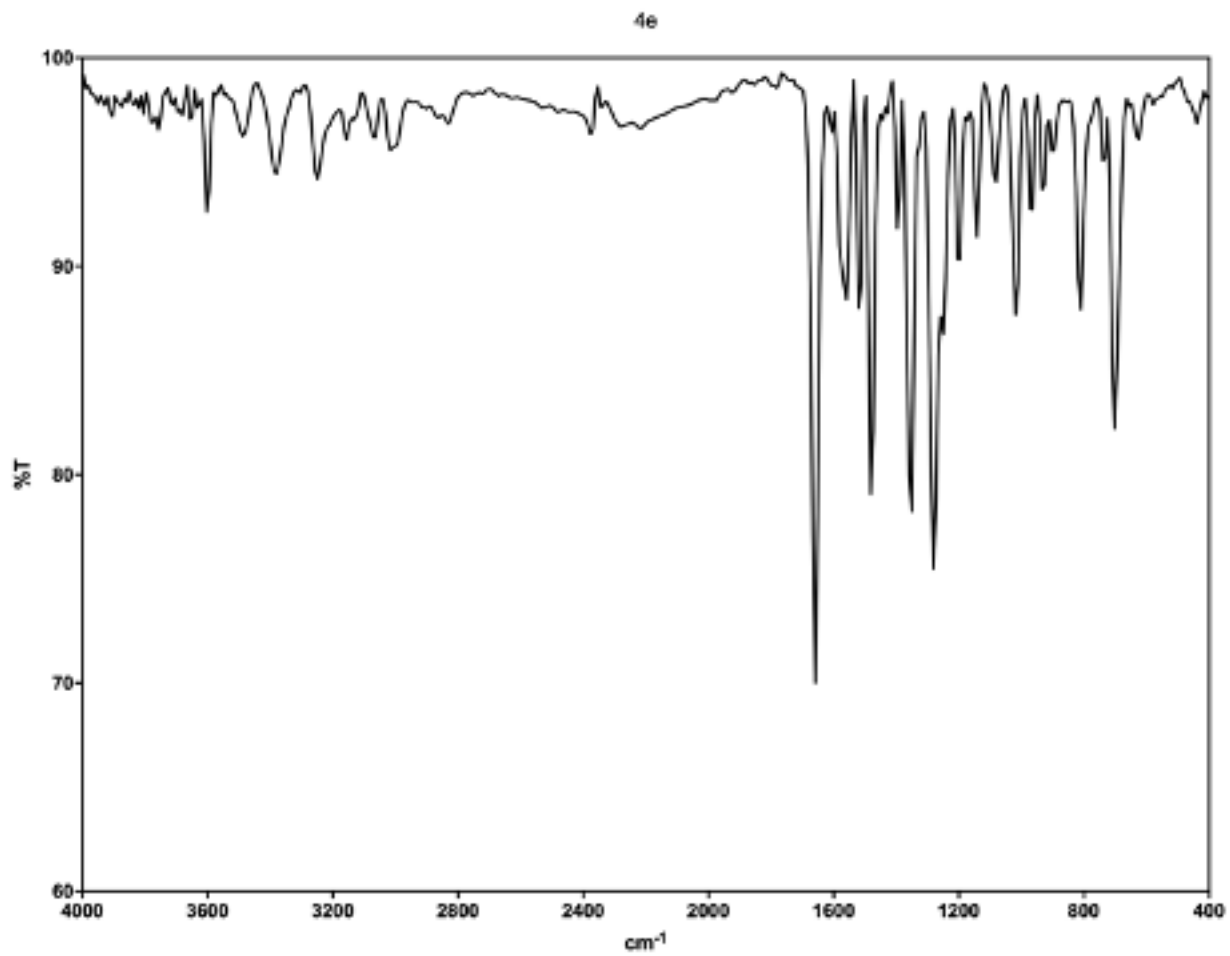


Figura 103. Espectro de FT-IR compuesto 4e

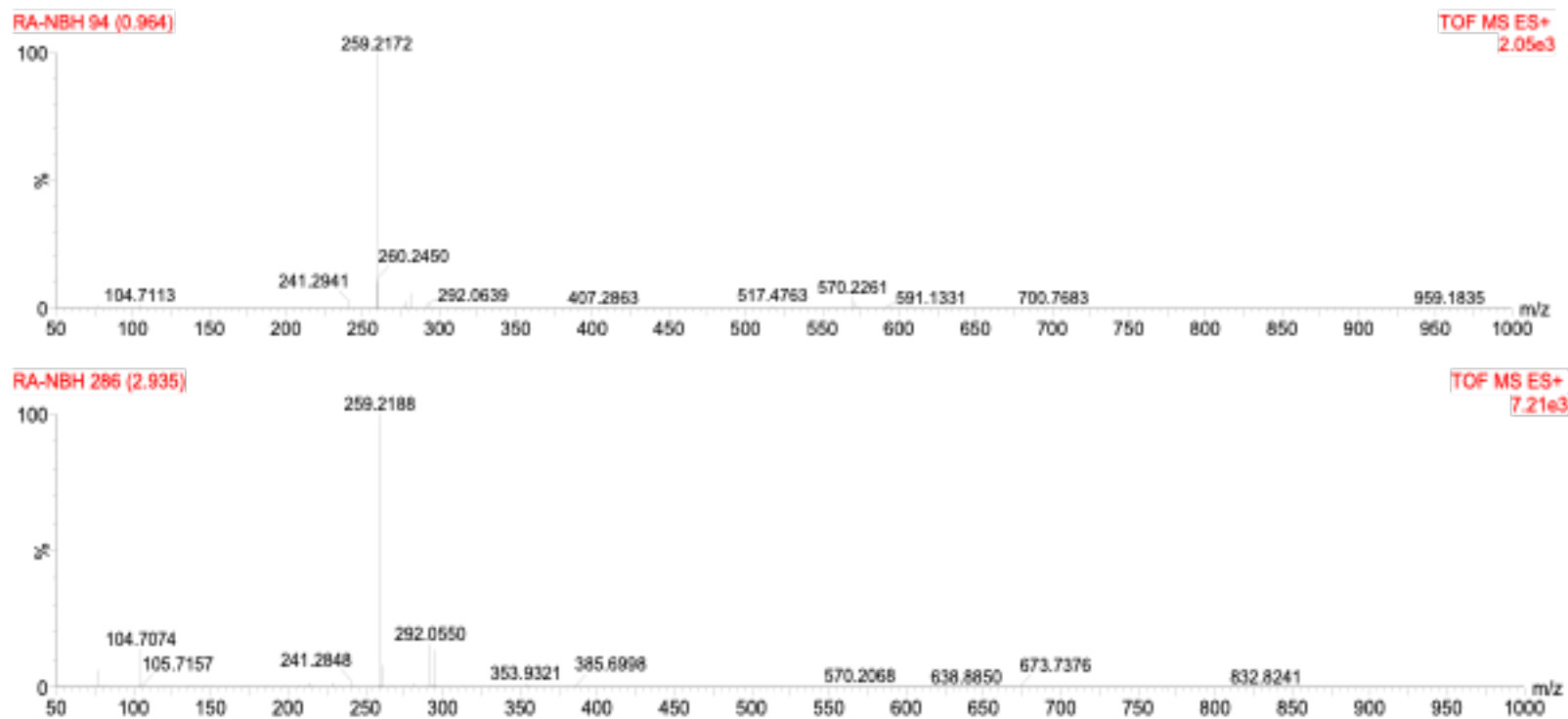
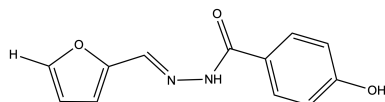


Figura 104. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 4e

### N<sup>2</sup>-(furan-2-ilmetilen)-4-hidroxibenzohidrazida (5a)



Una solución de hidrazida *p*-hidroxibenzoica (0,1292 g; 0,8492 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (70,3  $\mu$ l; 0,849 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **5a** (0,1725 g; 88 % rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 11.58 (s, 1H, NH), 10.12 (s, 1H, OH), 8.33 (s, 1H, H-6), 7.82 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-5), 7.81-7.75 (m, 2H, H-11), 6.89 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 6.87-6.82 (m, 2H, H-12), 6.62 (t,  $J = 3.4, 1.8$  Hz, 1H, H-4).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 162.7, 160.7, 149.6, 144.9, 136.7, 129.7, 123.8, 115.0, 113.0, 112.2.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1666 (C=O), 1435 (C=N).
- p.f. 230-234 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 230.2199. Encontrado: 230.2211.

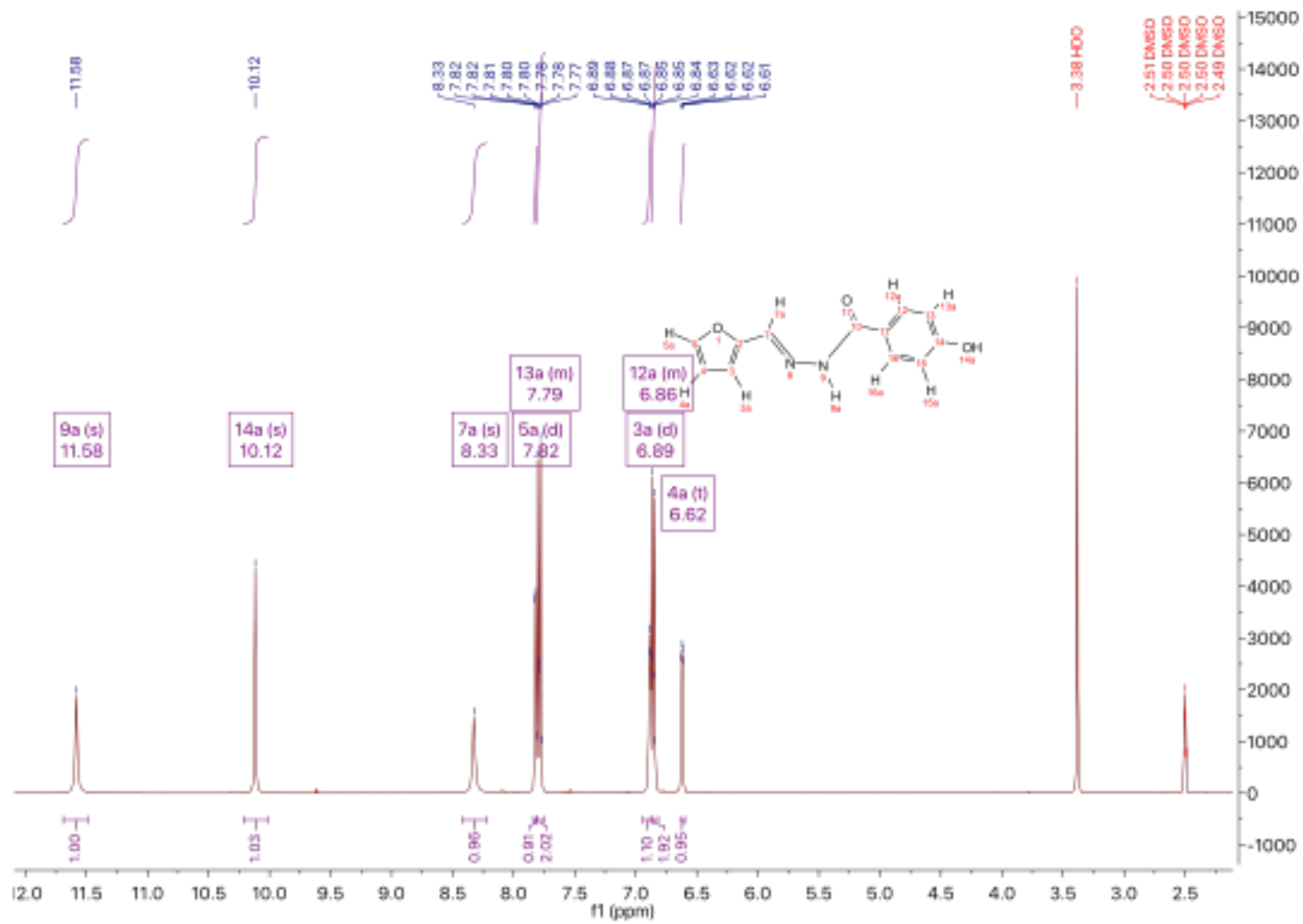


Figura 105. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 5a

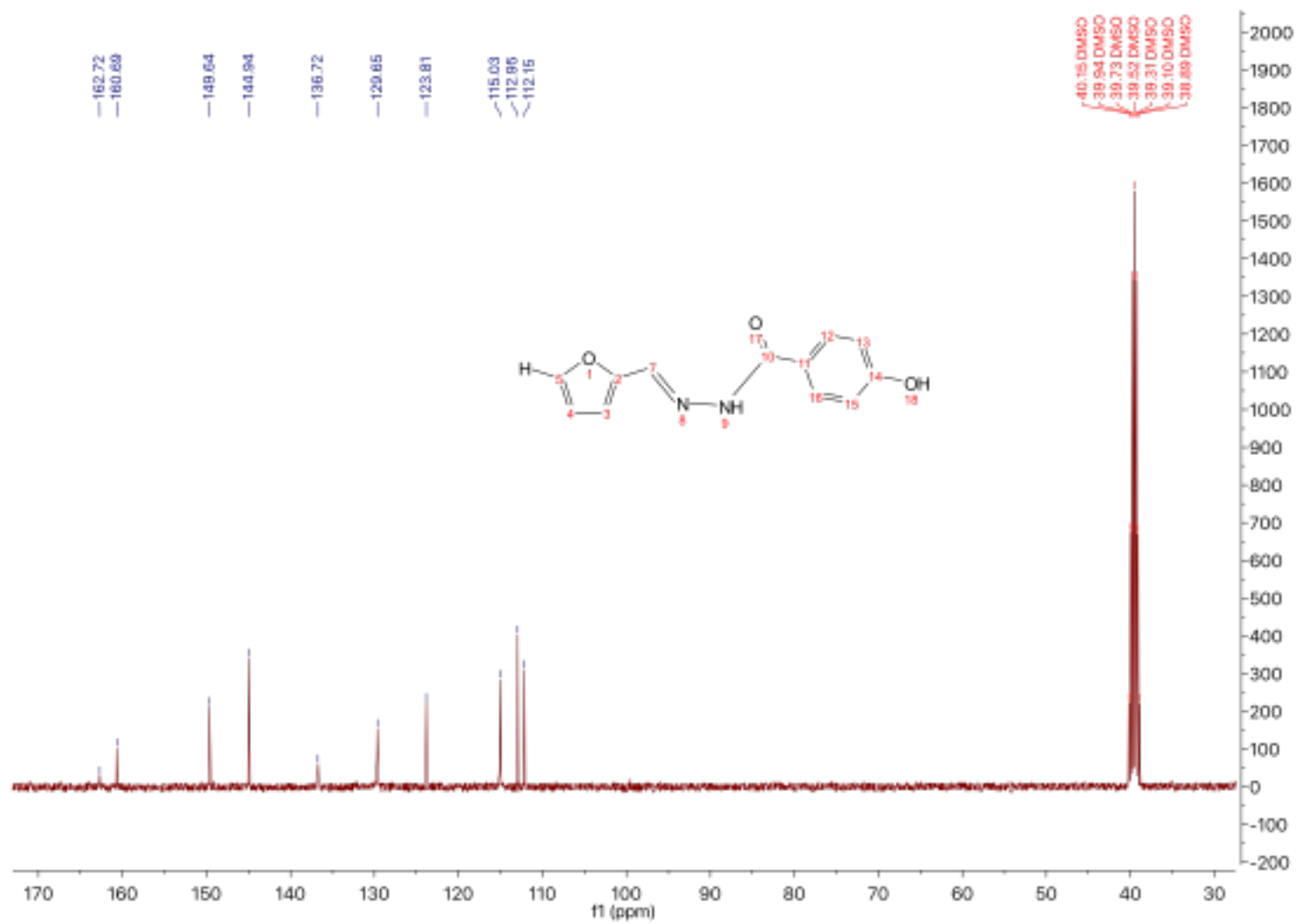


Figura 106. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 5a

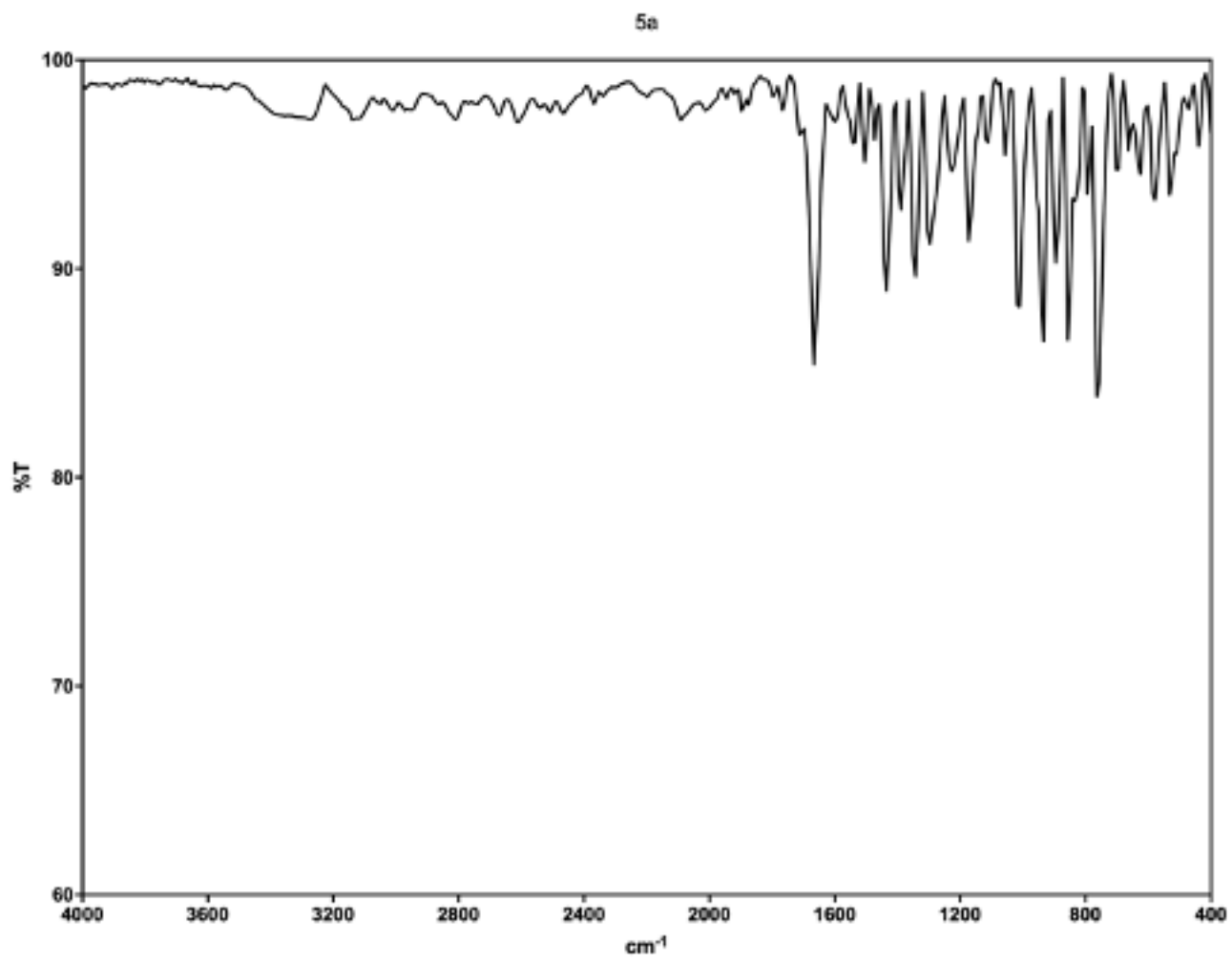


Figura 107. Espectro de FT-IR compuesto 5a

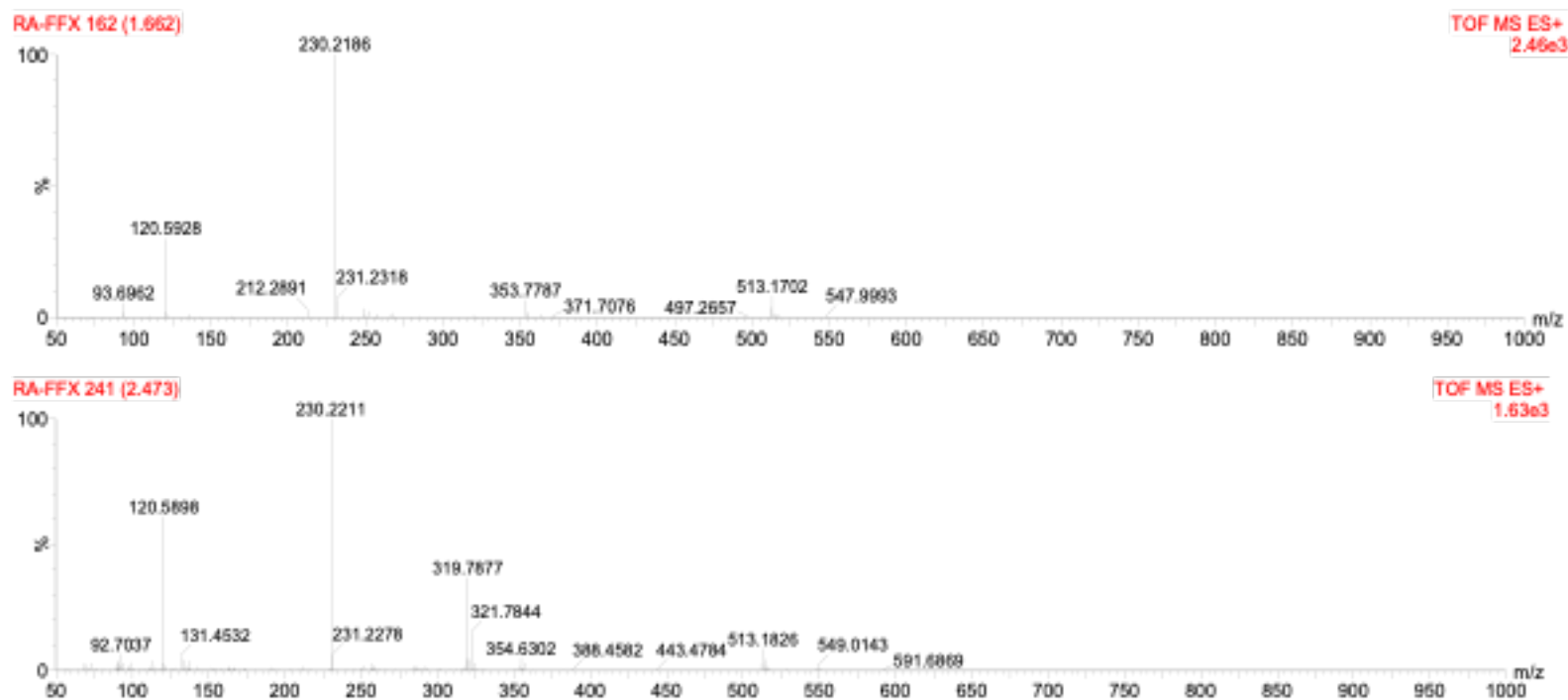
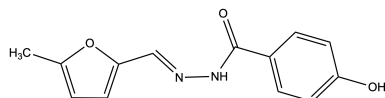


Figura 108. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 5a

### N<sup>2</sup>-(5-metilfuran-2-ilmetilen)-4-hidroxibenzohidrazida (**5b**)



Una solución de hidrazida *p*-hidroxibenzoica (0,2957 g; 1,943 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-metil-2-furaldehído (193,3 DMSO; 1,943 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **5b** (0,4603 g; 97 % rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 11.53 (s, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, OH), 8.24 (s, 1H, H-6), 7.80 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-11), 6.87 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-12), 6.75 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H-4), 6.23 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H-3), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 162.7, 160.7, 154.3, 148.1, 136.7, 129.6, 123.9, 115.0, 114.8, 108.5, 40.2, 39.9, 39.7, 39.5, 39.3, 39.1, 38.9, 13.5.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1620 (C=O), 1435 (C=N).
- p.f. 203-206 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 244.2466. Encontrado: 244.2477.



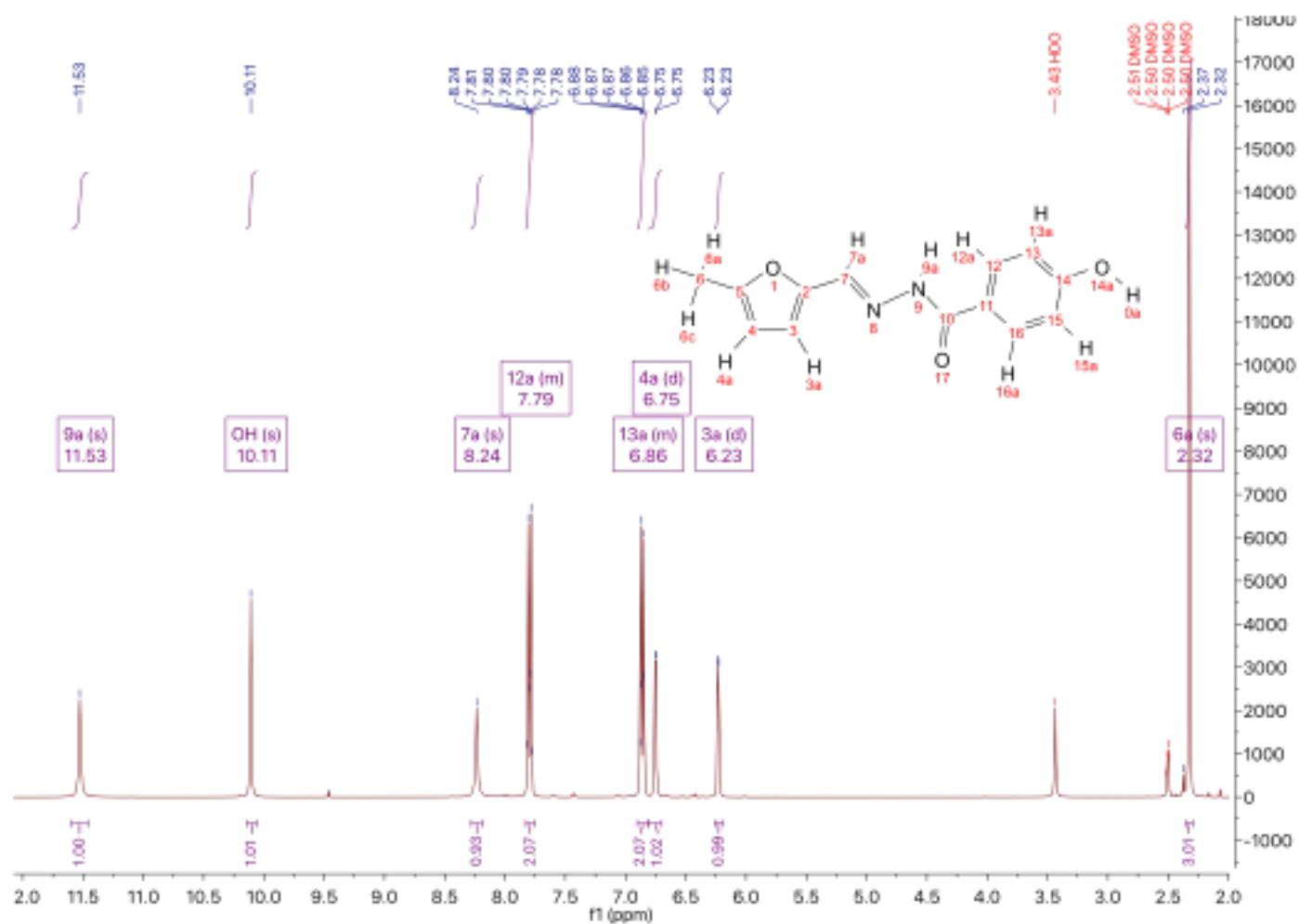


Figura 109. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto **5b**

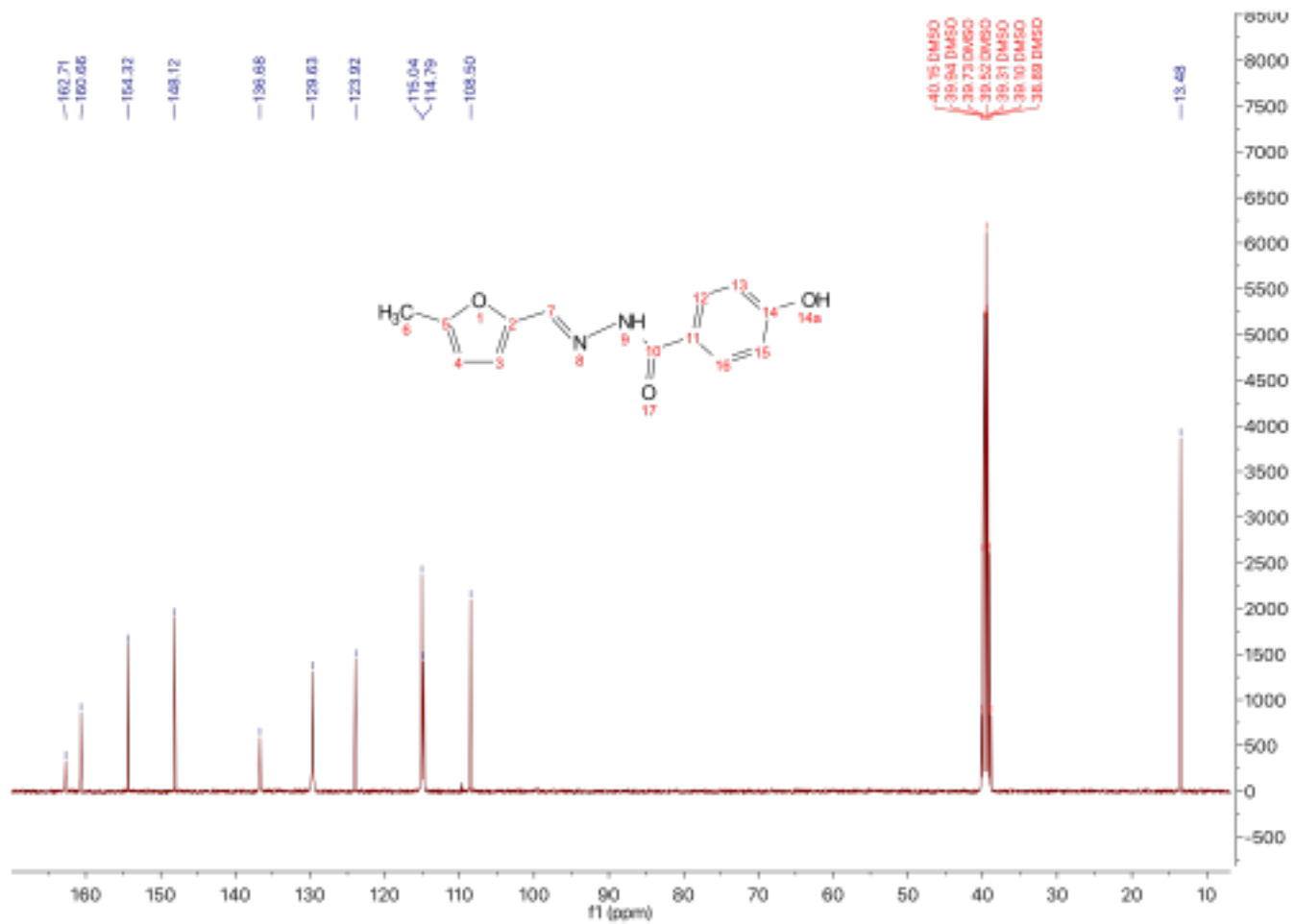


Figura 110. Espectro <sup>13</sup>C-RMN compuesto 5b

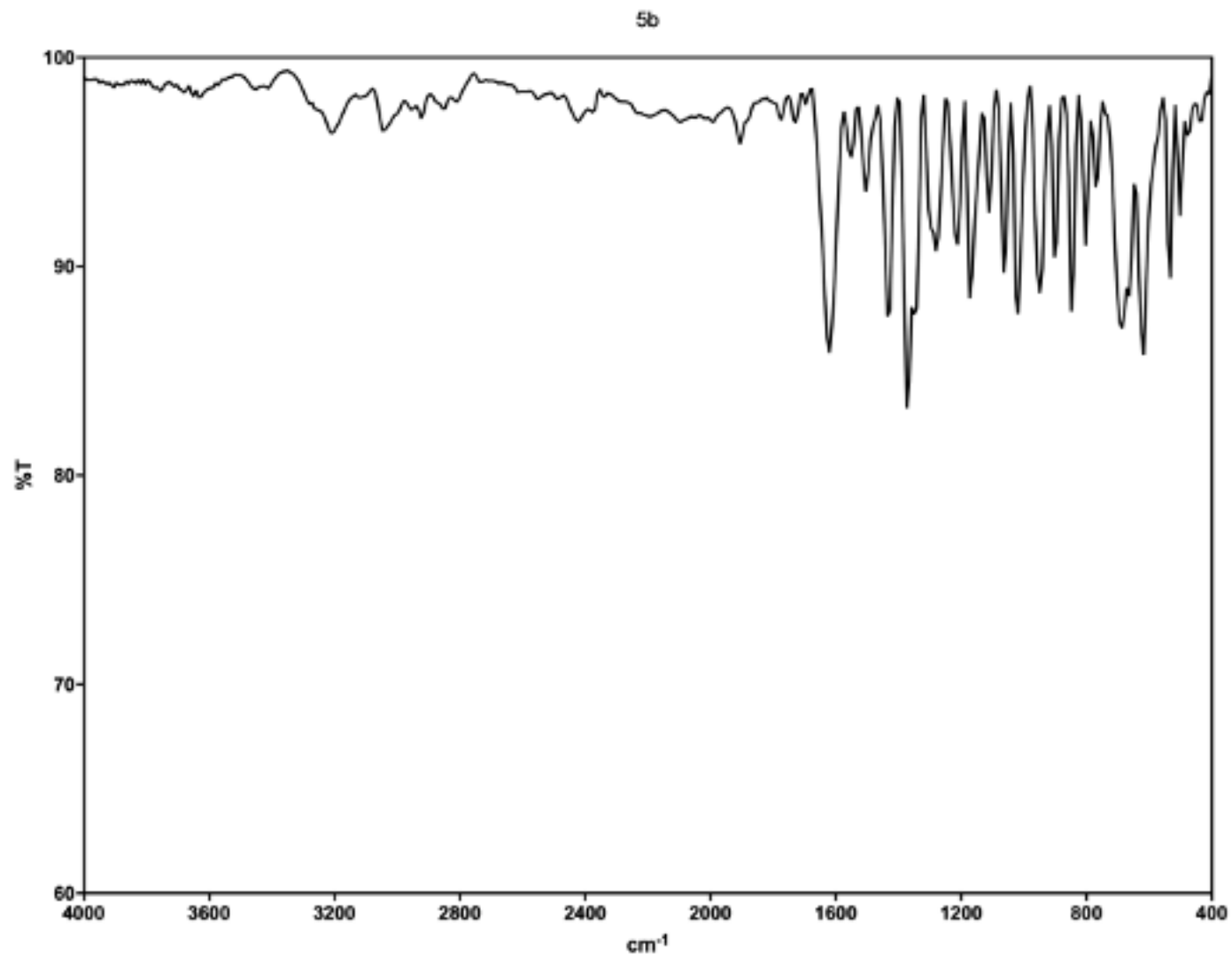


Figura 111. Espectro de FT-IR compuesto 5b

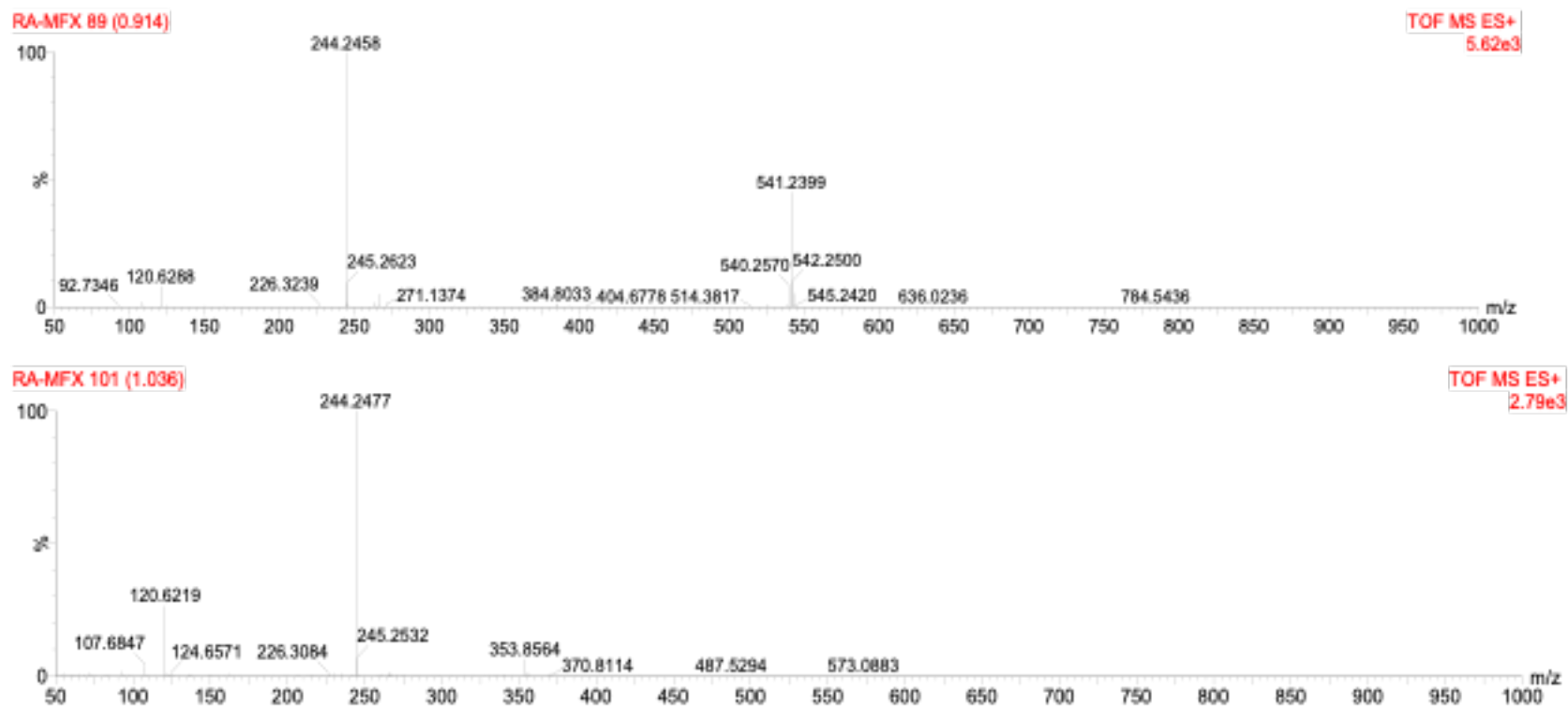
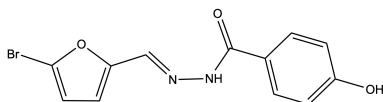


Figura 112. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 5b

### N<sup>2</sup>-((5-bromofuran-2-il)metilen)-4-hidroxibenzohidrazida (**5c**)



Una solución de hidrazida *p*-hidroxibenzoica (0,0888 g; 0,5836 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-bromo-2-furaldehído (0,1021 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,5835 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **5c** (0,1612 g; 89% rendimiento).

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 11.65 (s, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, OH), 8.23 (s, 1H, H-6), 7.78 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-11), 6.93 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-3), 6.86 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-12), 6.74 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H-4).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 160.7, 151.6, 135.4, 129.7, 124.3, 123.7, 115.7, 115.0, 114.2.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1651 (C=O), 1442 (C=N).
- p.f. 198-200 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Calculado: 309.1155. Encontrado: 309.1164.

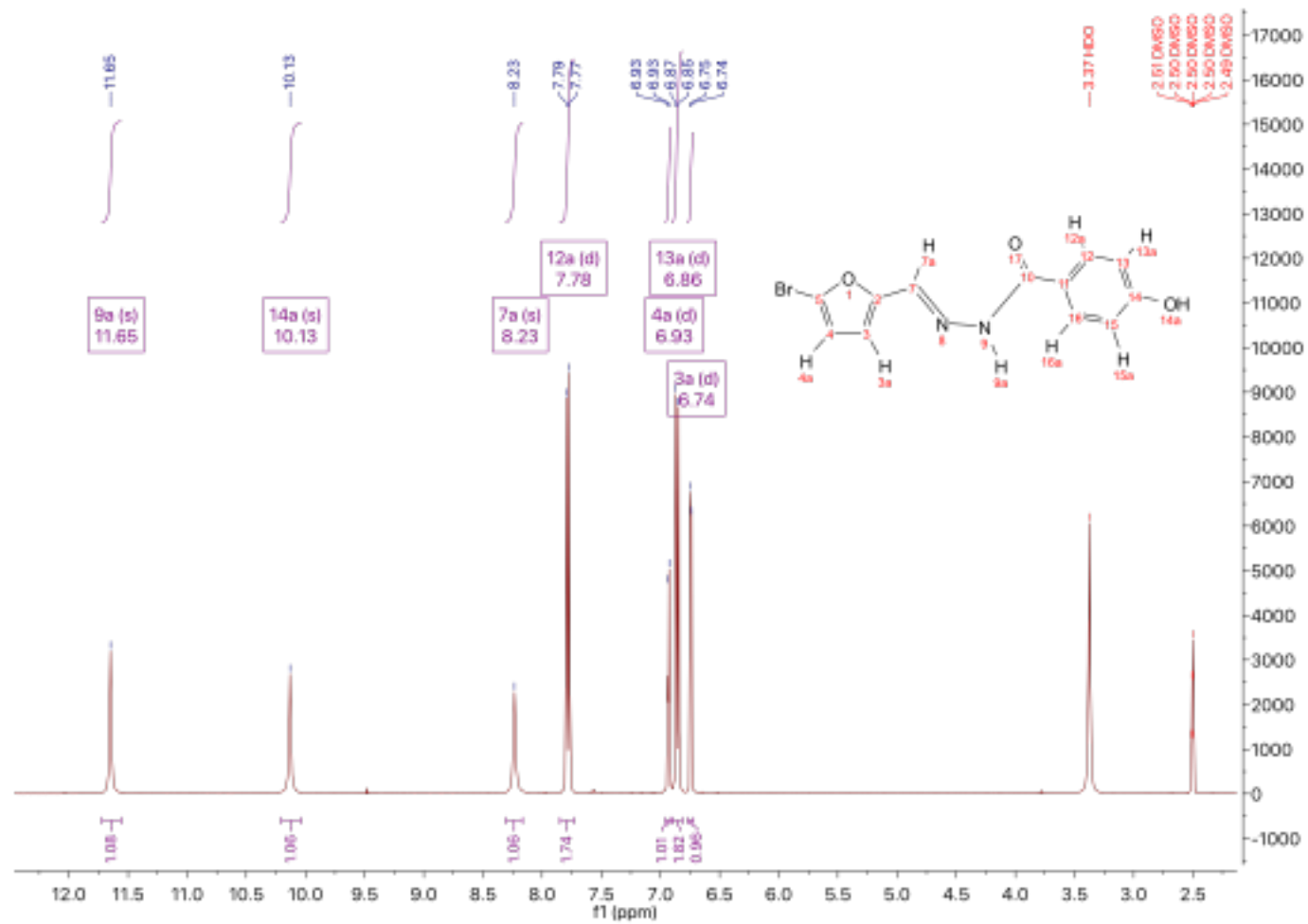


Figura 113. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto **5c**

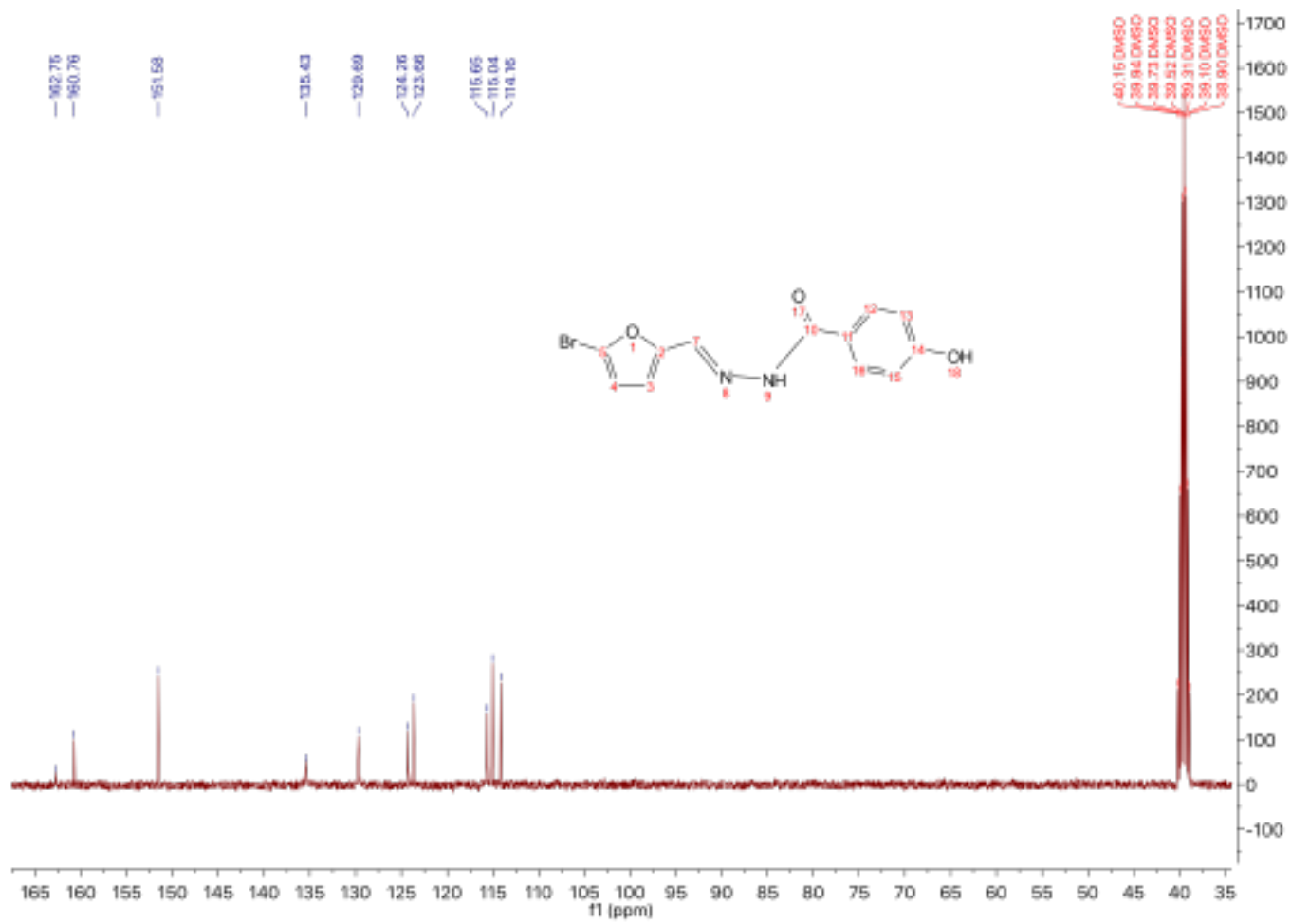


Figura 114. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 5c

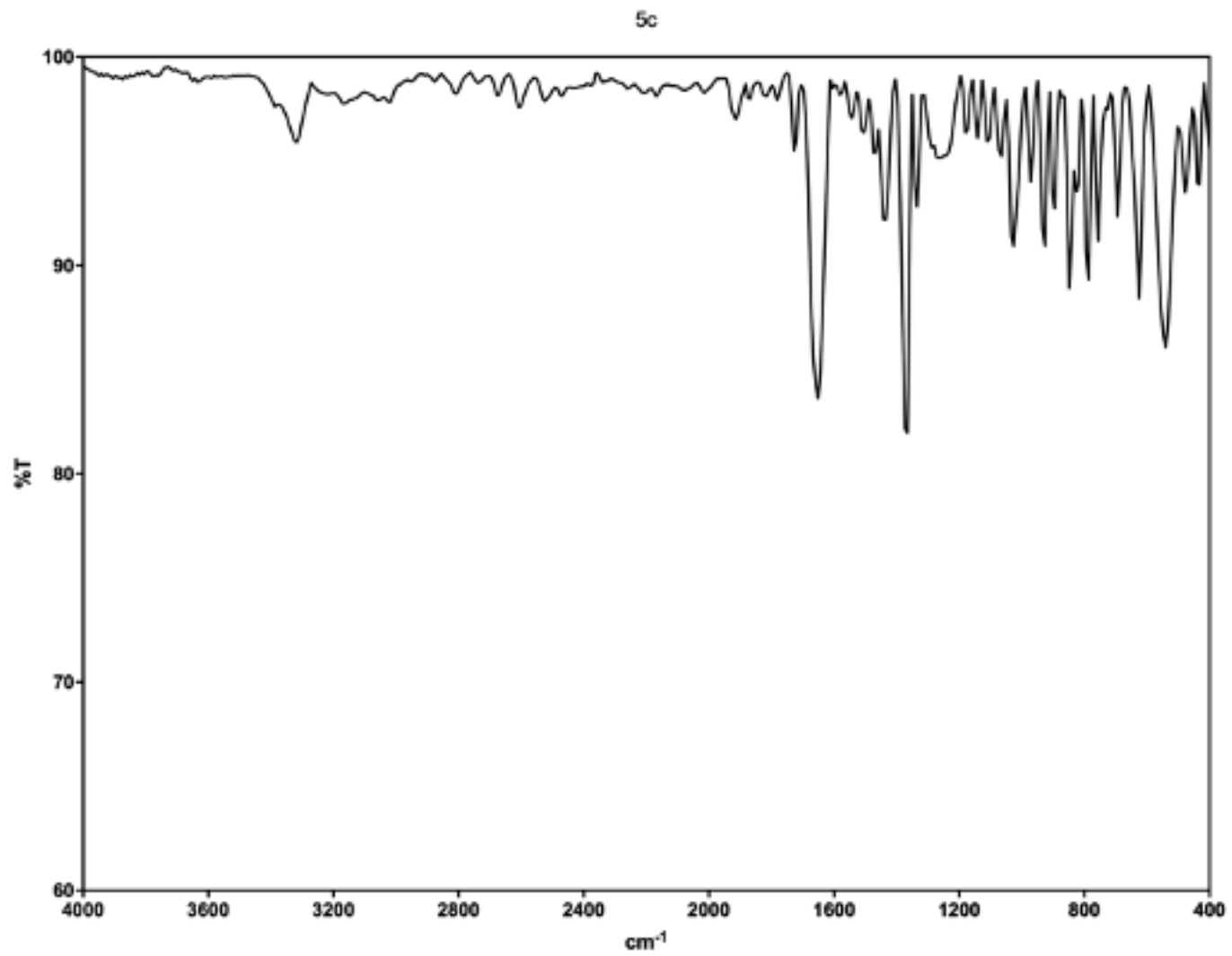


Figura 115. Espectro de FT-IR compuesto 5c



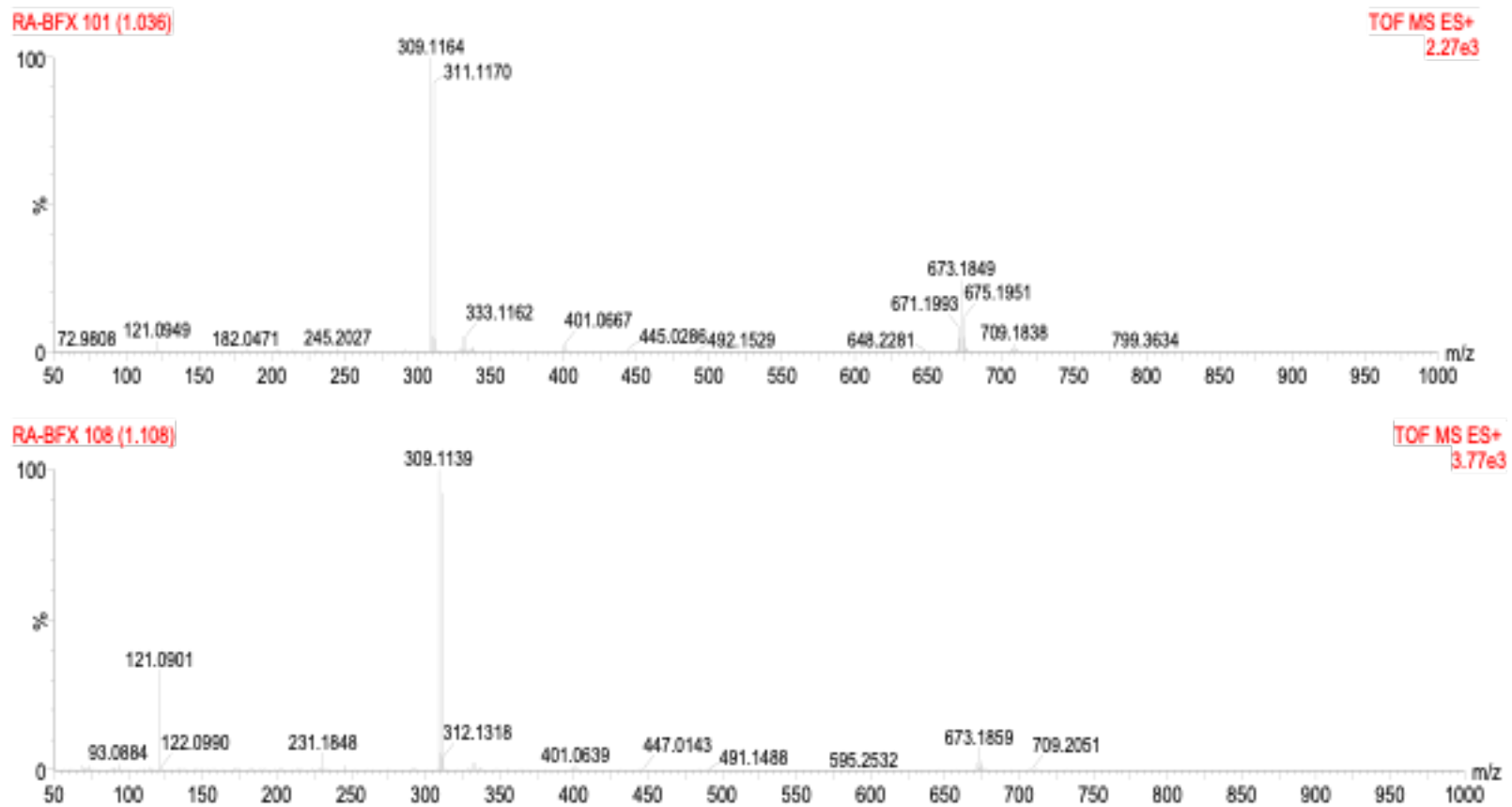
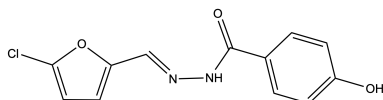


Figura 116. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto 5c

### N'-((5-clorofuran-2-il)metilen)-4-hidroxibenzohidrazida (**5d**)



Una solución de hidrazida *p*-hidroxibenzoica (0,1110 g; 0,7293 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 2-furaldehído (0,0898 g en 100  $\mu$ l de DMSO; 0,6876 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado blanquecino. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, para dar como resultado el compuesto **5d** (0,1620 g; 89 % rendimiento).

- $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 11.66 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, OH), 8.24 (s, 1H, H-6), 7.83-7.75 (m, 2H, H-11), 6.98 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-3), 6.91-6.83 (m, 2H, H-12), 6.66 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, H-4).
- $^{13}\text{C-RMN}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 163.25, 161.23, 149.90, 137.54, 135.95, 130.16, 124.13, 115.86, 115.51, 109.84.
- $\text{Ir } \nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1635 (C=O), 1435 (C=N).
- p.f. 186-188 °C.
- EMAR [M $^+$ ]:  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_3$  Calculado: 265.0380. Encontrado: 285.0383.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  11.66 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 2H), 6.98 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.91 – 6.83 (m, 2H), 6.66 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H).

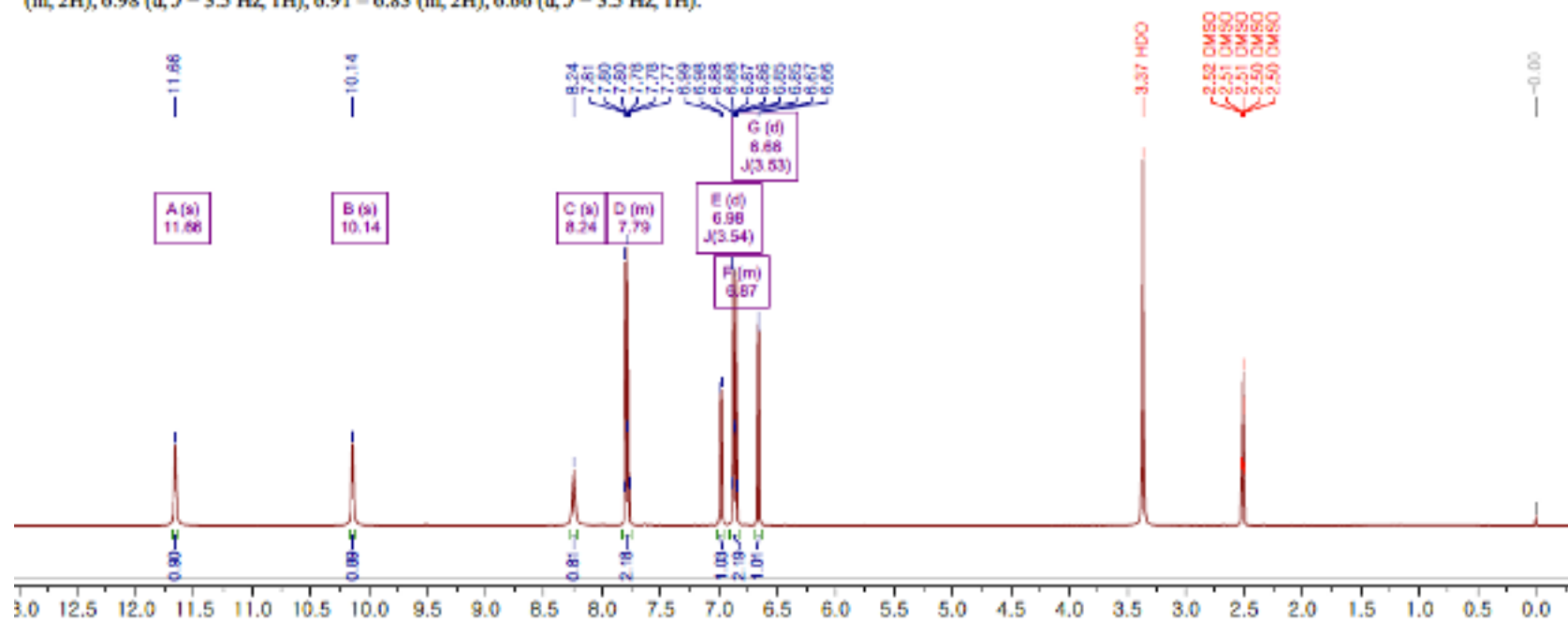


Figura 117. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  5d

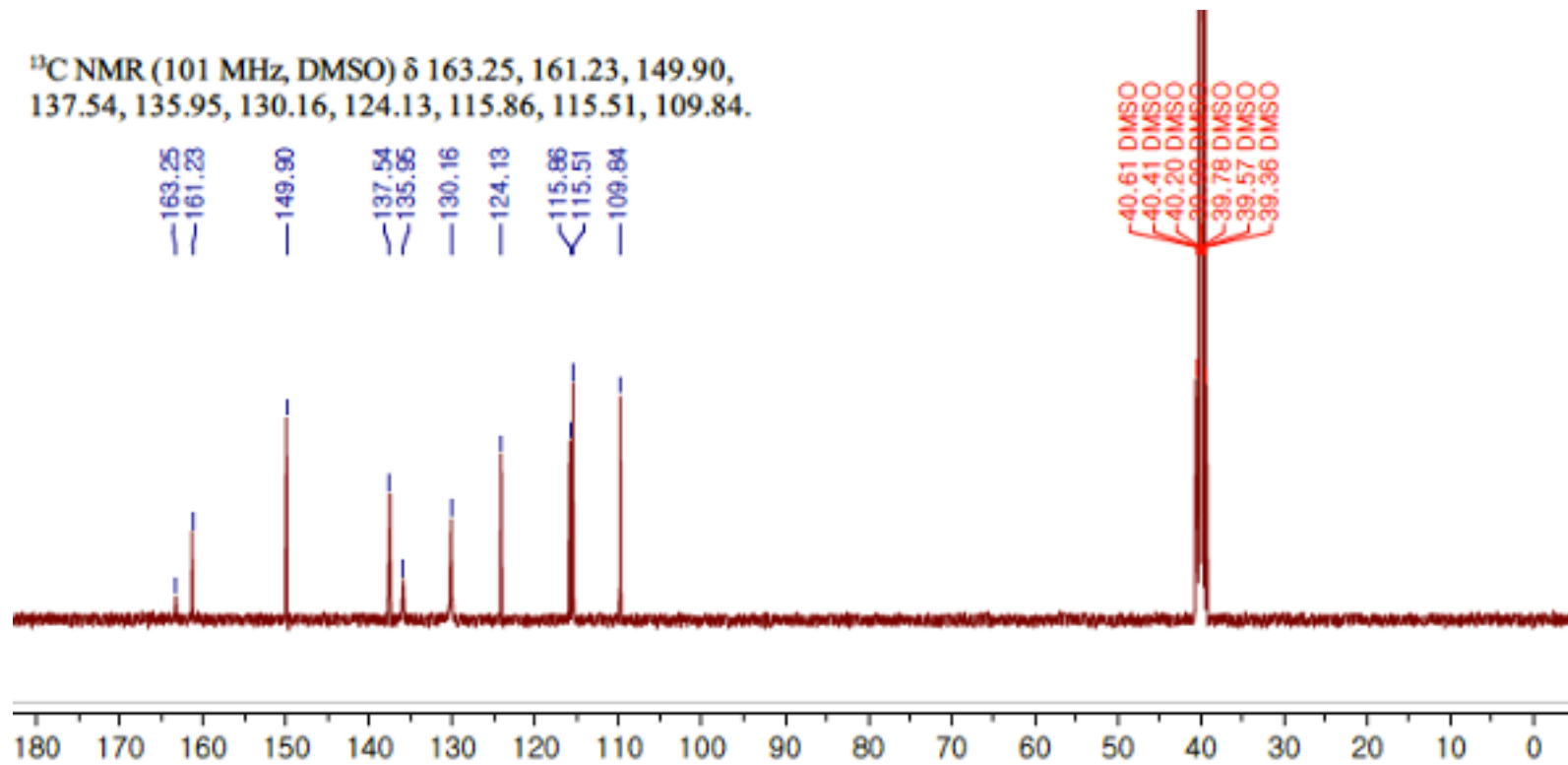


Figura 118. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto 5d

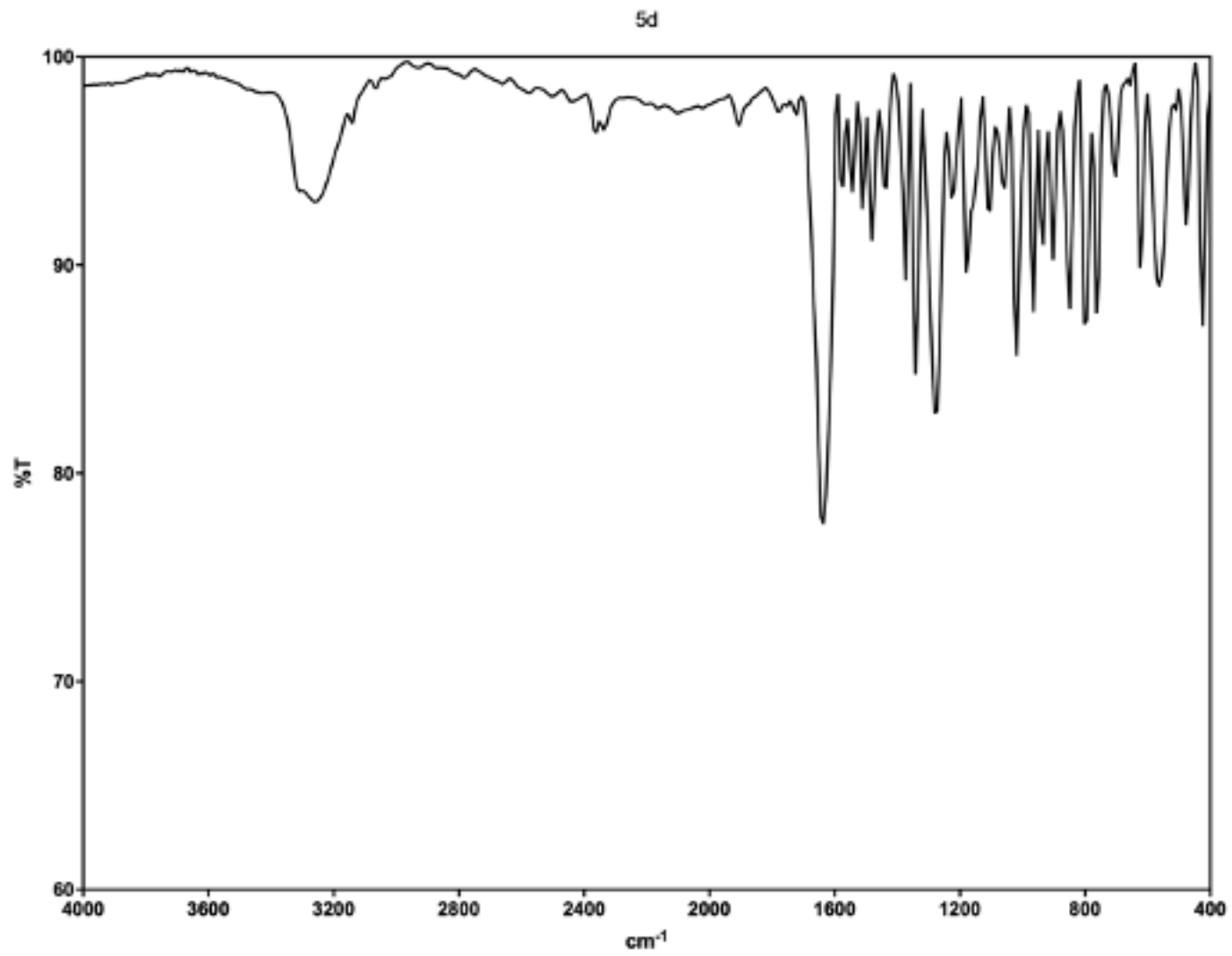


Figura 119. Espectro FT-IR compuesto 5d

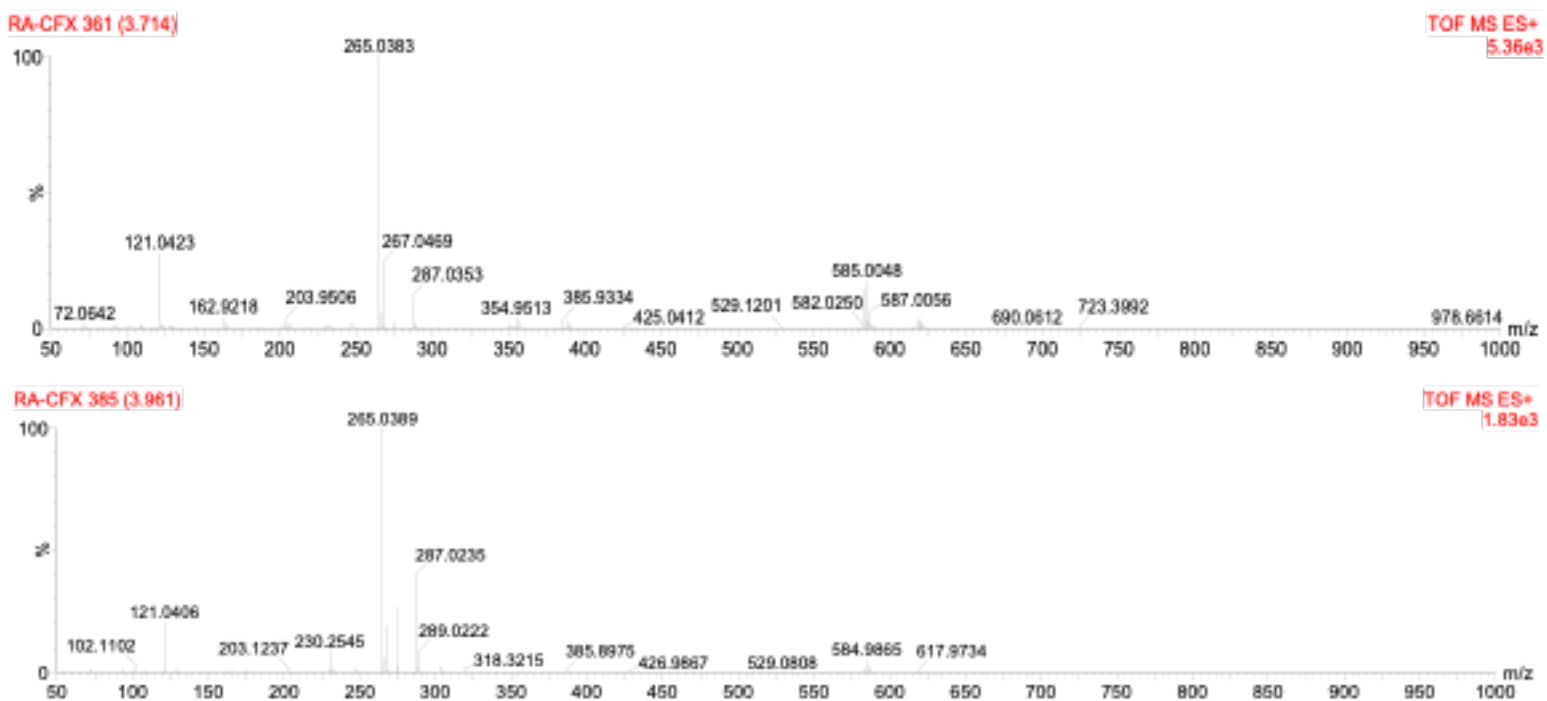
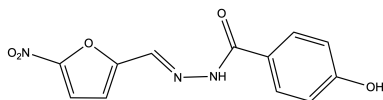


Figura 120. Espectroscopía de masas de alta resolución 5d

## N<sup>2</sup>-((5-nitrofurán-2-il)metilén)-4-hidroxibenzohidrazida (nifuroxazida, NFX)



Una solución de hidrazida *p*-hidroxibenzoica (0,1581 g; 1,039 mmol) en agua destilada (10 ml), conteniendo AcOH (100  $\mu$ l), es sometida a sonicación por ultrasonido por 30 min, añadiéndose a esta solución 5-nitro-2-furaldehído (0,1496 g disueltos en 100  $\mu$ l de DMSO; 1,060 mmol) por goteo, observándose la presencia de un precipitado amarillo. Finalizado este tiempo, la solución es filtrada al vacío, y el filtrado lavado con agua destilada helada (2 x 15 ml). El sólido resultante es secado por 24 h en un horno de vacío a 50 °C, DMSO; **5e (nifuroxazida)** (0,1850 g; 65 % rendimiento). Este derivado es idéntico espectralmente a lo reportado en la literatura, siendo este el primer reporte de síntesis de nifuroxazida a través de la metodología descrita.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 12.03 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, OH), 8.37 (s, 1H, H-6), 7.81 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-11), 7.78 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-4), 7.23 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-3), 6.88 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-12).
- <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm : 161.3, 161.1, 152.1, 151.8, 130.0, 123.2, 115.3, 115.1, 114.8, 114.7.
- Ir  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1674 (C=O), 1465 (C=N).
- p.f. dec. 257 °C.
- EMAR [M<sup>+</sup>]: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> Calculado: 275.2176. Encontrado: 275.2192.

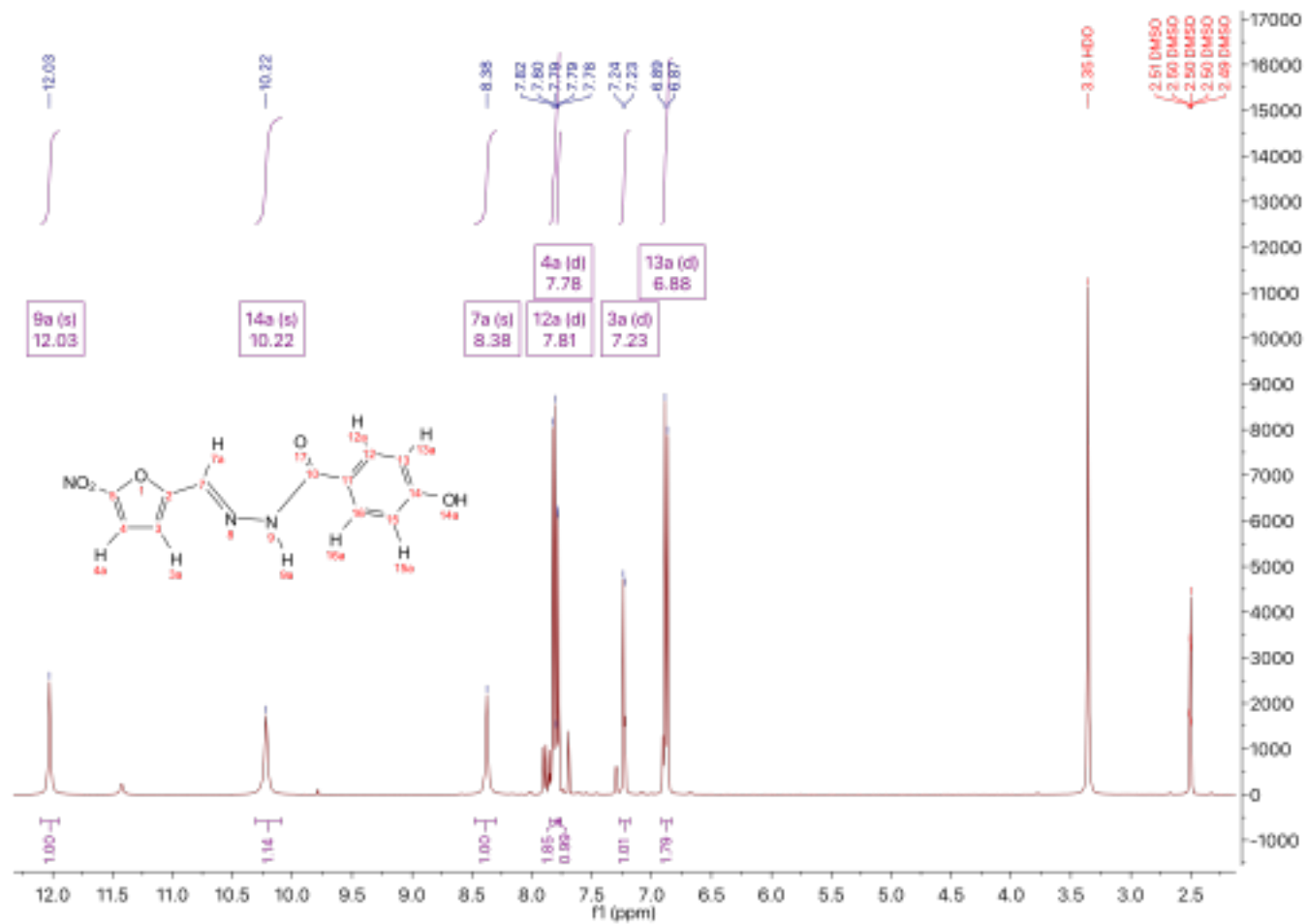


Figura 121. Espectro <sup>1</sup>H-RMN compuesto nifuroxazida



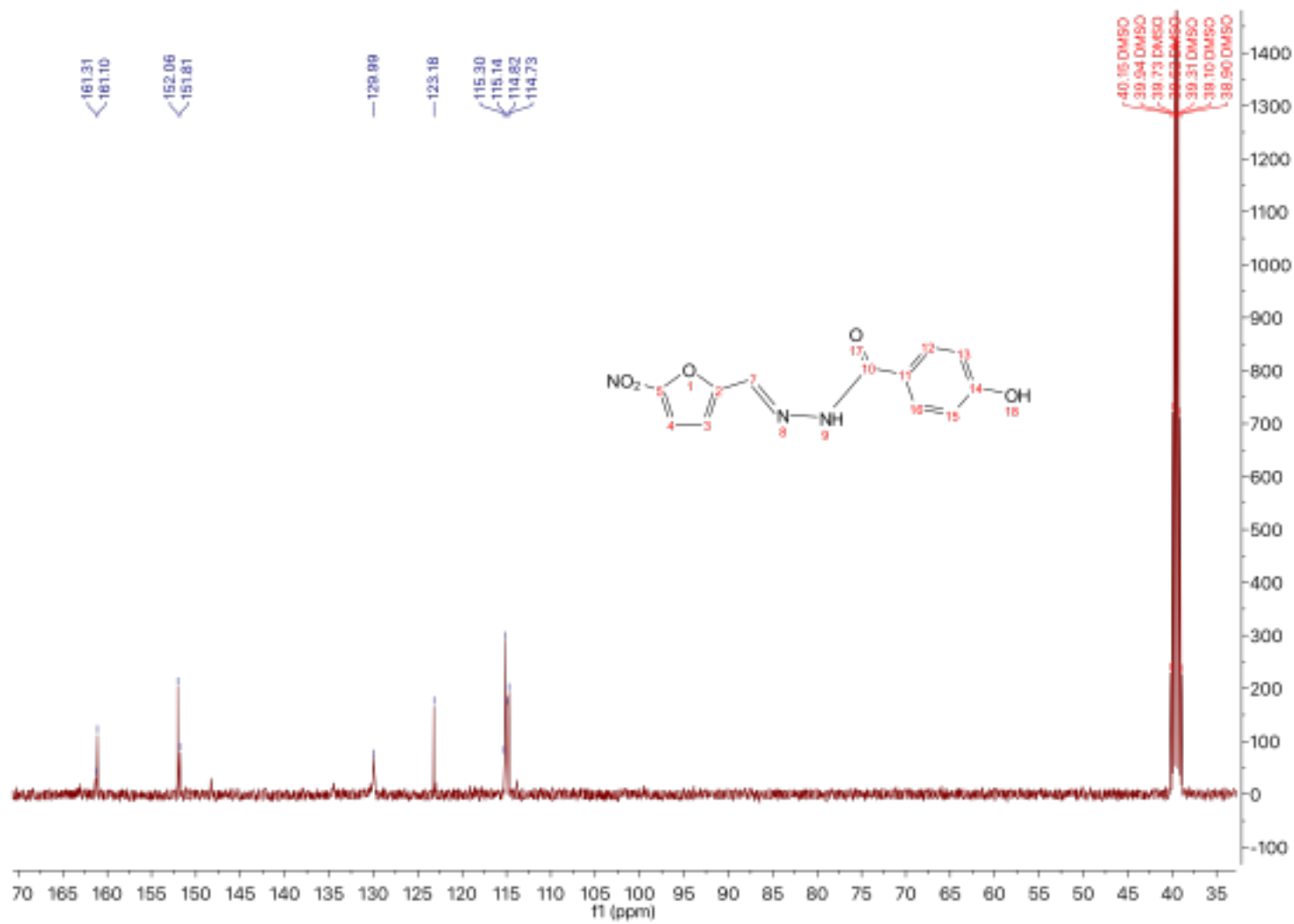


Figura 122. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto nifuroxazida

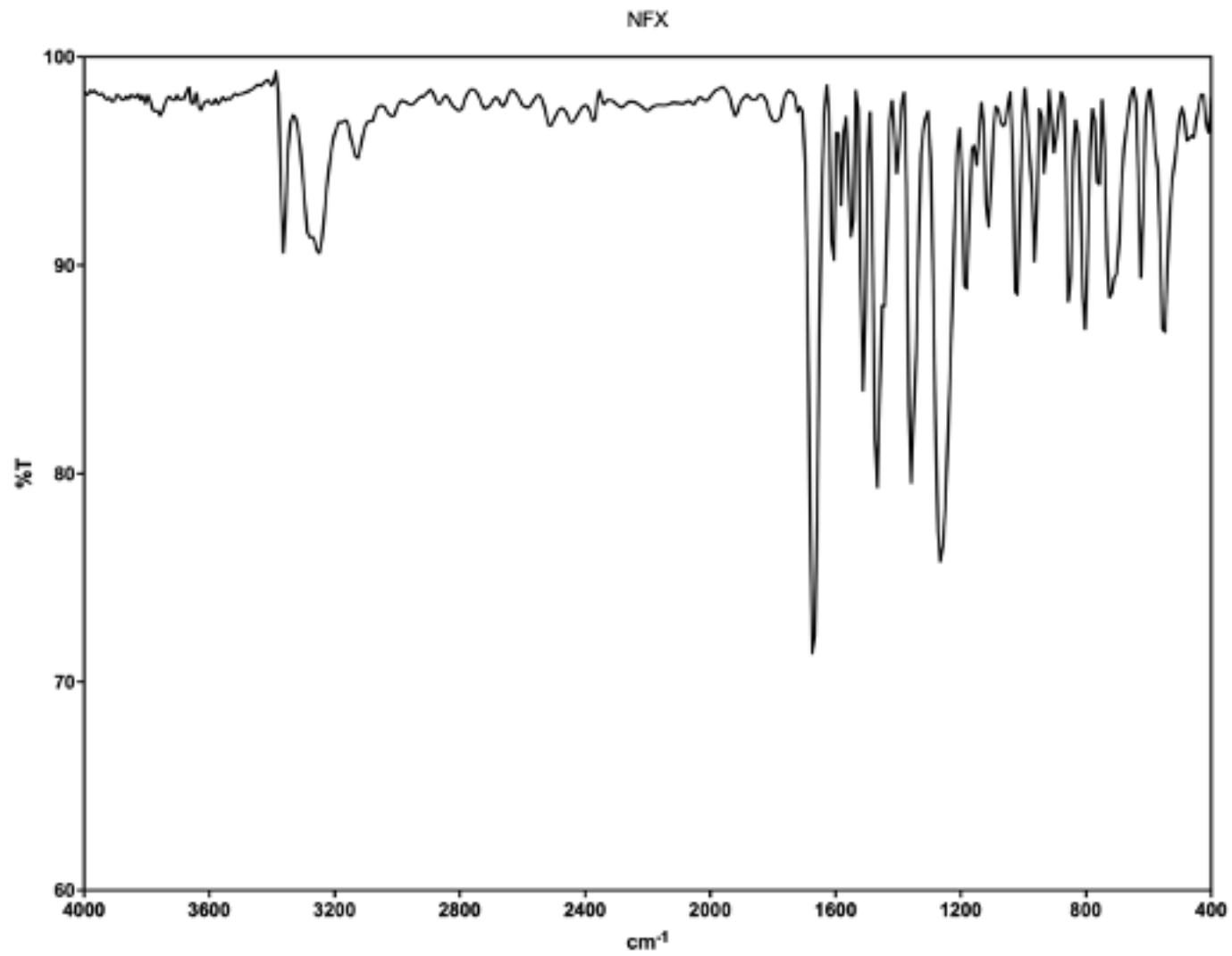


Figura 123. Espectro de FT-IR compuesto nifuroxazida

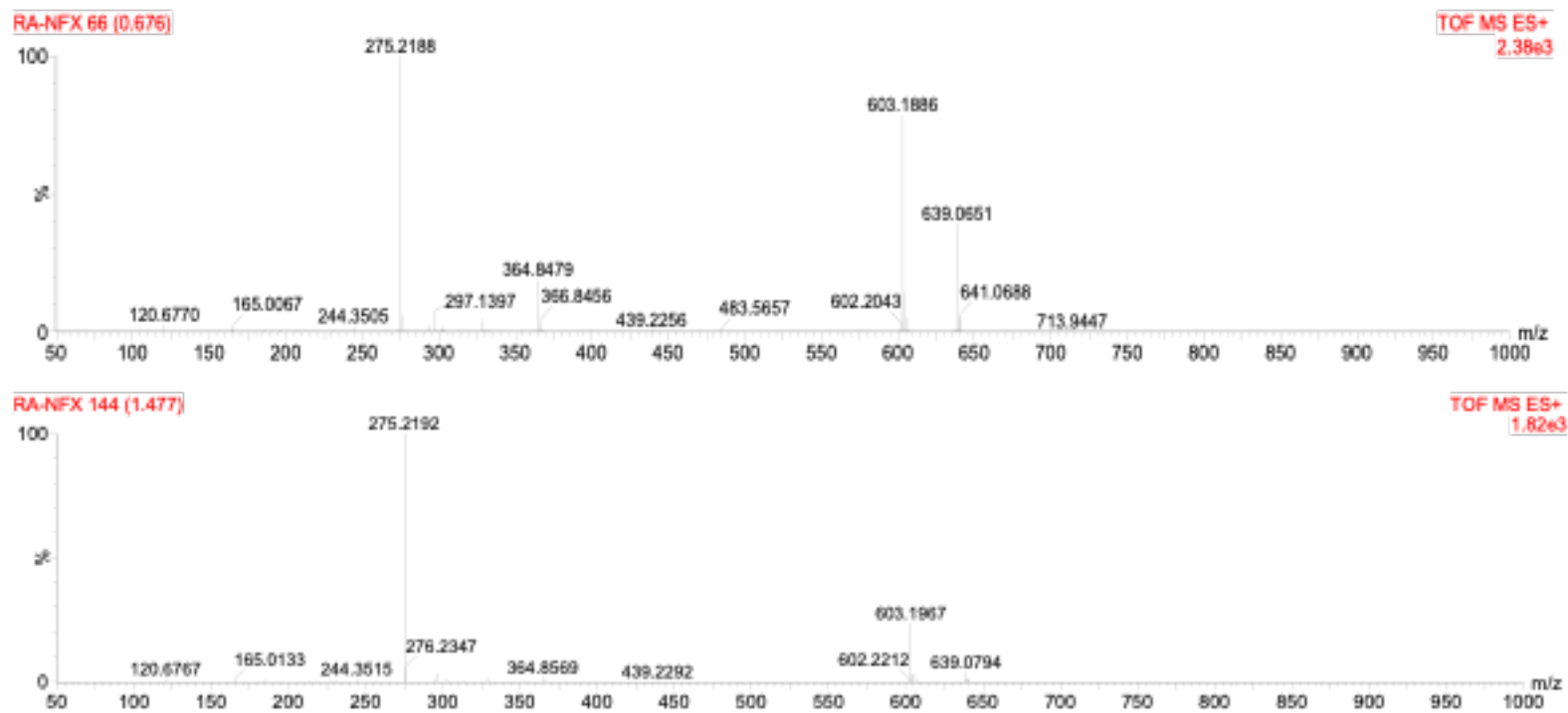


Figura 124. Espectroscopía de masas de alta resolución compuesto **nifuroxazida**