



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Síntesis y pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatoria y  
citotóxica de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-  
disustituidas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Ivonne Arellano Jiménez**

**Director de Tesis: Dr. Noé Rosas Espinosa**

**MÉXICO, DF**

**SEPTIEMBRE DE 2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

**ARELLANO JIMÉNEZ IVONNE**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado:  
**Síntesis y pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de  
1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.I. ANGEL PAVÓN LARA
VOCAL*	DR. NOÉ ROSAS ESPINOSA
SECRETARIO	Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ
SUPLENTE	M. en C. TERESA GRISELDA FUENTES LARA
SUPLENTE	M. en C. JOSÉ MANUEL NARVÁEZ MASTACHE

**ATENTAMENTE.**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D.F. a 28 de junio de 2004.

**Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ**  
**JEFE DE LA CARRERA**

ZARAGOZA  
JEFATURA DE LA CARRERA  
DE Q. F. B.

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química Inorgánica I y en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Noé Rosas Espinosa.



El trabajo de investigación que se presenta para optar por el grado de Químico Farmacéutico Biólogo fue realizado gracias al apoyo financiero otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA, proyecto N° IN-218901) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT , proyecto N° 38761-E)

El presente trabajo de investigación se llevó a  
cabo gracias a la asesoría técnica de la  
M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan  
y del  
M. en C. Antonio Nieto Camacho  
Se agradece la asesoría interna, en la  
FES-Zaragoza, del M. en C. Ángel Pavón Lara

Agradezco a Dios por todo lo que me  
ha dado y por todo lo que soy

Agradezco y dedico mi tesis a Margarita Jiménez  
y a Pedro Arellano, mis padres; a Betito y a  
Brenda, mis hermanos; y a Fernando Rodríguez,  
el amor de mi vida, por todo el apoyo, el amor y  
la confianza que siempre me han dado.

Agradezco también al Dr. Noé Rosas  
por el apoyo que me brindó para  
poder realizar esta tesis

---

---

## Tabla de Contenido

Abreviaturas y Acrónimos.....	i
Lista de figuras .....	iv
Lista de tablas .....	v
Lista de espectros.....	vi
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Síntesis de Pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas.....	2
1.1.1 Síntesis y catálisis.....	2
1.1.2 Química de las pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas y antecedentes de la síntesis .....	3
1.1.3 Síntesis propuesta de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas.....	6
1.2 Actividad Biológica.....	7
1.2.1 Radicales libres.....	8
1.2.2 Antioxidantes.....	10
1.2.2.1 función de los antioxidantes .....	10
1.2.3 Inflamación.....	12
1.2.3.1 células y mediadores de la inflamación.....	13
1.2.3.2 tipos de inflamación .....	15
1.2.3.3 medicamentos antiinflamatorios.....	16
1.2.3.3.1 corticosteroides.....	16
1.2.3.3.2 antiinflamatorios no esteroides.....	18
1.2.3.3.3 los que suprimen reacciones de hipersensibilidad inmediata .....	19
1.2.4 Cáncer.....	20
1.2.4.1 tipos de cáncer .....	21
1.2.4.2 agentes que causan el cáncer .....	23
1.2.4.3 medicamentos contra el cáncer.....	23
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
5.1 Diagrama de Flujo.....	28
5.2 Síntesis de 1,3-dimetilpirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas .....	29

---

---

---

---

<b>5.3 Evaluación de la Actividad Antioxidante .....</b>	<b>30</b>
<b>5.4 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria .....</b>	<b>32</b>
<b>5.5 Evaluación de la Actividad Citotóxica.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6 Material y Equipo.....</b>	<b>36</b>
5.6.1 Síntesis química.....	36
5.6.2 Evaluaciones biológicas .....	37
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 Resultados de la Síntesis Química.....</b>	<b>39</b>
6.1.1 Características físicas, espectrométricas y espectroscópicas.....	40
<b>6.2 Resultados de Actividad Antioxidante.....</b>	<b>44</b>
<b>6.3 Resultados de Actividad Antiinflamatoria .....</b>	<b>47</b>
<b>6.4 Resultados de Actividad Citotóxica .....</b>	<b>49</b>
<b>7. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>
<b>ESPECTROS.....</b>	<b>61</b>

---

---

---

---

### Abreviaturas y Acrónimos

$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	Tetrametil silano
$[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{-4}$	Ciano niquelato
$^{13}\text{C}$	Isótopo de carbono
$^1\text{H}$	Protón
a.C	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANDEVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATB	Ácido tiobarbitúrico
BHT	Butil Hidroxitolueno
<i>c</i>	Cuádruple
CCF	Cromatografía en capa fina
$\text{CDCl}_3$	Cloroformo deuterado
$\text{CI}_{50}$	Concentración inhibitoria al 50%
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
<i>d</i>	Doble
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
EM	Espectrometría de masas
ENR	Especies con nitrógeno reactivo
EOR	Especies con oxígeno reactivo
ES	Error estándar de la media
EtOH	Etanol
$\text{FeSO}_4$	Sulfato de fierro
$\text{FLA}_2$	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
$\text{FNT}\alpha$	Factor de crecimiento tumoral alfa

---

g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HCT-15	Línea de células tumorales de colón
IE	Impacto electrónico
IgE	Inmunoglobulina E
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
K562	Línea de células de leucemia
KCN	Cianuro de potasio
Kg	Kilogramo
LPS	Lipopolisacaridos
<i>m</i>	Múltiple
M	Concentración molar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
M <sup>+</sup>	Ión molecular
MCF-7	Línea de células tumorales de mama
MDA	Malondialdehído
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenyl tetrazolio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NDGA	Ácido norhidroguaiaurético
Ni(CN) <sub>2</sub>	Cianuro de níquel II
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
ONSi	Oxido nítrico sintasa inducible
PC-3	Línea de células tumorales de próstata
pf	Punto de fusión

---

---

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
PM	Peso molecular
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
ppm	Partes por millón
<i>q</i>	Quíntuple
R	Grupo sustituyente: etilo, propilo o butilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Simple
<i>sex</i>	Séxtuple
SRATB	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
SRB	Sulforodamina B
<i>t</i>	Triple
THP	Tetrahidropapaverolina
TMS	Trimetilsilano
TPA	Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
$\delta$	Desplazamiento químico
U251	Línea de células tumorales del sistema nervioso central
UV	Ultravioleta
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar

---



---

## Lista de Figuras

(Título, página)

- Figura 1.** Estructura general de las pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas, 4
- Figura 2.** Obtención de la 3-metil-2,4-dioxo[2,3-*d*]pirimidina, 4
- Figura 3.** Obtención de la 3-metil-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina, 5
- Figura 4.** Obtención de 1,3-dialquil-5-hidroxipirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4,7-trionas-6-sustituídas, 5
- Figura 5.** Obtención de 1,3-dialquil- pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas, 5
- Figura 6.** Obtención de pirido[2,3-*d*]pirimidinas, 6
- Figura 7.** Obtención de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituídas, 6
- Figura 8.** Formación de la especie catalítica activa, 7
- Figura 9.** Hidrocortisona, estructura base de los corticosteroides, 17
- Figura 10.** AINE comunes: derivados del ácido salicílico, acético, propiónico y enólico, 18
- Figura 11.** Algunos antihistamínicos antagonistas de receptores H<sub>1</sub>, 20
- Figura 12.** Algunos medicamentos usados en la quimioterapia del cáncer, 25
- Figura 13.** 1,1-difenil-2-picril-hidracilo, 30
- Figura 14.** Formación del aducto que absorbe a 532 nm, 32
- Figura 15.** Acetato del 12-*o*-tetradecanoilforbol, 33
- Figura 16.** Reducción del DPPH por el  $\alpha$ -tocoferol, 45
- Figura 17.** Inhibición de la lipoperoxidación por el BHT, 46
- Figura 18.** Mecanismo de reacción para la síntesis de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas, 51
- Figura 19.** Estructura base de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y sus sustituyentes, 52

---

---

## Lista de Tablas

(Título, página)

**Tabla 1.** Ejemplos de radicales libres, 8

**Tabla 2.** Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, 10

**Tabla 3.** Algunos medicamentos usados en la quimioterapia del cáncer, 24

**Tabla 4.** Productos de la reacción entre  $\alpha$ -alquilcetonas y 6-amino-1,3-dimetiluracilo, 39

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas de actividad antioxidante, 44

**Tabla 6.** Reducción del DPPH por el  $\alpha$ -tocoferol (%), 45

**Tabla 7.** Inhibición de la lipoperoxidación por BHT, 46

**Tabla 8.** Inhibición del edema inducido por TPA, 47

**Tabla 9.** Inhibición (dosis-respuesta) del edema por el compuesto I, 47

**Tabla 10.** Inhibición (dosis-respuesta) del edema por el compuesto II, 48

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de la producción de nitritos, y de crecimiento de macrófagos murinos, 48

**Tabla 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento en cinco líneas celulares cancerosas y en células normales, 49

---

---

## Lista de Espectros

**Espectro 1.** EM (IE) m/z: 7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 2.** EM (IE) m/z: 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 3.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 4.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, TMS): 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 5.** EM (IE) m/z: 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 7.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, TMS): 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 8.** EM (IE) m/z: 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 9.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

**Espectro 10.** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, TMS): 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

---

---

## INTRODUCCIÓN

Desde la era primitiva el hombre ya usaba remedios en el tratamiento de sus enfermos y sus dolencias. Entremezclaba lo religioso y lo mágico en su afán por alcanzar la salud y su bienestar. Fue así que al asociar algunas hierbas y plantas en el ritual mágico religioso nació la farmacia como una forma de curación y purificación.<sup>1</sup> De hecho, todavía a principios del siglo pasado, el hombre confiaba exclusivamente en la naturaleza para obtener los fármacos orgánicos que necesitaba, y las contribuciones de la farmacia se limitaban en gran parte a la preparación de extractos, tinturas y otras formas de dosificación, y al aislamiento de principios activos, especialmente alcaloides y glucósidos.<sup>2</sup>

Así pues, los productos sintéticos empezaron a surgir con rapidez apreciable en la década de 1920 gracias a la expansión de la industria química favorecida por la primera guerra mundial.<sup>2</sup> Actualmente, la mayor parte de los posibles nuevos fármacos se obtienen por modificación química de una molécula conocida o por la separación de éstos a partir de productos naturales.

Muchos compuestos bioquímicos importantes y fármacos de origen natural contienen anillos de estructura heterocíclica; la presencia de éstos en compuestos de tipos tan diferentes indica firmemente los profundos efectos que estas estructuras ejercen sobre la actividad fisiológica.<sup>2</sup> Este conocimiento refleja los esfuerzos por encontrar sustancias sintéticas con alguna actividad biológica.

Sin embargo, los fármacos y otras sustancias producidas por síntesis química muchas veces requieren, para obtenerse, demasiados pasos y recursos económicos, así como condiciones drásticas de reacción. Es por ello que en el presente proyecto de investigación se plantea la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas (Figura 1) con diferentes sustituyentes a los ya informados en la literatura. Dichos compuestos han demostrado tener actividad biológica importante, por lo que se pretende conocer si las nuevas moléculas sintetizadas presentan la misma u otra actividad biológica. Además, su síntesis es más sencilla ya que no se requieren condiciones drásticas de reacción.

---

---

---

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Síntesis de Pirido[2,3-*d*]pirimidinas

#### 1.1.1 Síntesis y catálisis

La síntesis química es el método de hacer reaccionar precursores químicos simples para obtener una molécula, generalmente, más compleja. El equilibrio de dicha reacción se lleva a cabo una vez que se ha detenido la disminución de las concentraciones de los reactivos, y que ya no han aumentado las concentraciones de los productos.

La inserción de moléculas pequeñas, como son monóxido de carbono, hidrógeno y grupo ciano, en sustratos insaturados es un proceso importante en la síntesis de aldehídos, cetonas, ácidos, lactamas, lactonas y otros compuestos orgánicos de interés general, tanto a nivel laboratorio como industrial. Generalmente el sustrato insaturado es inerte en condiciones normales de reacción, es decir, presión atmosférica y temperatura ambiente, por lo que se requiere para su activación algún catalizador organometálico.<sup>3</sup>

Un catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de reacción y que puede recuperarse al final sin sufrir modificación. Su función general consiste en suministrar un mecanismo adicional por medio del cual los reactivos puedan transformarse en productos. Este mecanismo alterno tiene una energía de activación menor que la del mecanismo en ausencia de catalizador; de manera que la reacción catalizada es más rápida.<sup>4</sup>

La catálisis se da en sistemas homogéneos y heterogéneos; la primera ocurre cuando el catalizador es dispersado uniformemente en la mezcla de reacción, que puede ser gaseosa o una solución líquida.<sup>5</sup> La catálisis heterogénea resulta de reacciones en fase líquida o gaseosa con catalizadores en estado sólido.<sup>6</sup>

---

---

En los procesos catalíticos homogéneos se han utilizado disolventes orgánicos como fase líquida, pero en los últimos años se ha venido implementando la utilización de agua para eliminar los inconvenientes que se presentan en los procesos homogéneos cuando se utilizan disolventes orgánicos.

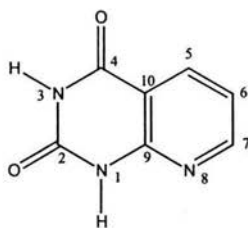
Muchas investigaciones se han enfocado al desarrollo de nuevos catalizadores solubles en agua y técnicas eficientes que permitan obtener de una manera sencilla, práctica y eficiente los productos deseados. En general, la utilización de agua en catálisis presenta las siguientes ventajas<sup>3</sup>:

- Elimina el uso de disolventes polares apróticos como dimetilsulfóxido y dimetilformamida
- Se evita la desactivación del catalizador
- El aislamiento de productos ya que generalmente son insolubles en agua
- Las condiciones de reacción son más suaves y los rendimientos de los productos más altos
- Las reacciones secundarias pueden ser eliminadas o reducidas

Con un catalizador soluble en agua se lleva a cabo la síntesis de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas.

### 1.1.2 Química de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y antecedentes de la síntesis

Las 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas pertenecen a una familia de compuestos heterocíclicos, cuya estructura general es pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas (Figura 1), que están dentro de un número de compuestos biológicamente activos que comprende antitumorales, antibacteriales y anticonvulsivos.<sup>7</sup>

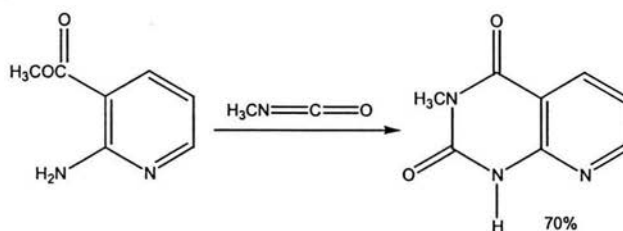


**Figura 1.** Estructura general de las pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas

Químicamente, la pirimidina es un heterociclo de seis miembros con dos átomos de nitrógeno situados en la posición 1 y 3. Cada nitrógeno tiene su par de electrones no compartido en el orbital híbrido  $sp^2$  en el plano del anillo aromático.

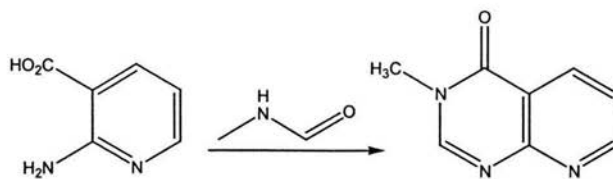
La pirido[2,3-*d*]pirimidina es un anillo fusionado compuesto de una molécula de piridina y una de pirimidina unidos en la posición 2 y 3 de esta última.

Algunos de los métodos de preparación, hasta ahora reportados, comprenden los publicados por Capuano et al.<sup>8</sup>, quienes propusieron la síntesis de la 3-metil-2,4-dioxo[2,3-*d*]pirimidina, por reflujo del 2-aminonicotinato de metilo con isocianato de metilo en piridina (Figura 2).



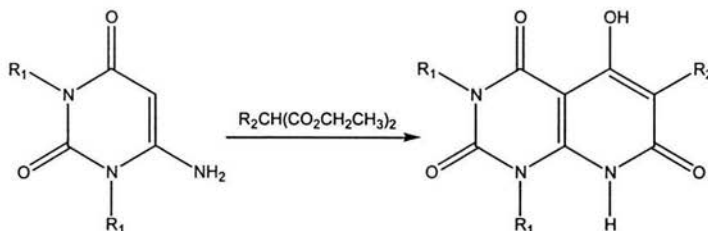
**Figura 2.** Obtención de la 3-metil-2,4-dioxo[2,3-*d*]pirimidina

Fox H. propone la condensación del ácido 2-aminonicotínico con N-metilformamida (Figura 3), para obtener la 3-metil-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina como producto principal.<sup>9</sup>



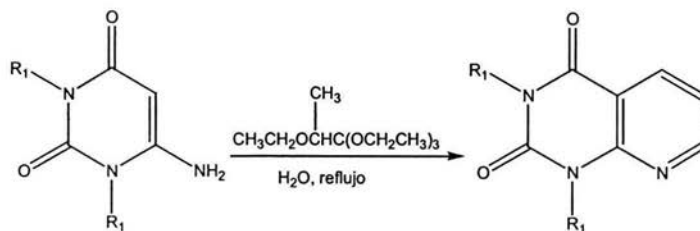
**Figura 3.** Obtención de la 3-metil-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina

Khattab y Kappe informaron la preparación de 1,3-dialquil-5-hidroxipirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4,7-trionas-6-sustituidas; a partir de la reacción de 1,3-dialquil-6-aminouracilo y un derivado del éster malónico <sup>10</sup>(Figura 4).



**Figura 4.** Obtención de 1,3-dialquil-5-hidroxipirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4,7-trionas-6-sustituidas

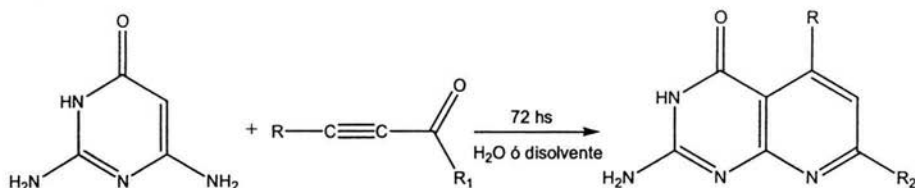
La propuesta de Pfeleiderer<sup>11</sup>, para la síntesis de derivados de 1,3-dialquil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas consiste en la reacción de condensación entre 6-aminouracilo y tetraetoxipropano (Figura 5).



**Figura 5.** Obtención de 1,3-dialquil- pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas



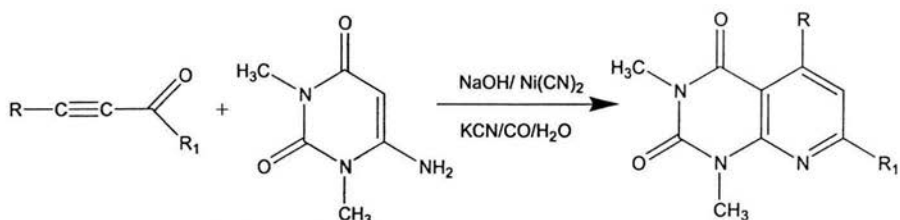
Recientemente, Bagley, et al <sup>12</sup> informaron la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas a partir de la reacción de 2,6-diaminopirimidin-4-ona y alquinoas en diferentes disolventes (Figura 6).



**Figura 6.** Obtención de pirido[2,3-*d*]pirimidinas

### 1.1.3 Síntesis propuesta de pirido[2,3-*d*]pirimidinas

La síntesis propuesta en este proyecto involucra la reacción de 6-amino-1,3-dimetiluracilo y  $\alpha$ -alquínilcetonas en un sistema catalítico acuoso de níquel para obtener 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas (Figura 7).<sup>13</sup>



**Figura 7.** Obtención de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas

La especie catalítica activa,  $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{4-}$  (ciano níquelato), se forma *in situ* en un sistema acuoso (Figura 8), por  $\text{Ni}(\text{CN})_2$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CO}$  y  $\text{KCN}$ , en condiciones suaves de reacción (presión atmosférica y temperatura ambiente).<sup>14</sup>

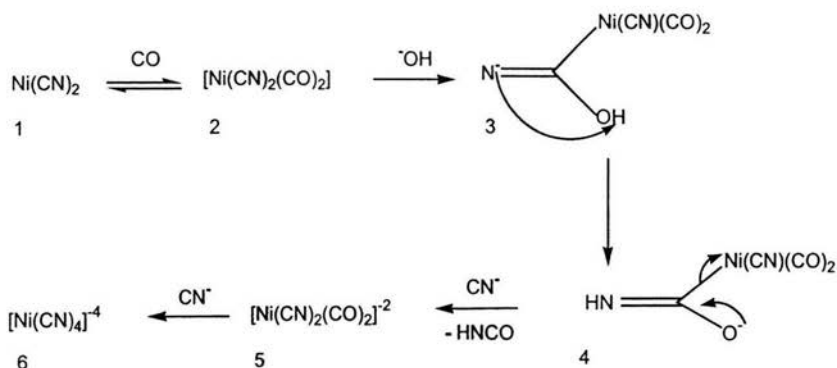


Figura 8. Formación de la especie catalítica activa

## 1.2 Actividad Biológica

Para llevar a cabo el desarrollo de un medicamento nuevo, se estima que el costo promedio alcanza los 200 millones de dólares, con tiempos que fluctúan entre los 8 y 15 años;<sup>15</sup> por ello es imprescindible, sobre todo para un país subdesarrollado, tener en cuenta aspectos que puedan contribuir a disminuir el costo y el tiempo en la elaboración de un fármaco o medicamento. Uno de esos aspectos es la de implementar investigación básica, que se inicia con la evaluación preclínica de las sustancias con posible actividad biológica.

Para determinar la actividad biológica de un compuesto es necesario evaluar la sustancia en un sistema biológico que no sea, originalmente, el organismo humano y así conocer los efectos tóxicos, y posibles terapéuticos, que posea. De los resultados obtenidos se toma la decisión si se sigue adelante en el proceso con el fin de utilizar dichas sustancias en aplicaciones más importantes.

Ciertas enfermedades, como el cáncer e inflamatorias, que afectan al mundo están relacionadas con los llamados radicales libres; es por ello que muchas de las evaluaciones que se realizan, inician con el estudio de la actividad antioxidante de la sustancia (según su estructura química) y de los resultados obtenidos se crean estrategias a seguir para estudios posteriores.

---

---

### 1.2.1 Radicales libres

Los enlaces químicos están formados por dos electrones que pueden romperse de dos maneras diferentes. En la primera, los dos electrones de enlace permanecen unidos a uno de los “fragmentos”. A este proceso se denomina heterólisis y a los “fragmentos” cargados, iones:



En el segundo proceso de ruptura de enlaces, los dos electrones que los constituyen se dividen simétricamente. A esto se le denomina homólisis y a los “fragmentos”, radicales libres.



Un radical libre se define como un átomo, grupo de átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones no apareados en su órbita externa.<sup>16</sup> En la tabla 1 se ejemplifican algunas especies que son consideradas radicales libres.

**Tabla 1.** Ejemplos de radicales libres

Especies	Nombres
CH <sub>3</sub> ·	Radical metilo
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ·	Radical fenilo
NO <sub>2</sub> ·	Dióxido de nitrógeno
OH·	Radical hidroxilo
NO·	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>	Superóxido

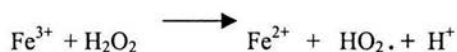
---

---

---

Los radicales pueden producirse por rompimiento térmico de enlaces, por irradiación de las moléculas y por procesos de oxidación-reducción (redox) de un solo electrón.

Las reacciones redox más importantes son las que implican un ion metálico que puede transferir un electrón. De éstas, la reacción del peróxido de hidrógeno con ion ferroso, descubierta por Fenton en 1894, es una de las más antiguas y de las más conocidas. En 1932, Haber y Weiss propusieron un mecanismo que, aún hoy, se sigue aceptando<sup>16</sup>:



Ahora bien, en ciertas condiciones metabólicas, la reducción del oxígeno es incompleta y conduce a la formación de radicales libres. Estos productos atacan los fosfolípidos de las membranas celulares, a nivel de ácidos grasos poliinsaturados en la peroxidación lipídica; de ella resultan productos que pueden ser citotóxicos.

Existen varias fuentes de radicales libres como las subcelulares, celulares, las de reacciones enzimáticas y ambientales y pueden afectar, además de los lípidos, a los carbohidratos: depolimerizando polisacáridos; proteínas: oxidando los puentes sulfidrílicos de los enzimas; y ácidos nucleicos: hidroxilando sus bases y causando mutaciones.

Actualmente es bien conocido que cierto tipo de enfermedades, como el cáncer, podrían estar unidas al fenómeno de la oxidación celular mediada por radicales libres.<sup>17</sup>

---

---

## 1.2.2 Antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato.<sup>18</sup> El sustrato oxidable incluye proteínas, lípidos, carbohidratos y ácido desoxirribonucleico (ADN).

El estrés oxidativo es un término usado para denotar el desequilibrio entre las concentraciones de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y los mecanismos de defensa antioxidantes del cuerpo.<sup>19</sup>

### 1.2.2.1 función de los antioxidantes

La forma en que actúan los antioxidantes es atrapando<sup>a</sup> o formando inhibidores de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EOR y ENR, respectivamente) o sus precursores. En la tabla 2, se muestran ejemplos de EOR y ENR que se involucran en la actividad oxidativa.

**Tabla 2.** Especies con oxígeno y nitrógeno reactivos

Radicales	No radicales
Especies reactivas de oxígeno	
Superóxido, $O_2 \cdot^-$	Peróxido de Hidrógeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $OH \cdot$	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, $RO_2 \cdot$	Ozono, $O_3$
Hidroperoxilo, $HO_2 \cdot$	
Especies reactivas de nitrógeno	
Óxido nítrico, $NO \cdot$	Ácido nitroso, $HNO_2$
Dióxido de nitrógeno, $NO_2 \cdot$	Trióxido de dinitrógeno, $N_2O_3$
	Peroxinitrito, $ONOO^-$

---

<sup>a</sup> Es común que se usen los términos scavenging o trapping, en el idioma inglés, para referir aquellas sustancias que atrapan u oxidan a los radicales libres.

---

---

---

Se han publicado diversos reportes sobre los efectos antioxidantes de algunas sustancias en la producción de citocinas proinflamatorias [FNT- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleucina-1  $\beta$ ) e IL-6 (interleucina-6)] por macrófagos peritoneales de ratón, activados con LPS (lipopolisacáridos) -que incrementan los niveles de dichas células-.<sup>20</sup>

Así, los antioxidantes, no naturales, lipofílicos moderados, incluyendo tetrahidropáverolina (THP), butilhidroxianisol (BHA) y ácido norhidroguaiarético (NDGA) resultan ser potentes inhibidores de la producción de IL-1 $\beta$ , FNT- $\alpha$  e IL-6 (el NDGA también inhibe la peroxidación de lípidos), mientras que los hidrofílicos, como el ácido ascórbico, no afectan la producción de IL-1 $\beta$  a concentraciones de hasta 200 $\mu$ M.<sup>20</sup>

Por otra parte, en la peroxidación de fosfolípidos de las membranas celulares se da un incremento de la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) debido a que los lípidos oxidados afectan tanto la membrana celular que ésta se vuelve buen sustrato para dicha enzima.

La activación de la FLA<sub>2</sub> es farmacológicamente importante porque está involucrada en la liberación del ácido araquidónico, paso limitante en la formación de mediadores lipídicos de la inflamación. Así, la actividad de la fosfolipasa sobre la membrana puede, en principio, ser reducida por antioxidantes lipofílicos que inhiban la oxidación inducida por radicales libres.<sup>20</sup>

Por todo lo anterior, surge una nueva estrategia terapéutica con fármacos antioxidantes para desordenes inflamatorios como el reumatismo y el shock.<sup>20</sup>

---

---

### 1.2.3 Inflamación

El organismo responde frente a diversos estímulos que pueden causarle daño. Las respuestas pueden ser más de una pero el primer evento que ocurre frente a una lesión es una inflamación. Ésta se puede definir, de manera directa, como el agrandamiento de órganos, piel u otras estructuras corporales causado por la acumulación excesiva de líquidos en los tejidos. Dicha acumulación puede llevar a un aumento rápido de peso durante un período corto de tiempo (de días a semanas). Si la hinchazón es generalizada se presenta en todo el cuerpo y si está limitada a una parte específica se dice que es localizada.

Como antecedentes históricos, en Egipto en el año 3000 a.C se tenía referencias de este proceso. Celso, en el siglo I, describió 4 signos cardinales de la respuesta inflamatoria: rubor o enrojecimiento, calor local, dolor y tumor (el aumento de volumen o hinchazón que se observa). A estos, en el siglo II, Galeno añadió un quinto signo, la alteración funcional.

Fisiológicamente, la inflamación es una reacción local, especialmente del tejido conectivo y vascular, provocada por microorganismos o sustancias irritantes, cuyo fin es localizar y destruir dichos agentes patógenos, así como reparar los daños que éstos puedan producir.<sup>21</sup>

El primer fenómeno aparente en la zona inflamada es el calor y el enrojecimiento causados, respectivamente, por la vasodilatación de arteriolas y capilares. Dicha vasodilatación se produce por la liberación inmediata de prostaglandinas, histamina y serotonina. Esto provoca un aumento en la permeabilidad capilar que da origen a una exudación del plasma sanguíneo y proteínas que se acumulan en el foco inflamatorio en el que se forma leucotoxina que atrae, por quimiotáxis, leucocitos para que ejerzan su función fagocitaria sobre los agentes patógenos.

---

---

Al mismo tiempo, interviene el factor XII de la coagulación (factor Hageman), que se activa en contacto con superficies extrañas, producidas por lesiones celulares, provocando la transformación del fibrinógeno en fibrina. Ésta obstruye los pequeños vasos capilares y cierra los poros, provocando estasis sanguínea e impidiendo la reabsorción del edema. Dicho edema es la causa del tumor inflamatorio.

Durante el periodo de estado de la inflamación, se acentúan los fenómenos ya descritos, y existe una alteración funcional debido a las lesiones celulares y a la existencia del edema por la exudación plasmática. Además, hay dolor que se debe, en primer lugar, a la estimulación de las terminaciones nerviosas por las sustancias liberadas; en segundo lugar, al edema con compresión tisular.

#### **1.2.3.1 células y mediadores de la inflamación**

La respuesta inflamatoria se puede generar a partir de células (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, células cebadas, plaquetas y endotelios) y de proteínas circulantes (componentes del complemento, coagulación, fibrinólisis y vía de la cinina).<sup>22</sup>

Se puede hacer una distinción entre células inflamatorias circulantes de vida corta (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y las que preexisten en el tejido como no circulantes de vida larga (cebadas y macrófagos). Para neutrófilos y macrófagos la función primaria es la fagocitosis y para las células cebadas y los basófilos, es la secreción de mediadores de la inflamación.

Las células fagocíticas, al eliminar partículas y microorganismos que entran al organismo, actúan como una barrera protectora entre el ambiente y el receptor. Las células secretoras contienen mediadores inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular.

Los mediadores de la inflamación o proinflamatorios son las sustancias químicas endógenas que nacen de la activación de células inflamatorias y que actúan desencadenando o aumentando aspectos específicos de la inflamación.

---

---



---

---

Los mediadores de la inflamación de mayor importancia son las prostaglandinas, la histamina, la serotonina y las cininas.

La histamina, se forma en todos los tejidos por descarboxilación del aminoácido histidina y se acumula principalmente en los mastocitos tisulares y en los basófilos sanguíneos, en sus granulaciones; se libera por desgranulación en los estados inflamatorios, por lesión de dichas células. Esta sustancia se libera en las fases precoz y tardía de la inflamación, en que contribuye a la producción de los fenómenos de vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina se forma en el organismo a partir del aminoácido triptófano y se deposita especialmente en las plaquetas, de donde es liberado durante el proceso inflamatorio. Esta sustancia contribuye, en la inflamación, a la producción de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar, pero su papel no es muy importante y las drogas antiserotonínicas actúan muy poco como antiinflamatorios.

Dos principales cininas tienen importancia en los procesos inflamatorios: la bradicinina o calidina I, nonapéptido, y la calidina II, decapéptido que se forman a partir de una  $\alpha_2$ -globulina del plasma. La bradicinina y en menor grado la calidina, producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular siendo potentes en este sentido.

Las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados, de estructura especial derivada químicamente del ácido prostanóico con 20 átomos de carbono y que posee un anillo pentagonal. Las más importantes en la inflamación derivan del ácido araquidónico ( $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_2$ ) que se forman a partir de fosfolípidos de la membrana celular o plasmática mediante la enzima fosfolipasa  $A_2$ , que se encuentra en todos los tejidos. Producen vasodilatación intensa, aumento de la permeabilidad vascular actuando sinérgicamente con la histamina y bradicinina, y sensibilizan las terminaciones nerviosas del dolor aumentando, en forma considerable, el producido por la bradicinina y la histamina (hiperalgesia).

---

---

Aunque la inflamación es un proceso eficaz de protección contra microorganismos patógenos invasores, y recuperación de la infección, las células y mediadores químicos que participan en esta respuesta, si se activan de manera excesiva o inadecuada, también son capaces de lesionar tejidos e interferir con el funcionamiento de los órganos dentro del individuo.

### **1.2.3.2 tipos de inflamación**

La respuesta inflamatoria se caracteriza de acuerdo a la duración y la cinética de la reacción como aguda y crónica. La inflamación aguda se considera como un mecanismo rápido de defensa fisiológica y la crónica como un sistema organizado de recuperación.<sup>23</sup>

La inflamación aguda es la respuesta temprana en reacción frente a un estímulo, que se caracteriza por dos aspectos importantes: vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, y entrada de leucocitos, principalmente polimorfonucleares (PMN), al tejido.

Primero se produce vasoconstricción, que dura muy poco, posteriormente vasodilatación, y apertura de uniones endoteliales. Pasa al intersticio agua, fibrinógeno, inmunoglobulinas, y en una etapa que sigue, los polimorfonucleares. Este fibrinógeno polimeriza y forma fibrina. Este paso de proteínas aumenta la presión osmótica y la salida de agua, lo que clínicamente se traduce como edema. Los PMN se atraen y unen por moléculas de adhesión del endotelio y migran por los espacios intercelulares.

La inflamación crónica representa un proceso que caracteriza a numerosas enfermedades. En primer lugar la reacción inflamatoria crónica es usualmente productiva o proliferativa. Las células en el sitio proliferan y producen una matriz que aporta un soporte estructural (colágeno) y nutritivo (nuevos vasos sanguíneos) a la lesión. Muchos de estos cambios representan componentes del proceso de reparación.

---

---

En segundo lugar muchos de los estímulos incidentes no son dañinos para los tejidos del organismo (muchas de las reacciones inflamatorias crónicas se disparan más por la sensibilidad del huésped hacia el agente incidente que por la lesión tisular inducida por el agente en cuestión).

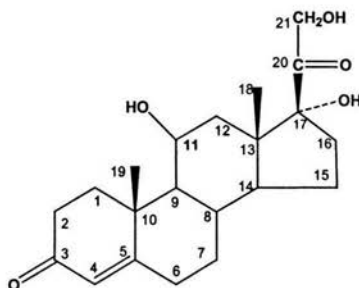
La inflamación crónica se caracteriza por la presencia de células mononucleares (monocitos y macrófagos). El macrófago puede activarse y producir células gigantes llamadas granulomas, los cuales, son más eficaces para matar microorganismos intracelulares, ya que son productores de secreciones extracelulares, particularmente de citocinas, y ciertas enzimas degradativas que poseen capacidad fagocítica mejorada y pueden reconocer y matar células tumorales más eficientemente.

### **1.2.3.3 medicamentos antiinflamatorios**

La inflamación es un proceso defensivo y protector, pero, como todo mecanismo de defensa, es “ciego al dispararse” y se puede transformar en un proceso perjudicial que es necesario frenar. Esto se logra con fármacos antiinflamatorios como los corticosteroides, los antiinflamatorios no esteroideos y los fármacos que suprimen las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

#### **1.2.3.2.1 corticosteroides**

Los corticosteroides son hormonas esteroideas de 21 carbonos, derivados del metabolismo del colesterol. La actividad de estos fármacos depende de la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 11 (Figura 9).



**Figura 9.** Hidrocortisona, estructura base de los corticosteroides.

Estos compuestos actúan al unirse a receptores de alta afinidad en el citoplasma (albúmina y globulina). El complejo de esteroide y receptor, a su vez, tiene alta afinidad para cromosomas de interfase nuclear y, por lo tanto, se une al ADN cromosómico. Esto desencadena la transcripción de ADN, con la información de ARN (ácido ribonucleico) mensajero, que provoca la síntesis de nuevas proteínas.

Las células expuestas a los glucocorticoides sintetizan y liberan una glucoproteína inhibidora de la FLA<sub>2</sub>, llamada ahora lipomodulina. La inhibición de esta enzima conduce a su vez a la reducción de la liberación de ácido araquidónico, disminuyendo la producción de los metabolitos de este ácido. De esta manera, las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides pueden estar relacionadas con la reducción de metabolitos del ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos.

Los glucocorticoides son los medicamentos más poderosos disponibles en la actualidad pero su uso se relaciona con toxicidad importante. El factor limitante para la aplicación de estos agentes son los efectos colaterales como el retraso en la cicatrización de heridas, incremento en el riesgo de la infección, hipertensión, entre otros.

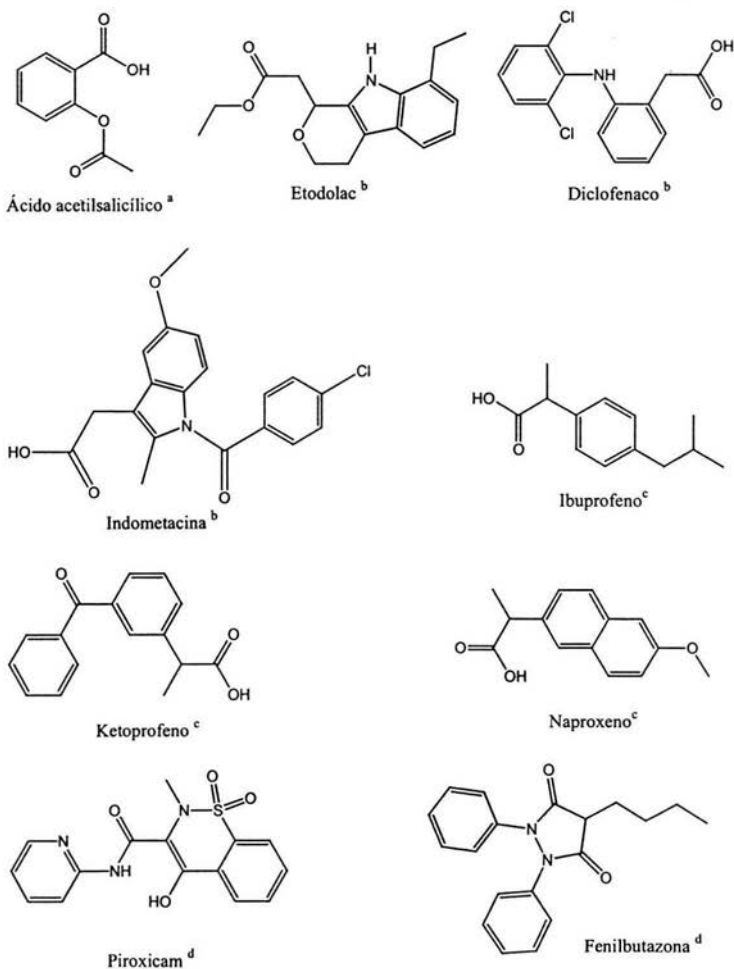
---

---

---

### 1.2.3.2.2 antiinflamatorios no esteroides

Los antiinflamatorios no esteroidales (AINE) previenen el dolor, inflamación, enrojecimiento y pérdida de función. Clínicamente se ha demostrado que estos fármacos son efectivos contra muchas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. A concentraciones terapéuticas inhiben la producción de prostaglandinas, uno de los mediadores hiperalgésicos más importantes liberado en los sitios de lesión tisular, al inhibir la ciclooxigenasa. Ejemplos de estos fármacos se presentan en la figura 10.<sup>24</sup>



**Fig 10.** AINE comunes: derivados del ácido salicílico<sup>a</sup>, acético<sup>b</sup>, propiónico<sup>c</sup> y enólico<sup>d</sup>.

---

---

---

Los efectos tóxicos de este tipo de fármacos se deben a que todos son ácidos orgánicos que pueden afectar directamente la mucosa gástrica; también pueden haber complicaciones renales y del sistema nervioso central.

#### **1.2.3.3.3 los que suprimen reacciones de hipersensibilidad inmediata**

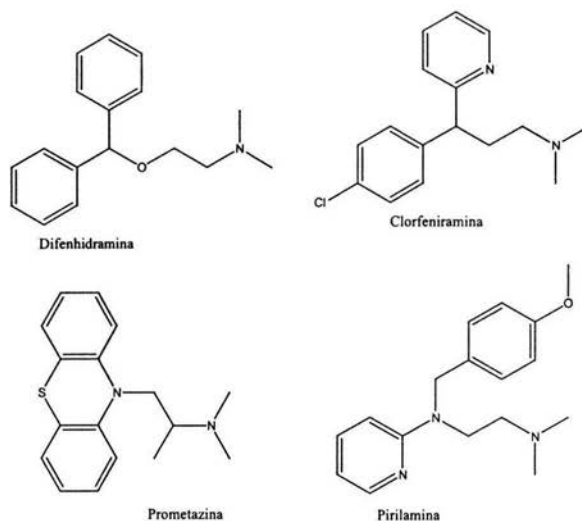
Entre los fármacos que suprimen las reacciones de hipersensibilidad inmediata se encuentran el cromolín sódico y los antihistamínicos.

El cromolín sódico inhibe la liberación de mediadores por las células cebadas, y bloquea la respuesta tisular y síntomas de la alergia mediada por IgE (inmunoglobulina E) ya que suprime la degranulación que normalmente es desencadenada por el entrecruzamiento, debido al antígeno de la IgE de membrana. Su toxicidad es baja y se relaciona principalmente con irritación del medicamento inhalado en forma de polvo.

En los antihistamínicos se distinguen dos clases: los denominados bloqueadores  $H_1$  y  $H_2$ , que corresponden a los dos tipos de receptores para histamina; pero el tipo  $H_1$  es el que posee notable actividad antiinflamatoria.

La principal función terapéutica es el tratamiento de enfermedades alérgicas que incluyen reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE. Los principales efectos colaterales son sedación, sequedad de mucosas y estreñimiento. Ejemplos de estos fármacos son (Figura 11):

- Alquilaminas (clorfeniramina y bromofeniramina)
- Etanolaminas (difenhidramina y dimenhidrato)
- Etilendiaminas
- Piperacinas (hidroxicina y meclizina)
- Fenotiacinas y Piperidinas
- Tricíclicos (amitriptilina e imipramina)



**Figura 11.** Algunos antihistamínicos antagonistas de receptores H<sub>1</sub>

### 1.2.4 Cáncer

La hipótesis de que los radicales libres pueden estar involucrados en carcinogénesis está basada en que muchos carcinógenos son radicales libres, son convertidos *in vivo* a estas especies, o son productos de reacciones biológicas de radicales libres. Además, muchos antioxidantes han mostrado inhibir la carcinogénesis en diversos modelos animales. Esta evidencia sugiere que los radicales libres juegan un papel importante en la iniciación de esta enfermedad.<sup>17</sup>

Una característica común de los promotores de tumor (grasas insaturadas, peróxido de hidrógeno, ésteres de forbol, fenobarbital y radiación) puede ser su habilidad para producir radicales de oxígeno, por lo que estos pueden ser importantes en el desarrollo y/o progresión del tumor. Los mecanismos que pueden estar involucrados en la promoción, son desconocidos.

---

---

Pero, ¿qué es el cáncer?. Este término se debe a Hipócrates, que fue el primero en comparar la propagación de los tumores malignos de la cara y de la mama a las patas de un cangrejo. La palabra cáncer procede del latín *cancrum*, que significa cangrejo.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la multiplicación incontrolada de ciertas células en el organismo. Las células cancerosas tienen tres propiedades características: disminución o ausencia del control de crecimiento; proliferación de los tejidos locales; y dispersión o metástasis a otras partes del cuerpo.

#### **1.2.4.1 tipos de cáncer**

Se distinguen habitualmente tres tipos de cánceres: los llamados sólidos, las leucemias y los hematomas.

En los cánceres sólidos, las células cancerosas se desarrollan en un órgano constituyendo un tumor que comprime, invade y destruye tejidos, incluso los que le rodean. En algunos casos las células cancerosas pueden pasar a sangre o a los vasos linfáticos para formar colonias de células cancerosas en otros órganos lejos del tumor de origen. Se habla entonces de metástasis.

En las leucemias, las células cancerosas no forman, al principio, un tumor localizado pero invaden uniformemente la sangre y todos los órganos hematopoyéticos (médula ósea, los ganglios linfáticos, etc.). Sin embargo, ocurre también que en las leucemias las células malignas pueden producir secundariamente tumores que comprimen e invaden otros órganos.



---

---

Una leucemia puede nacer a partir de cada una de las líneas celulares, pero las formas más frecuentes son las que nacen a partir de una de las variedades de glóbulos blancos. Una leucemia se llama linfóide cuando se desarrolla a partir de los linfocitos, y mieloide cuando se desarrolla a causa de los granulocitos. A estas leucemias se les llama agudas y son rápidamente mortales si no se las trata a tiempo. Las células son muy diferentes a las normales.

Las leucemias crónicas se caracterizan por su evolución más lenta. Las células que se acumulan en la médula ósea y en la sangre tienen generalmente un aspecto casi normal; solo su número es excesivo.

Los hematosarcomas representan una categoría intermedia. Al lado del sistema sanguíneo existe en el organismo otro sistema cuyo cometido es también el de alimentar y eliminar los desechos celulares el sistema linfático. El recorrido de los vasos linfáticos es interrumpido por los ganglios linfáticos y que actúan como filtros para impedir el paso de ciertas partículas o células voluminosas. Los ganglios pueden dar lugar a cánceres a partir de sus propias células; éstos son los hematosarcomas. Se desarrollan como tumores sólidos y pueden invadir los tejidos de alrededor. Pueden también complicarse a leucemias si infiltran la médula ósea.

Es imposible determinar como nace un cáncer siendo las causas múltiples y los tipos diferentes (según el órgano en que empiezan a desarrollarse) pero parece ser que la aparición se hace principal y esquemáticamente en dos estadios muy distintos. En un primer estadio, una célula normal se transforma en célula cancerosa mediante una mutación favorecida por productos químicos, virus, rayos electromagnéticos, etc.; y en un segundo estadio, ésta prolifera, si existen ciertos factores que la favorezcan, y produce un tumor.

---

---

#### **1.2.4.2 agentes que causan el cáncer**

Los rayos ultravioleta, los X y los gamma (considerados mutágenos y carcinógenos) lesionan el ADN de distintas maneras pero también provocan la formación de radicales libres en los tejidos. Los radicales resultantes: hidroxilo, superóxido y otros, pueden interactuar con el ADN y algunas otras macromoléculas provocando alteraciones moleculares que contribuyen, probablemente, a los efectos carcinógenos de la energía radiante.

Tanto las moléculas orgánicas como inorgánicas pueden ser carcinógenas, pero la diversidad de dichos compuestos indica que no poseen una característica estructural común que le confiera carcinogenicidad.

Los virus que causan el cáncer contienen ADN y ARN como genoma y entre ellos se pueden mencionar el Papovavirus, Adenovirus, Herpesvirus y Hepadnavirus; y Retrovirus tipo C y B, respectivamente.

#### **1.2.4.3 medicamentos contra el cáncer**

La cirugía, radioterapia y quimioterapia son las modalidades principales usadas para tratar pacientes con cáncer. El desarrollo de fármacos anticancerígenos se lleva a cabo de diferentes maneras; el problema consiste en preparar medicamentos (productos naturales o sintéticos) que destruyan células cancerosas en forma eficaz, pero no demasiado tóxicos para células normales. En la figura 12 se muestran las estructuras químicas de algunos agentes quimioterapéuticos presentados en la siguiente tabla.

---

---

**Tabla 3.** Algunos medicamentos usados en la quimioterapia del cáncer <sup>25</sup>

Clase de compuesto	Ejemplo	Para tratar
Agentes alquilantes	Melfalán	Mieloma
Antagonistas de purina	Mercaptopurina	Leucemia mielocítica aguda
Antagonistas de pirimidina	Fluorouracilo	Cáncer colorrectal
Antagonista de folato	Metotrexato	Coriocarcinoma
Antibióticos antitumorales	Doxorrubicina	Enfermedad de Hodgkin
Compuestos vegetales	Vinblastina	Sarcoma de Kaposi
Hormonas sexuales	Estrógenos	Cáncer de próstata
Corticosteroides	Prednisona	Mieloma

---

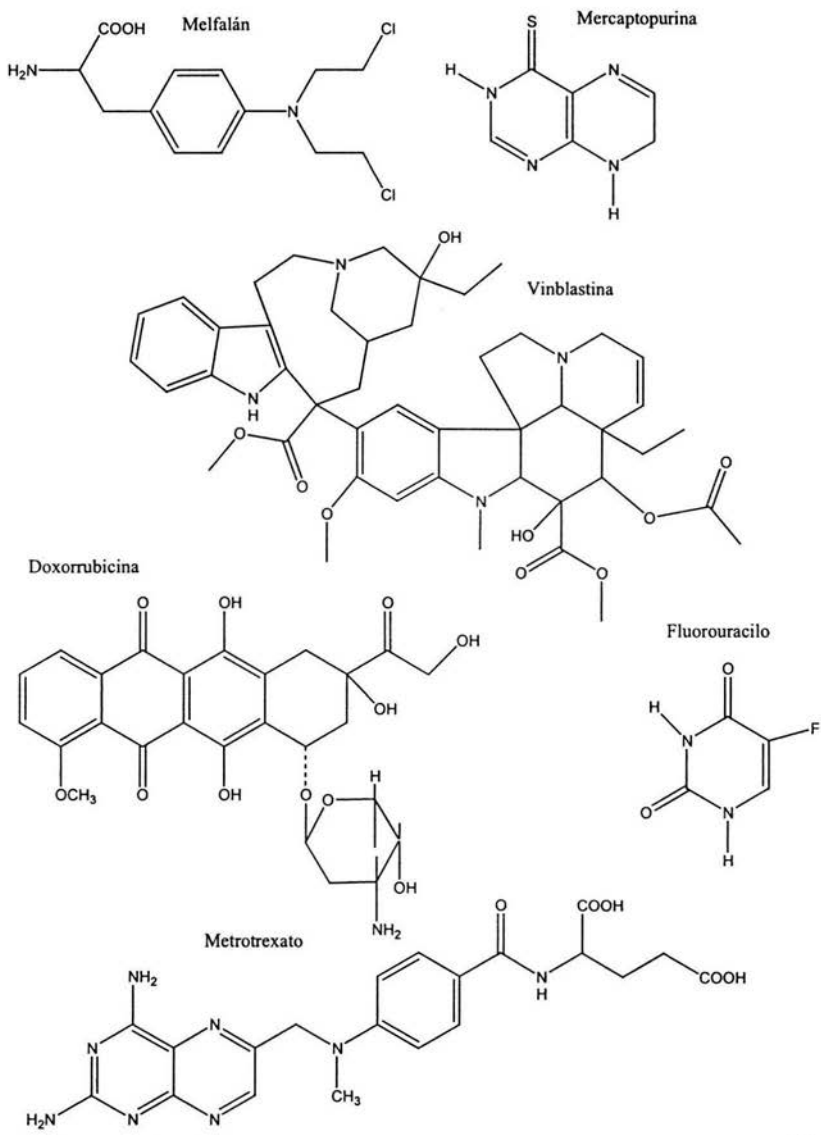
Dado que, la división celular descontrolada es una característica que tipifica a numerosos tumores malignos, muchos de estos fármacos se usan debido a que inhiben la síntesis del ADN. Por esta razón, también tienen probabilidad de lesionar tejidos normales cuyas células se dividen en forma continua.

Un problema mayor en la quimioterapia del cáncer es el desarrollo de resistencia a los fármacos usados. Aunque en un principio, los medicamentos son eficaces, después de un tiempo (por ejemplo, varios meses), las células tumorales desarrollan mecanismos que los vuelven ineficaces. Se cree que esto ocurre gracias a que estas células tienen una velocidad alta de mutación espontánea.

La tendencia actual es de estudiar y clasificar los cánceres en diversas variedades, según el órgano afectado y la severidad de la evolución. Esto permite encontrar el mejor tratamiento posible para cada variedad: evitar tratar demasiado las formas con muy buen pronóstico e, inversamente, tratar con más intensidad las formas malignas para mejorar las posibilidades del enfermo.<sup>26</sup>

---

---



**Figura 12.** Algunos medicamentos usados en la quimioterapia del cáncer <sup>27</sup>

---

---

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas se constituyen de dos anillos heterocíclicos fusionados; esto debe considerarse porque muchos compuestos bioquímicos (carbohidratos, aminoácidos esenciales y vitaminas) y fármacos de origen natural (alcaloides, antibióticos, glucósidos, etc. ), también presentan estructura heterocíclica y producen efectos considerables sobre la actividad fisiológica.

De hecho, son de interés considerable porque presentan diversas actividades biológicas asociadas con el enlace de sus anillos. Se ha encontrado que algunos análogos de estas piridopirimidinas actúan como agentes antitumorales inhibiendo reductasas de dihidrofolato o cinasas de tirosina; y otros, como antivirales.<sup>28</sup> También, Kajino y Meguro en 1990 informan otros derivados como antihipertensivos.<sup>29</sup>

Ahora bien, actualmente se sabe que la mayoría de los fármacos son sustancias producidas por síntesis química y que, para obtenerlos, muchas veces se requieren demasiados pasos y recursos económicos, así como condiciones drásticas de reacción. Por ello que se propone la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas en un sistema catalítico acuoso, bajo condiciones suaves de reacción, en un solo paso; y además evaluarlos biológicamente.

Las técnicas para evaluar la actividad antiviral o la antihipertensiva no están implementadas en el laboratorio de análisis por lo que no se llevan a cabo, pero sí se evalúa la actividad citotóxica, además de la antioxidante, por estar relacionadas entre sí.

También se realiza la prueba de actividad antiinflamatoria porque las pirido[2,3-*d*]pirimidinas, químicamente, tienen heteroátomos de nitrógeno y grupos carbonilo, como algunos antiinflamatorios no esteroideos, y tienen posibilidades de ser activos. Bagley las informa como antiinflamatorias.<sup>12</sup> Además, se conoce que las células inflamatorias activadas, generan y liberan EOR y radicales libres, que sumado a una abundante producción de factores quimiotácticos pueden ser importantes en la promoción de tumores de piel.<sup>30</sup> Esto relaciona la actividad antiinflamatoria con la citotóxica y con la antioxidante.

---

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

- Sintetizar y evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas con etilo, propilo y butilo

#### Objetivos Particulares

- ✓ Sintetizar, utilizando un sistema catalítico acuoso de níquel y condiciones suaves de reacción, 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas
- ✓ Evaluar si los compuestos obtenidos poseen actividad antioxidante mediante las pruebas de reducción del 1,1-difenil-2-picril-hidracilo e inhibición de la lipoperoxidación en cerebro de rata
- ✓ Evaluar la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con acetato del 12-*o*-tetradecanoilforbol en la oreja de ratón, y en la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos
- ✓ Evaluar la actividad citotóxica en cinco líneas celulares cancerosas

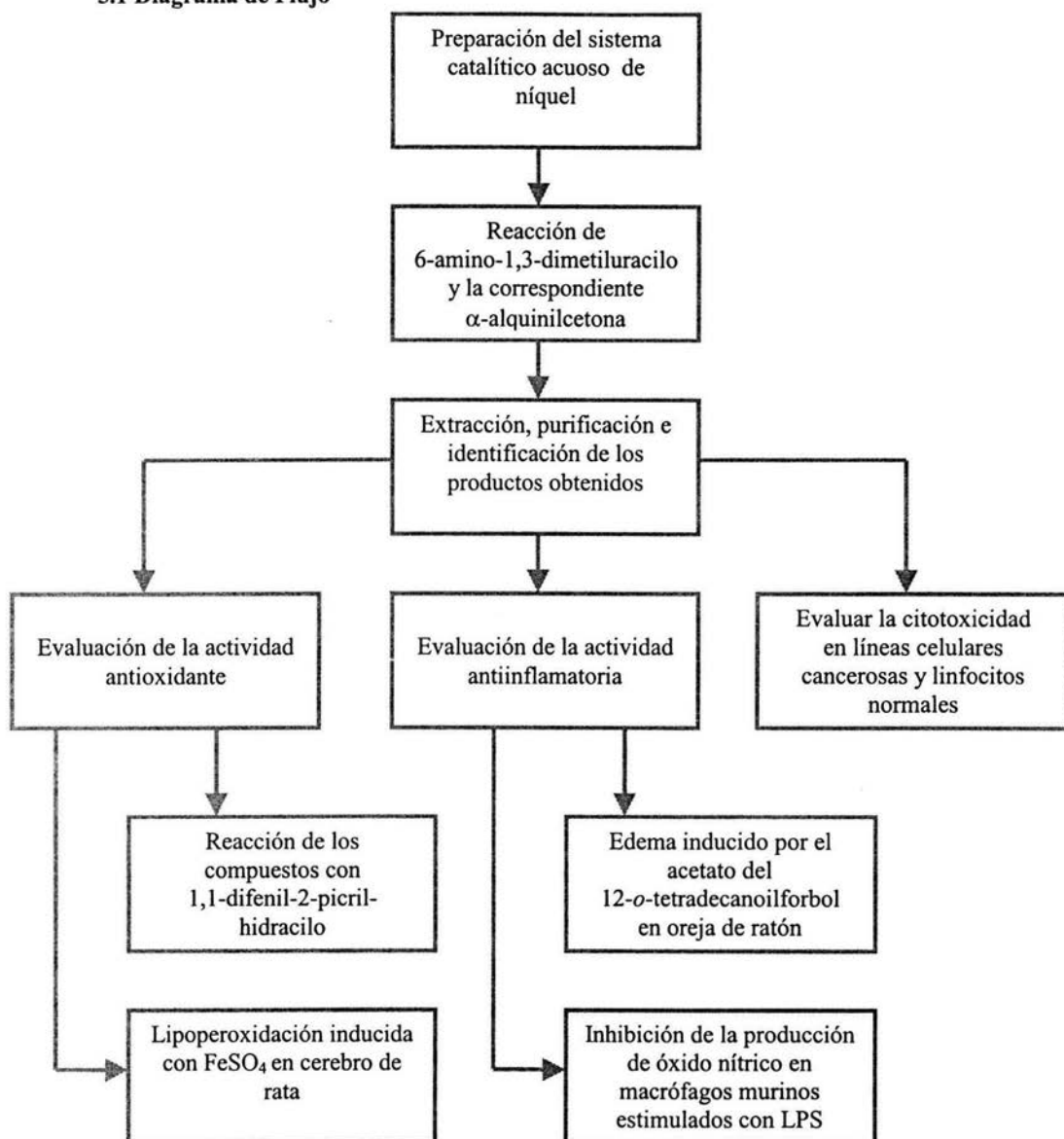
### 4. HIPÓTESIS

La reacción de 6-amino-1,3-dimetiluracilo y  $\alpha$ -alquinilcetonas, utilizando un sistema catalítico acuoso de complejos con níquel, da como resultado la síntesis, en un solo paso, de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas que pueden tener actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

---

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 Diagrama de Flujo



---

---

## 5.2 Síntesis de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas

A continuación se presenta la manera en que se obtuvieron los compuestos de interés y como se logró su identificación.

- Preparación del Sistema Catalítico<sup>13</sup>

Se burbujeó CO a 25ml de una solución de NaOH 5N a temperatura ambiente durante 30 minutos. A dicha solución se le agregaron 2 mmoles de Ni(CN)<sub>2</sub> manteniendo en agitación, bajo atmósfera de CO, por 20 horas. Después se adicionaron 15 mmoles de KCN manteniendo las mismas condiciones por 20 minutos más.

- Síntesis de las 2,4-dioxopirido[2,3-*d*]pirimidinas<sup>13</sup>

A la solución anterior se adicionaron 10 mmoles de 6-amino-1,3-dimetiluracilo y 10 mmoles de la correspondiente  $\alpha$ -alquilcetona y se siguió la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). Al final, se neutralizó la mezcla con HCl concentrado. El producto se recuperó de manera convencional empleando acetato de etilo (3 x 30 mL) y se purificó por cromatografía en columna eluyendo con una mezcla hexano:acetato de etilo (90:10). Los productos se identificaron con base a sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

- Identificación de los compuestos sintetizados

La identificación de las piridopirimidinas se lleva a cabo determinando su punto de fusión en un Fischer Johns; tomando el espectro de masas en un equipo Jeol JMS-AX505 HA mediante la técnica de impacto electrónico; y obteniendo los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en un equipo Jeol Eclipse LA300 a 300 MHz, empleando CDCl<sub>3</sub> (cloroformo deuterado). Los desplazamientos químicos  $\delta$  de las señales se dan en ppm y la multiplicidad se indica por las abreviaturas s, d, t, c, q, sex y m.



---

### 5.3 Evaluación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante la prueba de reducción del DPPH y la de inhibición de la lipoperoxidación inducida con sulfato de hierro.

- Reacción con DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidracilo)

La actividad antioxidante de los compuestos se determinó midiendo, la reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidracilo espectrofotométricamente.<sup>31-34</sup>

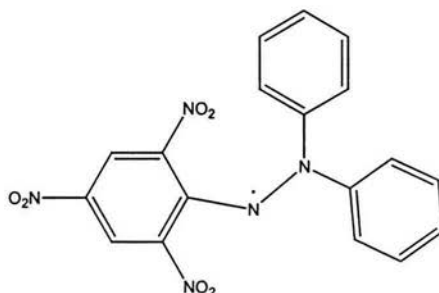
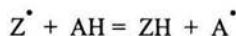


Figura 13. 1,1-difenil-2-picril-hidracilo

Se preparó una solución stock de los compuestos de prueba a una concentración de 20 mM y se realizaron diluciones de cada uno de los compuestos a 4, 40 y 400 mM. Se preparó el DPPH a una concentración de 133.33 mM en etanol. Se aplicaron por triplicado 50µL de cada una de las diluciones (1, 10 y 100 µM concentración final, respectivamente) en una microplaca de 96 pozos y posteriormente se adicionaron 150 µL de DPPH (100µM concentración final) a los pozos correspondientes, colocando blancos de DPPH y etanol. La placa se incubó a 37° C durante 30 minutos en la oscuridad y al final se determinó la densidad óptica en un lector de ELISA a 515 nm. Se utilizó α-tocoferol como control positivo.

La densidad óptica es inversamente proporcional a la reducción del DPPH y la actividad sobre el radical libre se expresa como porcentaje de reducción. La reacción característica es la siguiente:

---



donde  $Z^{\cdot}$  representa al DPPH y AH a la sustancia donadora de un átomo de hidrógeno.

- Lipoperoxidación en Cerebro de Rata <sup>35-37</sup>

Esta técnica fue usada para medir la actividad antioxidante de diversos compuestos. Se indujo, con  $FeSO_4$ , la formación de radicales libres que atacan los fosfolípidos de las membranas celulares, a nivel de ácidos grasos poliinsaturados, provocando la peroxidación lipídica y formación de productos secundarios como el pentanal, hexanal, 4-hidroxinonenal y malondialdehído (MDA), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB). En la práctica, SRATB es expresado en términos de equivalentes de MDA/mg de proteína.

Se anestesió y se sacrificó una rata de 250 g para extraerle el cerebro; éste se homogenizó y se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm para recuperar el sobrenadante del que se cuantificó la cantidad de proteínas por mililitro de homogenado, con base al método desarrollado por Scopes. <sup>38</sup> La solución se estandarizó a 2.5 mg de proteína/mL.

Para determinar la concentración de MDA generado por la lipoperoxidación inducida con  $FeSO_4$ , por triplicado se colocaron 400  $\mu$ L de sobrenadante ajustado en un tubo y se le agregó 50  $\mu$ L del compuesto a evaluar a 100 $\mu$ M y se incubaron a 37°C en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de  $FeSO_4$  100  $\mu$ M y se volvió a incubar durante una hora; inmediatamente se agregaron 700  $\mu$ L de reactivo ATB (ATB al 1% en NaOH 0.05 N y ácido tricloroacético al 30 % en proporción 1:1), se incubó a ebullición por 30 minutos, se enfrió y se centrifugó a 10 000 rpm; al sobrenadante se midió su absorbancia a 532 nm. Se empleó BHT como control positivo.

---

La densidad óptica es directamente proporcional a la cantidad de MDA inducido con el  $\text{FeSO}_4$ , e inversamente proporcional a la inhibición de la lipoperoxidación. La concentración de SRATB se calcula por interpolación en una curva estándar de MDA. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación.

En la siguiente figura se observa la formación del aducto entre el ATB y el MDA.<sup>39</sup>

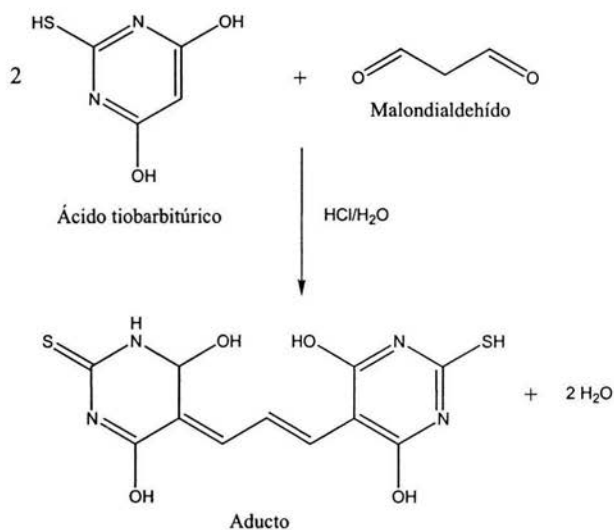


Figura 14. Formación del aducto que absorbe a 532 nm

#### 5.4 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

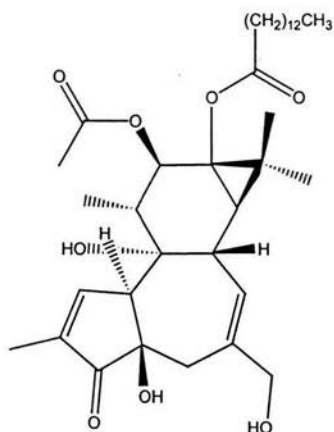
La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante la reducción del edema en oreja de ratón y la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos.

- 
- Edema en la oreja de ratón inducido por TPA <sup>40-42</sup>

El TPA (Figura 15) es un compuesto usado para inducir inflamación cutánea en animales de experimentación, ya que incrementa la producción de prostanoídes, y con esto, la permeabilidad vascular. Esta técnica es usada para evaluar si los compuestos sintetizados inhiben el edema provocado por dicha sustancia.

Se anestesiaron cinco ratones machos de la cepa CD1 (25-30 g) con pentobarbital sódico (3.5 mg/Kg, IP –intraperitoneal-) y se les aplicó 10  $\mu$ L de TPA en etanol (0.25 mg/mL) y 0.1, 0.31, 1.0 y 3.1  $\mu$ moles/oreja del compuesto prueba, disueltos en 20  $\mu$ L de etanol, en la oreja derecha. En la izquierda, sólo se les aplicó TPA (10  $\mu$ L) y el vehículo (20  $\mu$ L) en el cual se disuelve el compuesto. Cuatro horas después los animales se sacrificaron por dislocación cervical y con la ayuda de un horador, de 7 mm de diámetro, se tomó una muestra de ambas orejas.

El incremento del peso de la oreja derecha con respecto a la izquierda representa el edema. Se calculó el porcentaje de inhibición del edema.



**Figura 15.** Acetato del 12-*o*-tetradecanoilforbol

---

- 
- Producción de óxido nítrico en macrófagos activados con LPS<sup>43-45</sup>

Múltiples sustancias liberadas durante procesos inflamatorios, tales como IL-1, IL-6, FNT- $\alpha$  y el interferon  $\gamma$ , tienen la capacidad de aumentar la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) que se encuentra en los macrófagos, y por ende, elevar los niveles locales de óxido nítrico.<sup>46</sup>

Esta prueba se realizó en macrófagos murinos, de ratones hembras de la cepa tacon, activados con lipopolisacáridos de *Escherichia coli*. Se determinó la cantidad de nitritos, como indicador de la producción de óxido nítrico, mediante la adición del reactivo de Griess, sulfanilamida *N*-(1-naftil)etilendiamina, (formado con sulfanilamida al 1%, dihidrocloruro de naftiletilendiamina al 0.1 % y ácido fosfórico al 5%) al sobrenadante del cultivo celular, convirtiendo al nitrito en un grupo azo y formándose un cromóforo que absorbe a 515 nm. Se usó como sustancia control la aminoguanidina.

Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de nitritos que indica la capacidad, de los compuestos, de inhibir la producción de óxido nítrico.

La respiración celular, como indicador de viabilidad celular, se determinó mediante el método descrito por Mosmann<sup>47</sup>, adicionando MTT (bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) al remanente de células y midiendo la absorbancia del cromóforo, que se forma al reducirse el MTT, a 570 nm. Los datos se expresan en absorbancia y un decremento de ésta indica reducción en la viabilidad celular; los resultados se expresan como porcentaje de citotoxicidad.

---

## 5.5 Evaluación de la Actividad Citotóxica

Para determinar la actividad citotóxica, los productos se evaluaron en cinco líneas celulares cancerosas: próstata (PC-3), colon (HCT-15), mama (MCF-7), sistema nervioso central (U251) y leucemia (K562). La citotoxicidad se reporta como porcentaje de inhibición del crecimiento de las células y se determinó con las densidades ópticas de un complejo cromóforo que absorbe a 515 nm, formado por macromoléculas (proteínas aniónicas) de las células y un colorante aniónico llamado sulforodamina B (SRB) que se une electrostáticamente a ellas.<sup>48</sup> Se utiliza como compuesto control el 5-fluorouracilo, que entre las sustancias de referencia, utilizadas como citotóxicos, es de los que tienen poca actividad. Sin embargo es utilizado en quimioterapia contra el cáncer colorrectal.

Nota: Las pruebas de macrófagos y de actividad citotóxica no se describen específicamente porque se realizaron por personal especializado del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química.

---

---

## 5.6 Material y Equipo

### 5.6.1 Síntesis química

#### ✓ Vidrio y otros

- Anillo metálico
- Cámaras de elusión
- Campana de vacío
- Capilares
- Columna cromatográfica
- Cromatofolios con base de aluminio de sílica gel 60 F 254
- Embudo de separación (250 mL)
- Embudo de vidrio talla corto
- Embudo Hirsh de porcelana
- Espátulas de acero inoxidable
- Frascos viales de diferentes tamaños
- Matraz bola (50, 100 y 250 mL)
- Matraz bola con adaptación para entrada de nitrógeno (100 mL)
- Matraz erlenmeyer (25 mL)
- Matraz kitazato (50, 100 y 250 mL)
- Pipetas graduadas (1, 5 y 10 mL)
- Pipetas volumétricas (1 y 5 mL)
- Placa de toque de porcelana
- Probetas graduadas (50, 100, 250 y 500 mL)
- Soporte universal
- Tubos de vidrio para RMN
- Vasos de precipitados (30, 50, 100 y 250 mL)

#### ✓ Sustancias

- 6-amino-1,3-dimetiluracilo
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Cianuro de níquel  $[\text{Ni}(\text{CN})_2]$
- Cianuro de potasio (KCN)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Monóxido de carbono (CO)
- Sílica gel para CCF
- Sílica gel para columna
- Sulfato de sodio anhidro
- $\alpha$ -alquilcetonas

---

✓ Disolventes

- Acetato de etilo
- Acetona
- Etanol
- Hexano

✓ Equipo

- Balanza analítica (Sartorius BL 1205)
- Balanza granataria (OHAUS)
- Espectrómetro de masas (Jeol JMS-AX505 HA)
- Espectrómetro de RMN (Jeol Eclipse LA300)
- Estufa (WTB-BINDER GOES ONLINE)
- Fischer Johns (ESEVE)
- Lámpara UV 254/365 nm (Spectroline ENF-240C)
- Parrilla de agitación (Cimarec 2)
- Rotaevaporador (ESEVE D402-2)

### 5.6.2 Evaluaciones biológicas

✓ Vidrio y otros

- Algodón
- Baño de agua
- Celdas de cuarzo de 1cm
- Gradillas
- Guantes de látex
- Horador
- Jeringas de (1 y 2 mL)
- Microplacas de 96 pozos
- Micropuntas de diferentes capacidades
- Microtubos de 1.5 mL
- Pipetas de polipropileno (10 y 25 mL)
- Pipetas graduadas (10 mL)
- Reservorios de polipropileno
- Vasos de precipitados (30, 50 y 100 mL)



---

---

✓ Sustancias

- 1,1-difenil-2-picril-hidracilo
- Acetato del 12-*o*-tetradecanoilforbol
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido tiobarbitúrico
- Ácido tricloroacético
- Bifosfato ácido de potasio
- Bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
- Buffer de fosfatos
- Cloruro de potasio y cloruro de sodio
- Dextrosa
- Sulfato de hierro
- Sulfato de magnesio
- Tris [tris(hidroximetil)aminometano]

✓ Disolventes

- Acetona
- Dimetilsulfóxido
- Etanol
- Éter

✓ Equipo

- Agitador de placas
- Balanza analítica (Sartorius BP 61S)
- Balanza granataria (OHAUSE)
- Centrifuga clínica (Fisher Scientific Centrifug Model 228)
- Espectrómetro UV-VIS (Shimadzu UV 160U y Spectronic Genesis 5)
- Incubadora (Estufa de cultivo E-41)
- Lector ELISA (Elx808)
- Microcentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R)
- Micropipetas Eppendorf calibradas (20, 200, 1000 y 2500  $\mu$ L)
- Pipetas multicanal Eppendorf

Nota: Los disolventes utilizados en la síntesis fueron grado técnico y purificados por destilación fraccionada; los utilizados en la parte biológica fueron grado analítico, excepto el éter.

---

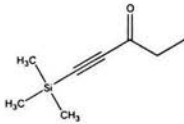
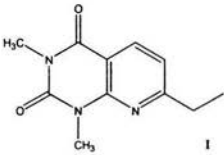
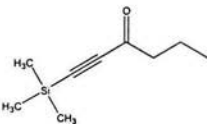
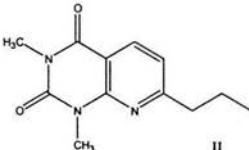
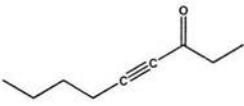
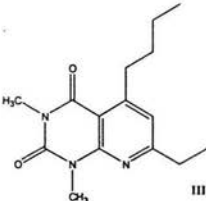
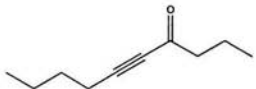
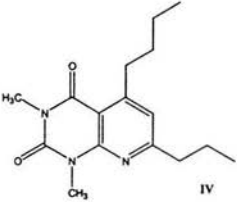
---

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Resultados de la Síntesis Química

Los compuestos obtenidos de la reacción de  $\alpha$ -alquinielconas con 6-amino-1,3-dimetiluracilo se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 4.** Productos de la reacción entre  $\alpha$ -alquinielconas y 6-amino-1,3-dimetiluracilo

$\alpha$ -alquinielconas y sus sustituyentes correspondientes	1,3-dimetilpirido[2,3- <i>d</i> ]- pirimidin- 2,4-dionas-5,7-disustituidas	Rendimiento
$R_1$ Me <sub>3</sub> Si	$R_2$ Etilo	
		73%
$R_1$ Me <sub>3</sub> Si	$R_2$ Propilo	
		70%
$R_1$ Butilo	$R_2$ Etilo	
		65%
$R_1$ Butilo	$R_2$ Propilo	
		58%

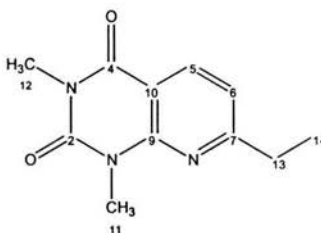
---

### 6.1.1 Características físicas, espectrométricas y espectroscópicas

La identificación de los productos obtenidos se realizó con base a la comparación de las propiedades físicas, espectrométricas y espectroscópicas con los informados previamente.

A continuación se presentan características físicas y espectroscópicas de los cuatro compuestos sintetizados.

#### 7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona (I)



Polvo blanco

$C_{11}H_{13}O_2N_3$

PM: 219 g/mol

pf: 66-67° C (etanol:hexano)

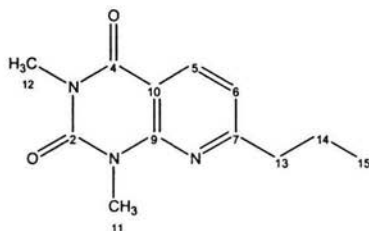
Rf : 0.326 (hexano : AcOEt, 90:10)

EM (IE,  $m/z$ ): 219( $M^+$ , 1), 205 (100). Ver espectro 1

---

---

**7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona (II)**



Agujas pequeñas ligeramente amarillas

$C_{12}H_{15}O_2N_3$

PM: 233 g/mol

pf: 86-87° C(etanol:hexano)

Rf : 0.334 (hexano : AcOEt, 90:10)

EM (IE, m/z): 233 ( $M^+$ , 14), 205 (100).Ver espectro 2

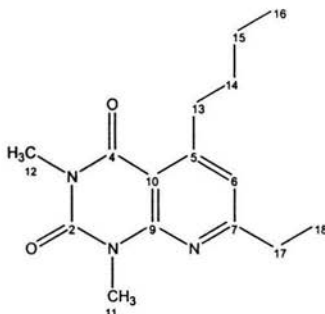
RMN  $^{13}C$ ,  $\delta$  (ppm): 168.4 ( $C_4$ ), 161.6 ( $C_2$ ), 151.0 ( $C_9$ ), 150.5 ( $C_{10}$ ), 137.5 ( $C_5$ ), 118.2 ( $C_6$ ), 108.2 ( $C_7$ ), 40.6 ( $C_{13}$ ), 29.3 ( $C_{11}$ ), 28.3 ( $C_{12}$ ), 22.3 ( $C_{14}$ ) y 13.8 ( $C_{15}$ ).Ver espectro 3

RMN  $^1H$ ,  $\delta$  (ppm): 8.26 y 6.96 ( 1H, *d*,  $H_5$  y  $6$  ), 3.65 y 3.40 ( 3H, *s*,  $H_{11}$  y  $12$  ), 2.74 ( 2H, *t*,  $H_{13}$ ), 1.72 (2H, *sex*,  $H_{14}$ ) y 0.91 (3H, *t*,  $H_{15}$ ). Ver espectro 4

---

---

**5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona (III)**



Polvo blanco

$C_{15}H_{21}O_2N_3$

PM: 275 g/mol

pf: 50° C(etanol:hexano)

Rf : 0.548 (hexano : AcOEt, 90:10)

EM (IE,  $m/z$ ): 275 ( $M^+$ , 31), 246 (100). Ver espectro 5

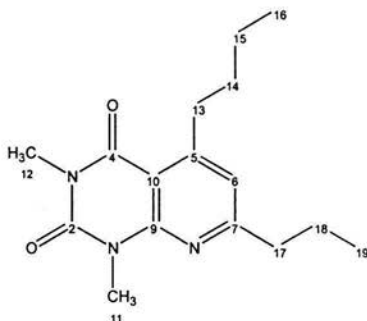
RMN  $^{13}C$ ,  $\delta$  (ppm):167.2 ( $C_4$ ), 161.7 ( $C_2$ ), 157.8 ( $C_9$ ), 151.7 ( $C_{10}$ ), 151.5 ( $C_5$ ), 119.9 ( $C_6$ ), 106.7 ( $C_7$ ), 34.5 ( $C_{13}$ ), 32.8 ( $C_{14}$ ), 31.4 ( $C_{17}$ ), 30.0 ( $C_{12}$ ), 28.3 ( $C_{11}$ ), 22.9 ( $C_{15}$ ), 14.1 ( $C_{18}$ ) y 13.0 ( $C_{16}$ ). Ver espectro 6

RMN  $^1H$ ,  $\delta$  (ppm): 6.80 ( 1H, *s*,  $H_6$  ), 3.68 ( 3H, *s*,  $H_{12}$  ), 3.42 ( 3H, *s*,  $H_{11}$  ), 3.17 ( 2H, *t*,  $H_{13}$  ), 2.77 ( 2H, *c*,  $H_{17}$  ), 1.57 ( 2H, *m*,  $H_{14}$  ), 1.43 ( 2H, *sex*,  $H_{15}$  ), 1.30 ( 3H, *t*,  $H_{18}$  ) y 0.93 ( 3H, *t*,  $H_{16}$  ). Ver espectro 7

---

---

**5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona (IV)**



Agujas blancas muy finas

$C_{16}H_{23}O_2N_3$

PM: 289 g/mol

pf: 62° C(etanol:hexano)

Rf : 0.583 (hexano : AcOEt, 90:10)

EM (IE,  $m/z$ ): 289 ( $M^+$ , 29), 260 (100). Ver espectro 8

RMN  $^{13}C$ ,  $\delta$  (ppm):164.7 ( $C_4$ ), 161.8 ( $C_2$ ), 156.2 ( $C_9$ ), 151.7 ( $C_{10}$ ), 150.2 ( $C_5$ ), 118.6 ( $C_6$ ), 108.2 ( $C_7$ ), 29.36 ( $C_{13}$ ), 28.41 ( $C_{12}$ ) y 25.22 ( $C_{18}$ ). Ver espectro 9

RMN  $^1H$ ,  $\delta$  (ppm): 6.77 ( 1H, *s*,  $H_6$  ), 3.69 ( 3H, *s*,  $H_{12}$  ), 3.42 ( 3H, *s*,  $H_{11}$  ), 3.15 ( 2H, *t*,  $H_{13}$  ), 2.69 ( 2H, *t*,  $H_{17}$  ), 1.73 ( 2H, *sex*,  $H_{18}$  ), 1.54 ( 2H, *m*,  $H_{14}$  ), 1.40 ( 2H, *sex*,  $H_{15}$  ) y 0.93 ( 3H, *c*,  $H_{16}$  y  $19$  ). Ver espectro 10

---

---

## 6.2 Resultados de Actividad Antioxidante

Se realizaron dos pruebas para determinar la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados; cada una se realizó por triplicado y en la tabla 5 se muestran los datos que representan el promedio.

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas de actividad antioxidante

Pirimidina	Pruebas de actividad antioxidante			
	% de Reducción del DPPH			Lipoperoxidación*
	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
I	5.98 $\pm$ 0.0033	1.38 $\pm$ 0.0041	1.69 $\pm$ 0.0006	9.07 $\pm$ 0.013
II	0.27 $\pm$ 0.0003	0.16 $\pm$ 0.0017	2.07 $\pm$ 0.0015	19.90 $\pm$ 0.327
III	0.16 $\pm$ 0.0018	-1.15 $\pm$ 0.0082	5.41 $\pm$ 0.0048	4.72 $\pm$ 0.049
IV	-3.28 $\pm$ 0.0019	-2.73 $\pm$ 0.0015	1.26 $\pm$ 0.0025	10.83 $\pm$ 0.210

\* Los datos indican el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación

Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar de la media (ES)

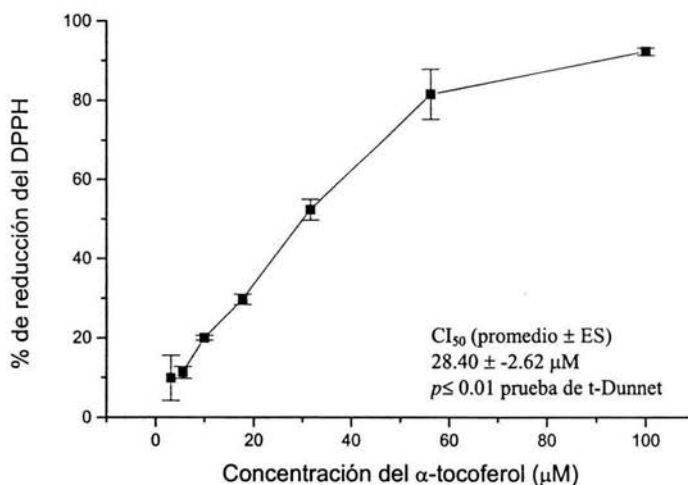
El  $\alpha$ -tocoferol es un antioxidante muy conocido, pero su actividad es más baja, en comparación con otros antioxidantes – como el NDGA- , por lo que en la prueba de DPPH se usó como referencia de actividad mínima para compararlo con las piridopirimidinas. (ver tabla 6 y figura 16)

**Tabla 6.** Reducción del DPPH por el  $\alpha$ -tocoferol (%)

Concentración ( $\mu$ M)	% de Reducción del DPPH $\alpha$ -tocoferol
3.16	9.931 $\pm$ 5.675
5.62	11.296 $\pm$ 1.492 $\blacktriangle$
10.00	20.008 $\pm$ 0.582 $\blacktriangle$
17.78	29.702 $\pm$ 1.343 $\blacktriangle$
31.62	52.317 $\pm$ 2.632 $\blacktriangle$
56.23	81.509 $\pm$ 6.293 $\blacktriangle$
100	92.234 $\pm$ 0.946 $\blacktriangle$

Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  ES.

$\blacktriangle$  Grupos significativos,  $p \leq 0.01$  comparado contra el grupo control mediante un análisis de ANDEVA seguida de una prueba de t-Dunnet



**Figura 16.** Reducción del DPPH por el  $\alpha$ -tocoferol

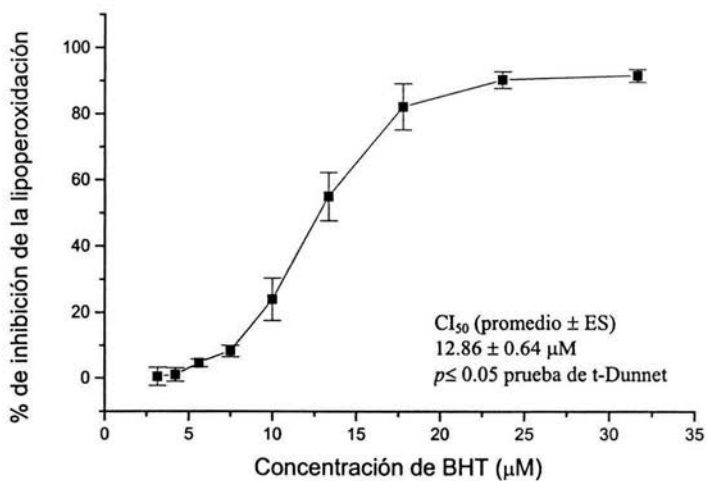
Para la prueba de lipoperoxidación se usó BHT como sustancia de control y en la tabla 7 se muestra una curva a diferentes concentraciones para determinar su concentración inhibitoria al 50% (CI<sub>50</sub>) (Figura 17) y compararla con la actividad que presentaron las piridopirimidinas.



**Tabla 7. Inhibición de la lipoperoxidación por BHT**

Concentración de BHT ( $\mu\text{M}$ )	% de Inhibición de la lipoperoxidación
3.16	0.45
4.22	0.98
5.62	$4.51 \pm 2.75$
7.50	$8.16 \pm 2.04$
10.0	$23.98 \pm 1.18$ $\blacktriangle$
13.34	$54.99 \pm 1.78$ $\blacktriangle$
17.78	$82.15 \pm 6.41$ $\blacktriangle$
23.71	$90.27 \pm 7.25$ $\blacktriangle$
31.62	$91.56 \pm 1.93$ $\blacktriangle$

Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  ES  
 $\blacktriangle$   $p \leq 0.05$  comparado contra el grupo control mediante un análisis de ANDEVA seguida de una prueba de t-Dunnet



**Figura 17. Inhibición de la lipoperoxidación por el BHT**

---

---

### 6.3 Resultados de Actividad Antiinflamatoria

En la tabla 8 se muestra el cernimiento al que se sometieron los compuestos sintetizados para determinar , a 1  $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ , que porcentaje de inhibición del edema presentaban y así decidir realizar una curva a diferentes concentraciones para determinar la  $\text{CI}_{50}$  .

**Tabla 8.** Inhibición del edema inducido por TPA

Pirimidina	Edema en mg (promedio)	% de Inhibición del edema ( $1\mu\text{mol}/\text{oreja}$ )
I	3.80	74.87
II	1.98	86.94
III	9.98	34.03
IV	14.45	21.57

Los datos representan el promedio;  $n=4$  ratones

▲ Los resultados se sometieron a un análisis de ANDEVA seguida de una prueba de t-Dunnet para determinar la diferencia significativa con respecto al control,  $p \leq 0.05$  . Todos son significativos

Según la tabla anterior, el II y el I resultaron tener una actividad considerable con un  $\mu\text{mol}$  de compuesto/ $\text{oreja}$ , por lo que se realizaron las curvas con diferentes cantidades por arriba y por debajo de un  $\mu\text{mol}$  para poder determinar la  $\text{CI}_{50}$  de cada producto. La tabla 9 y 10 muestra las curvas dosis-respuesta del compuesto II y del compuesto I, respectivamente.

**Tabla 9.** Inhibición (dosis-respuesta) del edema por el compuesto I

Concentración ( $\mu\text{moles}/\text{oreja}$ )	Edema en mg (promedio)	% de Inhibición del edema
0.10	11.60	14.23
0.31	12.83	5.18
1.00*	8.75	35.30
1.00	12.48	20.03
3.10	4.73	65.06 <sup>▲</sup>

Los datos representan el promedio de 4 ratones. Los resultados se sometieron a un análisis de ANDEVA seguida de una prueba de t-Dunnet para aislar los grupos significativos.

▲ Se considera como diferencia significativa con respecto al control,  $p \leq 0.05$

\* Se presentan dos valores de 1  $\mu\text{mol}/\text{oreja}$  porque se realizaron dos veces.

**Tabla 10.** Inhibición (dosis-respuesta) del edema por el compuesto II

Concentración ( $\mu$ moles/ oreja)	Edema en mg (promedio)	% de Inhibición del edema
0.18	11.38	13.83
0.32	6.63	49.81
0.56	7.58	42.61
1.00*	8.43	36.17
1.00	9.53	38.89*

Los datos representan el promedio de 4 ratones. Los resultados se sometieron a un análisis de ANDEVA seguida de una prueba de t-Dunnet para aislar los grupos significativos.

▲ Se consideran como diferencia significativa con respecto al control,  $p \leq 0.05$

\* Se presentan dos valores de 1  $\mu$ mol/ oreja porque se realizaron dos veces.

Para complementar la prueba de actividad antiinflamatoria, además del modelo del edema inducido con TPA, se evaluó la capacidad de los compuestos para inhibir la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos. Esto se observa en la tabla 11.

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de la producción de nitritos, y de crecimiento de macrófagos murinos

Pirimidina	[NO <sub>2</sub> ]	% Inhibición de NO <sub>2</sub> *	% Inhibición de crecimiento
I	36.88	54.49	< 10
II	34.52	50.33	< 10
III	19.78	95.63	93.83
IV	20.08	92.55	88.37

Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes

\* La concentración para la prueba en macrófagos murinos fue a 100  $\mu$ M

▲ El porcentaje de inhibición de la producción de nitritos está dado con base al máximo porcentaje de inhibición que produce la aminoguanidina (33.84 %  $\pm$  3.5,  $p < 0.05$ )

## 6.4 Resultados de Actividad Citotóxica

En la tabla 12 se muestra la actividad citotóxica, representada en porcentaje de inhibición del crecimiento, de los cuatros compuestos en estudio. Se utilizó como compuesto control el 5-fluorouracilo.

**Tabla 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento en cinco líneas celulares cancerosas y en células normales

Piridopirimidina a 50µM	Línea celular					
	U251 SNC	PC-3 Próstata	HCT-15 Colón	MCF-7 Mama	K562 Leucemia	Linfocitos Normales
I	14.24±0.5	23.97±0.4	1.89±0.6	9.42±3.9	24.40±2.3	-7.24
II	19.11±1.7	21.24±1.6	7.35±0.1	15.04±1.0	22.11±0.9	16.19
III	25.84±2.5	27.18±1.1	30.60±0.9	56.99±1.3	82.15±1.2	48.39
IV	48.46±2.0	30.56±3.2	25.36±1.2	39.34±0.5	85.97±0.5	62.28
5-fluorouracilo	40.61±2.1	28.62±2.5	68.70±1.8	62.58±6.4	63.96±3.0	ND

Los resultados indican el promedio de tres experimentos independientes ± ES; excepto en los linfocitos normales ya que los datos representan el promedio de tres repeticiones.

ND: no determinado

---

---

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

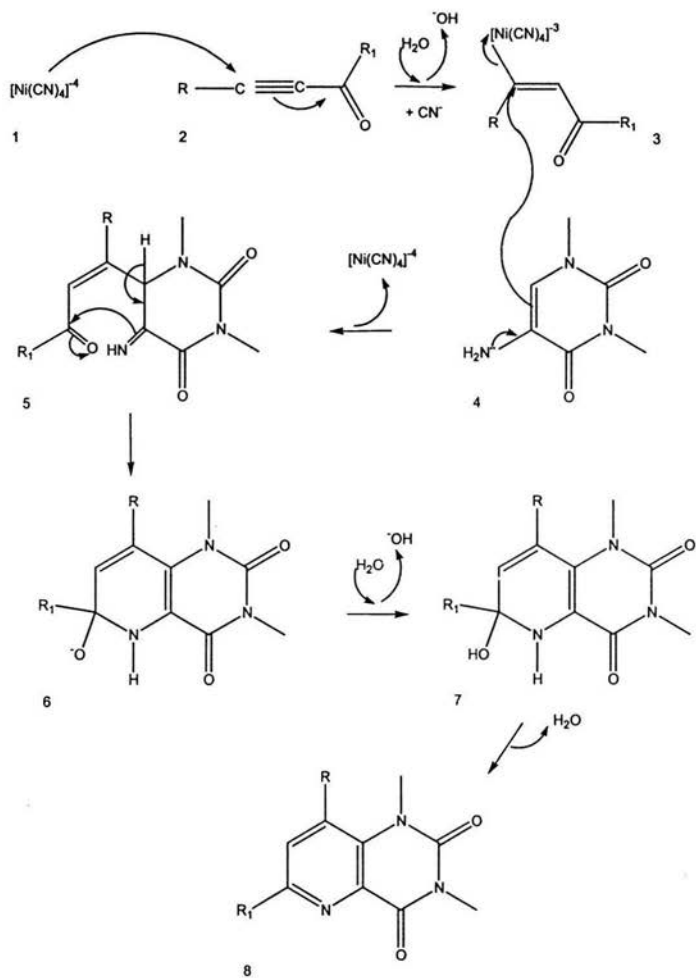
La utilización de un sistema acuoso, así como las condiciones suaves de reacción de presión atmosférica y temperatura ambiente, hizo más fácil la síntesis, extracción del medio de reacción y purificación de las 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-dionas.

Los resultados mostrados anteriormente dan a conocer que se obtuvieron dos piridopirimidinas sustituidas en la posición cinco y siete, cuando se utilizó una  $\alpha$ -alquinilcetona con sustituyentes alquilo.

Sin embargo, cuando se utilizaron  $\alpha$ -alquinilcetonas que tienen un sustituyente alquilo y un trimetilsilil, se obtuvieron dos piridopiriminas con solo un sustituyente en la posición siete ya que, se supone, el trimetilsilil se hidrolizó y no genera un sustituyente en la posición cinco.

El mecanismo que se propone para este tipo de síntesis comprende, en un primer paso, una adición de Michael de la especie aniónica de Ni<sup>0</sup> (1) sobre el triple enlace de la  $\alpha$ -alquinilcetona (2) que causa la activación del doble enlace conjugado que, a su vez, es atacado por el grupo enamina (4) por una secuencia de adición-eliminación, regenerando el catalizador y generando una cetoamina. Finalmente hay un ataque al carbonilo (6) del grupo animo de la enamina, seguido de una deshidratación y aromatización del anillo (8). (Figura 18)

Cabe señalar que los rendimientos obtenidos y el tiempo en que se sintetizaron los compuestos (veinte minutos), se deben al catalizador utilizado y a la perfecta disolución del 6-amino-1,3-dimetiluracilo antes de agregarle la correspondiente  $\alpha$ -alquinilcetona, ya que si no se lleva a cabo, no reacciona todo el reactivo y se reducen los rendimientos.



**Figura 18.** Mecanismo de reacción para la síntesis de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas

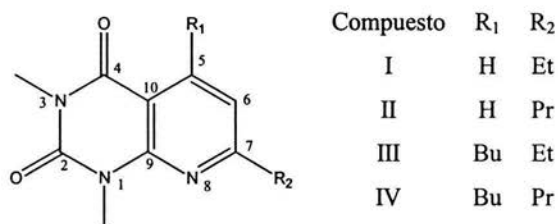
La pureza de los compuestos se verificó, de la manera más simple, por CCF en las que, para cada producto, aparece solo una mancha al revelar al UV a 254nm. Para identificar cada uno de los compuestos sintetizados primero se analizó el espectro de masas el cual indicó el peso molecular de cada uno de los productos mediante la asignación del ión molecular.

La identificación, con respecto a los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , se determinó fácilmente al detectar, en cada compuesto, dos señales simples en 3.6 y 3.4 que integran para tres protones, cada una, y que se asignan a los carbonos de grupo metilo unidos a los nitrógenos  $\text{N}_1$  y  $\text{N}_3$ . Además de una señal simple que es asignada al hidrógeno unido a  $\text{C}_6$  entre 6.7 y 6.8 ppm, para los compuestos 5,7-sustituídos; y una doble en 7.11 para los que solo tienen sustituyente en  $\text{C}_7$ .

Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  son muy parecidos entre sí por lo que hay señales características que se buscaron para poder identificar los compuestos. A campo bajo, entre 161 y 168 ppm aparecen señales que corresponden a los carbonos de grupos carbonilo que se encuentran en la posición dos y cuatro. Otras señales características son las que corresponden a los grupos metilo que están unidos a los nitrógenos  $\text{N}_1$  y  $\text{N}_3$  y que aparecen entre 28 y 30 ppm.

$\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$ , que son los que unen a los dos anillos, aparecen en campo bajo, después de los carbonilos, en 157 y 151 ppm, respectivamente. Otro carbono importante, que está afectado por los sustituyentes de  $\text{C}_5$  y  $\text{C}_7$ , es el  $\text{C}_6$  y aparece en 118 ppm. Los carbonos de los grupos alquilo aparecen desplazados a campos más altos.

Respecto a las pruebas de actividad biológica, se presenta la estructura base de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas con sus correspondientes sustituyentes para observar como cambia la actividad con el cambio de éstos. (Figura 19)



**Figura 19.** Estructura base de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y sus sustituyentes

---

Ninguno de los cuatro compuestos resultó tener actividad antioxidante considerable, de acuerdo a los compuestos que se utilizaron como control positivo.

En la prueba química de reducción del DPPH, se utilizó como referencia el  $\alpha$ -tocoferol que, según la curva dosis-respuesta, tiene una  $CI_{50}$  de 28.40  $\mu$ M. En los compuestos (I y II) que tienen un hidrógeno, en vez de otro sustituyente, en la posición cinco, es más activo el que tiene un grupo propilo en la posición siete, que el que tiene un etilo. En los compuestos III y IV, que tienen un sustituyente butilo en la posición cinco, resultó con mayor actividad el que tienen un grupo etilo en la posición siete; por lo que los compuestos II y III resultaron ser los más activos, aunque no más que el  $\alpha$ -tocoferol ya que éste a 100  $\mu$ M reduce al DPPH en un 92.23% y los compuestos, a la misma concentración, no lo reducen ni el 10%.

Esto revela que el tener un propilo o un etilo en la posición siete no va a aumentar o disminuir la actividad (como también los indican los compuestos I y IV) pero sí mejora cuando hay un sustituyente, como el butilo, en la posición cinco.

En lipoperoxidación, los compuestos que tienen un grupo propilo en la posición siete (II y IV) fueron los más activos, aunque no más que el BHT pues éste tiene una  $CI_{50}$  de 12.86  $\mu$ M y la actividad de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas fue menor al 20% a 100  $\mu$ M. Resulta interesante que los compuestos con cadenas alifáticas de más carbonos fueran los más activos; posiblemente esta característica les da cierto carácter lipofílico para interactuar con la membrana celular y tener un poco más de actividad en el medio biológico que en el químico.

Con estos resultados se comprueba que los compuestos pueden actuar de diferente manera en un medio químico y en uno biológico. Además, no se les puede considerar antioxidantes potenciales.

---



---

En la actividad antiinflamatoria, al realizar un cernimiento a un  $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ , resultaron ser más activos los compuestos I y II, que tienen un hidrógeno en la posición cinco. Los compuestos II y IV también tienen actividad pero menor al 35%.

Los compuestos con actividad mayor al 50% son los que poseen un grupo propilo o etilo en la posición siete pero que en la cinco carecen de un sustituyente, por lo que se procedió a realizar una curva dosis-respuesta para determinar su  $\text{CI}_{50}$ . El problema se dio cuando ya no se reprodujeron los resultados a la concentración en que se realizó el cernimiento (como se muestra en las tablas 10 y 11); la actividad disminuye más de la mitad por lo que no se pudo calcular la  $\text{CI}_{50}$  y, además, solo un dato fue significativo.

Es posible que esto ocurrió por una descomposición de los compuestos, pues las curvas se hicieron tiempo después del cernimiento; sin embargo, no se hicieron experimentos adicionales para comprobarlo.

En la prueba de inhibición de la producción de óxido nítrico, III y IV inhiben en más del 90% la producción de nitritos pero inhiben el crecimiento de la células en un 93.83 % y en 88.37 %, respectivamente, por lo que no se puede decir que inhiben la producción NO ya que matan a las células y es por ello que disminuye la cantidad de NO, pues no hay suficientes células que lo produzcan.

Sin embargo, I y II, aunque inhiben la producción del NO en un 50%, sí permiten el crecimiento de las células por lo que se dice que son compuestos activos directamente en la inhibición, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Esto indica que la actividad puede estar relacionada a una acción en la ONSi. Pero también a la síntesis de prostaglandinas por su actividad en la inhibición del edema por TPA. <sup>49</sup>

Se deja para estudios posteriores, realizar las curvas dosis-respuesta a concentraciones por arriba y por debajo de 100  $\mu\text{M}$  para determinar la  $\text{CI}_{50}$ ; aunque hay que considerarlo ya que a mayor concentración los compuestos pueden ser más citotóxicos.

---

---

En las pruebas de citotoxicidad, los cuatro compuestos resultaron citotóxicos para las células cancerosas. Los compuestos I y II reflejaron ser poco citotóxicos para todas las líneas celulares, en comparación con el 5-fluorouracilo; pero aunque no alcanzaron ni el 50% de inhibición del crecimiento, el I no afectó a los linfocitos normales permitiendo su crecimiento en un 7%.

Los compuestos III y IV resultaron más citotóxicos en todas la líneas celulares, incluso, en la línea K562 fueron más citotóxicos que el 5-fluorouracilo, aunque no de una manera selectiva ya que también fueron tóxicos para las células normales. Esto indica, si observamos la figura 19, que al tener sustituida la posición cinco y siete, en especial la primera con un grupo butilo, la actividad aumenta considerablemente que al tener solo sustituida la siete. Esto es, la citotoxicidad disminuye cuando en la posición cinco se cambia un butilo por un hidrógeno.

En general, todos compuestos resultaron ser menos activos que el 5-fluorouracilo, excepto el III y el IV en la línea de células de leucemia.

A todo lo anterior, los compuestos I y II reflejaron ser los más interesantes por no ser tan citotóxicos, tener cierta actividad antioxidante y, además, poseer actividad antiinflamatoria, vía inhibición de citocinas, (que son activadas en la respuesta inflamatoria e inducen la producción de NO)

---

## 8. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de dos 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-5,7-disustituídas y dos 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas-7-sustituídas que presentaron actividad biológica interesante.

La 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona y la 7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona resultaron tener actividad antiinflamatoria, según la prueba con TPA y la de inhibición del óxido nítrico. Además, la segunda, resultó ser citotóxica para células cancerosas, pero no para las células normales lo que puede dar indicios de una molécula importante para desarrollar, en un futuro, otras moléculas con posibilidad de transformarse en fármacos.

La 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona tiene actividad antioxidante e inflamatoria ligera, al igual que la 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona; sin embargo, pueden ser modificadas sus estructuras químicas para mejorar y/o elevar dicha actividad. Además, tienen actividad importante en células leucémicas.

Aunque no fue a muy buenas concentraciones, las cuatro pirido[2,3-*d*]pirimidinas tuvieron actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez Ruiz JF. La farmacia en mesoamérica. De la etapa nómada a las culturas preclásicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1994; 24(5): 21-24
2. Gennaro AK. *Remington Farmacia*. 19 ed; Buenos Aires: Médica Panamericana; 1998: tomo I: 530-537
- 3.- Flores García I. Síntesis de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas sustituidas empleando un sistema catalítico acuoso. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003: 3-4
4. Castellan GW. *Fisicoquímica*. 2da ed. México: Addison-Wesley Iberoamericana, 1990: 877-878
5. Steinfeld JI, Francisco JS, Hase WL. *Chemical kinetics and dynamics*. 2da ed. USA: Prentice Hall, 1999:148,163
6. Novaro O. *Catálisis y petroquímica*. México: El Colegio Nacional, 1997: 4-5
7. Anderson GL. Regioselective synthesis of pyrido[2,3-*d*]-pyrimidines. *J Heterocyclic Chem* 1985; 22:1469
8. Capuano L, Welter M, Zander R. Synthese von thieno-, tetrahydrobenzothieno-, pyrazolo-, triazolo- und pyrido-pyrimidinen sowie naphth- und thien-oxazinen. *Chem Ber* 1969; 102: 3698
- 9.- Fox H. Synthetic tuberculostats. II. Amino and hidroxy-pyridine carboxylic acid derivatives. *J Org Chem* 1952; 17: 547-554
10. Khattab F, Kappe T. Pyrido[2,3-*d*]-pyrimidines, 11 [1]. One step synthesis of pyrido[2,3-*d*]-pyrimidines and pyrido[4,5-*b*]quinolines from 6-aminouracils. *Monatshefte Fur Chemie* 1996; 127: 917
11. Pfleiderer M, Pfleiderer W. Ptrimides, XXXII: Synthesis and properties of pyrido[2,3-*d*]-pyrimidin-2,4-diones (5-deazalumazines). *Heterocycles* 1992; 33: 905
- 12.- Bagley MC, Hughes DD, Loyd R, Powers VEC. A new and highly expedient synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Tetrahedron Letters* 2001; 42: 6585-6588
13. Rosas N, Sharma P, Álvarez C, Cabrera A, Ramírez R, Delgado A, Arzoumanian H. Novel and facile catalytic synthesis of 2,4-dioxypyrido[2,3-*d*]-pyrimidine derivatives in water. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 2001: 2341

- 
14. Rosas N, Cabrera A, Sharma P, Arias JL, García JL, Arzoumanian H. Catalytic hydrocyanation of  $\alpha$ -ketoalkynes by Ni(CN)<sub>2</sub>/CO/KCN system in alkaline aqueous media: identification of the active species. *J Mol Catal A: Chem* 2000;156:103-112
  15. Martínez L, Bello JL. Esquema integral de evaluación preclínica de un nuevo medicamento antitumoral. *Rev Cubana Oncol* 1995; 11:164-169
  16. Pryor WA. *Introducción a la química de los radicales libres*. España: Alambra, 1975: 1-18, 65-70
  17. Mayne ST. Antioxidant nutrients and cancer incidence and mortality: an epidemiologic perspective. In: *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. USA: Academic Press, Inc, 1997: vol 38: 657-675
  18. Halliwell B. Antioxidants: The basics- what they are and how to evaluate them. In: *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. USA: Academic Press, Inc, 1997: vol 38: 3-20
  19. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuck I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43:200-227
  20. Allison A. C. Antioxidant drug targeting. In: *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. USA: Academic Press, Inc, 1997: vol 38: 273-290
  21. Litter M. *Farmacología experimental y clínica*. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo, 1988: 1303-1309
  22. Stites DP, Terr AI. *Inmunología básica y clínica*. México DF: Manual Moderno, 1993: 145-176
  23. Winyard PG, Blake DR, Evans CH, editores. *Free radicals and inflammation*. Alemania: Birkhäuser Verlag, 2000: 1-20
  24. Smith CM, Reynard AM. *Farmacología*. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1993: 393-413
  25. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, Mayes PA. *Bioquímica de Harper*. 13 ed. México: Manual Moderno, 1994: 851-873
  26. Khoury S, Jazmín C, García-Conde J. *Cáncer. Los grandes especialistas responden*. España: Aguilar, 1981: 23-53
  27. Goodman Gilman A. Editor. *Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. México: McGraw-Hill, 1996: 1302-1343
-

- 
- 
28. Mont N, Teixidó J, Borrell JI, Kappe CO. A three-component synthesis of pyrido[2,3-*d*]-pyrimidines. *Tetrahedron Letters* 2003; 44: 5385
- 29.- Kajino M, Meguro K. The Hantzsch synthesis with 6-aminouracils: one step synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Heterocycles* 1990;31:2153-2161
30. Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayashi S, Torikai K, Hayashi R, Sato T, et al. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Rad Biol & Med* 2003; 35 (9):997.
31. Cotelle N, et al. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Rad Biol & Med* 1996; 20: 35
32. Gámez E. et al. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *J Nat Prod* 1998; 61: 706
33. Cavin A, et al. Antioxidant and liophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica* 1998; 64: 393
34. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol* 2004; 26:211-219
35. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351
36. Rossato JI, Ketzer LA, Centuriano FB, Silva SJ, Lüdtké DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA, Rocha BT. Antioxidant properties of new chalcogenides agents lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 2002; 37: 355
37. Lefevie g, et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin* 1998; 56 (3):305
38. Peterson GL. Determination of total protein. En: *Methods in enzymology*. USA: Academic Press, Inc, 1983: vol 91:105
39. Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem* 1997; 59:345-353
40. Puigneró v, Turull A, Queralt J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. *Inflammation* 1998; 22 (3): 307
- 
-

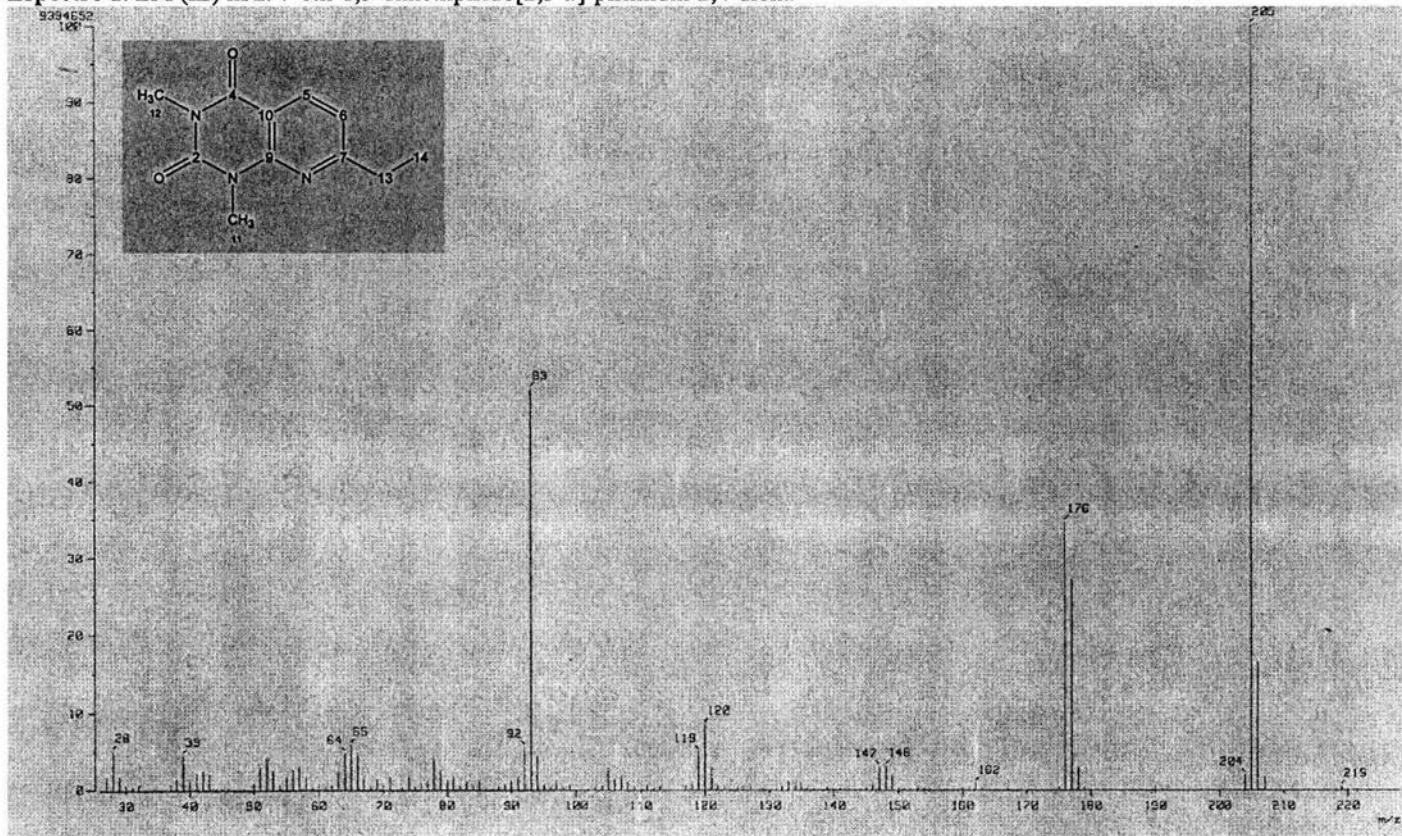
- 
- 
41. Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson P. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) –and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation* 1993; 10:723
42. Payá M, Ferrándiz ML, Erradi F, Terencio MC, Kijjoa A, Pinto M, alcaraz MJ. Inhibition of inflammation responses by a series of novel dalabrane derivates. *Eur J Pharmacol* 1996; 312: 97
43. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. [<sup>15</sup>N] Nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131
44. Miles A, Wink D, Cook J, Grisham M. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. En: *Methods in Enzymology*. USA: Academic Press, Inc, 1996: vol 268
45. Schulz K, Kerber SS, Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO<sub>2</sub> in aqueous and protein-containing samples. *Nitric oxide. Biology and Chemistry* 1999; 3 (3): 225
- 46.- Nakamura A, Fujita M, Shiomi H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin induced peripheral hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 407
47. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55
48. Monks A, Scudiero D, Skehan P, shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Cancer Inst* 1991; 83 (11):757
49. Arciniegas A, Ramírez MT, Pérez-Castorena AL, Romo A. Anti-inflammatory constituents of *Mortonia greggii* gray. *Z Naturforsch* 2004; 54c:237-243
- 
-

---

# ESPECTROS



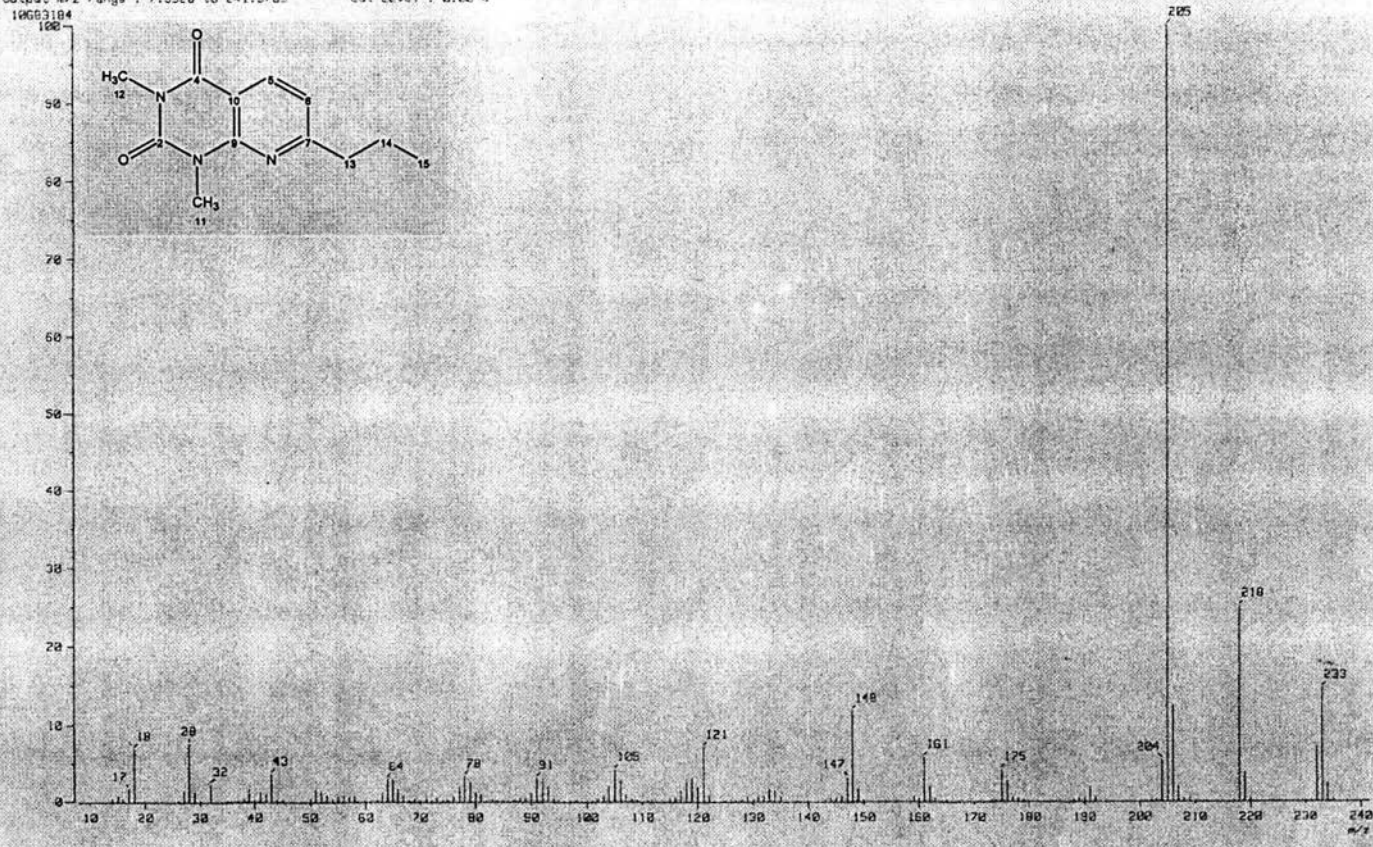
**Espectro 1. EM (IE) m/z: 7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona**



# Espectro 2. EM (IE) m/z: 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-d]-pirimidin-2,4-diona

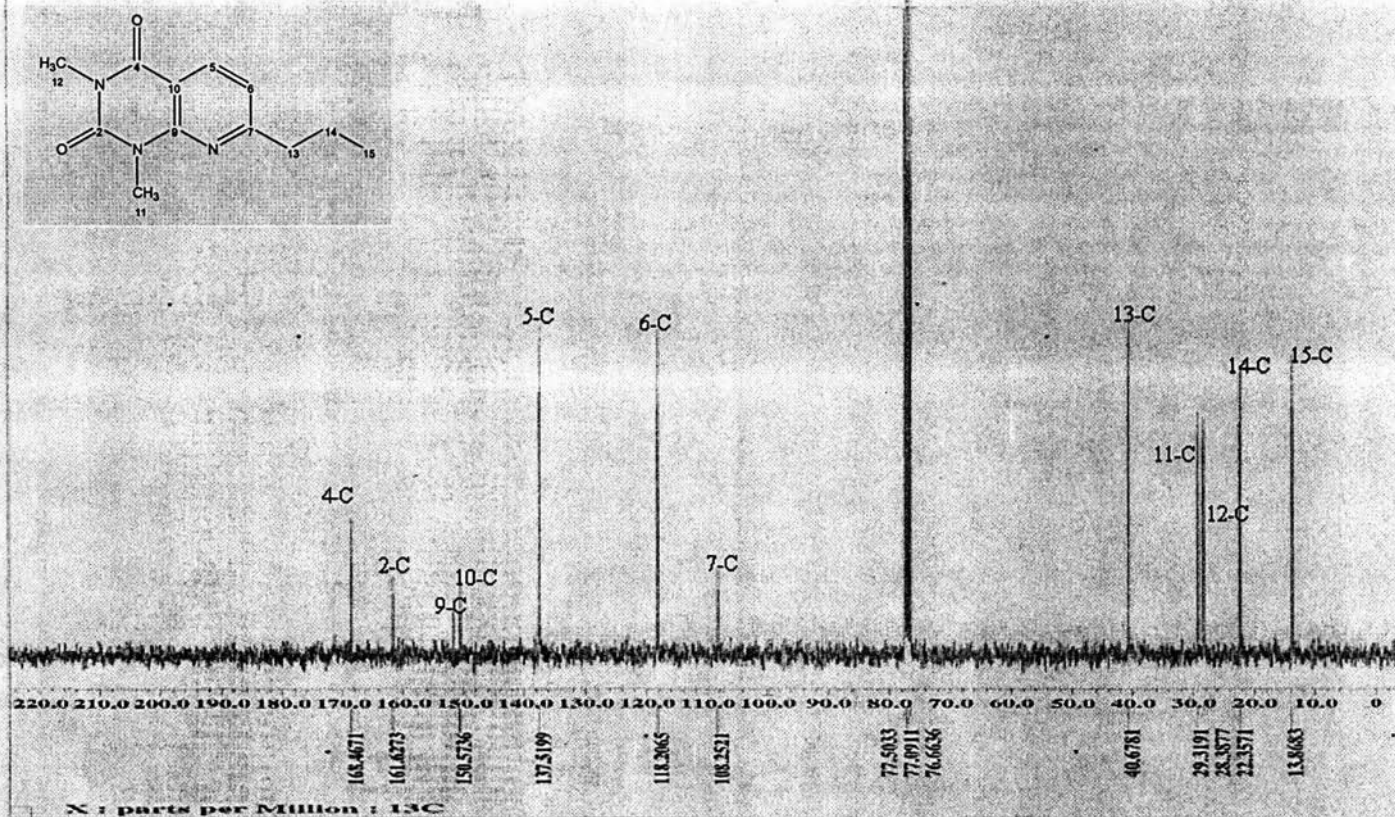
Output m/z range : 7.9528 to 241.5765

Cut Level : 0.00 %

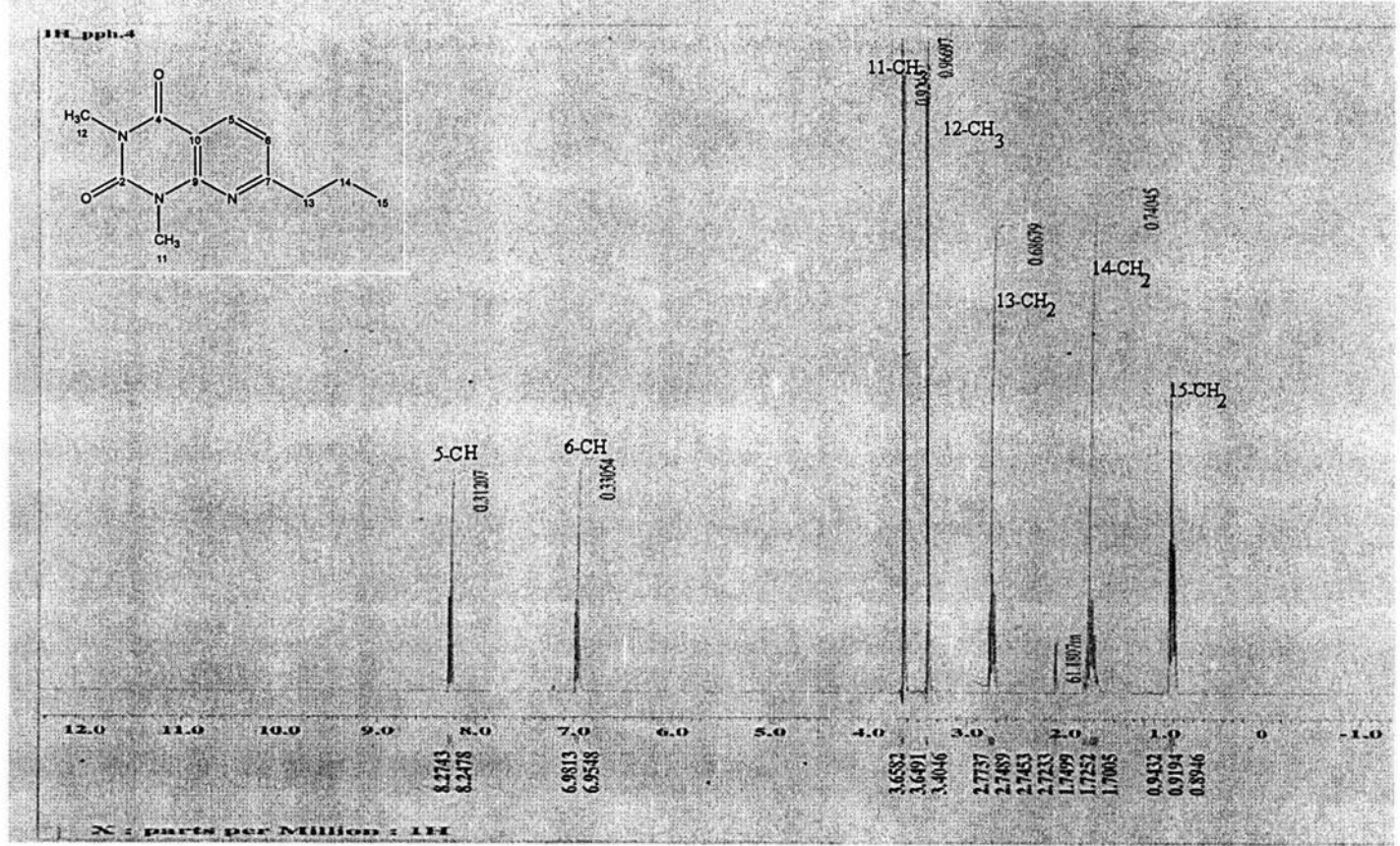


Espectro 3. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

13C\_pph.2

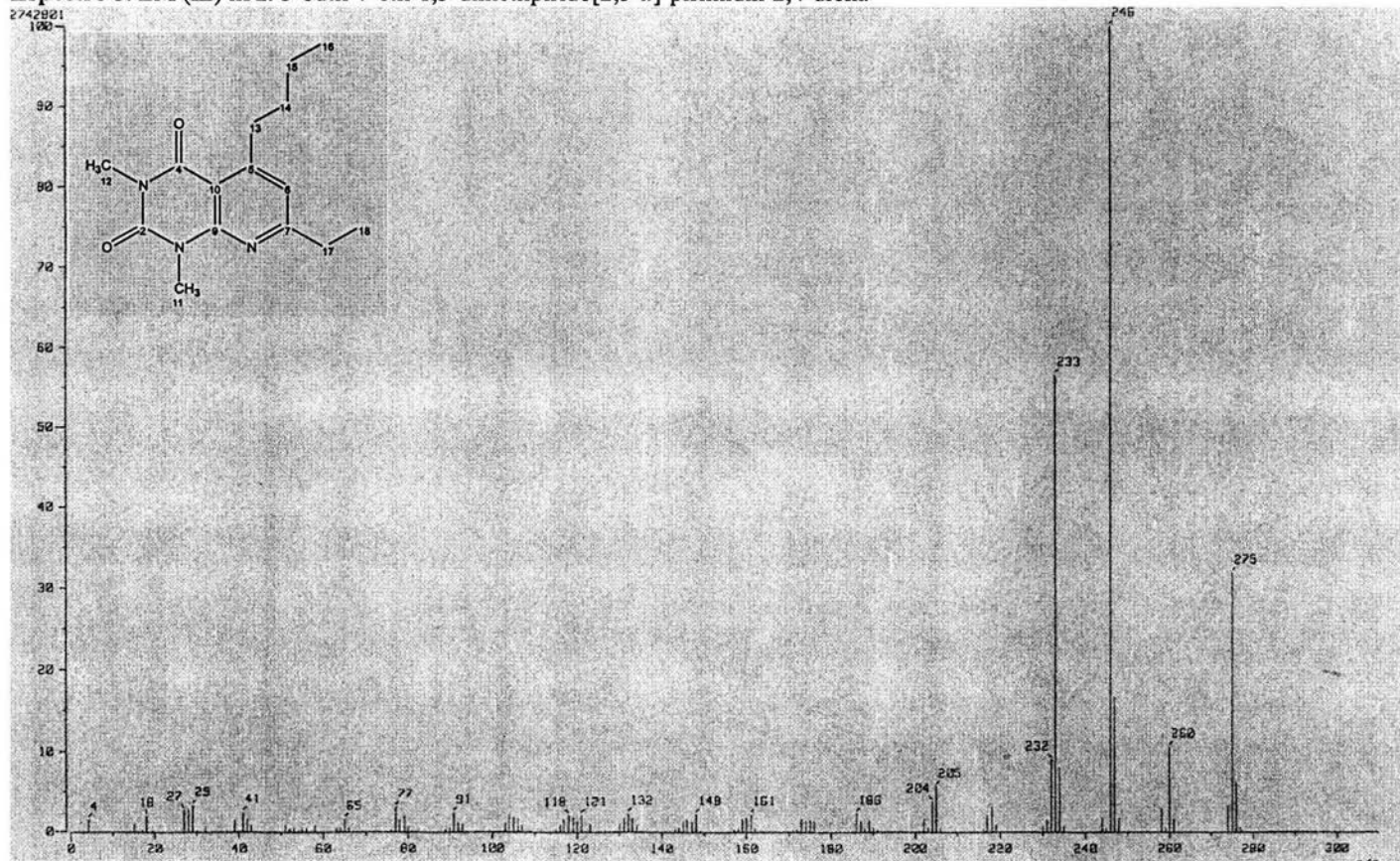


**Espectro 4.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, TMS): 7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona

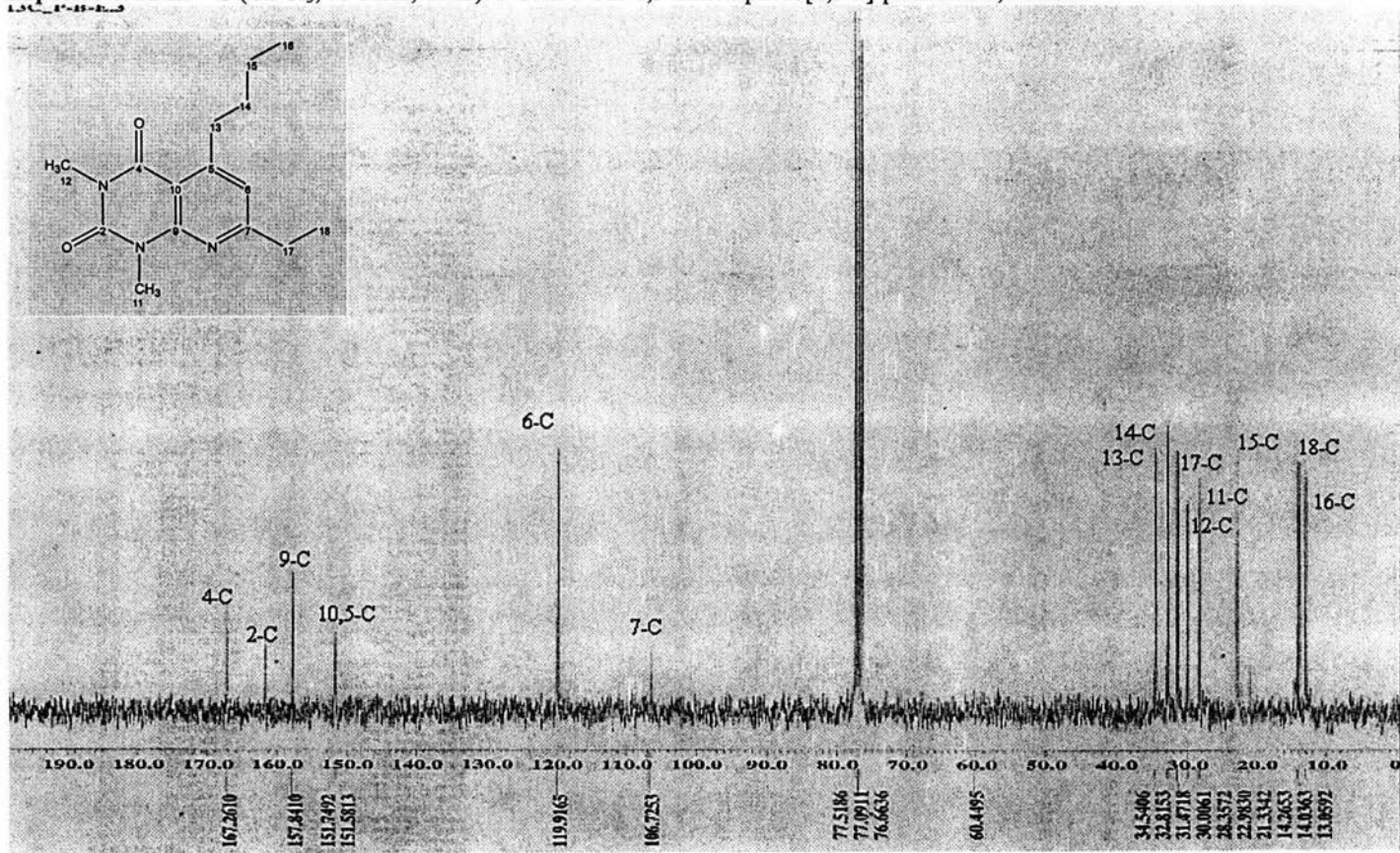




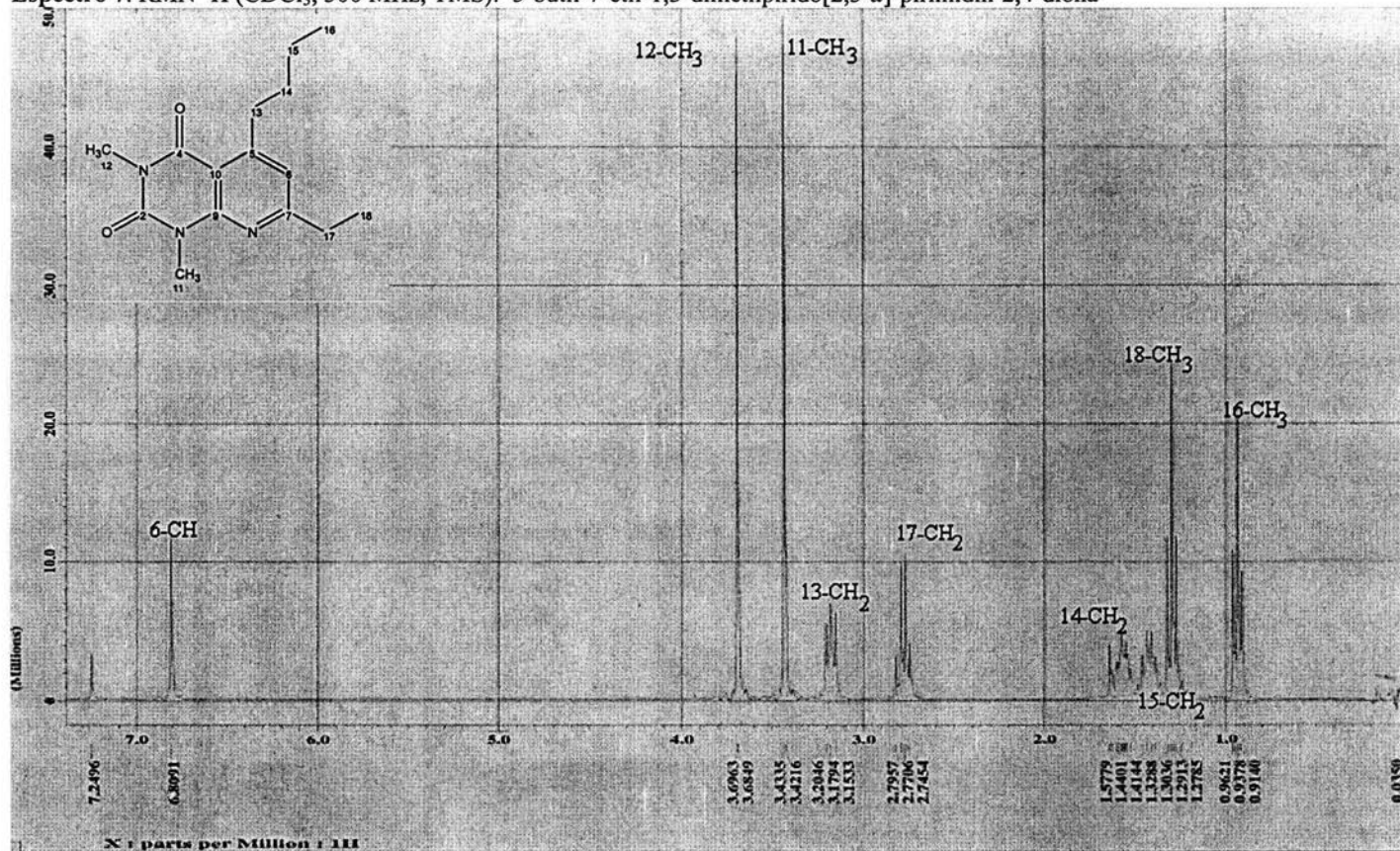
**Espectro 5. EM (IE) m/z: 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-d]-pirimidin-2,4-diona**



Espectro 6. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona



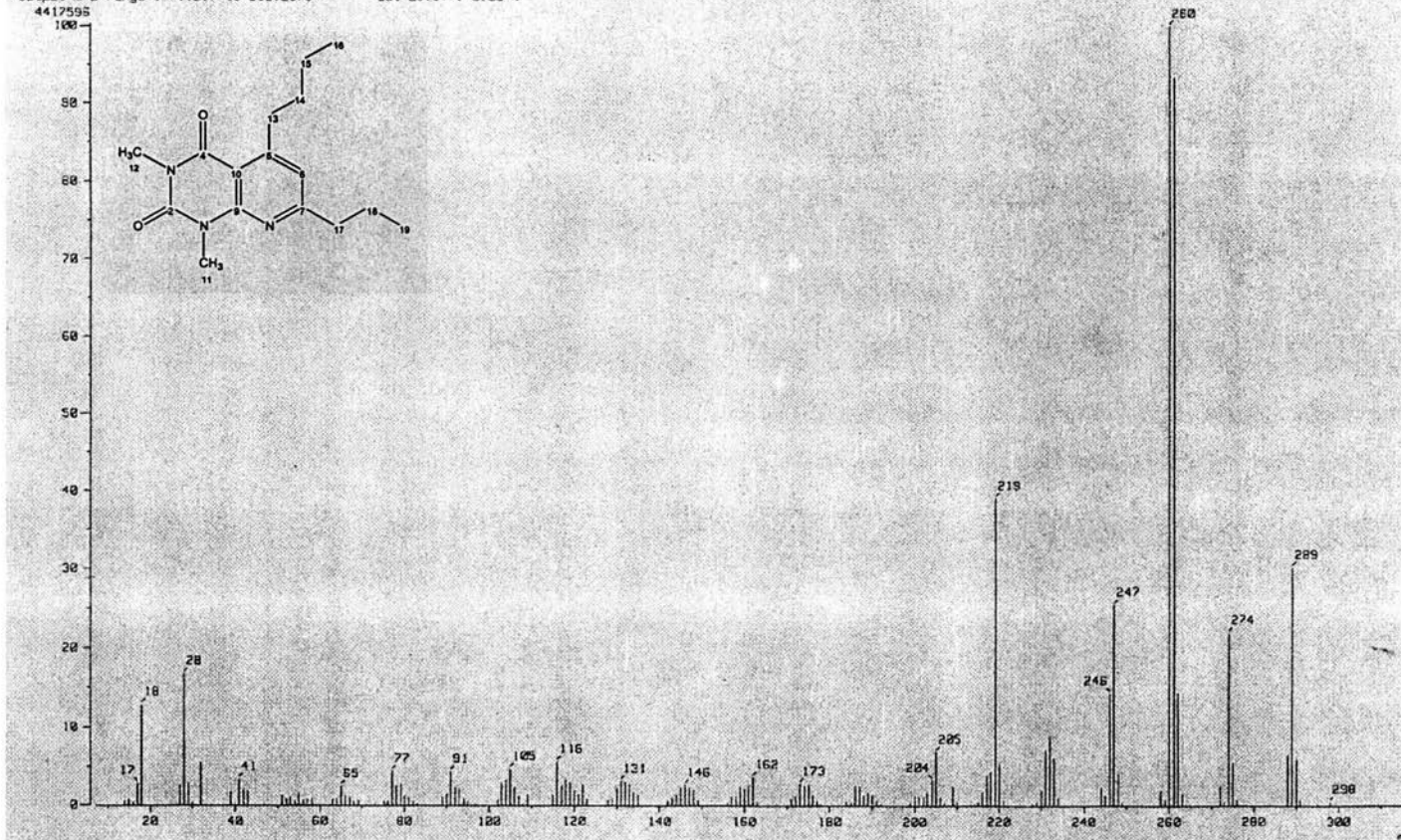
Espectro 7. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, TMS): 5-butil-7-etil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona



**Espectro 8. EM (IE) m/z: 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-d]-pirimidin-2,4-diona**

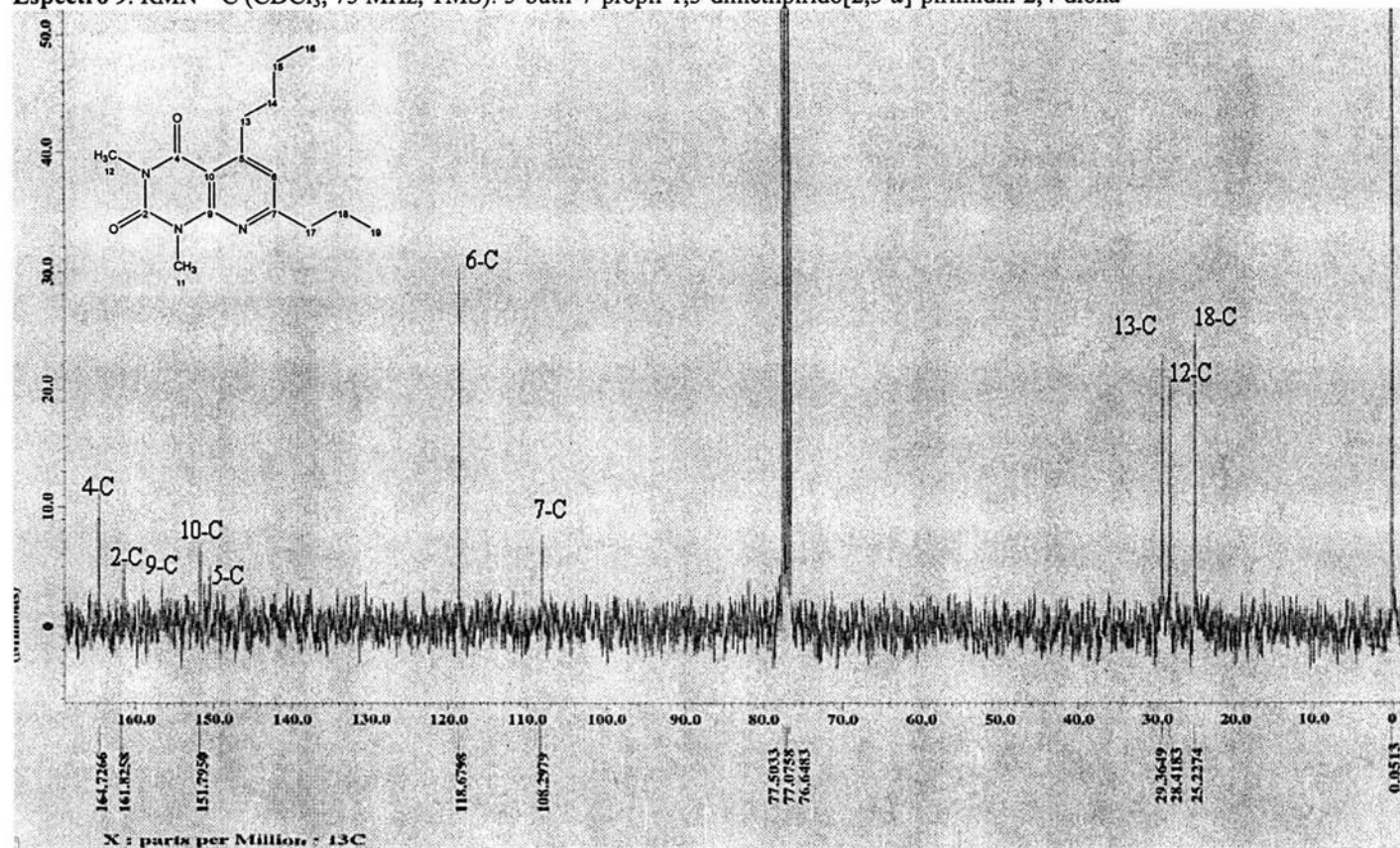
Output m/z range : 7.1217 to 319.2878

Cut Level : 0.00 %





**Espectro 9.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, TMS): 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]-pirimidin-2,4-diona



Espectro 10. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, TMS): 5-butil-7-propil-1,3-dimetilpirido[2,3-d]-pirimidin-2,4-diona

