

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“SÍNTESIS Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
INTERCALANTES AL ADN DE NUEVOS DERIVADOS DE  
7-FLUOROTIAZOLO[5,4-b]QUINOLINA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**KARINA MALDONADO HERNÁNDEZ**

**MÉXICO D.F.**

**2006**



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.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. María Reyna Gómez Gómez

Vocal: Prof. Mauro Cruz Morales

Secretario: Prof. Alfonso Sebastián Lira Rocha

1er Suplente: Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez

2º Suplente: Prof. Fernando Cortes Guzmán

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 121, Departamento de Farmacia, Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM

Asesor.

---

M en C Alfonso Sebastián Lira Rocha

Supervisor Técnico.

---

M en C Marco Antonio Loza Mejía

Sustentante.

---

Karina Maldonado Hernández

## **Agradecimientos.**

*A mis padres.*

Por estar siempre a mi lado apoyándome y por darme los cuidados y el amor que me ayudaron a cumplir esta meta tan importante en mi vida. Siempre los tengo en mi corazón.

*A mis hermanos.*

Por todo lo que me han enseñado, los consejos, los juegos, el apoyo y todos los momentos alegres en mi vida a su lado. Su apoyo ha sido muy importante para mí.

*A Thomas.*

Espero que de ahora en adelante podamos compartir los grandes logros de nuestras vidas y siempre estemos uno al lado del otro apoyándonos. Ich liebe dich mit meinem ganzem Herzen.

*A todos mis amigos.*

En especial a Marco, Rafa, Carlitos del lab 121 por que hicieron de este trabajo de tesis algo divertido y por la ayuda que me dieron durante este tiempo. Omar, Marcos por los buenos momentos que pasamos durante la carrera y con especial cariño a Karina, sin ti la universidad no habría sido lo mismo, eres una amiga única.

*A Jorge.*

Por que durante esta etapa de mi vida me diste tu apoyo en todos los sentidos y me impulsaste siempre a salir adelante. Por todo el cariño y todo lo vivido. Te quiero mucho.

*A mi asesor, Dr. Alfonso Lira.*

Usted ha sido, además de un excelente profesor, un gran amigo. Gracias por sus consejos y su ayuda cuando la he necesitado, han sido siempre algo positivo en mi vida.

*A mi facultad.*

*Al Honorable Jurado.*

**KARINA.**

## Índice.

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	3
2.1 Cáncer .....	3
2.2 Etiología del cáncer .....	5
2.3 Tratamiento del cáncer .....	5
2.3.1 Cirugía .....	6
2.3.2 Radioterapia .....	6
2.3.3 Inmunoterapia .....	6
2.3.4 Quimioterapia .....	7
2.3.4.1 Agentes alquilantes del ADN .....	7
2.3.4.2 Inhibidores de la mitosis .....	8
2.3.4.3 Antimetabolitos .....	9
2.3.4.4 Hormonas esteroidales .....	10
2.3.4.5 Agentes enlazantes al ADN .....	11
2.3.4.5.1 Agentes intercalantes de ADN .....	12
2.4 El fenómeno de la intercalación en ADN .....	13
2.4.1 Métodos para determinar las propiedades intercalantes al ADN .....	14
2.4.1.1 Determinación de la intercalación a través de espectroscopia de absorción UV/vis .....	15
2.4.1.2 Determinación de la intercalación a través de curvas de desnaturalización térmica del ADN .....	15
2.4.1.3 Determinación de la intercalación a través de la técnica de cristalografía por difracción de rayos X .....	16
2.4.1.4 Determinación de la intercalación a través de análisis por RMN <sup>1</sup> H y <sup>31</sup> P .....	16
2.4.1.5 Determinación de la intercalación a través de técnicas fluorométricas .....	17
2.5 Topoisomerasas .....	18
2.6 Acridinas .....	21
2.7 Isosterismo y bioisosterismo .....	22
2.8 Tiazolo[5,4-b]quinolinas .....	23
3. Objetivos .....	29
4. Esquema general de síntesis .....	31
5. Análisis de Resultados .....	33
5.1. Intermediarios .....	33
5.2 Compuesto IV .....	33
5.3 Análisis de los derivados de 9-anilino-7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina .....	34
5.3 Análisis espectroscópico de los derivados de 9-anilino-7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina .....	35
5.4 Compuesto X .....	38
5.8 Compuesto XIV .....	40
5.8.1 Compuesto XII .....	40
5.8.2 Compuesto XIII .....	41

5.8.3 Compuesto XIV .....	42
5.9 Pruebas de intercalación en ADN.....	43
6. Parte experimental.....	50
6.1 Parte Química.....	50
6.1.1 Reactivos y equipo .....	50
6.1.2 Cromatografía .....	50
6.1.3 Descripción de las síntesis.....	51
6.1.3.1 N –((Etoxicarbonil)metil)ditiocarbamato de metilo (I).....	51
6.1.3.2 N-((Etoxicarbonil)metil)iminoditiocarbamato de dimetilo (II) .....	52
6.1.3.3 4-(Etoxicarbonil)-5-(4-fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (III).....	52
6.1.3.4 9-Cloro-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IV).....	53
6.1.3.5 9-anilino7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (V).....	54
6.1.3.6 7-fluoro-9-[[3-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VI) .....	55
6.1.3.7 9-[[3-metoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina .....	56
6.1.3.7.1 3-nitroanisol (XV).....	56
6.1.3.7.2 3-aminoanisol (XVI) .....	57
6.1.3.7.2 9-[[3-metoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VII) .....	57
6.1.3.8 7-fluoro-9-[[4-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VIII) .....	58
6.1.3.9 9-[[4-metoxi)fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IX).....	58
6.1.3.10 9-Cloro-7-Fluoro-2-[[2-(N,N-dietilamino)etil]amino]tiazolo [5,4-b]quinolina (X).....	58
6.1.3.11 9-[[2-(N,N-dietilamino)etil]amino]-2-(metiltio)-tiazolo[5,4-b]quinolina (XIV) .....	58
6.1.3.11.1 4-Carboxi-5-(fenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XI).....	58
6.1.3.11.2 4-(1H-imidazol-1-il)carbonil-5-(4-fluorofenilamino)-2- (metiltio)tiazol (XII) .....	58
6.1.3.11.3 4-[[2-(N,N-dietilamino)etil]carbamoil]-5-(4- fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XIII).....	58
6.2 Pruebas de intercalación en ADN.....	58
6.2.1 Buffer Tris-HCl 0.1M, pH= 7.4 .....	58
6.2.2 Buffer Tris-HCl 0.4M, pH= 7.4 .....	58
6.2.3 Solución de ADN 300 µg/mL.....	58
6.2.4 Solución 0.72 mM de Bromuro de Etidio.....	58
6.2.5 Preparación de los ensayos.....	58
7. Conclusiones .....	58
8. Bibliografía.....	58
9. Espectros .....	58

## Índice de tablas y figuras.

Figura 1. Ejemplos de agentes alquilantes.....	8
Figura 2. Alcaloides de la vinca (inhibidores de la mitosis).....	9
Figura 3. Antimetabolitos.....	10
Figura 4. Hormona esteroide.....	11
Figura 5. Agente enlazante al ADN.....	11
Figura 6. Agentes intercalantes.....	13
(A) (B).....	14
Figura 7. Modelo de inserción en ADN.....	14
Figura 8. Estructura del Bromuro de Etidio.....	18
Figura 9. Ciclo catalítico de la enzima ADN Topoisomerasa II.....	20
Figura 10. Mecanismo de acción de los fármacos que estabilizan el complejo ADN-enzima.....	21
Figura 11. Farmacóforo postulado para los agentes intercalantes.....	22
estabilizadores del complejo ADN-topoisomerasa II.....	22
Figura 12. Semejanza estructural entre el núcleo de acridina.....	23
y el de tiazolo[5,4-b]quinolina.....	23
Tabla 1. Actividad biológica de Tiazolo[5,4-b]quinolinas reportados por Alvarez-Ibarra.....	24
Tabla 2. Datos de actividad citotóxica de derivados de 9-anilino tiazolo[5,4-b]quinolinas.....	25
Tabla 3. Datos de actividad biológica citotóxica de alquilamino[5,4-b]quinolinas.....	27
Figura 13. Esquema general de síntesis.....	31
Figura 14. Compuesto IV.....	33
Tabla 4. Punto de fusión, $R_f$ y rendimientos de reacción.....	35
Tabla 5. Espectroscopía IR (cm <sup>-1</sup> ).....	36
Tabla 6. Desplazamientos químicos RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> ).....	37
Figura 15. 9-anilino 7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina.....	37
Tabla 7. Espectrometría de masas.....	38
Figura 16. Compuesto X.....	38
Figura 17. Patrón de fragmentación del compuesto X.....	39
Figura 18. Compuesto XII.....	40
Figura 19. Compuesto XIII.....	41
Figura 20. Compuesto XIV.....	42
Tabla 8. Resultados de las pruebas de intercalación en ADN.....	43
Tabla 9. Resultados de las pruebas de intercalación en ADN de los análogos no fluorados.....	45
Tabla 10. Resultados relativos con respecto a AHMA.....	45
Gráfico 1. Q <sub>max</sub> con respecto a AHMA.....	46

Gráfico 2. Valores de Q .....	47
Gráfico 3. Valores de eficiencia relativa .....	48
Tabla 11. Sistemas de elución empleados. ....	51
Tabla 12. Soluciones patrón de los compuestos. ....	58
Tabla 13. Preparación de los ensayos. ....	58
Tabla 14. Adición y volumen de las alícuotas .....	58

---

## 1. Introducción

El cáncer es un importante problema de Salud Pública en nuestro país. Según las estadísticas de la Secretaría de Salud es una de las principales causas de muerte de la población mexicana en general, siendo además una de las más difíciles de vencer en la actualidad.<sup>1</sup>

El cáncer puede describirse generalmente como un crecimiento descontrolado de células que puede estar acompañado por propagación de las mismas hacia otros tejidos sanos. Las células cancerosas son capaces de invadir y destruir tejidos.

La quimioterapia fue introducida como herramienta para combatir el cáncer desde los años cuarenta y se ha mantenido en evolución constante logrando un enorme progreso desde entonces. La meta de la quimioterapia es eliminar las células cancerosas hasta lograr controlar o detener la enfermedad, sin embargo existen varios inconvenientes con el uso de agentes quimioterápicos:

- 1) No todos los tipos de cáncer pueden ser combatidos por un mismo agente quimioterápico, la selección del fármaco dependerá de la naturaleza del cáncer.
- 2) Las células cancerosas son capaces de desarrollar resistencia a los agentes quimioterápicos reduciendo las posibilidades de éxito del tratamiento.
- 3) Los agentes quimioterápicos no son selectivos ya que, desafortunadamente, las células cancerosas no son suficientemente diferentes en el aspecto biológico y bioquímico a las células normales. La mayoría de los fármacos atacan a las células en crecimiento, por lo cual dañan también a células sanas, sobre todo a las de crecimiento rápido como folículos pilosos, células del epitelio intestinal y médula ósea, causando efectos secundarios en los pacientes.

Actualmente, la investigación en quimioterapia está enfocada en solucionar estos problemas mediante el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos que sean más específicos sobre las células cancerosas para lograr una mayor efectividad en el tratamiento de la enfermedad y reducir los efectos secundarios en los pacientes, mejorando así la calidad de vida de los mismos y aumentando las posibilidades de curación.

Una de las formas de obtención de nuevos fármacos es la modificación estructural de una molécula patrón que muestre actividad antitumoral, buscándose con esto aumentar la selectividad y efectividad de la misma. Un ejemplo de esta estrategia es la que se observa con algunas sustancias derivadas de la modificación estructural de la amsacrina, un derivado de 9-anilinoacridina utilizado con buenos resultados en el tratamiento de leucemia.

Las 9-anilino[5,4-b]quinolinas son isómeros de la amsacrina, por lo cual son potenciales antitumorales. En el presente trabajo se describe la síntesis, caracterización estructural y determinación de las propiedades intercalantes al ADN de siete derivados de 9-anilino[5,4-b]quinolina con el objetivo de obtener mayor información que conduzca a sustancias con mayor eficacia y selectividad hacia células tumorales.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Cáncer.

La formación de tumores es muy común y frecuente en animales y en humanos, sobre todo en aquellos de edad avanzada, sin embargo, la mayoría de estos tumores son de carácter benigno, es decir, se trata de tumores definidos, localizados y de tamaño pequeño. Los tumores benignos no representan generalmente un riesgo para la salud del huésped y están conformados por células diferenciadas y muy similares a las normales, además éstas células se mantienen en el lugar donde se originó el tumor (un tumor de hígado se mantiene en el hígado, etc.) y normalmente se encuentran dentro de una cápsula fibrosa. Algunos ejemplos de este tipo de tumores son las verrugas, adenomas y miomas.<sup>22</sup>

Existen otro tipo de tumores denominados malignos o cáncer. Este tipo de tumores sí representan un riesgo para la salud del huésped y a diferencia de las células que conforman los tumores benignos, las de los tumores malignos son células poco diferenciadas que crecen y se dividen con mayor rapidez que las normales.

El cáncer no es una sola enfermedad, si no que se trata de un conjunto de más de 200 enfermedades diferentes que atacan a un amplio rango de células. Las características principales del cáncer son una alteración en el control de la proliferación celular y la reducción del proceso de apoptosis. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y aspecto, y al multiplicarse dan origen a una colonia de células diferentes que se reproducen rápidamente invadiendo y destruyendo los tejidos normales.<sup>2</sup>

Existen unos 200 tipos diferentes de cáncer, clasificados en carcinomas (si derivan del endodermo o ectodermo), sarcomas (si derivan del mesodermo) y leucemias, que proliferan como células aisladas, es decir, no se trata de tumores sólidos.

Para dar origen a una célula cancerosa es necesario que la misma presente una acumulación de aproximadamente 3 a 20 mutaciones en genes que regulan la multiplicación celular normal. Hasta el momento no se ha encontrado que el cáncer sea causado por una sola mutación aislada. La acumulación de mutaciones que finalmente llevan al cáncer se da por que las células pueden adquirir ventajas de proliferación con una primera mutación, cuando una célula mutada sufre una segunda mutación puede llegar a

proliferar en forma descontrolada y formar un pequeño tumor benigno. Una tercera mutación en la progenie puede desencadenar cáncer y mutaciones adicionales pueden conferirle a las células capacidades como ingresar al torrente sanguíneo y establecerse en lugares secundarios de crecimiento (metástasis). Para que esto suceda se requieren décadas, por lo cual el riesgo de cáncer aumenta con la edad, sin embargo el cáncer no sólo se origina por mutaciones espontáneas.<sup>2</sup>

Los genes que están involucrados en el control de la proliferación celular y que al sufrir mutaciones dan origen al cáncer son llamados protooncogenes. Los protooncogenes están clasificados de acuerdo a su función y a las propiedades bioquímicas de las proteínas que codifican en:

- 1) Factores de crecimiento.
- 2) Receptores para factores de crecimiento
- 3) Transductores de señales
- 4) Factores de transcripción
- 5) Otros.

Un ejemplo de protooncogenes es el gen *ras*, responsable del crecimiento celular. Este gen participa en transducción de señales celulares activadas por factores de crecimiento. Cuando este gen está mutado envía señales estimulantes del crecimiento que hacen que se pierda el control de la proliferación celular. Otro protooncogen es el gen *Adenomatous polyposis coli* (APC) el cual es un oncosupresor, y se encuentra frecuentemente mutado en el caso de pacientes con cáncer de colon.<sup>23</sup>

Las principales características de las células tumorales son la angiogénesis, metástasis, inmortalidad, crecimiento rápido, el hecho de que no necesitan de factores de crecimiento para su proliferación como las células normales, entre otros.

La metástasis es la diseminación de las células tumorales y su establecimiento en zonas secundarias de crecimiento. Las células metastásicas son capaces de alterar los contactos con otras células del tejido de origen y superar restricciones de la membrana basal y otras barreras. Una de las principales barreras físicas que mantiene a los tejidos separados, es la lámina basal, las células tumorales tienen la capacidad de desintegrarla, con lo cual logran

establecerse en tejidos secundarios e ingresar al torrente sanguíneo. Esto también es de utilidad en el proceso de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) proceso indispensable para la evolución y crecimiento del cáncer.<sup>2, 22, 23</sup>

## **2.2 Etiología del cáncer.**

El cáncer puede ser originado por diversos factores, entre los cuales se encuentran los siguientes:

- Predisposición genética.
- Agentes químicos.
- Agentes físicos.
- Virus.

La predisposición genética se refiere al riesgo de padecer algún tipo de cáncer por alguna mutación en genes específicos. Se han encontrado alrededor de 40 mutaciones en las células de la línea germinal que están asociadas con el riesgo a desarrollar algunos tipos de cáncer. Por esto es muy importante la prevención en familias que presentan casos frecuentes de cáncer. Un caso común es el de la mutación del gen APC, el cual produce un polipéptido asociado a la formación de microtúbulos, que, mutado se asocia a la unión del citoesqueleto a una molécula de adhesión implicada en la carcinogénesis. También como resultado de la mutación del gen APC se origina una proteína incapaz de promover la apoptosis y frenar los procesos de replicación celular. Este gen está frecuentemente relacionado con el desarrollo de cáncer de colon.

Los agentes químicos, físicos y los virus pueden ser causantes de cáncer. El desarrollo de cáncer por exposición a estos agentes es en parte similar al desarrollo por mutaciones espontáneas, es decir, es en varios pasos y requiere de la acumulación de varias mutaciones para que finalmente se llegue al desarrollo de células malignas.<sup>2,22,23</sup>

## **2.3 Tratamiento del cáncer.**

Existen en la actualidad diversos tratamientos contra el cáncer, la mayoría de las veces es necesario usarlos en conjunto para lograr resultados positivos. Dentro de las

posibilidades de tratamiento se encuentran la cirugía, la radioterapia con rayos X o con radioisótopos, terapia inmune y quimioterapia.

### **2.3.1 Cirugía.**

La cirugía es uno de los métodos más antiguamente utilizados, sin embargo no siempre es efectiva por sí sola debido a que cuando el cáncer es metastático ya no está localizado y no puede ser eliminado mediante una cirugía, es necesario el uso de agentes quimioterápicos. Otro caso en el que no es efectiva la cirugía es en leucemia ya que éste no es un tumor sólido que pueda combatirse de esta forma. Sin embargo, en muchas ocasiones se recurre a la cirugía para la eliminación de grandes masas de tumores.

### **2.3.2 Radioterapia.**

La radioterapia es un tratamiento que utiliza radiaciones ionizantes para destruir las células cancerosas. Las radiaciones penetran en los tejidos a diferentes profundidades según sus características y provocan la ionización generalmente de moléculas de agua y finalizan dañando al ADN. Este proceso no es muy selectivo, y aunque se dice que afecta en mayor medida a las células de división rápida (como las células cancerosas) también afecta en gran parte a las células sanas causando así gran cantidad de efectos secundarios dependiendo de la zona en la que se aplica. La radioterapia puede ser utilizada como tratamiento único o bien después de una cirugía para evitar la recurrencia del cáncer.<sup>12, 13</sup>

### **2.3.3 Inmunoterapia.**

La inmunoterapia se basa en la tendencia natural del organismo a defenderse contra las células cancerosas por medio del sistema inmunológico. Aunque por muchos años se pensó que el sistema inmune sólo actuaba sobre células extrañas al organismo o infecciosas, ahora se sabe que también actúa sobre células tumorales. La inmunoterapia está enfocada en aumentar esta tendencia del organismo a defenderse. La terapia de interferón es un tipo de inmunoterapia, el interferón una citocina que actúa disminuyendo la velocidad de crecimiento de los tumores directamente además de ayudar a la activación del sistema inmune. Otras citocinas comúnmente empleadas en el tratamiento del cáncer son las interleucinas. Este tipo de tratamiento también causa efectos secundarios entre los cuales se encuentran malestar general y síntomas similares a los del resfriado. Otro tipo de

inmunoterapia son los anticuerpos monoclonales, generalmente “fabricados” en ratones y dirigidos hacia células tumorales, ayudan a activar o aumentar la actividad del sistema inmune contra las células tumorales y son efectivos como tratamiento en algunos tipos de cáncer.<sup>14, 16</sup>

#### **2.3.4 Quimioterapia.**

La quimioterapia consiste en el uso de agentes químicos ya sea de origen natural, sintético o semisintético que sean capaces de atacar células tumorales ya sea eliminándolas o deteniendo su proliferación. Uno de los principales enfoques de la investigación para combatir el cáncer es la búsqueda de fármacos antitumorales, en la mayoría de ellos, el mecanismo de acción tiene como objeto alterar el principal proceso de replicación del ADN. Hasta ahora no existen fármacos antitumorales selectivos, es decir, aquellos que diferencian entre células tumorales y células normales.

Dentro de los fármacos antitumorales existen diferentes clasificaciones dependiendo de su mecanismo de acción y de su estructura química, algunos ejemplos de fármacos antitumorales se mencionan a continuación:

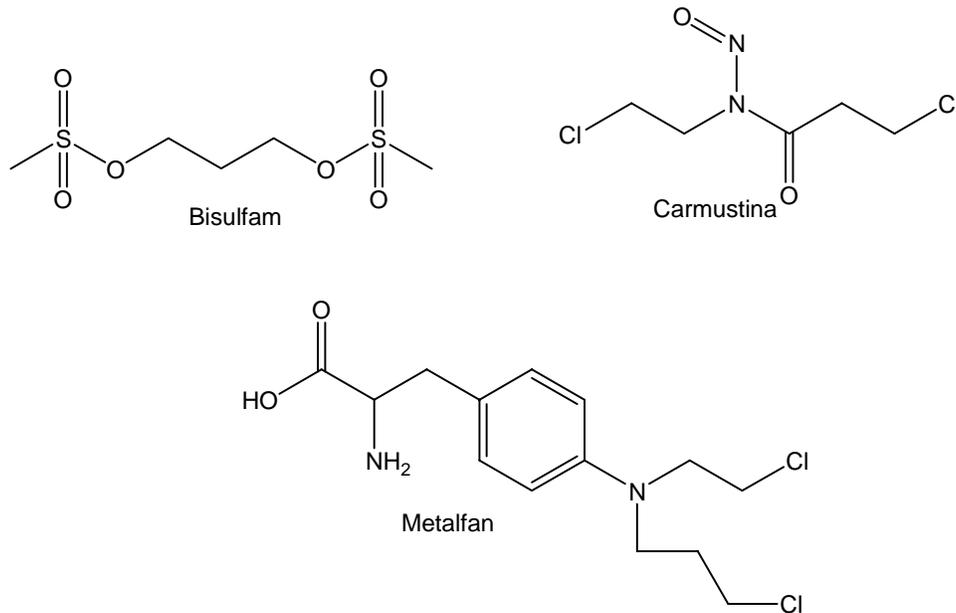
##### **2.3.4.1 Agentes alquilantes del ADN**

Los primeros agentes antitumorales en ser utilizados en la terapéutica fueron las mostazas nitrogenadas, las cuales mostraron cierta especificidad hacia tejido linfoide. Las mostazas nitrogenadas son agentes alquilantes, es decir, compuestos capaces de unirse de manera covalente al ADN por medio de alquilaciones en las bases nitrogenadas. Estos compuestos forman enlaces cruzados entre las dos hebras de ADN distorsionando así la doble hélice, además alteran el equilibrio ceto-enol de la guanina provocando que se aparee con timina en lugar de con adenina como lo hace normalmente. Todas estas modificaciones provocan problemas en el proceso de replicación del ADN.

Otros ejemplos de agentes alquilantes son las 2-cloroetil-N-nitrosoureas, estas son utilizadas en el tratamiento de cáncer cerebral debido a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica aunque por lo mismo son más tóxicos que otros agentes antitumorales. Algunos epóxidos son también agentes antitumorales, aunque la mayoría de ellos son muy reactivos y no pueden ser utilizados en la terapia. La carzinofilina es un ejemplo de epóxido que presenta buena actividad antitumoral.

El cisplatino es otro ejemplo de agente alquilante, tiene la desventaja de ser muy tóxico, sobre todo para los riñones, además de que tiene gran actividad emética y muchas células tumorales presentan actualmente resistencia contra este fármaco. El cisplatino forma enlaces covalentes con una hebra de ADN interfiriendo de esta manera con su replicación.

En la lista de agentes alquilantes pueden encontrarse la procarbazida (utilizada en el tratamiento del linfoma de Hodgkin) la ciclofosfamida, hexametilamina dacarbazina, antraciclina y algunos profármacos de las mostazas nitrogenadas, entre otros.



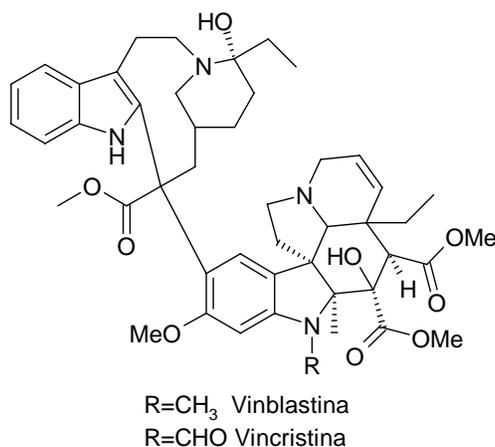
**Figura 1. Ejemplos de agentes alquilantes.**

#### 2.3.4.2 Inhibidores de la mitosis.

Este tipo de compuestos, impiden la división celular. Durante la metafase, los husos mitóticos contienen los dos juegos de ADN que la célula necesita para dividirse. Los husos son los responsables del movimiento de los cromosomas y están compuestos por una proteína llamada tubulina. Los inhibidores de la mitosis se unen a la tubulina, lo que impide la asociación de los microtúbulos y por lo tanto la formación de husos mitóticos. Sin éstos, la célula no puede dividirse. La mayoría de estos fármacos son de origen natural. Ejemplos de ellos son los alcaloides de la vinca como vincristina y vinblastina; colchicina y

podofilotoxina, se administran por vía intravenosa. Algunos ejemplos de esta categoría son: vincristina y vinblastina.

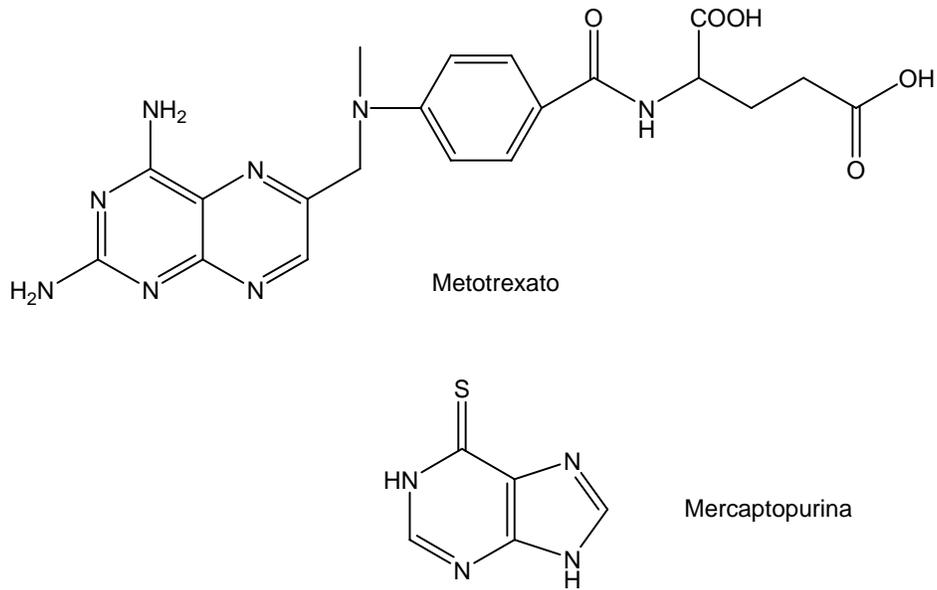
El taxol es otro ejemplo de inhibidor de la mitosis, sin embargo esta sustancia no actúa de la misma forma que las mencionadas anteriormente, más bien, al unirse a la tubulina promueve la formación de haces de microtúbulos resistentes a la despolimerización con lo cual paraliza la división celular.<sup>11</sup>



**Figura 2. Alcaloides de la vinca (inhibidores de la mitosis)**

### 2.3.4.3 Antimetabolitos.

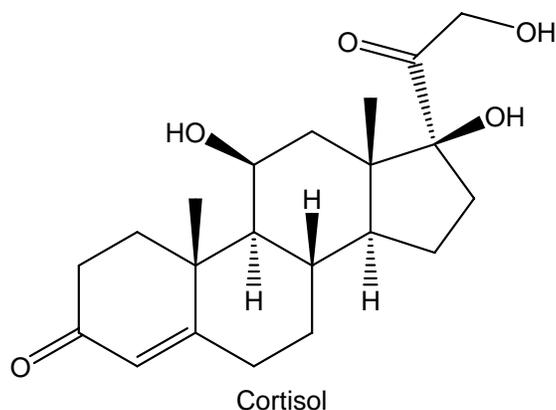
Los antimetabolitos detienen la síntesis de ADN mediante la inhibición alostérica o competitiva de enzimas involucradas en la síntesis de purinas y pirimidinas. Estos medicamentos operan simulando una sustancia que participa en la síntesis de ADN, es decir, actúan como falsos sustratos de las enzimas. Las fluoropirimidinas inhiben la síntesis de pirimidinas a través de la timidilato sintasa. La síntesis de purinas se bloquea con fármacos como la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina. El metotrexato a diferencia de los mencionados anteriormente no es un análogo de las bases nitrogenadas, es un análogo del ácido fólico que inhibe competitivamente a la dihidrofolato reductasa, con lo cual impide la síntesis del ácido timidílico, necesario para la síntesis de ADN. Este tipo de fármacos se utilizan sobre todo en el tratamiento de leucemia y linfomas.<sup>11, 15, 16</sup>



**Figura 3. Antimetabolitos**

#### 2.3.4.4 Hormonas esteroidales.

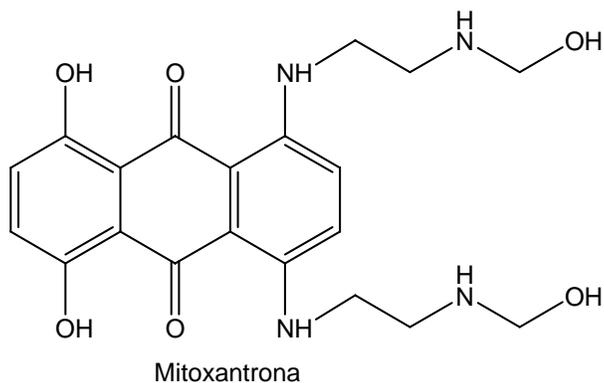
Los corticosteroides han sido muy usados en el tratamiento del cáncer debido a su capacidad para inhibir la mitosis en linfocitos, por lo que su uso es más frecuente en linfomas y leucemia, ejemplos de ellos son la prednisona y la dexametasona. Sin embargo en el cáncer de mama que generalmente es causado por sobreestimulación de estrógenos, se usa un inhibidor competitivo de la unión de estradiol al receptor de estrógeno llamado Tamoxifen.<sup>16</sup>



**Figura 4. Hormona esteroide.**

#### 2.3.4.5 Agentes enlazantes al ADN.

También llamados citostáticos, funcionan al unirse con el ADN para evitar la síntesis de ARN. Estos fármacos también impiden el crecimiento celular al imposibilitar la replicación de ADN. Los agentes enlazantes evitan que el ADN se vuelva a fijar a sí mismo, lo que provoca la muerte celular. Esta categoría de medicamentos sirve para tratar una variedad amplia de cánceres incluyendo el testicular y la leucemia. Algunos ejemplos son: actinomicina D, doxorubicina y mitomicina-C.<sup>16</sup>



**Figura 5. Agente enlazante al ADN**

Dentro de los agente enlazantes al ADN existe un tipo denominado agentes intercalantes, los cuales son capaces de deslizarse entre los pares de bases del ADN. Un ejemplo de ellos son las antraciclinas (figura 5). En ellas el sistema de antraquinona es un cromóforo plano particularmente bien adaptado para su intercalación entre los pares de

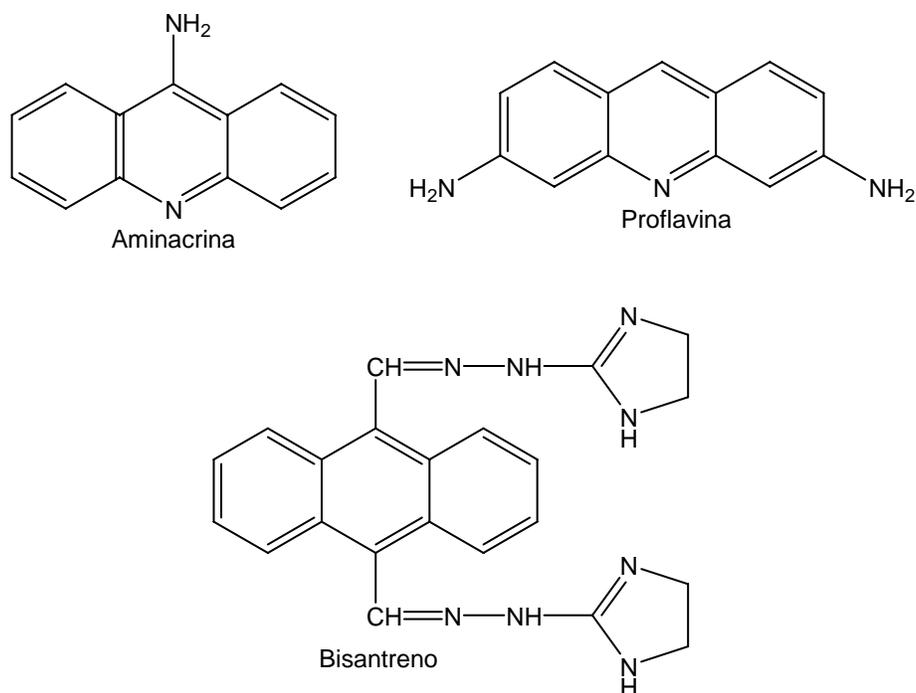
bases de ADN ya que su superficie se acopla íntimamente a éstas. Los derivados de antraquinona surgieron en la búsqueda de análogos de antraciclinas que carecieran de la toxicidad cardíaca de éstas.<sup>16,24</sup>

#### **2.3.4.5.1 Agentes intercalantes de ADN.**

Los agentes intercalantes de ADN son aquellas sustancias capaces de incorporarse entre los pares de bases del ADN modificando la topología, generalmente se trata de compuestos planos aromáticos o heteroaromáticos que suelen tener cadenas flexibles polares. El proceso de intercalación es mediado por interacciones electrostáticas (fuerzas de Wan der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, etc) y enlaces no covalentes entre el fármaco y los pares de bases del ADN, por lo cual es un proceso reversible. Este fenómeno altera las propiedades químicas y espectroscópicas del fármaco, lo cual es muchas veces aprovechado para medir la interacción del mismo con el ADN.

La formación del complejo fármaco-ADN interfiere con la acción de algunas enzimas involucradas en la replicación del ADN como es el caso de las topoisomerasas y las polimerasas, fundamentalmente, esto debido a que como se mencionó anteriormente, se modifica la topología de la doble hélice. Adicionalmente algunos agentes intercalantes son capaces a través de las cadenas unidas al cromóforo, formar un complejo terciario con las enzimas que termina dañando al ADN.

Los agentes intercalantes pueden ser más o menos selectivos, hay algunos de ellos que se ha comprobado que tienen cierta afinidad por alguna secuencia de bases específica u otros que se acercan al ADN preferentemente por el surco menor. Como ya se mencionó anteriormente, las antraquinonas son un ejemplo de agentes intercalantes. Los derivados de antraceno, como el bisantreno, tienen un mecanismo de acción análogo.<sup>11, 15-18</sup>



**Figura 6. Agentes intercalantes.**

La actividad citotóxica de estos compuestos no es debida solamente a su capacidad de intercalación. Estos compuestos además afectan la actividad de una enzima involucrada en la síntesis de ADN llamada ADN topoisomerasa.

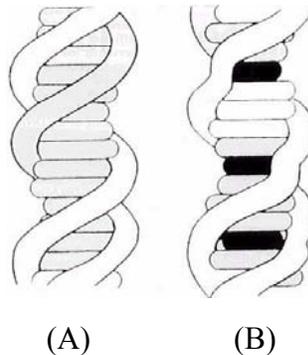
A continuación se hablará con más detalle de la enzima ADN Topoisomerasa y del fenómeno de intercalación en ADN que forman parte del mecanismo de acción de los agentes intercalantes.

#### **2.4 El fenómeno de la intercalación en ADN.**

El fenómeno de intercalación en el ADN sucede cuando una molécula denominada agente intercalante interactúa con las bases nitrogenadas de manera que se posiciona entre ellas quedando atrapado en medio a manera de “sándwich” y desorganizando la estructura de doble hélice del ADN. Es requisito indispensable que la molécula que interactúa con el ADN tenga un residuo planar aromático o heteroaromático en su estructura ya que este residuo es el que tiene la capacidad de intercalarse entre los pares de bases. Las interacciones entre el agente intercalante y los pares de bases del ADN para formar el complejo son de tipo no covalente, principalmente se trata de fuerzas de Wan der Vaals,

interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. La formación del complejo es reversible.

Durante el proceso de intercalación y después del mismo suceden cambios de tipo estructural en el ADN, interacciones electrónicas entre el ADN y el agente intercalante y por lo tanto, cambios en las propiedades electrónicas del intercalante. Para que el agente intercalante pueda colocarse entre los pares de bases del ADN tiene que suceder un desdoblamiento y alargamiento de la doble hélice, una vez formado el complejo se produce rigidez en la cadena del ácido nucleico, el intercalante también se vuelve rígido y su parte planar se orienta de manera perpendicular al eje helicoidal. Estos cambios se traducen en cambios macromoleculares que pueden ser aprovechados para evidenciar que la intercalación se está llevando a cabo, por ejemplo, cambia la viscosidad de las soluciones de ADN, también cambia el coeficiente de sedimentación y la movilidad electroforética del ácido nucleico.<sup>16, 18, 19</sup>



**Figura 7. Modelo de inserción en ADN.**  
**(A) ADN (B) ADN con intercalador**

#### **2.4.1 Métodos para determinar las propiedades intercalantes al ADN.**

Debido a las evidencias macromoleculares que el fenómeno de intercalación produce, existen varios métodos para determinar las propiedades intercalantes de algunas sustancias. Estos métodos pueden dividirse por el tipo de cambio que se observa:

- Aquellos que indican los cambios estructurales en el ADN, en los cuales evidencian el desdoblamiento y estiramiento de la doble hélice principalmente.

- Aquellos que indican la interacción electrónica entre el agente intercalante y el ADN, los cuales son principalmente métodos espectroscópicos y de RMN de distintos núcleos atómicos.
- Aquellos que indican la orientación molecular y la rigidez de los cuales no se hablará en el presente trabajo.

A continuación se presentan algunos de los métodos que indican la interacción electrónica entre el agente intercalante y el ADN.

#### **2.4.1.1 Determinación de la intercalación a través de espectroscopia de absorción UV/vis.**

Este método se basa en el hecho de que los cromóforos (generalmente moléculas planas compuestas por entre 2 y 4 anillos aromáticos fusionados) al intercalarse en los pares de bases del ADN cambian a una mayor longitud de onda sus transiciones electrónicas resultando un hipocromismo. Estos cambios pueden seguirse con ayuda de espectrofotometría UV/Vis, siendo de esta manera posible medir la interacción de las moléculas con el ADN. Al compararse los espectros de los potenciales agentes intercalantes libres con los de los complejos formados cromóforo-ADN se determina si existe interacción con el ADN.

Las constantes aparentes de afinidad pueden ser también medidas por espectroscopia de absorción UV-vis haciendo una titulación con ADN en soluciones diluidas de los compuestos a evaluar.<sup>4, 19</sup>

#### **2.4.1.2 Determinación de la intercalación través de curvas de desnaturalización térmica del ADN**

La desnaturalización térmica del ADN (el equilibrio entre el estado de doble hélice y el estado de hélice sencilla) se ve modificada cuando éste se encuentra interaccionando con algún ligando como es el caso de los agentes intercalantes. En muchos casos las curvas de desnaturalización térmica del ADN se determinan por espectroscopia UV, aunque también puede hacerse por RMN protónica y recientemente se introdujeron las técnicas de calorimetría.

Las determinaciones por espectroscopia UV consisten en medir de manera continua la absorbencia (a 260nm) de soluciones de ADN y de complejo ADN-agente intercalante a través del tiempo aumentando la temperatura a una tasa determinada hasta llegar a la desnaturalización del ADN. Los datos se transfieren a un programa de computadora para ser procesados y realizar las gráficas y análisis correspondientes.<sup>6,8</sup>

En el caso de los métodos calorimétricos las curvas de desnaturalización térmica se obtienen graficando la temperatura (la cual se va aumentando con el tiempo, por ejemplo a una tasa de 1°C por minuto), contra el exceso de capacidad calorífica (calorías/°C). Las curvas deben realizarse al ADN sin agente intercalante y al ADN con el intercalante de manera que todos los sitios posibles de unión estén saturados, ya que si existen sitios libres, el ligando se cambiará de los sitios en los que el ADN se ha desnaturalizado hacia los sitios libres, resultando una curva muy compleja (multifásica) de la que no pueden obtenerse datos fácilmente. Los datos para todo el rango de concentraciones del agente intercalante pueden obtenerse mediante cálculos matemáticos.

La combinación de estos métodos proporciona información suficiente para determinar parámetros como la constante de unión del agente intercalante,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de la unión con el ADN y es hasta ahora la única manera de obtener estos datos experimentalmente.<sup>5,6</sup>

#### **2.4.1.3 Determinación de la intercalación a través de la técnica de cristalografía por difracción de rayos X.**

En este tipo de técnicas es necesario obtener cristales del complejo ADN-agente intercalante, los cristales deben ser de un tamaño adecuado (aproximadamente un tamaño medio de partícula de 15 micras) para poder ser utilizados. A estos cristales se les somete a la exposición de rayos X y se observa la estructura que los conforma. Si además se cuenta con los datos de la estructura cristalina del ADN sin agente intercalante se pueden observar las diferencias entre ambos y de esta manera saber como están interactuando el agente intercalante y el ADN en el complejo.<sup>7</sup>

#### **2.4.1.4 Determinación de la intercalación a través de análisis por RMN 1H y 31P.**

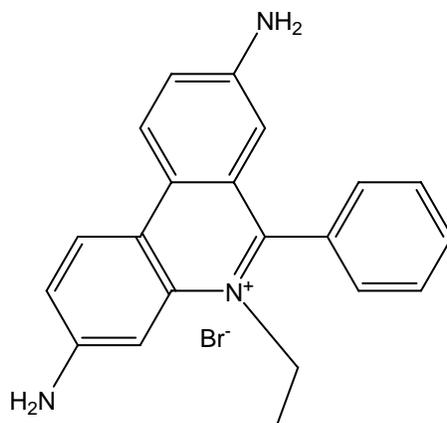
Esta técnica consiste en obtener los espectros de resonancia magnética nuclear tanto del ADN sin complejar como de los complejos formados con los agentes a evaluar. Este

método ofrece ventajas sobre el de difracción de rayos X ya que los datos pueden ser obtenidos a partir de soluciones de las sustancias a evaluar y no es necesario obtener cristales. La desventaja de este método es que no muchos sistemas pueden ser evaluados y que además los datos con los que se cuentan de RMN de ADN corresponden sólo a oligonucleótidos de hasta 13 pares de bases.

En los espectros de RMN se observan cambios en los desplazamientos químicos de los núcleos. En RMN  $^1\text{H}$  los protones aromáticos del agente intercalante aparecen a campos de frecuencia más alta cuando éste está formando un complejo con el ADN que cuando se encuentra libre. En RMN  $^{31}\text{P}$ , las señales de fósforo del enlace fosfodiéster del esqueleto del ADN, aparecen a campo más bajo cuando el ADN está interactuando con el agente intercalante que cuando está libre, esto indica una perturbación en el esqueleto de azúcar y fosfato provocada por la intercalación. También por RMN pueden detectarse cambios en los puentes de hidrógeno que se forman y se puede deducir cuál es la interacción entre el ADN y el agente intercalante, es decir, se puede estudiar la estructura tridimensional de los oligonucleótidos libres y complejados. Como ya se ha mencionado anteriormente, la RMN también puede ser utilizada para los estudios de desnaturalización térmica del ADN.<sup>8, 19</sup>

#### **2.4.1.5 Determinación de la intercalación a través de técnicas fluorométricas.**

Las técnicas fluorométricas se basan en el hecho de que algunos complejos formados entre agentes intercalantes y ADN son fluorescentes, un ejemplo de ellos es el complejo formado con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una molécula formada por tres anillos aromáticos fusionados, posee propiedades de cromóforo y su estructura planar le permite intercalarse entre los pares de bases del ADN formando un complejo fluorescente.



**Figura 8. Estructura del Bromuro de Etidio.**

La formación de dicho complejo es reversible y el bromuro de etidio puede ser desplazado de sus sitios de unión por otros agentes intercalantes que tengan mayor afinidad por el ADN. Al ser desplazado el bromuro de etidio la fluorescencia inicial de la solución va en decremento y este fenómeno puede ser monitoreado con el uso de un espectrofluorómetro.

Los datos recogidos del espectrofluorómetro son procesados estadísticamente, se les ajusta a la ecuación de una hipérbola cuadrada de la cual es posible obtener el desplazamiento máximo de bromuro de etidio provocado por el compuesto evaluado, así como también la constante de afinidad aparente al ADN. Dada la sencillez del método, las técnicas por desplazamiento de bromuro de etidio son muy utilizadas para evaluar otros agentes intercalantes.<sup>10</sup>

Es muy importante considerar que además de la intercalación hay otras formas en que las moléculas pueden interactuar con el ADN, debido a que además del residuo planar algunas de las moléculas poseen también cadenas y ramificaciones que al ser capaces de interactuar con el ADN pueden inducir algunos cambios en las propiedades del mismo como su topología, densidad, punto de fusión o desnaturalización, etc.<sup>19</sup>

## 2.5 Topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas que actúan sobre la topología del ADN, se encargan de eliminar el superenrollamiento de las hebras de ADN, es decir, de relajarlo. Son importantes en procesos como replicación, expresión de genes, reparación y

empaquetamiento de los ácidos nucleicos La replicación del ADN implica que sean separadas las dos cadenas, si se realizara esta separación de una manera mecánica se produciría una rotación en un extremo del ADN, dando como resultado un sobreenrollamiento que dificultaría la separación de las hélices. Para evitar este problema los organismos han desarrollado herramientas enzimáticas que enrollan o desenrollan la molécula de ADN.<sup>20,21</sup>

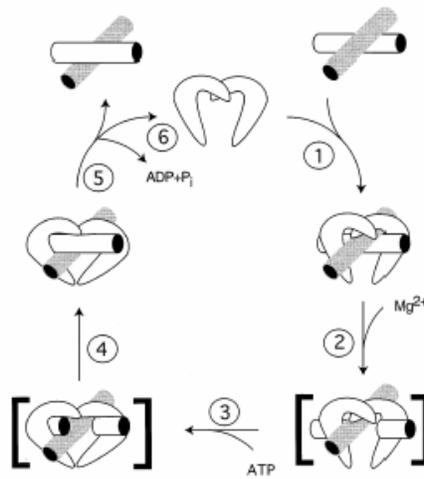
Este proceso se logra por la acción de las topoisomerasas. Las topoisomerasas catalizan la ruptura y unión de las cadenas de ADN tornándolo más o menos enrollado que el ADN original. Existen dos clases de topoisomerasas en los mamíferos:

1. La topoisomerasa I, actúa provocando un corte transitorio en una de las hebras del ADN y hace rotar uno de los extremos alrededor de la hebra intacta, luego vuelve a unir los extremos separados esto produce una relajación del superenrollamiento.
2. La topoisomerasa II tiene la capacidad de romper las dos cadenas del ADN, es dependiente de ATP es decir las topoisomerasas son ATPasas y puede generar o deshacer asas superenrolladas.

La topoisomerasa II tiene un ciclo catalítico dividido en seis pasos:

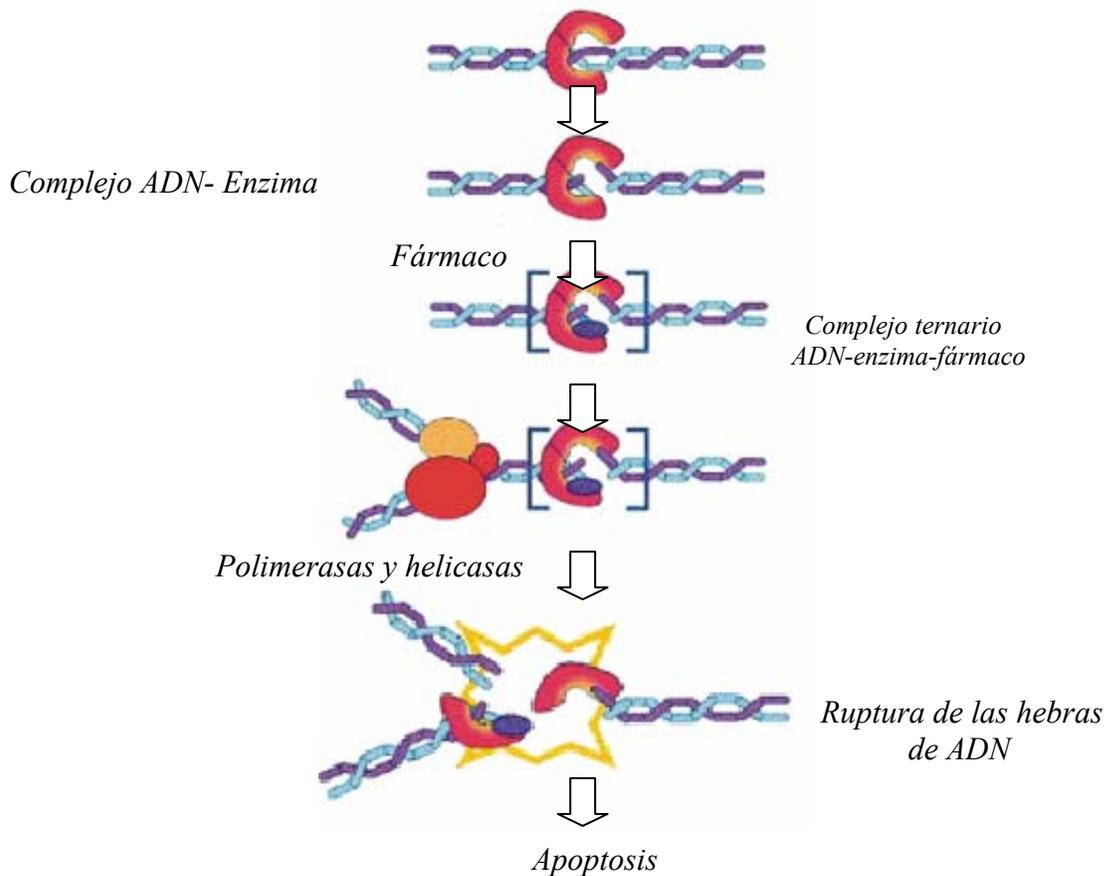
1. Unión de la enzima al ADN. Ciertas secuencias específicas son reconocidas por la topoisomerasa II, además la enzima es capaz de reconocer la topología del ADN distinguiendo entre zonas enrolladas y no enrolladas interactuando preferentemente con zonas enrolladas.
2. Formación del complejo previo a la translocación. Se forma un complejo entre el ADN y la enzima, se produce la ruptura de la doble hebra de ADN y se establece un equilibrio de ruptura/ unión de las doble hélice de ADN. Durante la ruptura de la doble hélice se forma un enlace entre un residuo de tirosina del sitio activo de la enzima con un grupo 5'-fosfato de la cadena de ADN.
3. Translocación. La unión de ATP al complejo favorece un cambio conformacional en la enzima, lo que lleva al paso de la parte intacta de la doble hebra a través del corte transitorio formado en el paso anterior.

4. Post-translocación. Después de la translocación, se vuelve a establecer un equilibrio ruptura/unión el cual permite la unión de la doble hebra de ADN. Este paso es similar al segundo.
5. Hidrólisis de ATP. La hidrólisis del ATP incorporado en el paso anterior es necesaria para la separación del complejo enzima- ADN y que la enzima recupere su conformación original.
6. Reciclaje de la enzima.



**Figura 9. Ciclo catalítico de la enzima ADN Topoisomerasa II**

La topoisomerasa II es el blanco primario de algunos fármacos citotóxicos como antitumorales y antimicrobianos. Estos fármacos no actúan inhibiendo la actividad de la enzima, si no, favoreciendo la ruptura del ADN en el paso dos del ciclo catalítico de la enzima, es decir, estabilizando el complejo en la forma en que la doble hélice de ADN está rota y evitando que vuelva a unirse, lo cual conduce a la muerte celular. La topoisomerasa II se convierte entonces en una especie de toxina para la célula.<sup>20, 21</sup>



**Figura 10. Mecanismo de acción de los fármacos que estabilizan el complejo ADN-enzima.**

Un ejemplo destacado de fármaco que actúan bajo este mecanismo son los derivados de acridina, los cuales han sido utilizados en el tratamiento contra el cáncer con buenos resultados y de los cuales se habla a continuación.

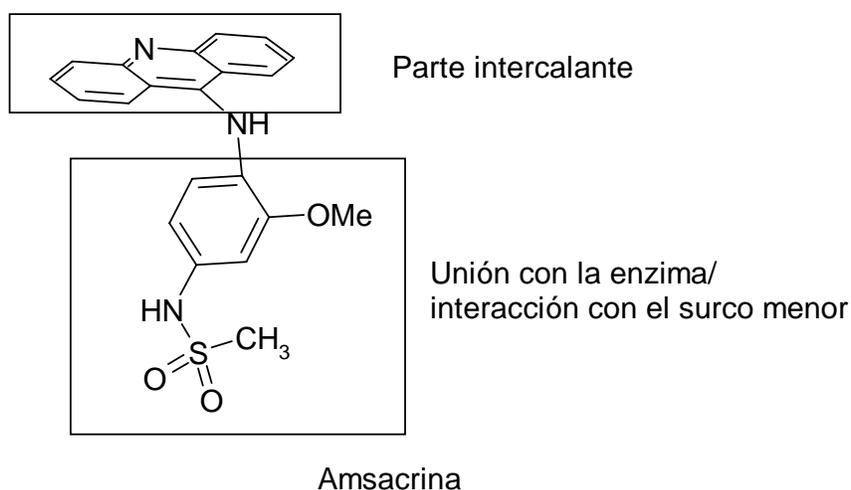
## 2.6 Acridinas.

Los agentes terapéuticos basados en el núcleo de acridina fueron inicialmente utilizados como antimaláricos como es el caso de la azacrina y como antibióticos como la aminacrina. El primer derivado de acridina utilizado en el tratamiento del cáncer fue la amsacrina (m-AMSA), un miembro de la familia de las 9-anilinoacridinas utilizado en el tratamiento de la leucemia.

Los derivados de acridina se han usado como antitumorales debido a su capacidad intercalante y a su afinidad por el ADN. Como ya se mencionó, la intercalación es

necesaria pero no es suficiente para la acción antitumoral. La citotoxicidad de estos compuestos ha sido asociada a la inhibición de las topoisomerasas y las telomerasas. Los derivados de acridina han sido utilizados como modelos para el diseño de nuevos fármacos antitumorales debido a la efectividad que han mostrado en el tratamiento de esta enfermedad. Uno de los derivados de 9-aminoacridina más conocido es el antes mencionado m-AMSA.

El mecanismo de acción de m-AMSA es la formación de un complejo terciario con ADN y topoisomerasa II como ya se ha descrito anteriormente. Se ha postulado que la estructura del farmacóforo para los agentes intercalantes como la amsacrina puede considerarse de la siguiente forma: un sistema planar que se intercala con el ADN y una cadena lateral que interactúa con el surco menor y con la enzima ADN topoisomerasa II.<sup>11, 15, 16, 17, 18</sup>



**Figura 11. Farmacóforo postulado para los agentes intercalantes estabilizadores del complejo ADN-topoisomerasa II**

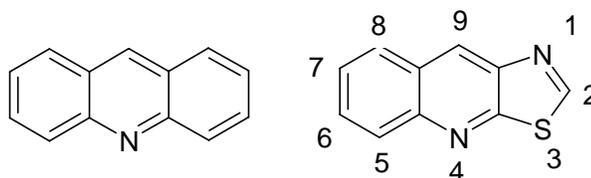
## 2.7 Isosterismo y bioisosterismo

En un principio, el isosterismo era en un concepto puramente químico, se decía que eran isómeros aquellos átomos o moléculas que presentaran distribución electrónica similar ya que esto conduce a propiedades químicas y físicas similares en ambas especies, así pueden observarse las similitudes en las propiedades fisicoquímicas (densidad, constante

dieléctrica, solubilidad) entre el nitrógeno molecular y el monóxido de carbono, en donde estas similitudes pueden atribuirse a que se trata de moléculas con el mismo número de átomos y de electrones de valencia. Erlenmeyer propuso extender el concepto de isosterismo para incluir a aquellas especies que son idénticos en su capa electrónica externa y también a aquellas especies que son aparentemente muy distintas pero que tienen en la práctica propiedades físicas similares. Pensando en la utilización del isosterismo como un criterio para la preparación de análogos en el diseño de fármacos, Friedman propuso llamar bioisósteros a aquellos compuestos que “cumplan alguna de las definiciones de isosterismo y posean el mismo tipo de actividad biológica”. De forma más concreta, Thornber propuso definir los bioisósteros como “grupos o moléculas que tienen propiedades físicas y químicas semejantes y que producen efectos fisiológicos aproximadamente similares”.<sup>11</sup>

## 2.8 Tiazolo[5,4-b]quinolinas

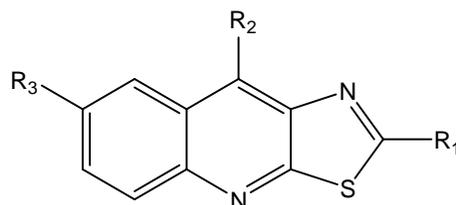
Los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas son isósteros del núcleo de acridina, se trata también de sistemas tricíclicos en los cuales, un anillo de benceno ha sido sustituido por un anillo de tiazol. Estos derivados ya han sido reportados anteriormente en la literatura aunque no con mucha frecuencia. En algunos trabajos se han reportado como potenciales antiespasmódicos y antiinflamatorios.



**Figura 12. Semejanza estructural entre el núcleo de acridina y el de tiazolo[5,4-b]quinolina**

En 1997 Alvarez-Ibarra reporta por primera vez los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina como potenciales antitumorales.<sup>24</sup> En dicho trabajo se realizan modificaciones en los patrones de sustitución del núcleo tiazoloquinolina, dentro de las cuales está la incorporación de un átomo de flúor en la posición 7 del núcleo. Se determinó la actividad citotóxica de estos compuestos en tres líneas celulares; P-388 (neoplasma linfático murino), A-549 (carcinoma de pulmón) y HT-29 (tumor de colon humano), los resultados se ilustran en la siguiente tabla.

**Tabla 1. Actividad biológica de Tiazolo[5,4-b]quinolinas reportados por Alvarez-Ibarra.**



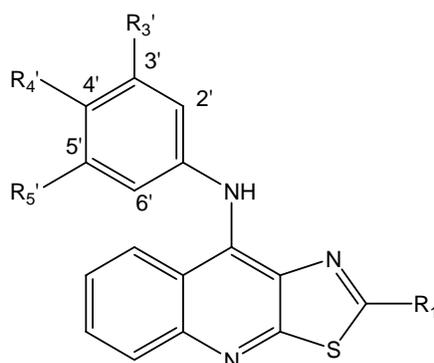
Compuesto	Sustituyentes			Actividad biológica $Cl_{50}$ ( $\mu$ M)		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Línea celular P-388	Línea celular A-549	Línea celular HT-29
<b>A</b>	SO <sub>2</sub> Me	OH	H	32.4	32.4	32.4
<b>B</b>	SO <sub>2</sub> Me	OH	Me	>60.4	>60.4	>60.4
<b>C</b>	SO <sub>2</sub> Me	OH	F	6	6	6
<b>D</b>	$\alpha$	OH	H	5.76	7.22	7.22
<b>E</b>	$\alpha$	OH	Me	3.3	5.6	3.3
<b>F</b>	$\alpha$	OH	F	1.65	2.9	5
<b>G</b>	SMe	$\beta$	H	6	6	6
<b>H</b>	SMe	$\beta$	Me	5.4	5.4	5.4
<b>I</b>	SMe	$\gamma$	H	12.1	12.1	12.1

$\alpha$  = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>,  $\beta$  = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub>,  $\gamma$  = MeN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NMe<sub>2</sub>,  $Cl_{50}$  = Concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular.

En este trabajo puede observarse que la presencia del átomo de flúor en la posición 7 del núcleo mejora la actividad biológica del compuesto si se compara con los análogos que tienen H o Me en la misma posición.

Una nueva familia de derivados de 9-anilino[5,4-b]quinolinas fue sintetizada y evaluada su actividad biológica por Lira-Rocha y colaboradores.<sup>25-28</sup> En estos derivados se incorpora un grupo tiometilo o bien grupos alquilamino en la posición 2 del sistema tricíclico. El grupo anilino incorporado en la posición 9 del núcleo de tiazoloquinolina presenta distintos patrones de sustitución. La actividad biológica fue evaluada en las siguientes líneas celulares: dos líneas celulares cervicales (Hela y C-33), dos líneas celulares de cáncer colorectal (SW480 y SW620) y una línea celular de leucemia mielogénica (K-562). Los resultados reportados en dicho trabajo se muestran a continuación:

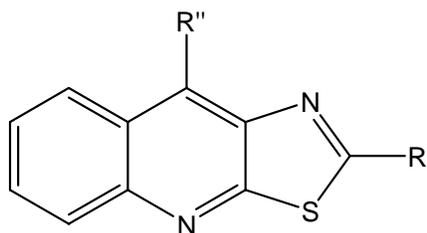
**Tabla 2. Datos de actividad citotóxica de derivados de 9-anilino[5,4-b]quinolinas.**



Compuesto	Sustituyentes.				Actividad biológica. Cl <sub>50</sub> (μM) en líneas celulares.				
	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Hela	C-33	SW480	SW620	K-562
1	SCH <sub>3</sub>	H	H	H	>200	153.7	>200	>200	>200
2	SCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	176.5	138.8	>200	>200	143.4
3	SCH <sub>3</sub>	NHAc	H	H	>200	>200	>200	153.9	85.3

4	SCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	>200	>200	>200	183.9	143.4
5	SCH <sub>3</sub>	Cl	H	H	69.4	129.3	110.7	129.7	80.3
6	SCH <sub>3</sub>	CN	H	H	7.8	15.0	28.7	43.8	8.0
7	SCH <sub>3</sub>	OMe	H	H	25.3	75.4	66.7	26.6	22.2
8	SCH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	H	H	43.3	59.7	65.1	62.3	67.1
9	SCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	H	H	152.2	>200	>200	160.82	>200
10	SCH <sub>3</sub>	OH	H	H	>200	146.1	146.9	146.3	173.3
11	SCH <sub>3</sub>	NHMe	H	H	46.22	133.9	101.4	118.7	46.9
12	SCH <sub>3</sub>	X	H	H	21.7	19.9	13.6	19.7	12.5
13	SCH <sub>3</sub>	H	Cl	H	123.8	>200	>200	145.9	79.5
14	SCH <sub>3</sub>	H	H	H	200	>200	>200	110.8	77.2
15	SCH <sub>3</sub>	H	H	H	140	>200	>200	>200	120
m- AMSA					9.5	8.8	27.7	16.7	19.9

*X = -(CO)EDA, EDA= 2-(N,N-dietilamino)etilamino, Cl<sub>50</sub>= concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular.*

**Tabla 3. Datos de actividad biológica citotóxica de alquilamino[5,4-b]quinolinas.**

Compuesto	Sustituyentes		Actividad biológica. Cl <sub>50</sub> (μM) en líneas celulares.				
	R'	R''	Hela	C-33	SW480	SW620	K-562
16	SCH <sub>3</sub>	EDA	12.9	9.6	27.9	16.8	7.8
17	EDA	Cl	12.9	9.4	19.5	15.2	9.3
18	EDA	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	15.9	22.4	37.7	21.6	16.8
m-AMSA			9.5	8.8	27.7	16.7	19.9

EDA= 2-((N,N-dietilamino)etilamino)

De estos resultados se encontró que los compuestos que presentan mayor actividad biológica son el 6, el cual tiene un grupo nitrilo en la posición 3' del anillo de anilina, y los compuestos 12, 16, 17 y 18 que tienen una cadena alquilamino en su estructura. En términos generales, se observa que los compuestos con mayor actividad biológica son aquellos que tienen sustituyentes en la posición 3' del anillo de anilina que los que lo tienen en posición 4'. Además aquellos compuestos que presentan una cadena alquilamino en su estructura presentan una mayor actividad que los que no la tienen.

En un trabajo de tesis posterior, en donde se sintetizaron y evaluaron en las mismas líneas celulares derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinolina con cadenas alquilamino en la posición 2 del sistema tricíclico, se encontró que contrario a los resultados del primer trabajo, la actividad citotóxica se veía favorecida por la presencia de sustituyentes en la posición 4' del anillo de anilina más que por la presencia de grupos en la posición 3' del mismo.<sup>29</sup>

En ambos trabajos se encontró que existe influencia en la actividad biológica del compuesto dependiendo de la naturaleza de los grupos sustituyentes en el anillo de anilina de la posición 9 del núcleo de tiazoloquinolina, encontrándose que en general la presencia de grupos electroattractores favorece la actividad citotóxica.

Basándose en estas observaciones, es interesante plantear un trabajo donde se estudie nuevamente la influencia sobre la actividad biológica de 9-anilino[5,4-b]quinolina de grupos sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo de anilina, tanto electroattractores como electrodonadores, así como también la influencia de las cadenas de alquilamino en la estructura pero en los cuales se ha incorporado un átomo de flúor en la posición 7 del sistema tricíclico, por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantea la síntesis y determinación de las propiedades intercalantes en ADN de derivados de 7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina en los cuales se proponen las siguientes variaciones estructurales: la incorporación del anillo de anilina en la posición 9 del núcleo de 7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina, la incorporación de un grupo OMe (electrodonador) o de un grupo CN (electrotractor) en las posiciones 3' o 4' del anillo de anilina y la incorporación de un grupo alquilamino en las posiciones 2 o 9 del sistema tricíclico.

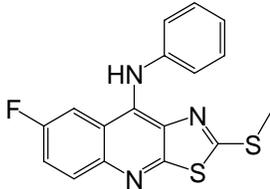
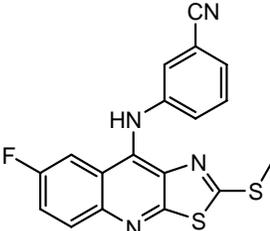
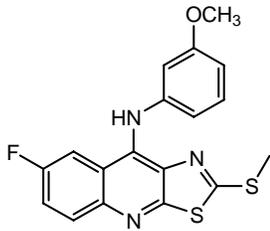
### 3. Objetivos

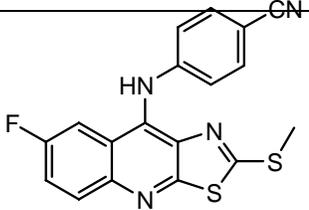
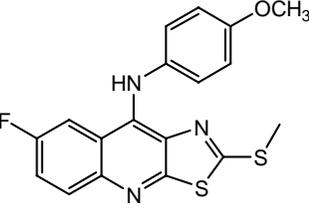
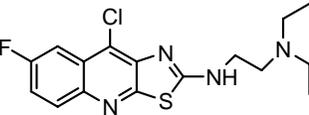
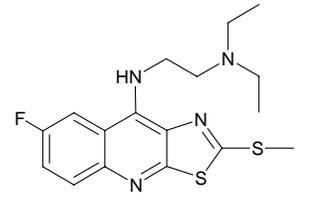
#### 3.1 Objetivo general.

Sintetizar, caracterizar y determinar las propiedades intercalantes en ADN de derivados de 7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolinas como posibles agentes antitumorales.

#### 3.2 Objetivos particulares.

1. Realizar la síntesis de los siguientes compuestos.

No. de compuesto	Estructura	Nombre
V		9-anilino-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina
VI		9-[(3-ciano)fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina
VII		9-[(3-metoxi)fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina

VIII		9-[[4-ciano]fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina
IX		9-[[4-metoxi]fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina
X		9-Cloro-2-[[2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etil]amino]-7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina
XIV		9-[[2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina

2. Caracterizar los derivados obtenidos con base a sus constantes físicas y espectroscópicas.

Determinar las propiedades intercalantes al ADN de los derivados sintetizados por el método de desplazamiento de bromuro de etidio.

## 4. Esquema general de síntesis.

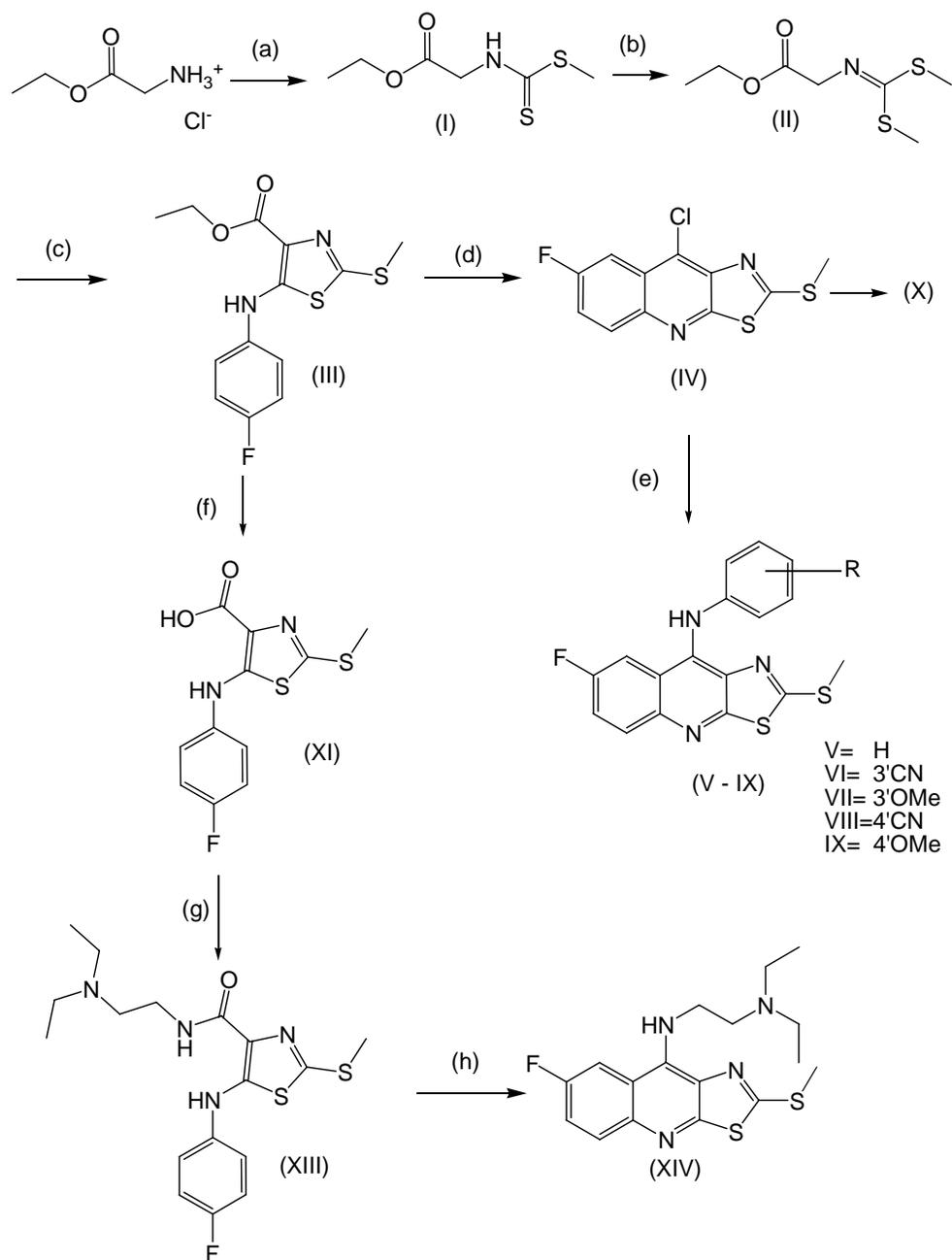
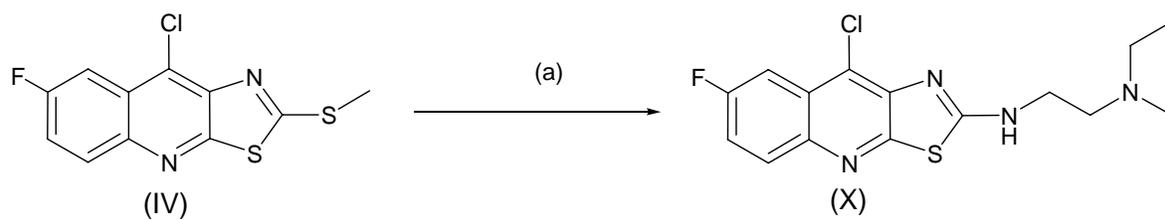


Figura 13. Esquema general de síntesis.

- (a) 1.  $\text{CS}_2/\text{NaOH}$  2.  $\text{CH}_3\text{I}$ .<sup>24-29</sup> (b)  $\text{CH}_3\text{I}/\text{K}_2\text{CO}_3$ .<sup>24-29</sup>  
(c) 1.  $\text{tBuO}^-\text{K}^+/\text{THF}$  anh./  $-75^\circ\text{C}$  2.  $\text{F}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NCS}$ . 16hrs.<sup>24</sup>  
(d)  $\text{PPA}/\text{POCl}_3/145-150^\circ\text{C}/4\text{hr}$ .<sup>24-29</sup>  
(e)  $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2/\text{EtOH}$   
(f)  $\text{KOH}/\text{EtOH}$ , reflujo 30 min  
(g) 1. 1,1'-carbonildiimidazol/ $\text{THF}$ , reflujo, 1hr 2.  $N,N$ -diétiletilendiamina/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , reflujo, 3hrs  
(h)  $\text{POCl}_3/\text{PPA}/120^\circ\text{C}/30\text{ min}$ <sup>28</sup>

Continuación



(a) N,N-dietiletilendiamina/Benceno, Temperatura ambiente, 4 hrs

## 6. Parte experimental

### 6.1 Parte Química.

#### 6.1.1 Reactivos y equipo

Todas las materias primas utilizadas en las síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi modelo RE 111. Para la destilación a presión reducida se ocupó una bomba para vacío marca FELISA modelo FE-1405 con capacidad máxima de 0.1 mm Hg.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Nicolet FT5SX en pastilla de KBr a menos que se indique otra cosa. Las unidades se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (300 MHz). Los desplazamientos químicos están dados en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, c= señal cuádruple, sa= señal simple ancha, ta= señal triple ancha, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, dt= señal doble de triple, m= señal múltiple. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Los espectros de masas se determinaron por IE en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA, y por IQ y FAB en un espectrómetro de masas JEOL Sx102, empleando en FAB alcohol 3-nitro bencílico como matriz. El ion molecular se indica como  $\text{M}^+$ . La nomenclatura se indica como  $m/z$ = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.

#### 6.1.2 Cromatografía

Para las cromatografías en columna se empleó gel de sílice Merck 60 malla 70-230. Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas Sigma-Aldrich de vidrio recubiertas con gel de sílice con

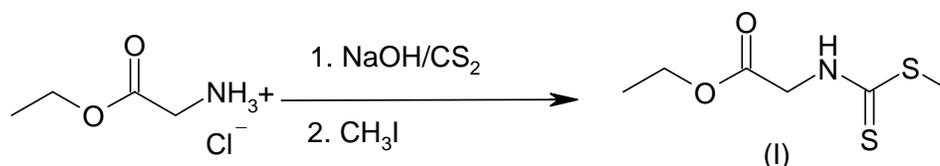
un espesor de 0.25 mm, tamaño de partícula de 0.017mm y con indicador para luz UV. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y exposición a vapores de yodo.

**Tabla 11. Sistemas de elución empleados.**

Sistema	Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano/Acetato de etilo	8:2
II	Hexano/Acetato de etilo	7:3
III	Diclorometano/Metanol	9:1
IV	Diclorometano/Metanol/NH <sub>4</sub> OH	9:1:0.1

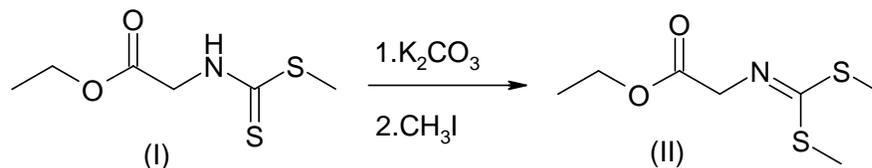
### 6.1.3 Descripción de las síntesis

#### 6.1.3.1 N –((Etoxicarbonil)metil)ditiocarbamato de metilo (I)



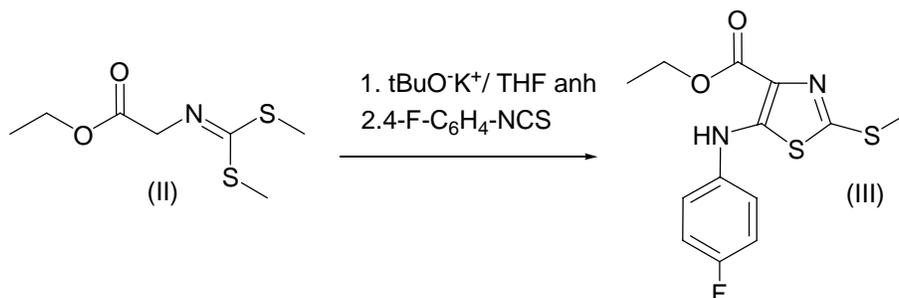
En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición, se mezclaron 300 mL de dimetilsulfóxido y 83.76 g del diclorhidrato de glicinato de etilo (0.6 moles). La suspensión se agitó vigorosamente a temperatura ambiente hasta disolución total. A esta solución se le adicionaron lentamente 36 mL de una solución 20 M de hidróxido de sodio, manteniendo la temperatura a 20° C. Terminada la adición se agregaron lentamente 48 mL de disulfuro de carbono (0.78 moles), manteniendo la temperatura entre 15 y 20° C. Se mantuvo en agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La solución naranja se enfrió a 0° C y se adicionaron lentamente 48 mL de yoduro de metilo (0.78 moles), manteniendo la temperatura de reacción a 0° C. Terminada la adición se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó agitando por 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre 3000 mL de una mezcla de hielo-agua con agitación constante. El precipitado formado se aisló y secó por filtración. Se obtuvieron 44.38 g (38.31%) de un precipitado ligeramente amarillo (Lit. 51%) con un Rf de 0.30 (sistema I)

### 6.1.3.2 N-((Etoxicarbonil)metil)iminoditiocarbamato de dimetilo (II)



En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición se mezclaron 44.38 g del crudo del compuesto I (aproximadamente 0.231 moles), en 123.8 ml de dimetilsulfóxido, a la solución amarilla resultante se le agregó lentamente, una solución de 49.5 g de carbonato de potasio en 39 mL de agua, manteniendo la temperatura en 20° C, formándose una suspensión color rojo pardo. Terminada la adición la suspensión se enfrió a 0° C y se adicionaron lentamente 20 mL de yoduro de metilo (0.32 moles), manteniendo la temperatura en 0° C y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió lentamente sobre 1000 mL de agua con agitación. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (4 x 400 mL). Los extractos orgánicos se trataron con sulfato de sodio anhidro y se eliminó por evaporación el acetato de etilo obteniéndose un aceite oscuro. Este aceite se purificó por destilación a presión reducida, colectando la fracción que destiló entre 145-160 °C. Se obtuvieron 44.53 g (96.04%) de un aceite ligeramente amarillo que se oscurece con la exposición a la luz (Lit. 98%<sup>24</sup>) con un R<sub>f</sub> de 0.4 (sistema II)

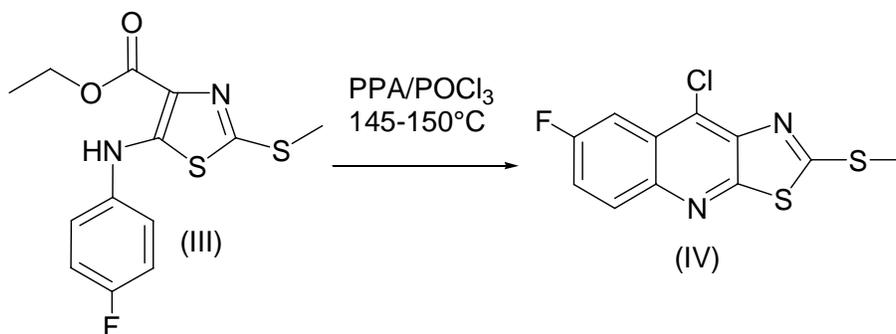
### 6.1.3.3 4-(Etoxicarbonil)-5-(4-fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (III)



En un matraz de tres bocas, tipo europeo, acondicionado con termómetro para bajas temperaturas, embudo de adición, condiciones anhidras y atmósfera de argón, se

mezclaron 6.34 g de *tert*-butóxido de potasio (56.60 mmoles) en 200 mL de tetrahidrofurano anhidro. La suspensión formada se enfrió a  $-75^{\circ}\text{C}$  mediante un baño de hielo seco-acetona. Al embudo de adición se transfirió mediante una cánula una solución de 8 g del compuesto II (38.64 mmoles) en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, la cual se adicionó por goteo a la suspensión de *tert*-butóxido de potasio, manteniendo la temperatura en  $-75^{\circ}\text{C}$ . Terminada la adición, la solución amarillo-naranja resultante se dejó agitar durante 90 minutos a la misma temperatura. A continuación se transfirió al embudo de adición una solución de 5.9 g de 4-fluorofenilisotiocianato (38.64 mmoles) en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro y se adicionó por goteo, cuidando que la temperatura se mantuviera en  $-75^{\circ}\text{C}$ . Se dejó agitar durante 45 minutos más y se retiró el sistema de enfriamiento. Cuando la temperatura se acercó a  $-10^{\circ}\text{C}$  se formó un precipitado amarillo. La suspensión formada se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la suspensión amarilla se vertió lentamente en 1600 mL de agua con agitación constante, formándose un precipitado blanco el cual se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 10.89 g (90.6 %) del compuesto III con un punto de fusión de  $75^{\circ}\text{C}$  y un  $R_f$  de 0.57 (sistema I)

#### 1.1.3.4 9-Cloro-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IV)



En un matraz de fondo redondo de 1 boca se colocaron 3.12 g (10 mmol) del compuesto III, se adicionaron 900 mg de ácido polifosfórico (7.6 mmol) y 3 mL de oxiclورو de fósforo (11.7 mmol). La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante a  $145-150^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Terminado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se obtiene un aceite color café al cual se le agregaron lentamente y en baño de

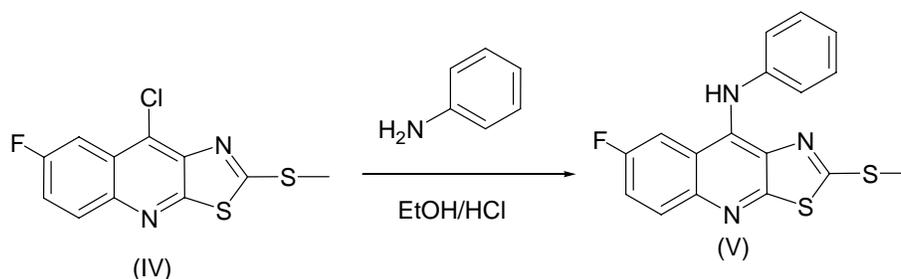
hielo 5 mL de etanol frío. Al disolverse el aceite precipitó un sólido color amarillo. La suspensión se vertió sobre 20 ml de agua, el precipitado resultante se separó por filtración. Posteriormente este sólido se suspendió en 5 ml de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con solución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado amarillo pálido se separó por filtración al vacío y secó por succión. El crudo se suspendió en metanol con agitación durante 5 minutos y se filtró para obtener 1 g (35%) del compuesto VII con un punto de fusión de 184- 186° C y un Rf de 0.65 (sistema II)

IR (pastilla, espectro 4): 1371 (C-S); 1628, 1586, 1549, 1494, 1453 (aromáticos).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 5): 2.89 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.53 (ddd, J=10.8, 7.8, 2.7 Hz) H-6; 7.97 (dd, J= 9.3, 5.1 Hz) H-5 8.09 (dd J= 9.6, 2.7 Hz) H-8.

EM (IE, espectro 6): 284 (M<sup>+</sup> , 100%)

#### 6.1.3.5 9-anilino-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (V)



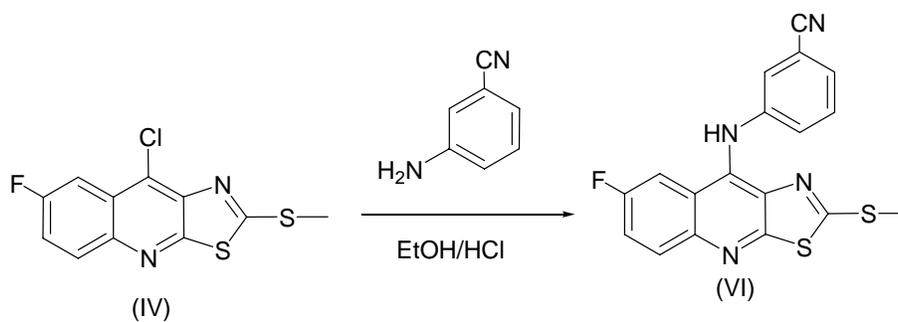
En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante y con atmósfera de nitrógeno se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 ml de etanol absoluto, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 0.4 mL (1.05 mmol) de anilina y se calentó la mezcla a reflujo durante 7 horas. Transcurrido ese tiempo la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío. Se resuspendió nuevamente el sólido en 10 mL de agua destilada y se llevó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío. El sólido se resuspendió en metanol, se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 138.7 mg (81.47%) de 9-anilino-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.58 (sistema II) y un punto de fusión de 187-190° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 7): 3423, 3208 (-NH-); 1624, 1597, 1580, 1545, 1525, 1493, 1448, 1401 (aromáticos).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 8): 2.335 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.155 (d, J= 7.6) H-2', H-6'; 7.329 (t, J= 15.6,8.0) H-3', H-5'; 7.094 (t, J= 7.6) H-4'; 7.992 (dd, J= 9.2,5.2) H-5; 7.713 (ddd, J= 10.8,9.6,2.8) H-6; 8.273 (dd, J= 11.2,2.4) H-8; 9.706 (s, intercambia con D<sub>2</sub>O) Ar-NH-Ar

EM (FAB, espectro 9): 342 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 341 (M<sup>+</sup>, 41.3%)

#### 6.1.3.6 7-fluoro-9-[[3-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VI)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 ml de etanol, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 126 mg (1.05 mmol) de 3-aminobenzonitrilo y se calentó la mezcla a reflujo durante 18 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua se separó por filtración al vacío. Se resuspendió nuevamente en 10 mL de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 153 mg (81.4%) de 7-fluoro-9-[[3-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un R<sub>f</sub> de 0.43 (sistema II) y un punto de fusión de 252-253° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

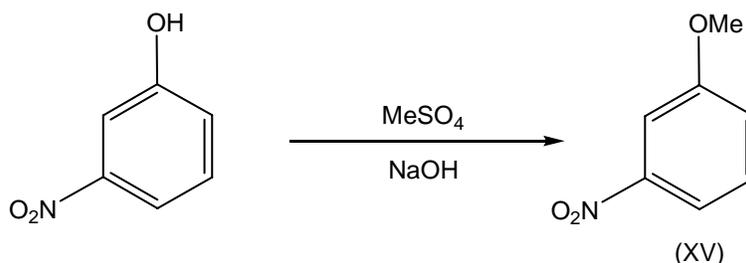
IR (pastilla, espectro 10): 3430 (-NH-); 1603, 1586, 1543, 1511, 1479, 1443(aromáticos); 2222 (-CN).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 11): 2.319 (s, 3H)  $\text{SCH}_3$ ; 7.650 (s) H-2'; 7.536 (sa, 3H) H-4', H-5', H-6'; 8.008 (dd,  $J=9.6,5.6$ ) H-5; 7.757 (ddd,  $J=9.2, 2.0$ ) H-6; 8.496 (dd,  $J=10.4,2.0$ ) H-8; 10.429 (s, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ) NHAr

EM (FAB, espectro 12): 367 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%), 366 ( $\text{M}^+$ , 17.4%)

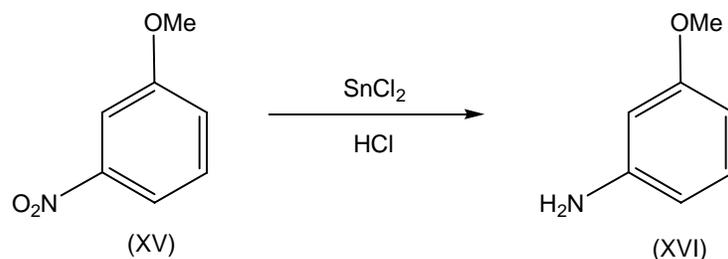
### 6.1.3.7 9-[[3-metoxi]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina

#### 6.1.3.7.1 3-nitroanisol (XV)



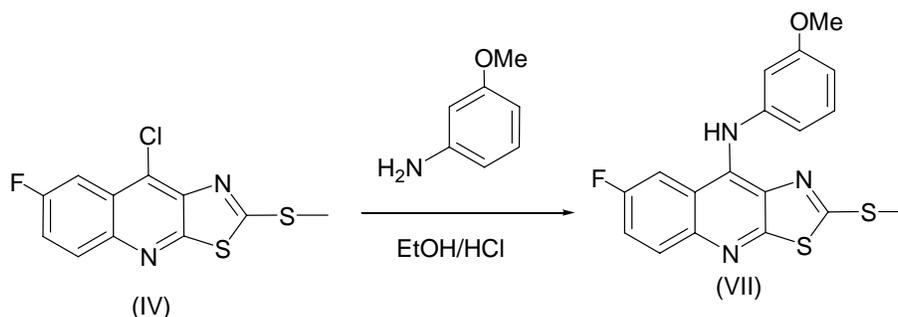
En un matraz de fondo redondo de una boca y con agitación magnética, se colocaron 10 g (0.072 moles) de 3-nitrofenol y se añadieron 30 ml de una solución de NaOH al 15% (0.1125 moles). La mezcla se agitó vigorosamente y se formó una solución de color rojo pardo. La solución se enfrió a  $10^\circ\text{C}$  y se añadieron por goteo 7.2 ml (0.076 moles) de sulfato de dimetilo cuidando que la temperatura se mantuviera en  $10^\circ\text{C}$ . Terminada la adición se dejó agitando a temperatura ambiente por 10 minutos, se adaptó un refrigerante y se calentó a reflujo por 2 horas. Durante los primeros 10 minutos la solución se fue aclarando hasta quedar de color café claro. Terminado el tiempo de reflujo se extrajo con acetato de etilo (4 x 20 ml), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con NaOH al 5% (4 x 10 ml) y agua destilada (3 x 15 ml). La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida, quedando un residuo color café que se recristalizó de hexano, obteniéndose 5.90 g (54%) de agujas blancas de 3-nitroanisol con un punto de fusión de  $38^\circ\text{C}$  (Lit  $38-39^\circ\text{C}$ ) y un  $R_f$  de 0.46 (sistema II)

## 6.1.3.7.2 3-aminoanisol (XVI)



En un vaso de precipitados con agitación magnética puesto en un baño de hielo-agua, se colocaron 30 ml de HCl concentrado y se añadieron lentamente 7.2 g (30 mmol) de cloruro estanoso. A la suspensión blanca formada, se le añadió lentamente 1.00 g (7.2 mmol) de 3-nitroanisol, terminada la adición se dejó en agitación por 10 minutos, se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó agitando por 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión ligeramente amarilla se ajustó a pH 14 con una solución de NaOH al 50% quedando una solución blanca que se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con agua destilada, hasta que las aguas de lavado fueran neutras. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida, quedando 700 mg (87%) de un aceite amarillo que mostró una sola mancha en cromatografía de capa fina con un Rf de 0.30 (sistema II)

## 6.1.3.7.2 9-[[3-metoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 143 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 148.8 mg (1.2 mmol) de 3-aminoanisol y se calentó la mezcla a reflujo durante

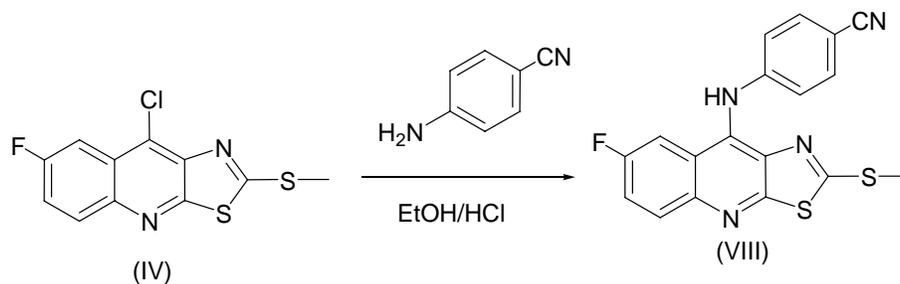
16 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, el sólido amarillo resultante se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10 mL de H<sub>2</sub>O y se llevó a pH= 10 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo limón, el cual se resuspendió en diclorometano, se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 130.9 mg (70.07%) de 7-fluoro-9-[[3-(3-metoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un R<sub>f</sub> de 0.53 (sistema II) y un punto de fusión de 193-195° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 13): 3424 (-NH-); 1599, 1578, 1549, 1510, 1486, 1438 (aromáticos); 3028 (-OCH<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 14): 2.359 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 3.71 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.74 (m, 3H) H-2', H-4', H-6'; 7.25 (dd, J= 8.7,8.7 Hz) H-5'; 7.75 (ddd, J= 10.5,7.8,2.7) H-6; 7.97 (dd, J= 9.3,5.1) H-5; 8.27 (dd, J= 10.8,2.7) H-8; 10.13 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (IE, espectro 15): 372 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 371 (M<sup>+</sup>, 17.4%)

#### 6.1.3.8 7-fluoro-9-[[4-(4-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VIII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol y se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 126 mg (1.05 mmol) de 4-aminobenzonitrilo y se calentó la mezcla a reflujo durante 27 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10 mL de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío, posteriormente este sólido se resuspendió en diclorometano y se separó y secó por succión

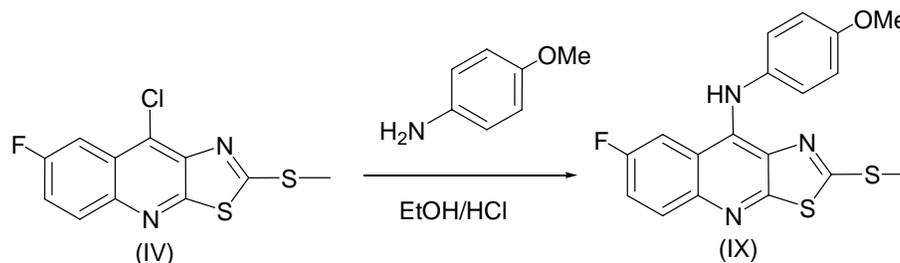
para obtener 111.0 mg (75.05%) de 7-fluoro-9-[[4-ciano]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.38 (sistema II) y un punto de fusión de 235-238° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 16): 3422 (-NH-); 1600, 1575, 1534, 1511, 1496, 1474, 1437 (aromáticos); 2220 (-CN).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 17): 2.49 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.2 (d, J=8.1) H-2', H-6'; 7.66 (d, J=8.1) H-3', H-5'; 7.72 (dd, J= 9.0,7.5), H-6; 8.07 (dd, J=9.6), H-5; 8.15 (d, J=9), H-8; 9.90 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (FAB, espectro 18): 367 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 366 (M<sup>+</sup>, 28.4%)

#### 6.1.3.9 9-[[4-metoxi]fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IX)



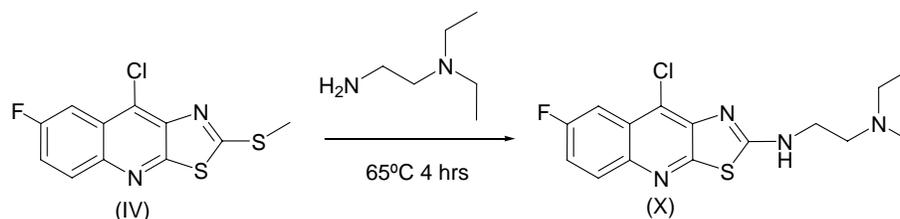
En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 143 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol y se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 80 mg (0.65 mmol) de 4-aminoanisol y se calentó la mezcla a reflujo durante 20 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10 mL de agua destilada y se llevó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo limón que se filtró al vacío, se lavó con cloroformo y se secó por succión para obtener 133.93 mg (72.3%) de 7-fluoro-9-[[4-metoxi]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.5 (sistema II) y un punto de fusión de 203-205° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 19): 3444, 3204 (-NH-); 1602, 1577, 1545, 1504, 1472, 1444 (aromáticos); 3026 (-OCH<sub>3</sub>).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 20): 2.30 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 3.77 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.96 (d, J= 8.8), H-3', H-5'; 7.22 (d, J= 8.8), H-2', H-6'; 7.78 (ddd, J= 9.2,8.0,2.8) H-6; 7.989 (dd, J= 9.2, 5.6) H-5; 8.413 (dd, J= 11.2, 2.4) H-8; 10.11 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (FAB, espectro 21): 372 ( $M^+ + 1$ , 100%), 371 ( $M^+$ , 26.1%)

#### 6.1.3.10 9-Cloro-7-Fluoro-2-[[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]tiazolo [5,4-*b*]quinolina (X)



En un matraz de una boca acondicionado con refrigerante y bajo atmósfera de argón, se colocaron 150 mg del compuesto IV (0.53 mmol), 0.3 mL (4.5 mmol) de *N,N*-dietiletilendiamina y 1 mL de benceno, la mezcla se colocó en baño María y se agitó manteniendo la temperatura del baño en 60°C durante 4 horas. Durante el transcurso de la reacción se apreció el desprendimiento de un olor desagradable. A la solución café resultante se agregaron 30 mL de diclorometano (3 x 10 mL). La solución orgánica se lavó con agua destilada (3 x 5 mL) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 5 mL) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida, obteniéndose un sólido de color blanco de consistencia ligeramente pastosa, el cual se resuspendió en metanol, se separó y se secó por succión obteniéndose 78.1 mg de un sólido color blanco (42.23%) de 7-fluoro-9-cloro-2-[[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]tiazolo[5,4-*b*]quinolina con un punto de fusión de 138-140° C y un R<sub>f</sub> de 0.44 (sistema V) determinándose sus constantes espectroscópicas:

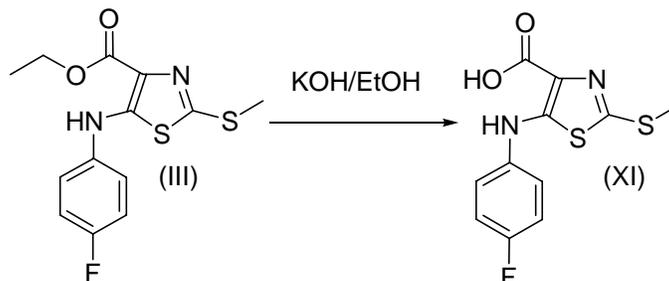
IR (pastilla, espectro 22): 3425 (-NH-); 2965, 1392 (-CH<sub>3</sub>); 1615, 1564, 1495, 1445, 1424 (aromáticos).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 23): 1.06 (t, J= 6.9, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.53 (q, J=7.2, 4H) 2-CH<sub>2</sub>-; 2.65 (t, J= 7.2,2H) -CH<sub>2</sub>-; 3.64 (sa, 2H) -N-CH<sub>2</sub>-; (dd, J= 9.9,2.1Hz) H-8; 7.98 (dd, J= 9.0,5.7) H-5; 7.54 (ddd, J=9.0,8.4,2.4) H-6; 8.91 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr.

EM (FAB, espectro 24) 353 ( $M^+ + 1$ , 100%)

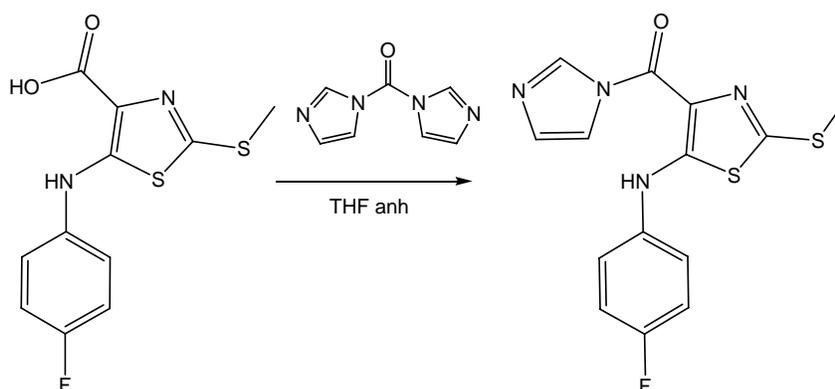
6.1.3.11 9-[[2-(*N,N*-dietilamino)]etil]amino]-2-(metiltio)-tiazolo[5,4-*b*]quinolina (XIV)

## 6.1.3.11.1 4-Carboxi-5-(fenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XI)



En un matraz de fondo redondo de dos bocas, acondicionado con termómetro y agitación magnética, se disolvieron 4.00 g del compuesto III (13.6 mmoles) por agitación en 40 ml de etanol absoluto. A la solución se le agregó una solución de 2.45 g de hidróxido de potasio en 3.5 ml de agua y se calentó en baño María a reflujo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió sobre 500 ml de agua-hielo. Se acidificó con ácido clorhídrico al 10% hasta pH aproximadamente 5. El precipitado blanco formado se separó por filtración al vacío y se dejó secando por succión para obtener 2.87g (78.82%) de un sólido rosa claro con un Rf de 0.29 (sistema III)

## 6.1.3.11.2 4-(1H-imidazol-1-il)carbonil-5-(4-fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XII)



En un matraz acondicionado con refrigerante, condiciones anhidras y trampa de cloruro de calcio, se colocaron 684 mg de 1,1'-carbonildiimidazol (4.20 mmol) y se suspendieron en 5 ml de tetrahidrofurano anhidro. La suspensión blanca se enfrió en baño

de hielo-agua a 5° C y se agregaron 532 mg del compuesto IV (1.873 mmol). Se observó la formación de una solución color ámbar y la evolución de dióxido de carbono. Se retiró el sistema de enfriamiento, se cambió por un baño María, se calentó a reflujo por 1 hora. Transcurrido este tiempo se agregaron 25 ml de diclorometano y la solución orgánica se lavó con bicarbonato de sodio al 10% (3 x 10 ml), agua destilada (3 x 10 ml) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 10 ml) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida obteniéndose 295 mg (88.3%) de un sólido color amarillo intenso con un punto de fusión de 38°C y un Rf de 0.50 (sistema III), sus constantes espectroscópicas son:

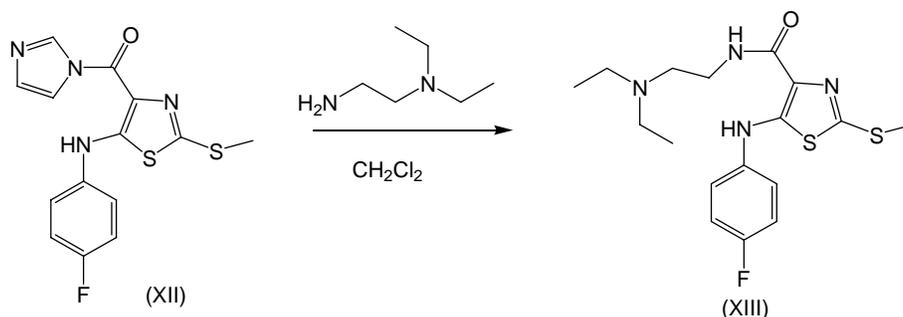
IR (pastilla, espectro 25): 3209, 3154, 3062 (NC=O); 1620 (C=O); 1604, 1554, 1509, 1420 (aromáticos).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 26): 2.71 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.13 (d, J= 8.1,2.1) H-2', H-6'; 7.14 (s, 1H) H-4''; 7.28 (ddd, J=9.0,3.6,2.1) H-3'; 8.04 (s, 1H) H-2''; 9.12 (s, 1H) H-5''; 10.5 (s, 1H, intercambia lentamente con D<sub>2</sub>O) N-H.

EM (FAB, espectro 27): 335 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

#### 6.1.3.11.3 4-[[2-(N,N-dietilamino)etil]carbamoil]-5-(4-

#### fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XIII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante y trampa de cloruro de calcio se suspendieron 382 mg (1mmol) del compuesto XII en 5 mL de diclorometano y se añadió una solución de 0.3 mL (3 mmol) de *N,N*-diétilendiamina en 2 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se agregaron 20 mL de diclorometano y la solución orgánica se lavó con agua destilada (3 x 10 mL) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 10 mL) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida

obteniéndose un sólido ligeramente amarillo, el cual se resuspende en benceno y se separa por filtración al vacío para obtener 344 mg (90.12%) de un sólido blanco con punto de fusión de 40°C y un R<sub>f</sub> de 0.50 (sistema III), sus constantes espectroscópicas son:

IR (pastilla, espectro 28): 3410 (-NH-); 3117, 3067 (NC=O); 2962 (-CH<sub>3</sub>); 1775, 1666 (C=O); 1555, 1508, 1451 (aromáticos)

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 29): 1.05 (t, J=7.2, 6H, 2 -CH<sub>3</sub>), 2.62 (q J=7.2, 4H, 2 -CH<sub>2</sub>), 2.7 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.76 (t, J=7.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.64 (t, J=7.5 2H, CH<sub>2</sub>), 7.24 (td, J=8.1, 2.1, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (ddd, J= 9.0, 3.6, 2.1, 2H, H-3', H-5')

EM (FAB, espectro 30) 383 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

## 6.2 Pruebas de intercalación en ADN

Las soluciones de los compuestos a evaluar fueron preparadas en DMSO. En todos los casos se pesó el compuesto en una balanza analítica Satorius Handy H51 y se disolvió directamente en 5 mL de DMSO. A continuación se muestra una tabla con los pesos de los compuestos y la concentración de cada solución patrón:

**Tabla 12. Soluciones patrón de los compuestos.**

Compuesto	Peso (mg)	Conc. (mg/mL)
V	2.1	0.42
VI	2.3	0.46
VII	2.2	0.44
VIII	2.3	0.46
IX	2.2	0.44
X	2.2	0.44
AHMA	2.1	0.42

El compuesto AHMA se utilizó como control debido a que se trata de una agente intercalante muy efectivo y reportado anteriormente en literatura.

Se prepararon las siguientes soluciones para los ensayos:

### 6.2.1 Buffer Tris-HCl 0.1M, pH= 7.4

Se pesaron 6.057 g (0.05mol) de Tris y se disolvieron en 490 mL de agua desionizada y filtrada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl concentrado utilizando un potenciómetro. Se transfirió la solución a un matríz volumétrico de 500 mL y se ajustó el

volumen con agua desionizada filtrada. El buffer se transfirió a 5 frascos con 100 mL cada uno y se esterilizó en una autoclave durante 15 min a 15 lb de presión y 121°C. El buffer se utilizó en la preparación de la solución de ADN.

### **6.2.2 Buffer Tris-HCl 0.4M, pH= 7.4**

Se pesaron 2.423 g (0.02mol) de Tris y se disolvieron en 40 mL de agua desionizada y filtrada, se ajustó el pH a 7.4 con HCl concentrado utilizando un potenciómetro. Se transfirió la solución a un matraz volumétrico de 50 mL y se ajustó el volumen con agua desionizada filtrada. El buffer se utilizó en los ensayos de desplazamiento de bromuro de etidio.

### **6.2.3 Solución de ADN 300 µg/mL**

Se pesó una fibra de ADN de alto peso molecular con ayuda de pinzas flameadas con etanol. A partir de este punto todo el manejo del ADN se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Los viales y el agua utilizados en la preparación de esta solución fueron previamente esterilizados en autoclave a 15lb de presión y 121°C durante 15min.

La fibra se colocó dentro de un vial estéril y se le agregaron 15 mL del buffer Tris-HCl 0.1M pH= 7.4 estéril, el vial se cerró y se dejó en el refrigerador durante toda la noche para permitir la hidratación del ADN.

Se realizó la diálisis de la solución de ADN colocando la solución de ADN dentro de una bolsa de diálisis de tamaño adecuado dejando algo de aire dentro de la misma, la bolsa cerrada se colocó dentro de un vaso de precipitados con agitación magnética y agua estéril suficiente para cubrir la bolsa de diálisis, se dejó en agitación durante dos horas. Transcurrido ese tiempo el agua se cambió por Buffer Tris-HCl 0.1M pH=7.4 estéril y se mantuvo en agitación en un cuarto frío durante toda la noche. Se transfirió la solución de ADN a una caja petri estéril asegurando que no quedara solución en la bolsa de diálisis.

Se realizó la cuantificación de la solución de ADN por espectroscopía UV registrando la absorbencia a una longitud de onda de 260 nm. La concentración de la solución fue de 1.756 mg/mL. De la caja se tomaron alícuotas de 685 µL y se transfirieron a frascos viales con tapón de rosca estériles con capacidad de 5 mL. A partir de este punto el manejo del ADN ya no se realizó bajo condiciones de esterilidad. Los viales se

almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para su utilización las soluciones de ADN se descongelaron y se le agregó a cada frasco a utilizar una alícuota de  $3315\ \mu\text{L}$  de agua desionizada para completar un volumen final de  $4\text{mL}$  de la solución y obtener una concentración aproximada de  $300\ \mu\text{M}$  de ADN.

#### **6.2.4 Solución 0.72 mM de Bromuro de Etidio**

Se pesaron  $40\ \text{mg}$  de bromuro de etidio ( $0.1\text{mmol}$ ) y se disolvieron en  $1\ \text{mL}$  de DMSO. La solución se filtró a través de un filtro Millipore, previamente esterilizado en autoclave. Para conocer la concentración de la solución se realizó una cuantificación por espectroscopia UV/vis, para lo cual se tomaron  $20\ \mu\text{L}$  de la solución y se llevó al aforo con agua en un matraz volumétrico de  $50\ \text{mL}$ . Se realizó un barrido del espectro de absorción de  $200$  a  $500\ \text{nm}$  y se determinó la absorbencia a  $285\ \text{nm}$  con lo cual se calculó la concentración del bromuro de etidio. La concentración de la solución fue de  $72\ \text{mM}$ . Finalmente se preparó una solución poniendo  $5\ \mu\text{L}$  de la solución anterior en un volumen final de  $0.5\ \text{mL}$ .

La determinación de las propiedades intercalantes en ADN fue realizada a través del ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio en ADN<sup>10</sup>. Todas las determinaciones se realizaron en celdas de cuarzo de  $10\ \text{mm}$  ( $3\ \text{mL}$ ) de longitud. El equipo utilizado fue un espectrofluorómetro marca Shimadzu, modelo RF5000U con lámpara de Xenón. Los parámetros utilizados durante las determinaciones fueron los siguientes:

- Modo de barrido: Tiempo.
- Longitudes de onda: Excitación  $546\ \text{nm}$ ; Emisión  $584\ \text{nm}$ .
- Anchos de banda: Excitación  $3\ \text{nm}$ ; Emisión  $5\ \text{nm}$ .
- Sensibilidad: Alta.
- Resolución: Fina.

#### **6.2.5 Preparación de los ensayos.**

Las concentraciones de los reactivos durante los ensayos fueron las siguientes:

**Tabla 13. Preparación de los ensayos.**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final aproximada
Sol. Patrón de ADN (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	300	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Tris- HCl (0.4M)	750	0.1 M
Bromuro de etidio (0.72mM)	20	5 $\mu\text{M}$
Agua desionizada	1630	---

*El volumen final de cada ensayo fue de 2.7 mL antes de la adición de las soluciones de los compuestos. El volumen al final de cada prueba fue de aproximadamente 3 mL.*

Previo a las determinaciones se permitió la homogeneización de la mezcla durante unos segundos mediante agitación magnética. Posteriormente se inició la lectura de fluorescencia y cada 30 segundos se agregaron alícuotas de la solución stock del compuesto a evaluar de la siguiente manera:

**Tabla 14. Adición y volumen de las alícuotas**

Tiempo(seg)	Vol( $\mu\text{L}$ )
0	0
30	10
60	10
90	10
120	20
150	20
180	20
210	30
240	30
270	30
300*	50
330*	50

*\*Compuesto X y AHMA.*

Todos los compuestos excepto el X y AHMA presentaron problemas de solubilidad, por lo cual sólo se realizó la prueba hasta la adición de 180  $\mu\text{L}$  (270 seg) de la solución stock del compuesto. Después de este punto, los registros de fluorescencia no son confiables debido la interferencia de las partículas suspendidas. Para cada serie de ensayos, se corrieron tres blancos con DMSO para eliminar los efectos de la dilución.

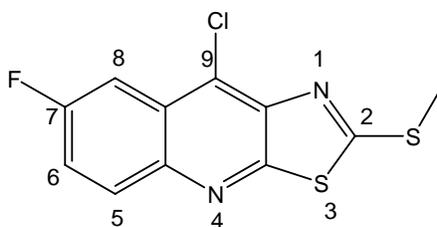
Para cada compuesto se realizaron 6 repeticiones del ensayo descrito anteriormente. Se hizo un promedio de los datos obtenidos de las 6 repeticiones y los resultados se ajustaron a la ecuación de una hipérbola cuadrada de la cual se obtuvieron los valores de  $Q_{max}$  (quenching máximo) y  $Q_{50}$  (concentración necesaria para lograr el 50% del quenching máximo) de cada compuesto.

## 5. Análisis de Resultados

### 5.1. Intermediarios.

Los intermediarios (compuestos I, II, III XV y XVI) para esta síntesis fueron obtenidos por métodos previamente informados<sup>24-29</sup> y se caracterizaron mediante análisis por cromatografía en capa fina comparativa y por su punto de fusión.

### 5.2 Compuesto IV.



**Figura 14. Compuesto IV**

El compuesto novedoso IV fue sintetizado basándose en técnicas reportadas anteriormente<sup>(24-29)</sup>, sin embargo se obtuvo un rendimiento menor al esperado (19%, comparado contra 60% para el caso del derivado no fluorado). Probablemente el anillo de anilina se encuentra desactivado para la reacción de sustitución electrofílica aromática por la presencia de un átomo de flúor en la posición 4 del mismo. Para incrementar el rendimiento se realizaron varias modificaciones variando la cantidad de ácido polifosfórico y la temperatura de reacción. Con respecto al ácido polifosfórico, al rebasar la cantidad de 0.76 equivalentes de éste reactivo en la mezcla de reacción, no se observa un incremento en el rendimiento. En cuanto a las variaciones en la temperatura de reacción, después de 150 °C el rendimiento decrece y adicionalmente se encuentran productos de descomposición en el análisis por cromatografía en capa fina, lo cual dificulta la purificación del producto deseado. Finalmente como condiciones de reacción adecuadas, se utilizaron 900 mg de ácido polifosfórico y una temperatura de reacción de 145 – 150 °C.

El trabajo de reacción también fue modificado con respecto al reportado anteriormente debido a que se observó que al neutralizar la mezcla de reacción se

---

contamina el producto, con lo cual se dificulta la purificación del mismo y por lo tanto el rendimiento disminuye.

El rendimiento final obtenido fue de 35%, por lo que queda pendiente la optimización de esta técnica, la cual es importante ya que este compuesto es un elemento clave en el esquema de síntesis divergente que se presenta en este trabajo.

El producto se obtuvo como un sólido amorfo de color crema. En su espectro de IR (pastilla, Espectro 4) se observó a  $1371\text{cm}^{-1}$  una banda característica del enlace carbono con azufre. Se observan bandas a 1628, 1586, 1549, 1494 y  $1453\text{cm}^{-1}$  características de grupos aromáticos.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 5), a 2.89 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones que corresponde al grupo metilo del tioéter; en la zona aromática se observa una señal doble de dobles a 8.09 ppm ( $J=9.6,2.7\text{Hz}$ ) que integra para un protón que corresponde a H-8; una señal doble de dobles a 7.97 ppm ( $J=9.3,5.1\text{Hz}$ ) que integra para un protón y que corresponde a H-5; una señal doble de doble de dobles a 7.53 ppm ( $J=10.8,7.8,2.7\text{Hz}$ ) que integra para un protón que se asignó a H-6.

En su espectro de masas (FAB, Espectro 6) se observó un pico base que corresponde al ión molecular de 284 ( $M^+$ , 100%) y que corresponde al peso molecular del compuesto.

### 5.3 Análisis de los derivados de 9-anilino-7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina.

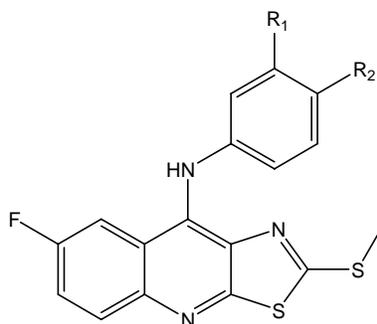
Para la obtención de los compuestos del V-IX, se utilizó, inicialmente, la técnica previamente informada para la preparación de los análogos no fluorados<sup>24-29</sup>. Lo anterior resultó inadecuado ya que los tiempos de reacción fueron más prolongados y los rendimientos bajos. Por lo anterior se decidió cambiar el disolvente del medio de reacción de metanol a etanol con el fin de alcanzar mayores temperaturas de reacción dada la baja reactividad del compuesto IV, lo cual se atribuye a la presencia del átomo de flúor. Esta modificación resultó adecuada ya que los tiempos de reacción se redujeron a aproximadamente 16-18 horas, y los rendimientos se incrementaron, siendo éstos de entre 70-80%. Aún así los tiempos de reacción son mayores que para los análogos no fluorados.

Durante el trabajo de reacción se detectó la presencia de impurezas que dificultaron la purificación del producto. Normalmente después del tiempo de reacción, el pH del crudo se ajusta a 8 con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10%. La modificación en el presente trabajo consistió en

separar el crudo de reacción por filtración al vacío antes de ajustarlo a pH=8, el residuo se resuspendió en agua y se procedió al ajuste del pH. Para verificar si había producto en las aguas madres de filtración, éstas se neutralizaron con bicarbonato de sodio al 10% y se realizó un análisis por cromatografía en capa fina. Se observó durante la neutralización, la formación de un precipitado de consistencia semisólida color mostaza para el cual también se realizó un análisis por cromatografía en capa fina. Ni en éste precipitado ni en las aguas madres se encontró el producto esperado, por lo que se consideró adecuada la modificación hecha al trabajo de reacción. Con esta modificación lograron obtenerse rendimientos de hasta 80% en algunos casos.

Todos los compuestos V-IX se obtuvieron como sólidos amorfos de color amarillo. En la tabla 4 se resumen los rendimientos, puntos de fusión y  $R_f$  de estos derivados.

**Tabla 4. Punto de fusión,  $R_f$  y rendimientos de reacción**



Compuesto	Sustituyente	p.f. (°C)	$R_f$ (a)	Rendimiento (%)
V	$R_1$ -H, $R_2$ -H	185-187	0.68	81.47
VI	$R_1$ -CN, $R_2$ -H	252-253	0.57	81.40
VII	$R_1$ -OMe, $R_2$ -H	193-195	0.60	70.07
VIII	$R_1$ -H, $R_2$ -CN	235-238	0.52	75.05
IX	$R_1$ -H, $R_2$ -OMe	203-205	0.56	72.30

(a) sistema de elución hexano/ acetato de etilo 7:3

### 5.3 Análisis espectroscópico de los derivados de 9-anilino7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina.

En los espectros de IR (pastilla, Espectros 7, 10, 13, 16, 19) de estos compuestos se observaron varias bandas que fueron útiles para confirmar la adición de la anilina correspondiente, que se observa alrededor de  $3100\text{ cm}^{-1}$ . En espectros de los compuestos

sintetizados se hallaron bandas cuya presencia fue constante. Estas bandas pueden asociarse al núcleo de tiazolo[5,4-b]quinolina, las cuales se localizan entre 1600 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  (aromáticos). En algunos casos también fue posible observar una banda alrededor de 1285  $\text{cm}^{-1}$  que indicaba la presencia del tioéter.

En la tabla 5 se resumen las bandas más importantes de los espectros de IR de cada uno de los compuestos.

**Tabla 5. Espectroscopía IR ( $\text{cm}^{-1}$ )**

<b>Compuesto</b>					
	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>
<b>NH</b>	3423, 3208.	3430	3424	3422	3444, 3204
<b>Aromaticidad</b>	1624, 1597, 1580, 1545, 1525, 1493, 1448, 1401	1603, 1586, 1543, 1511, 1479, 1443.	1599, 1578, 1549, 1510, 1486, 1438.	1600, 1575, 1534, 1511, 1496, 1474, 1437.	1602, 1577, 1545, 1504, 1472, 1444.
<b>Grupos funcionales</b>	----	-CN 2222	-O-CH 3028	-CN 2220	-O-CH 3026

*Todos los espectros se realizaron en pastilla de KBr*

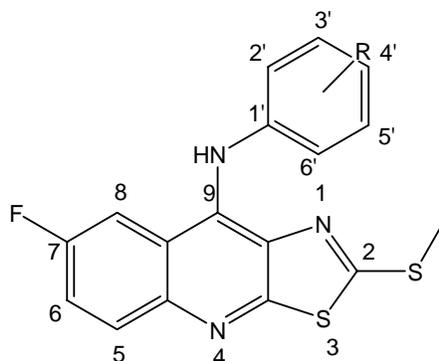
La asignación de las señales de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , se realizó aplicando la teoría del desplazamiento químico, multiplicidad de las señales y por comparación con datos previamente reportados.<sup>24-29</sup> Se pudo establecer el siguiente patrón de señales:

- Señal simple entre 2.30 y 2.60 ppm que corresponde al grupo metilo del tioéter.
- Las señales de los protones del anillo de anilina varían de acuerdo al sustituyente y a la posición que este ocupa.
- Las señales de los protones del sistema de tiazolo[5,4-b]quinolina aparecen en el siguiente orden de campo alto a campo bajo:
  - o H-6, señal doble de doble de doble (J aproximadamente de 10, 8, 2 Hz)
  - o H-5, señal doble de doble (J aproximadamente de 9.5, 5.5 Hz)
  - o H-8, señal doble de doble (J aproximadamente de 11, 2.5 Hz)

La señal del grupo amino que une al anillo de anilino con el sistema tricíclico se observa como una señal simple ancha alrededor de 10.8 ppm que intercambia con óxido de deuterio.

En la tabla 6 se resumen las señales observadas (Espectros 8, 11, 14, 17, 20)

**Tabla 6. Desplazamientos químicos RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)**



**Figura 15. 9-anilino-7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina.**

R	Compuesto				
	V	VI	VII	VIII	IX
	-H	3'-CN	3'-OMe	4'-CN	4'-OMe
<b>SMe</b>	2.34 (s)	2.32 (s)	2.36 (s)	2.49 (s)	2.30
<b>H-5</b>	7.99 (dd, J=9.2,5.2)	8.01 (dd, J=9.6,5.6)	7.97 (dd, J=9.3,5.1)	8.07 (dd, J=9.6)	7.99 (dd, J=9.2,5.6)
<b>H-6</b>	7.71 (ddd, J=10.8,9.6,2.8)	7.76 (ddd, J= --, 9.2,2.0)	7.75 (ddd, J=10.5,7.8,2.7)	7.72 (dd, J=9.0,7.5)	7.78 (ddd, J=9.2,8.0,2.8)
<b>H-8</b>	8.27 (dd, J=11.2,2.4)	8.49 (dd, J=10.4,2.0)	8.27 (dd, J=10.8,2.7)	8.15 (d, J=9)	8.41 (dd, J=11.2,2.4)
<b>H-2'</b>	7.16 (d, J=7.6)	7.65 (s)		7.20 (d, J=8.1)	7.22 (d, J=8.8)
<b>H-3'</b>	7.33 (t, J=15.6,8.0)	-----	-----	7.66 (d, J=8.1)	6.96 (d, J=8.8)
<b>H-4'</b>	7.09 (t, J=7.6)	7.54 (sa)		-----	-----
<b>H-5'</b>	7.33 (t, J=15.6,8.0)	7.54 (sa)		7.66 (d, J=8.1)	6.96 (d, J=8.8)
<b>H-6'</b>	7.16 (d, J=7.6)	7.54 (sa)		7.20 (d, J=8.1)	7.22 (d, J=8.8)
<b>NHAr</b>	9.71 (s)	10.43 (s)	10.13 (s)	9.90 (s)	10.11 (s)
<b>Otras</b>	-----	-----	OMe 3.71 (s)	-----	OMe 3.77 (s)

En la espectrometría de masas de estos compuestos se observó el pico  $M+1$  como el pico base. En todos los casos coincidió con el peso molecular esperado.

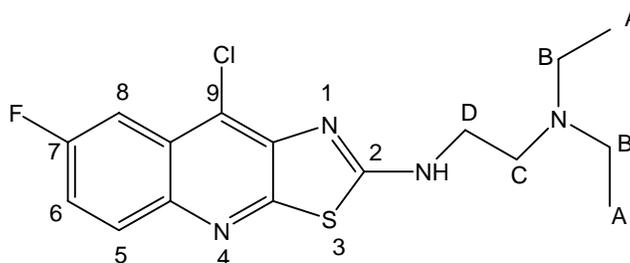
En la tabla 7 se muestran datos de la espectrometría de masas de los compuestos (Espectros 9, 12, 15, 18, 21)

**Tabla 7. Espectrometría de masas.**

Compuesto (abundancia relativa)					
	V	VI	VII	VIII	IX
<b>M+1</b>	342 (100%)	367 (100%)	372 (100%)	367 (100%)	372 (100%)
<b>M+</b>	341 (41.3%)	366 (17.4%)	371 (17.4%)	366 (23.8%)	371 (26.1%)

*Todos los espectros realizados en FAB<sup>+</sup>*

#### 5.4 Compuesto X.



**Figura16. Compuesto X**

Normalmente la incorporación del grupo dietilendiamino se hace por solvólisis del correspondiente tioéter, pero debido a que la materia prima no se disolvió en la etilendiamina como es el caso de la síntesis del análogo no fluorado<sup>28</sup>, se añadió benceno como cosolvente, lo cual ayudó a obtener el producto correspondiente.

El compuesto X se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco. En su espectro de IR (pastilla, Espectro 22), se observa una banda a  $3425\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo amino secundario vecino a un grupo aromático, a  $2965$  y  $1392\text{ cm}^{-1}$  bandas características de los grupos metilo, a  $1615$ ,  $1564$ ,  $1495$ ,  $1445$  y  $1424\text{ cm}^{-1}$  bandas características de los grupos aromáticos.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 23), en la región alifática, a  $1.06\text{ ppm}$ , se observa una señal triple ( $J= 6.9\text{ Hz}$ ) que integra para seis protones que corresponde a los grupos metilo de la cadena lateral ubicada en la posición dos del sistema tricíclico (Figura 16, protones A); a  $2.53\text{ ppm}$  una señal cuádruple ( $J=7.2\text{ Hz}$ ) que integra para cuatro

protones y que corresponde a dos grupos metileno (protones B); a 2.65ppm una señal triple ( $J=7.2$  Hz) que integra para dos protones, que se atribuye a un grupo metileno (protones C); una señal ancha a 3.64 ppm que integra para dos protones y que corresponde a los protones del metileno vecino a un átomo de nitrógeno (protones D); en la zona aromática se observa una señal doble de dobles ( $J= 9.9, 2.1$  Hz) que integra para un protón y que se atribuye a H-8; una señal doble de dobles a 7.98 ppm ( $J= 9.0, 5.7$  Hz) que integra para un protón y que corresponde a H-5; una señal doble de doble de dobles a 7.54 ppm ( $J= 9.0,8.4,2.4$  Hz) que integra para un protón que se asignó a H-6; a 8.91 ppm una señal simple que corresponde a un protón unido al átomo de nitrógeno de la amina secundaria, la señal desaparece con  $D_2O$ .

En su espectro de masas (FAB, Espectro 24) se observó un pico base que corresponde al ión molecular de 353 ( $M^+ +1, 100\%$ ) y que corresponde al peso molecular del compuesto. Se puede observar la contribución isotópica del cloro  $M^+ +2$ . El patrón de fragmentación propuesto es el siguiente:

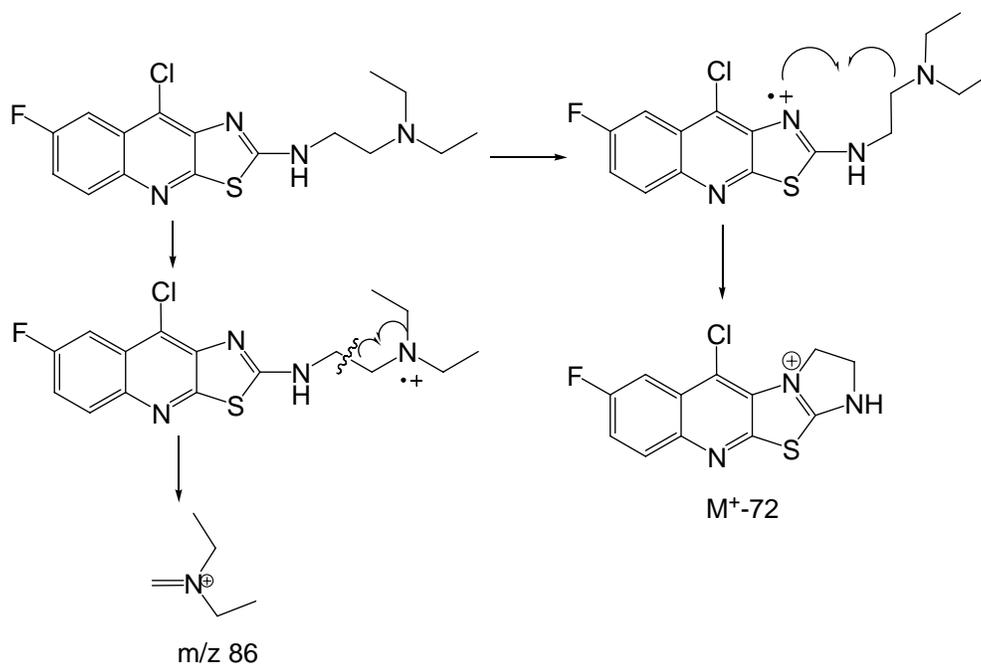
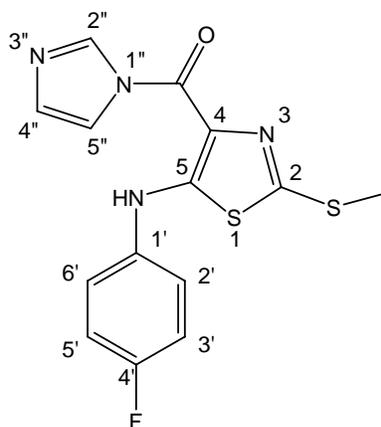


Figura 17. Patrón de fragmentación del compuesto X.

## 5.8 Compuesto XIV.

### 5.8.1 Compuesto XII.



**Figura 18. Compuesto XII**

Este intermediario se obtuvo como producto principal al intentar obtener el compuesto XIII usando tetrahidrofurano anhidro como disolvente.

Esta reacción normalmente se realiza sin el aislamiento del derivado imidazólico, debido a que diversos reportes señalan la inestabilidad del mismo.<sup>24-29</sup> Normalmente, la transformación se lleva a cabo con diclorometano como disolvente, pero debido a la nula solubilidad de la materia prima en este disolvente, se optó por ocupar, dada su mayor constante dieléctrica, tetrahidrofurano, en el cual sí se disolvió la materia prima. Después de hacer reaccionar la materia prima y el 1,1'-carbonildiimidazol, para formar el intermediario, se agrega la anilina para formar la amida correspondiente. Contra lo esperado, la incorporación del grupo alquilamina no se llevó a cabo de manera satisfactoria y se obtuvo como producto mayoritario el intermediario imidazólico, el cual se pudo aislar y purificar.

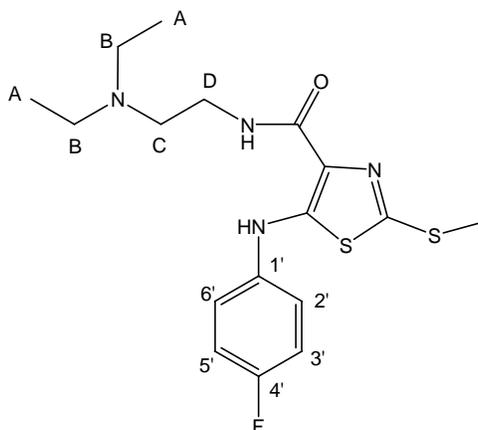
El compuesto XII se obtuvo como agujas amarillas con punto de fusión de 40 °C. En su espectro de IR (pastilla, Espectro 25) a 3209, 3154, 3062  $\text{cm}^{-1}$  bandas características el grupo amida, a 1620  $\text{cm}^{-1}$  una banda característica del grupo carbonilo, a 1604, 1554  $\text{cm}^{-1}$  bandas características de los grupos aromáticos.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 26), en la región alifática se observó una señal simple a 2.71 ppm que integra para tres protones y que corresponde al grupo metilo del tioéter. En la zona aromática se observa una señal doble a 7.13 ppm ( $J= 8.1, 2.1$  Hz) que

integra para dos protones y que corresponde a H-2' y H-6'; una señal simple a 7.14 ppm que integra para un protón y se asignó a H-4''; una señal doble de doble de dobles a 7.28 ppm (J=9.0, 3.6, 2.1 Hz) que integra para un protón y corresponde a H-3'; una señal simple a 8.04 ppm que integra para un protón y se asignó a H-2'' una señal simple a 9.12 ppm que integra para un protón y que corresponde a H-5''; a 10.5 ppm una señal ancha que corresponde a un protón unido al átomo de nitrógeno en la posición 5 del anillo de tiazol, la cual desaparece con D<sub>2</sub>O.

En su espectro de masas (FAB, Espectro 27) se observó un pico base que corresponde al ión molecular de 335 (M<sup>+</sup> +1, 100%) y que corresponde al peso molecular del compuesto.

### 5.8.2 Compuesto XIII



**Figura 19. Compuesto XIII**

Se intentó la incorporación del grupo alquilamino utilizando THF como disolvente, pero la formación no fue satisfactoria, por lo que se optó por emplear diclorometano. Lo anterior se atribuye a una alta solvatación que impide el ataque del nucleófilo. La reacción en diclorometano resultó de buen rendimiento (90%) y la purificación del producto por lavados con benceno es sencilla.

En su espectro de IR (pastilla, Espectro 28) se observa a 3410 cm<sup>-1</sup> una banda característica de un grupo amino secundario, a 3117 y 3067 cm<sup>-1</sup> bandas características del grupo amida, a 2962 una banda característica de los grupos metilo, a 1775 y 1666 cm<sup>-1</sup> bandas características del grupo carbonilo, a 1555, 1508, 1451 cm<sup>-1</sup> bandas características de grupos aromáticos.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 29), en la región alifática; a 1.05 ppm se observa una señal triple ( $J= 7.2$  Hz) que integra para seis protones que corresponde a los grupos metilo de la cadena ubicada en posición cuatro del anillo de tiazol (Figura 19, protones A); a 2.62 ppm una señal cuádruple ( $J=7.2$  Hz) que integra para cuatro protones y que corresponde a dos grupos metileno (protones B); a 2.7 ppm una señal simple que integra para tres protones y que corresponde al grupo metilo del tioéter; a 2.76 ppm una señal triple ( $J=7.5$  Hz) que integra para dos protones y que se atribuye a un grupo metileno (protones C); una señal triple a 3.64ppm ( $J=7.5$  Hz) que integra para dos protones y que corresponde a los protones del metileno vecino a un átomo de nitrógeno (protones D); en la zona aromática se observa una señal td a 7.24 ppm ( $J= 8.1, 2.1$  Hz) que integra para dos protones y que se atribuye a H-3' y H-6'; una señal doble de doble de dobles a 7.42 ppm ( $J= 9.0, 3.6, 2.1$  Hz) que integra para dos protones y que corresponde a H-3' y H-5'.

En su espectro de masas (FAB, Espectro 30) se observó un pico base que corresponde al ión molecular de 383 ( $M^+ +1, 100\%$ ) y que corresponde al peso molecular del compuesto.

A pesar de que se requiere un paso adicional para la obtención del compuesto XIII, en comparación a la técnica reportada para el análogo no fluorado, las reacciones son de buen rendimiento y fácil trabajo de reacción lo cual compensa el inconveniente del paso adicional.

### 5.8.3 Compuesto XIV

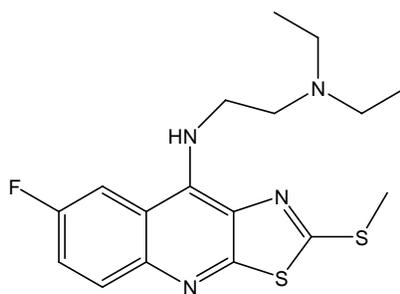


Figura 20. Compuesto XIV

Se intentó obtener el compuesto XIV por una reacción de ciclación del compuesto XIII utilizando ácido polifosfórico y oxiclورو de fósforo como se menciona en la literatura para el análogo no fluorado<sup>28</sup>, sin embargo, sólo se recuperó materia prima.

La reacción se intentó nuevamente haciendo algunas variaciones. Se redujo la cantidad de ácido polifosfórico y se recuperó nuevamente materia prima. Otras modificaciones incluyeron, la reacción en ausencia de oxiclورو de fósforo; incremento en los tiempos de reacción y aumento de la temperatura de reacción hasta 130 °C. Todas las modificaciones resultaron infructuosas, más aún, cuando se incrementó la temperatura de reacción se encontró como producto mayoritario el ácido carboxílico (compuesto XI).

Debido a la presencia del átomo de flúor en la posición 4 del anillo de anilina es posible que éste se encuentre desactivado para la reacción de sustitución nucleofílica aromática como se se observó en el compuesto IV, por lo tanto la técnica empleada para la obtención de este compuesto no es adecuada.

### 5.9 Pruebas de intercalación en ADN.

En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos para las pruebas de intercalación de los compuestos sintetizados. Se empleó AHMA como patrón de referencia debido a que es un compuesto que tiene buenas propiedades intercalantes(x).

**Tabla 8. Resultados de las pruebas de intercalación en ADN**

Comp	Qmax(%) <sup>a</sup>	Q <sub>50</sub> (uM) <sup>b</sup>	Qmax/Q <sub>50</sub> <sup>c</sup>
AHMA	65.36 (1.63)	7.7 (2.13)	8.489 (2.24)
V	0.85 (0.57)	1.12 (0.83)	0.758
VI	11.8 (4.94)	45.02 (4.42)	0.262 (0.17)
VII	3.64 (0.86)	15.57 (10.08)	0.234 (0.13)
VIII	11.12 (2.84)	36.24 (2.11)	0.307 (0.15)
IX	-5.00 (9.72)	47.5 (34.12)	-0.105 (-0.16)
X	38.64 (6.26)	38.06 (3.43)	1.015 (0.77)

<sup>a</sup> Quenching máximo para cada compuesto expresado como porcentaje final de decremento de la intensidad de fluorescencia tomando como 100% la intensidad de fluorescencia antes de agregar la primera alícuota del compuesto a evaluar.

<sup>b</sup> Concentración necesaria del compuesto para lograr el 50% del quenching máximo.

<sup>c</sup> Eficiencia con la que los compuestos se intercalan al ADN.

La desviación estándar de los valores se presenta entre paréntesis.

El valor Qmax de los compuestos indica que tanto se ha unido el compuesto evaluado al ADN ya que, para lograr un decremento en la intensidad de fluorescencia en el

ensayo, el bromuro de etidio debe ser desplazado de sus sitios de intercalación por el nuevo compuesto. Mientras mayor es el decremento de la fluorescencia, más son los sitios en los que el compuesto evaluado se ha unido al ADN.

El valor de  $Q_{50}$  representa la concentración necesaria del compuesto para alcanzar el 50% del quenching máximo y es un indicativo de la afinidad de los compuestos al ADN, mientras mayor sea el valor de  $Q_{50}$ , menor es la afinidad del compuesto evaluado por el ADN.

El valor del cociente  $Q_{max}/Q_{50}$  indica la eficiencia de intercalación del compuesto, mientras mayor es el valor de este cociente, mayor es la eficiencia del compuesto. Un compuesto se considera más eficiente mientras mayor sea el  $Q_{max}$  y menor sea el  $Q_{50}$  (y por lo tanto el cociente es mayor) esto quiere decir que se necesita poca cantidad del compuesto para lograr el efecto deseado.

Se observó que aquellos compuestos que cuentan con una cadena alquílica lateral en su estructura tienen mayor afinidad por el ADN y además son más eficientes para intercalarse entre los pares de bases del ADN que los que tienen cadenas laterales de naturaleza aromática. Además se observó que en el caso de los derivados de 9-anilino-7-fluorotioazolo[5,4-b]quinolina, la presencia del grupo CN como sustituyente en el anillo de anilina favorece las propiedades de intercalación, sin embargo la posición del sustituyente en el anillo de anilina (posición 3' o 4') parece no afectar dichas propiedades.

Los resultados que se presentan para el compuesto IX tienen valor negativo. Este resultado anómalo puede atribuirse a que al intercalarse con el ADN esté interactuando con el bromuro de etidio de manera que hace que el complejo con ADN intensifique su fluorescencia en lugar de disminuirla, en cuyo caso no es posible detectar el desplazamiento de bromuro de etidio mediante la medición de decrementos en la intensidad de la fluorescencia como se hace en este ensayo.

Previamente a este trabajo se han determinado las propiedades intercalantes de los análogos no fluorados, las cuales se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9. Resultados de las pruebas de intercalación en ADN de los análogos no fluorados.**

Compuesto	Qmax(%) <sup>a</sup>	Q50 (uM) <sup>b</sup>	Qmax/Q50 <sup>c</sup>
AHMA	47.79 (1.36)	7.36 (2.01)	6.494 (1.69)
VI*	7.84 (0.45)	11.54(3.58)	0.679 (0.19)
VII*	6.65 (0.58)	3.71 (1.77)	1.794 (0.79)
VIII*	12.81 (2.44)	14.26 (8.18)	0.899 (0.455)
IX*	3.73 (0.69)	9.48 (5.67)	0.393 (0.21)
X*	26.24 (1.03)	11.1 (3.29)	2.363 (0.66)

a Quenching máximo para cada compuesto expresado como porcentaje final de decremento de la intensidad de fluorescencia tomando como 100% la intensidad de fluorescencia antes de agregar la primera alícuota del compuesto a evaluar.

b Concentración necesaria del compuesto para lograr el 50% del quenching máximo.

c Eficiencia con la que los compuestos se intercalan al ADN.

La desviación estándar de los valores se presenta entre paréntesis.

\* Análogo no fluorado.

En general se observan las mismas tendencias descritas para los derivados fluorados.

Con el objeto de comparar los parámetros de intercalación de los derivados no fluorados contra los de los derivados fluorados, se normalizaron los mismos tomando como compuesto de referencia el AHMA, considerando el Qmax para éste compuesto como el 100% en ambos casos. Los valores relativos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Resultados relativos con respecto a AHMA**

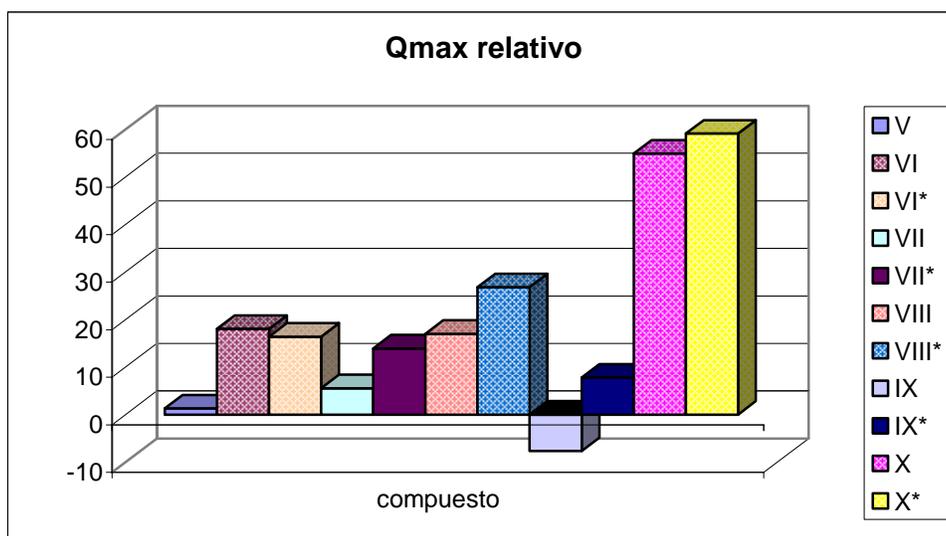
Compuesto	Qmax(%) <sup>a</sup>	Q <sub>50</sub> (uM)	Qmax/Q <sub>50</sub> <sup>a</sup>
AHMA	100	7.36	100
V	1.3	1.12	8.93
VI	18.05	45.02	3.09
VI*	16.41	11.54	10.46
VII	5.57	15.57	2.76
VII*	13.92	3.71	27.63
VIII	17.01	36.24	3.62
VIII*	26.8	14.26	13.84
IX	-7.65	47.5	-1.24
IX*	7.8	9.48	6.05
X	59.12	38.06	11.96
X*	54.91	11.1	36.96

<sup>a</sup> valores relativos con respecto a AHMA

\* Análogo no fluorado.

Al comparar los resultados se encuentra que hay diferencias entre los análogos fluorados y los no fluorados en cuando a la eficiencia de intercalación y la afinidad por el ADN, sin embargo parece que las diferencias en los valores de  $Q_{max}$  no son tan marcadas por lo que la afinidad es lo que define la eficiencia.

El gráfico 1 ilustra los valores normalizados de  $Q_{max}$  de todos los compuestos.

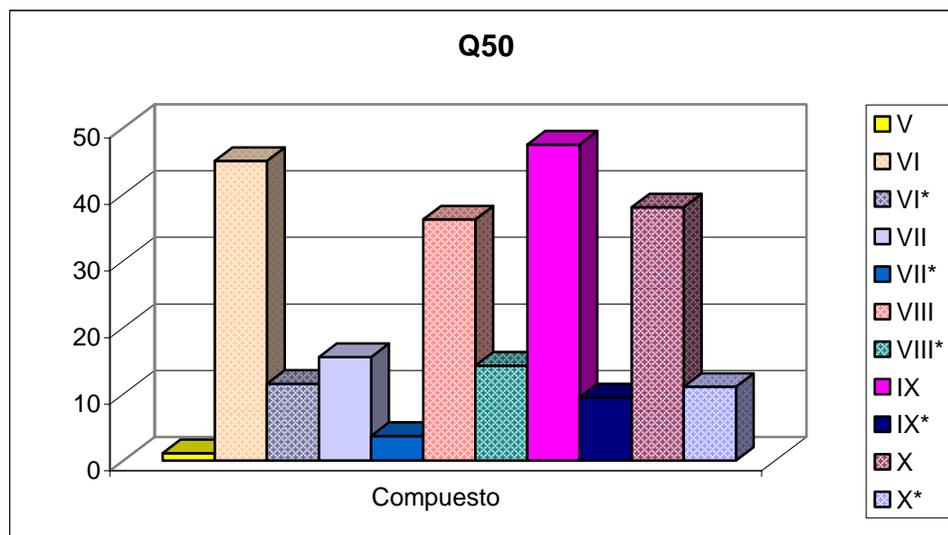


**Gráfico 1.  $Q_{max}$  con respecto a AHMA**

En el caso de los compuestos X y X\*; y los compuestos VI y VI\* se observa que la diferencia en los valores de  $Q_{max}$  no es muy marcada lo cuál indica que los análogos se intercalan en un número similar de sitios sin que el átomo de flúor en la posición 7 influya en esta propiedad. Para el caso de los compuestos VIII y VIII\* y los compuestos VII y VIII\* las diferencias son más notorias pero aún así no muy pronunciadas.

Se observa que el compuesto V no desplaza casi al bromuro de etidio lo cual quiere decir que no se intercala en muchos sitios entre los pares de bases del ADN. No se cuenta con los datos del análogo no fluorado para su comparación.

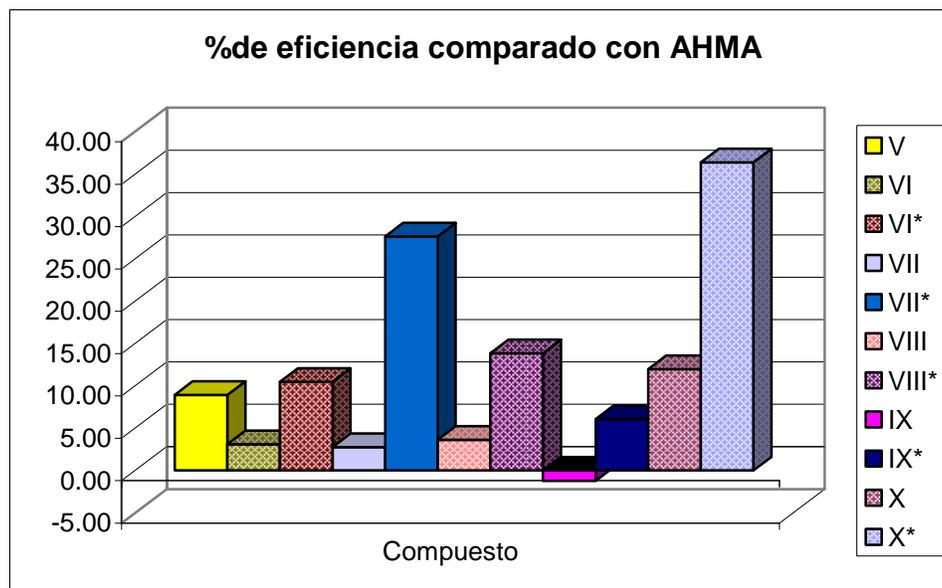
El gráfico 2, ilustra los valores de  $Q_{50}$  de todos los compuestos.



**Gráfico 2. Valores de  $Q_{50}$**

En este gráfico se observa que en los valores de  $Q_{50}$  hay diferencias pronunciadas entre los análogos fluorados y los no fluorados, siendo en el caso de los primeros el valor considerablemente más alto que en el caso de los segundos, lo cual indica que los análogos no fluorados tienen mayor afinidad al ADN que los fluorados.

El gráfico 3, ilustra los valores normalizados de eficiencia de todos los compuestos.



**Gráfico 3. Valores de eficiencia relativa**

De acuerdo a los valores del cociente  $Q_{max}/Q_{50}$  para ambos tipos de análogos, los compuestos no fluorados presentan mayor eficiencia para intercalarse entre los pares de bases del ADN. El átomo de flúor en la posición 7 de las moléculas afecta a la afinidad de los compuestos por el ADN y por lo tanto la eficiencia de los mismos para intercalarse.

La presencia del átomo de flúor en la posición 7 de los compuestos sintetizados en el presente trabajo les confiere a los mismos propiedades distintas a las de sus análogos no fluorados. Se observó que los compuestos sintetizados presentan puntos de fusión más altos,  $R_f$  mayor y mejor solubilidad en medio acuoso que los análogos no fluorados.

Podría pensarse que los compuestos V-X son menos afines al ADN y menos eficientes para intercalarse al ADN debido a que la densidad electrónica que el átomo de flúor genera en la zona donde se encuentra puede dificultar el acomodo de los compuestos entre los pares de bases del ADN ya que, normalmente, la manera en que un compuesto que se intercala en el ADN interacciona con los pares de bases, es aceptando electrones de las mismas. La densidad electrónica generada por el átomo de flúor en la posición 7 de los compuestos V al X dificultaría entonces que la interacción descrita anteriormente se lleve a cabo, creándose probablemente incluso una repulsión entre los pares de bases y el

compuesto en esa zona. Este comportamiento se esperaba, sin embargo, se incorporó en estos compuestos el átomo de flúor en posición 7 ya que de acuerdo al trabajo de Alvarez-Ibarra<sup>24</sup>, esta modificación estructural les confiere a esta clase de derivados una mayor actividad citotóxica que los derivados no fluorados.

Los compuestos sintetizados en el presente trabajo no tienen mejores propiedades intercalantes al ADN que sus análogos no fluorados, sin embargo, queda pendiente la evaluación de la citotoxicidad para poder hacer una comparación más profunda de ambos conjuntos de análogos. De esta manera será posible saber si la intercalación al ADN es un paso importante para la actividad citotóxica de los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina, ya que si los derivados V-X resultan con una actividad citotóxica mayor a los análogos no fluorados, podría pensarse que la intercalación al ADN no es un paso determinante y que los derivados poseen otro mecanismo de acción.

Los compuestos IV-XIII fueron sintetizados y caracterizados por primera vez en el presente trabajo por lo que se trata de compuestos novedosos que ayudarán a la dilucidación del mecanismo de acción de los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina.

---

## 6. Parte experimental

### 6.1 Parte Química.

#### 6.1.1 Reactivos y equipo

Todas las materias primas utilizadas en las síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi modelo RE 111. Para la destilación a presión reducida se ocupó una bomba para vacío marca FELISA modelo FE-1405 con capacidad máxima de 0.1 mm Hg.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Nicolet FT5SX en pastilla de KBr a menos que se indique otra cosa. Las unidades se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (300 MHz). Los desplazamientos químicos están dados en ppm. ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, c= señal cuádruple, sa= señal simple ancha, ta= señal triple ancha, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, dt= señal doble de triple, m= señal múltiple. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Los espectros de masas se determinaron por IE en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA, y por IQ y FAB en un espectrómetro de masas JEOL Sx102, empleando en FAB alcohol 3-nitro bencílico como matriz. El ion molecular se indica como  $\text{M}^+$ . La nomenclatura se indica como  $m/z$ = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.

#### 6.1.2 Cromatografía

Para las cromatografías en columna se empleó gel de sílice Merck 60 malla 70-230. Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas Sigma-Aldrich de vidrio recubiertas con gel de sílice con un espesor de 0.25 mm, tamaño de partícula de 0.017mm y con indicador para luz UV. Para

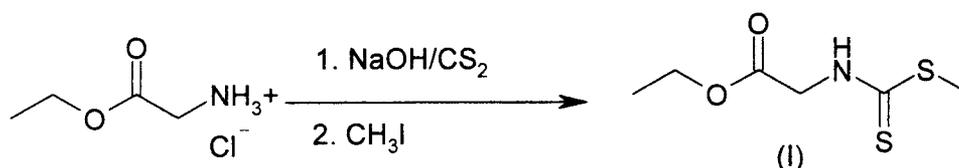
la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y exposición a vapores de yodo.

**Tabla 11. Sistemas de elución empleados.**

Sistema	Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano/Acetato de etilo	8:2
II	Hexano/Acetato de etilo	7:3
III	Diclorometano/Metanol	9:1
IV	Diclorometano/Metanol/NH <sub>4</sub> OH	9:1:0.1

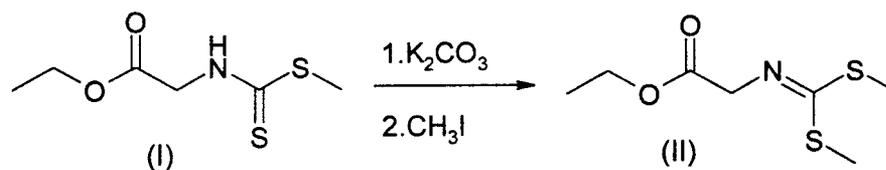
### 6.1.3 Descripción de las síntesis

#### 6.1.3.1 N –((Etoxicarbonil)metil)ditiocarbamato de metilo (I)



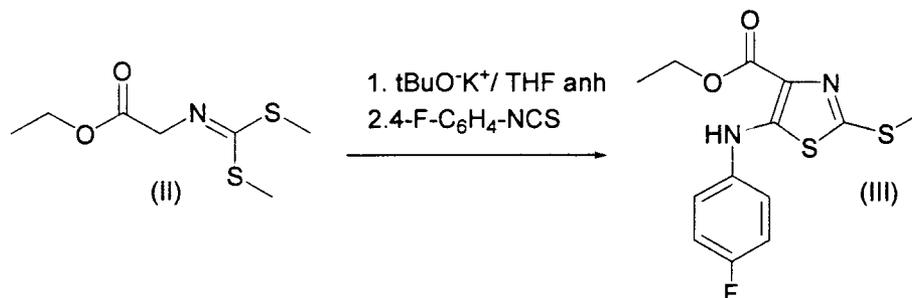
En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición, se mezclaron 300 mL de dimetilsulfóxido y 83.76 g del diclorhidrato de glicinato de etilo (0.6 moles). La suspensión se agitó vigorosamente a temperatura ambiente hasta disolución total. A esta solución se le adicionaron lentamente 36 mL de una solución 20 M de hidróxido de sodio, manteniendo la temperatura a 20° C. Terminada la adición se agregaron lentamente 48 mL de disulfuro de carbono (0.78 moles), manteniendo la temperatura entre 15 y 20° C. Se mantuvo en agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La solución naranja se enfrió a 0° C y se adicionaron lentamente 48 mL de yoduro de metilo (0.78 moles), manteniendo la temperatura de reacción a 0° C. Terminada la adición se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó agitando por 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre 3000 mL de una mezcla de hielo-agua con agitación constante. El precipitado formado se aisló y secó por filtración. Se obtuvieron 44.38 g (38.31%) de un precipitado ligeramente amarillo (Lit. 51%) con un R<sub>f</sub> de 0.30 (sistema I)

## 6.1.3.2 N-((Etoxicarbonil)metil)iminoditiocarbamato de dimetilo (II)



En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición se mezclaron 44.38 g del crudo del compuesto I (aproximadamente 0.231 moles), en 123.8 ml de dimetilsulfóxido, a la solución amarilla resultante se le agregó lentamente, una solución de 49.5 g de carbonato de potasio en 39 mL de agua, manteniendo la temperatura en 20° C, formándose una suspensión color rojo pardo. Terminada la adición la suspensión se enfrió a 0° C y se adicionaron lentamente 20 mL de yoduro de metilo (0.32 moles), manteniendo la temperatura en 0° C y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió lentamente sobre 1000 mL de agua con agitación. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (4 x 400 mL). Los extractos orgánicos se trataron con sulfato de sodio anhidro y se eliminó por evaporación el acetato de etilo obteniéndose un aceite oscuro. Este aceite se purificó por destilación a presión reducida, colectando la fracción que destiló entre 145-160 °C. Se obtuvieron 44.53 g (96.04%) de un aceite ligeramente amarillo que se oscurece con la exposición a la luz (Lit. 98%<sup>24</sup>) con un R<sub>f</sub> de 0.4 (sistema II)

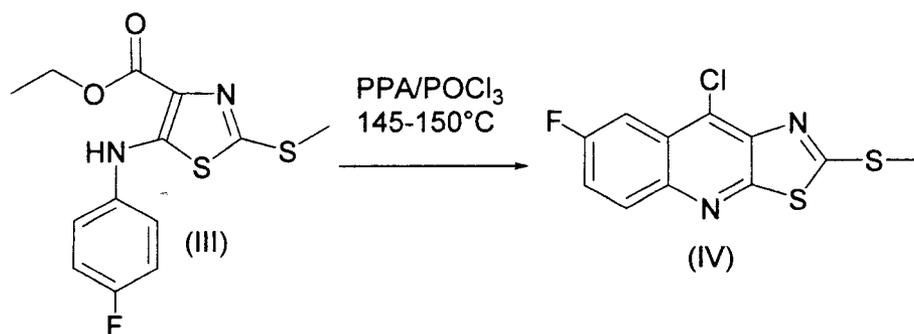
## 6.1.3.3 4-(Etoxicarbonil)-5-(4-fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (III)



En un matraz de tres bocas, tipo europeo, acondicionado con termómetro para bajas temperaturas, embudo de adición, condiciones anhidras y atmósfera de argón, se mezclaron 6.34 g de *tert*-butóxido de potasio (56.60 mmoles) en 200 mL de

tetrahidrofurano anhidro. La suspensión formada se enfrió a  $-75^{\circ}\text{C}$  mediante un baño de hielo seco-acetona. Al embudo de adición se transfirió mediante una cánula una solución de 8 g del compuesto II (38.64 mmoles) en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, la cual se adicionó por goteo a la suspensión de *tert*-butóxido de potasio, manteniendo la temperatura en  $-75^{\circ}\text{C}$ . Terminada la adición, la solución amarillo-naranja resultante se dejó agitar durante 90 minutos a la misma temperatura. A continuación se transfirió al embudo de adición una solución de 5.9 g de 4-fluorofenilisotiocianato (38.64 mmoles) en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro y se adicionó por goteo, cuidando que la temperatura se mantuviera en  $-75^{\circ}\text{C}$ . Se dejó agitar durante 45 minutos más y se retiró el sistema de enfriamiento. Cuando la temperatura se acercó a  $-10^{\circ}\text{C}$  se formó un precipitado amarillo. La suspensión formada se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la suspensión amarilla se vertió lentamente en 1600 mL de agua con agitación constante, formándose un precipitado blanco el cual se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 10.89 g (90.6 %) del compuesto III con un punto de fusión de  $75^{\circ}\text{C}$  y un  $R_f$  de 0.57 (sistema I)

#### 6.1.3.4 9-Cloro-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IV)



En un matraz de fondo redondo de 1 boca se colocaron 3.12 g (10 mmol) del compuesto III, se adicionaron 900 mg de ácido polifosfórico (7.6 mmol) y 3 mL de oxiclورو de fósforo (11.7 mmol). La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante a  $145-150^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Terminado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se obtiene un aceite color café al cual se le agregaron lentamente y en baño de hielo 5 mL de etanol frío. Al disolverse el aceite precipitó un sólido color amarillo. La

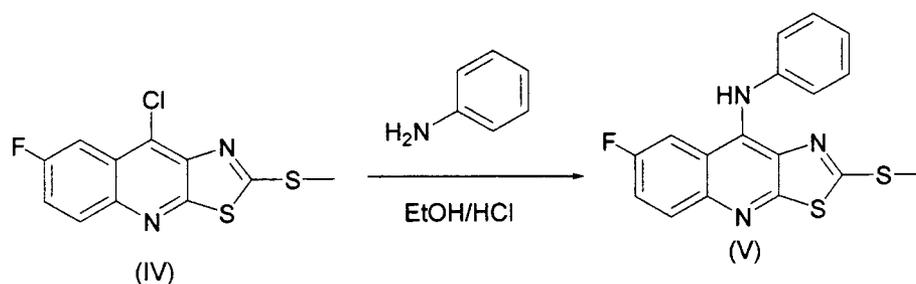
suspensión se vertió sobre 20 ml de agua, el precipitado resultante se separó por filtración. Posteriormente este sólido se suspendió en 5 ml de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con solución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado amarillo pálido se separó por filtración al vacío y secó por succión. El crudo se suspendió en metanol con agitación durante 5 minutos y se filtró para obtener 1 g (35%) del compuesto VII con un punto de fusión de 184- 186° C y un Rf de 0.65 (sistema II)

IR (pastilla, espectro 4): 1371 (C-S); 1628, 1586, 1549, 1494, 1453 (aromáticos).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 5): 2.89 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.53 (ddd, J=10.8, 7.8, 2.7 Hz) H-6; 7.97 (dd, J= 9.3, 5.1 Hz) H-5 8.09 (dd J= 9.6, 2.7 Hz) H-8.

EM (IE, espectro 6): 284 (M<sup>+</sup>, 100%)

#### 6.1.3.5 9-anilino-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (V)



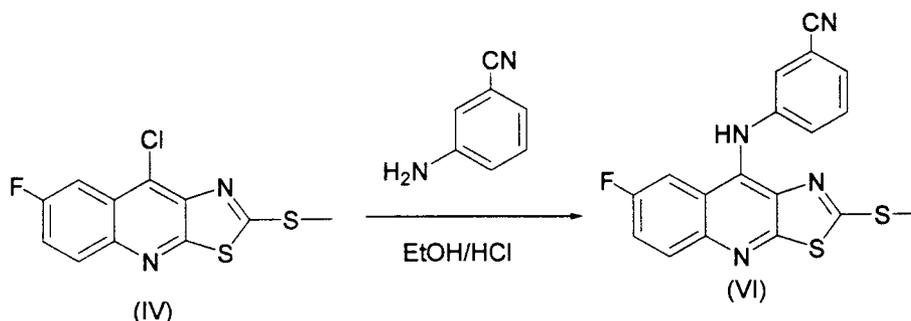
En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante y con atmósfera de nitrógeno se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 ml de etanol absoluto, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 0.4 mL (1.05 mmol) de anilina y se calentó la mezcla a reflujo durante 7 horas. Transcurrido ese tiempo la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío. Se resuspendió nuevamente el sólido en 10 mL de agua destilada y se llevó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío. El sólido se resuspendió en metanol, se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 138.7 mg (81.47%) de 9-anilino-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.58 (sistema II) y un punto de fusión de 187-190° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 7): 3423, 3208 (-NH-); 1624, 1597, 1580, 1545, 1525, 1493, 1448, 1401 (aromáticos).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 8): 2.335 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.155 (d, J= 7.6) H-2', H-6'; 7.329 (t, J= 15.6,8.0) H-3', H-5'; 7.094 (t, J= 7.6) H-4'; 7.992 (dd, J= 9.2,5.2) H-5; 7.713 (ddd, J= 10.8,9.6,2.8) H-6; 8.273 (dd, J= 11.2,2.4) H-8; 9.706 (s, intercambia con D<sub>2</sub>O) Ar-NH-Ar

EM (FAB, espectro 9): 342 ( $M^+ + 1$ , 100%), 341 ( $M^+$ , 41.3%)

#### 6.1.3.6 7-fluoro-9-[[3-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VI)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 ml de etanol, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 126 mg (1.05 mmol) de 3-aminobenzonitrilo y se calentó la mezcla a reflujo durante 18 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua se separó por filtración al vacío. Se resuspendió nuevamente en 10 mL de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 153 mg (81.4%) de 7-fluoro-9-[[3-ciano)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un R<sub>f</sub> de 0.43 (sistema II) y un punto de fusión de 252-253° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

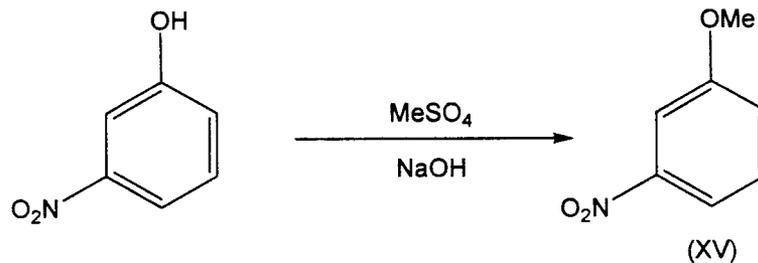
IR (pastilla, espectro 10): 3430 (-NH-); 1603, 1586, 1543, 1511, 1479, 1443(aromáticos); 2222 (-CN).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 11): 2.319 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.650 (s) H-2'; 7.536 (sa, 3H) H-4', H-5', H-6'; 8.008 (dd, J= 9.6,5.6) H-5; 7.757 (ddd, J=9.2, 2.0) H-6; 8.496 (dd, J= 10.4,2.0) H-8; 10.429 (s, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (FAB, espectro 12): 367 ( $M^+ + 1$ , 100%), 366 ( $M^+$ , 17.4%)

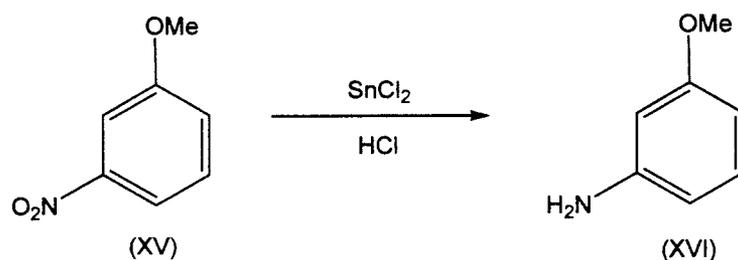
### 6.1.3.7 9-[[3-(3-metoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina

#### 6.1.3.7.1 3-nitroanisol (XV)



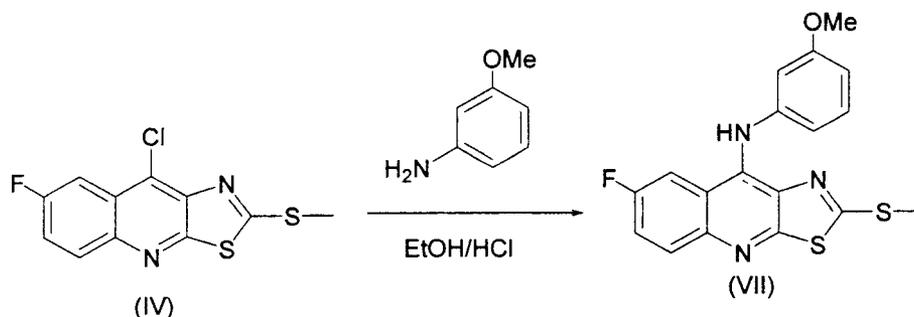
En un matraz de fondo redondo de una boca y con agitación magnética, se colocaron 10 g (0.072 moles) de 3-nitrofenol y se añadieron 30 ml de una solución de NaOH al 15% (0.1125 moles). La mezcla se agitó vigorosamente y se formó una solución de color rojo pardo. La solución se enfrió a 10° C y se añadieron por goteo 7.2 ml (0.076 moles) de sulfato de dimetilo cuidando que la temperatura se mantuviera en 10° C. Terminada la adición se dejó agitando a temperatura ambiente por 10 minutos, se adaptó un refrigerante y se calentó a reflujo por 2 horas. Durante los primeros 10 minutos la solución se fue aclarando hasta quedar de color café claro. Terminado el tiempo de reflujo se extrajo con acetato de etilo (4 x 20 ml), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con NaOH al 5% (4 x 10 ml) y agua destilada (3 x 15 ml). La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida, quedando un residuo color café que se recristalizó de hexano, obteniéndose 5.90 g (54%) de agujas blancas de 3-nitroanisol con un punto de fusión de 38°C (Lit 38-39° C) y un Rf de 0.46 (sistema II)

## 6.1.3.7.2 3-aminoanisol (XVI)



En un vaso de precipitados con agitación magnética puesto en un baño de hielo-agua, se colocaron 30 ml de HCl concentrado y se añadieron lentamente 7.2 g (30 mmol) de cloruro estanoso. A la suspensión blanca formada, se le añadió lentamente 1.00 g (7.2 mmol) de 3-nitroanisol, terminada la adición se dejó en agitación por 10 minutos, se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó agitando por 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión ligeramente amarilla se ajustó a pH 14 con una solución de NaOH al 50% quedando una solución blanca que se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml), las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con agua destilada, hasta que las aguas de lavado fueran neutras. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida, quedando 700 mg (87%) de un aceite amarillo que mostró una sola mancha en cromatografía de capa fina con un Rf de 0.30 (sistema II)

## 6.1.3.7.2 9-[[3-metoxi]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 143 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 148.8 mg (1.2 mmol) de 3-aminoanisol y se calentó la mezcla a reflujo durante 16 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión

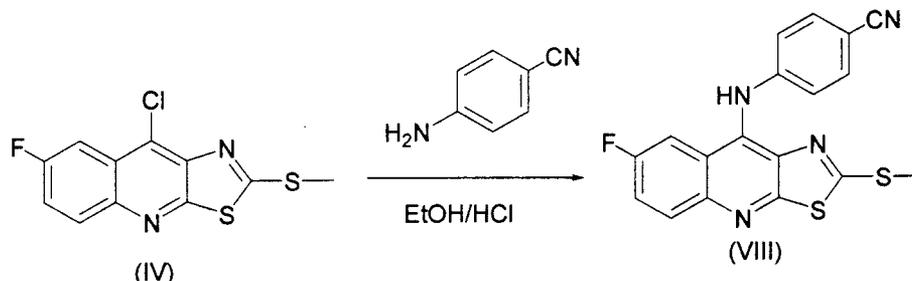
reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, el sólido amarillo resultante se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10 mL de H<sub>2</sub>O y se llevó a pH= 10 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo limón, el cual se resuspendió en diclorometano, se filtró al vacío y se secó por succión para obtener 130.9 mg (70.07%) de 7-fluoro-9-[[3-metoxi]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un R<sub>f</sub> de 0.53 (sistema II) y un punto de fusión de 193-195° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 13): 3424 (-NH-); 1599, 1578, 1549, 1510, 1486, 1438 (aromáticos); 3028 (-OCH<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 14): 2.359 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 3.71 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.74 (m, 3H) H-2', H-4', H-6'; 7.25 (dd, J= 8.7,8.7 Hz) H-5'; 7.75 (ddd, J= 10.5,7.8,2.7) H-6; 7.97 (dd, J= 9.3,5.1) H-5; 8.27 (dd, J= 10.8,2.7) H-8; 10.13 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (IE, espectro 15): 372 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 371 (M<sup>+</sup>, 17.4%)

#### 6.1.3.8 7-fluoro-9-[[4-ciano]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (VIII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 142 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol y se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 126 mg (1.05 mmol) de 4-aminobenzonitrilo y se calentó la mezcla a reflujo durante 27 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10 mL de agua destilada y se ajustó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo que se filtró al vacío, posteriormente este sólido se resuspendió en diclorometano y se separó y secó por succión para obtener 111.0 mg (75.05%) de 7-fluoro-9-[[4-ciano]fenil]amino]-2-

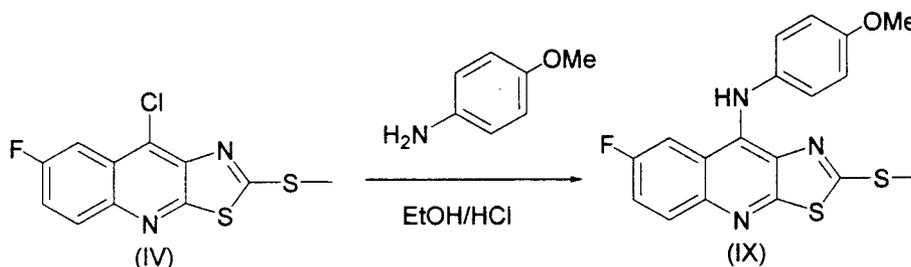
(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.38 (sistema II) y un punto de fusión de 235-238° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 16): 3422 (-NH-); 1600, 1575, 1534, 1511, 1496, 1474, 1437 (aromáticos); 2220 (-CN).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 17): 2.49 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.2 (d, J=8.1) H-2', H-6'; 7.66 (d, J=8.1) H-3', H-5'; 7.72 (dd, J= 9.0,7.5), H-6; 8.07 (dd, J=9.6), H-5; 8.15 (d, J=9), H-8; 9.90 (sa, intercambia con D<sub>2</sub>O) NHAr

EM (FAB, espectro 18): 367 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 366 (M<sup>+</sup>, 28.4%)

#### 6.1.3.9 9-[[4-metoxi]fenil]amino]-7-fluoro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (IX)



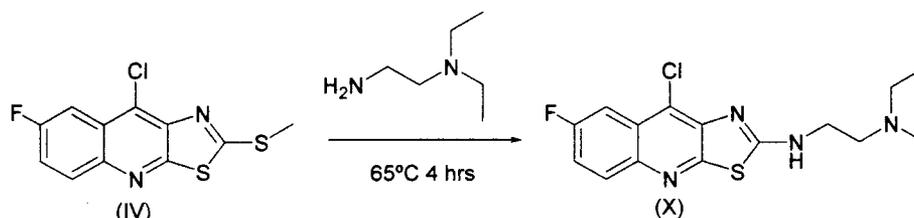
En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 143 mg (0.5 mmol) del compuesto IV en 5 mL de etanol y se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 80 mg (0.65 mmol) de 4-aminoanisol y se calentó la mezcla a reflujo durante 20 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua, se separó por filtración al vacío, se resuspendió nuevamente en 10mL de agua destilada y se llevó a pH= 8 con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido amarillo limón que se filtró al vacío, se lavó con cloroformo y se secó por succión para obtener 133.93 mg (72.3%) de 7-fluoro-9-[[4-metoxi]fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina, con un Rf de 0.5 (sistema II) y un punto de fusión de 203-205° C (con descomposición) al que se determinaron sus constantes espectroscópicas:

IR (pastilla, espectro 19): 3444, 3204 (-NH-); 1602, 1577, 1545, 1504, 1472, 1444 (aromáticos); 3026 (-OCH<sub>3</sub>).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 20): 2.30 (s, 3H)  $\text{SCH}_3$ ; 3.77 (s, 3H)  $\text{OCH}_3$ ; 6.96 (d,  $J= 8.8$ ), H-3', H-5'; 7.22 (d,  $J= 8.8$ ), H-2', H-6'; 7.78 (ddd,  $J= 9.2, 8.0, 2.8$ ) H-6; 7.989 (dd,  $J= 9.2, 5.6$ ) H-5; 8.413 (dd,  $J= 11.2, 2.4$ ) H-8; 10.11 (sa, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ) NHAr

EM (FAB, espectro 21): 372 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%), 371 ( $\text{M}^+$ , 26.1%)

#### 6.1.3.10 9-Cloro-7-Fluoro-2-[[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]tiazolo [5,4-*b*]quinolina (X)



En un matraz de una boca acondicionado con refrigerante y bajo atmósfera de argón, se colocaron 150 mg del compuesto IV (0.53 mmol), 0.3 mL (4.5 mmol) de *N,N*-dietiletilendiamina y 1 mL de benceno, la mezcla se colocó en baño María y se agitó manteniendo la temperatura del baño en  $60^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Durante el transcurso de la reacción se apreció el desprendimiento de un olor desagradable. A la solución café resultante se agregaron 30 mL de diclorometano (3 x 10 mL). La solución orgánica se lavó con agua destilada (3 x 5 mL) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 5 mL) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida, obteniéndose un sólido de color blanco de consistencia ligeramente pastosa, el cual se resuspendió en metanol, se separó y se secó por succión obteniéndose 78.1 mg de un sólido color blanco (42.23%) de 7-fluoro-9-cloro-2-[[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]tiazolo[5,4-*b*]quinolina con un punto de fusión de  $138\text{-}140^\circ\text{C}$  y un  $R_f$  de 0.44 (sistema V) determinándose sus constantes espectroscópicas:

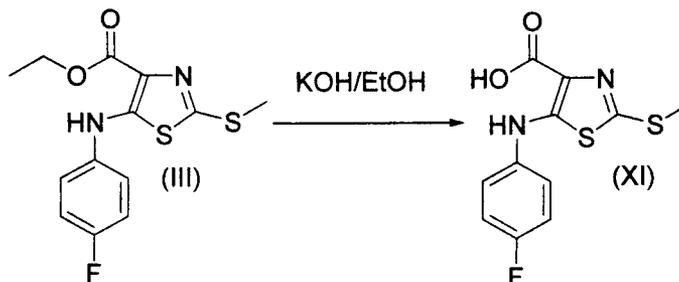
IR (pastilla, espectro 22): 3425 ( $-\text{NH}-$ ); 2965, 1392 ( $-\text{CH}_3$ ); 1615, 1564, 1495, 1445, 1424 (aromáticos).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , espectro 23): 1.06 (t,  $J= 6.9$ , 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.53 (q,  $J=7.2$ , 4H) 2- $\text{CH}_2$ -; 2.65 (t,  $J= 7.2, 2\text{H}$ )  $-\text{CH}_2-$ ; 3.64 (sa, 2H)  $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ; (dd,  $J= 9.9, 2.1\text{Hz}$ ) H-8; 7.98 (dd,  $J= 9.0, 5.7$ ) H-5; 7.54 (ddd,  $J=9.0, 8.4, 2.4$ ) H-6; 8.91 (sa, intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ) NHAr.

EM (FAB, espectro 24) 353 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

6.1.3.11 9-[[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]-2-(metiltio)-tiazolo[5,4-*b*]quinolina (XIV)

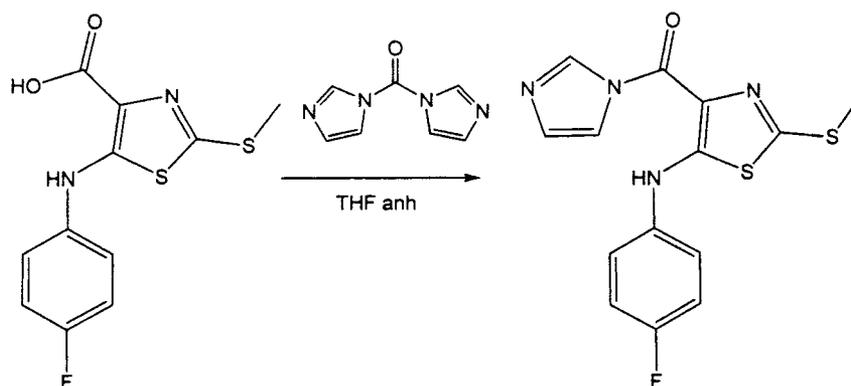
## 6.1.3.11.1 4-Carboxi-5-(fenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XI)



En un matraz de fondo redondo de dos bocas, acondicionado con termómetro y agitación magnética, se disolvieron 4.00 g del compuesto III (13.6 mmoles) por agitación en 40 ml de etanol absoluto. A la solución se le agregó una solución de 2.45 g de hidróxido de potasio en 3.5 ml de agua y se calentó en baño María a reflujo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió sobre 500 ml de agua-hielo. Se acidificó con ácido clorhídrico al 10% hasta pH aproximadamente 5. El precipitado blanco formado se separó por filtración al vacío y se dejó secando por succión para obtener 2.87g (78.82%) de un sólido rosa claro con un  $R_f$  de 0.29 (sistema III)

## 6.1.3.11.2 4-(1H-imidazol-1-il)carbonil-5-(4-fluorofenilamino)-2-

## (metiltio)tiazol (XII)



En un matraz acondicionado con refrigerante, condiciones anhidras y trampa de cloruro de calcio, se colocaron 684 mg de 1,1'-carbonildiimidazol (4.20 mmol) y se suspendieron en 5 ml de tetrahidrofurano anhidro. La suspensión blanca se enfrió en baño

de hielo-agua a 5° C y se agregaron 532 mg del compuesto IV (1.873 mmol). Se observó la formación de una solución color ámbar y la evolución de dióxido de carbono. Se retiró el sistema de enfriamiento, se cambió por un baño María, se calentó a reflujo por 1 hora. Transcurrido este tiempo se agregaron 25 ml de diclorometano y la solución orgánica se lavó con bicarbonato de sodio al 10% (3 x 10 ml), agua destilada (3 x 10 ml) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 10 ml) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida obteniéndose 295 mg (88.3%) de un sólido color amarillo intenso con un punto de fusión de 38°C y un Rf de 0.50 (sistema III), sus constantes espectroscópicas son:

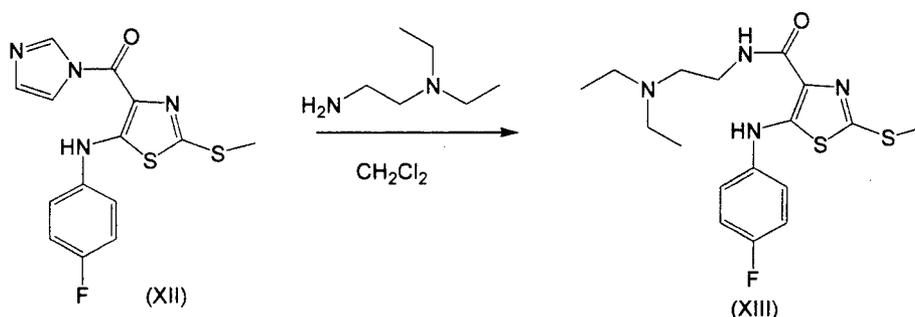
IR (pastilla, espectro 25): 3209, 3154, 3062 (NC=O); 1620 (C=O); 1604, 1554, 1509, 1420 (aromáticos).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 26): 2.71 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.13 (d, J= 8.1,2.1) H-2', H-6'; 7.14 (s, 1H) H-4''; 7.28 (ddd, J=9.0,3.6,2.1) H-3'; 8.04 (s, 1H) H-2''; 9.12 (s, 1H) H-5''; 10.5 (s, 1H, intercambia lentamente con D<sub>2</sub>O) N-H.

EM (FAB, espectro 27): 335 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

#### 6.1.3.11.3 4-[[2-(N,N-dietilamino)]etil]carbamoil]-5-(4-

#### fluorofenilamino)-2-(metiltio)tiazol (XIII)



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante y trampa de cloruro de calcio se suspendieron 382 mg (1mmol) del compuesto XII en 5 mL de diclorometano y se añadió una solución de 0.3 mL (3 mmol) de *N,N*-dietiletilendiamina en 2 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se agregaron 20 mL de diclorometano y la solución orgánica se lavó con agua destilada (3 x 10 mL) y solución saturada de cloruro de amonio (3 x 10 mL) y se trató con sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el diclorometano a presión reducida

obteniéndose un sólido ligeramente amarillo, el cual se resuspende en benceno y se separa por filtración al vacío para obtener 344 mg (90.12%) de un sólido blanco con punto de fusión de 40°C y un Rf de 0.50 (sistema III), sus constantes espectroscópicas son:

IR (pastilla, espectro 28): 3410 (-NH-); 3117, 3067 (NC=O); 2962 (-CH<sub>3</sub>); 1775, 1666 (C=O); 1555, 1508, 1451 (aromáticos)

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, espectro 29): 1.05 (t, J=7.2, 6H, 2 -CH<sub>3</sub>), 2.62 (q J=7.2, 4H, 2 -CH<sub>2</sub>), 2.7 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.76 (t, J=7.5, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.64 (t, J=7.5 2H, CH<sub>2</sub>), 7.24 (td, J=8.1, 2.1, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (ddd, J= 9.0, 3.6, 2.1, 2H, H-3', H-5')

EM (FAB, espectro 30) 383 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

## 6.2 Pruebas de intercalación en ADN

Las soluciones de los compuestos a evaluar fueron preparadas en DMSO. En todos los casos se pesó el compuesto en una balanza analítica Satorius Handy H51 y se disolvió directamente en 5 mL de DMSO. A continuación se muestra una tabla con los pesos de los compuestos y la concentración de cada solución patrón:

**Tabla 12. Soluciones patrón de los compuestos.**

Compuesto	Peso (mg)	Conc. (mg/mL)
V	2.1	0.42
VI	2.3	0.46
VII	2.2	0.44
VIII	2.3	0.46
IX	2.2	0.44
X	2.2	0.44
AHMA	2.1	0.42

El compuesto AHMA se utilizó como control debido a que se trata de una agente intercalante muy efectivo y reportado anteriormente en literatura.

Se prepararon las siguientes soluciones para los ensayos:

### 6.2.1 Buffer Tris-HCl 0.1M, pH= 7.4

Se pesaron 6.057 g (0.05mol) de Tris y se disolvieron en 490 mL de agua desionizada y filtrada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl concentrado utilizando un potenciómetro. Se transfirió la solución a un matríz volumétrico de 500 mL y se ajustó el

---

volumen con agua desionizada filtrada. El buffer se transfirió a 5 frascos con 100 mL cada uno y se esterilizó en una autoclave durante 15 min a 15 lb de presión y 121°C. El buffer se utilizó en la preparación de la solución de ADN.

### **6.2.2 Buffer Tris-HCl 0.4M, pH= 7.4**

Se pesaron 2.423 g (0.02mol) de Tris y se disolvieron en 40 mL de agua desionizada y filtrada, se ajustó el pH a 7.4 con HCl concentrado utilizando un potenciómetro. Se transfirió la solución a un matraz volumétrico de 50 mL y se ajustó el volumen con agua desionizada filtrada. El buffer se utilizó en los ensayos de desplazamiento de bromuro de etidio.

### **6.2.3 Solución de ADN 300 µg/mL**

Se pesó una fibra de ADN de alto peso molecular con ayuda de pinzas flameadas con etanol. A partir de este punto todo el manejo del ADN se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Los viales y el agua utilizados en la preparación de esta solución fueron previamente esterilizados en autoclave a 15lb de presión y 121°C durante 15min.

La fibra se colocó dentro de un vial estéril y se le agregaron 15 mL del buffer Tris-HCl 0.1M pH= 7.4 estéril, el vial se cerró y se dejó en el refrigerador durante toda la noche para permitir la hidratación del ADN.

Se realizó la diálisis de la solución de ADN colocando la solución de ADN dentro de una bolsa de diálisis de tamaño adecuado dejando algo de aire dentro de la misma, la bolsa cerrada se colocó dentro de un vaso de precipitados con agitación magnética y agua estéril suficiente para cubrir la bolsa de diálisis, se dejó en agitación durante dos horas. Transcurrido ese tiempo el agua se cambió por Buffer Tris-HCl 0.1M pH=7.4 estéril y se mantuvo en agitación en un cuarto frío durante toda la noche. Se transfirió la solución de ADN a una caja petri estéril asegurando que no quedara solución en la bolsa de diálisis.

Se realizó la cuantificación de la solución de ADN por espectroscopía UV registrando la absorbencia a una longitud de onda de 260 nm. La concentración de la solución fue de 1,756 mg/mL. De la caja se tomaron alícuotas de 685 µL y se transfirieron a frascos viales con tapón de rosca estériles con capacidad de 5 mL. A partir de este punto el manejo del ADN ya no se realizó bajo condiciones de esterilidad. Los viales se

---

almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para su utilización las soluciones de ADN se descongelaron y se le agregó a cada frasco a utilizar una alícuota de  $3315\ \mu\text{L}$  de agua desionizada para completar un volumen final de  $4\text{mL}$  de la solución y obtener una concentración aproximada de  $300\ \mu\text{M}$  de ADN.

#### 6.2.4 Solución $0.72\ \text{mM}$ de Bromuro de Etidio

Se pesaron  $40\ \text{mg}$  de bromuro de etidio ( $0.1\text{mmol}$ ) y se disolvieron en  $1\ \text{mL}$  de DMSO. La solución se filtró a través de un filtro Millipore, previamente esterilizado en autoclave. Para conocer la concentración de la solución se realizó una cuantificación por espectroscopia UV/vis, para lo cual se tomaron  $20\ \mu\text{L}$  de la solución y se llevó al aforo con agua en un matraz volumétrico de  $50\ \text{mL}$ . Se realizó un barrido del espectro de absorción de  $200$  a  $500\ \text{nm}$  y se determinó la absorbencia a  $285\ \text{nm}$  con lo cual se calculó la concentración del bromuro de etidio. La concentración de la solución fue de  $72\ \text{mM}$ . Finalmente se preparó una solución poniendo  $5\ \mu\text{L}$  de la solución anterior en un volumen final de  $0.5\ \text{mL}$ .

La determinación de las propiedades intercalantes en ADN fue realizada a través del ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio en ADN<sup>10</sup>. Todas las determinaciones se realizaron en celdas de cuarzo de  $10\ \text{mm}$  ( $3\ \text{mL}$ ) de longitud. El equipo utilizado fue un espectrofluorómetro marca Shimadzu, modelo RF5000U con lámpara de Xenón. Los parámetros utilizados durante las determinaciones fueron los siguientes:

- Modo de barrido: Tiempo.
- Longitudes de onda: Excitación  $546\ \text{nm}$ ; Emisión  $584\ \text{nm}$ .
- Anchos de banda: Excitación  $3\ \text{nm}$ ; Emisión  $5\ \text{nm}$ .
- Sensibilidad: Alta.
- Resolución: Fina.

#### 6.2.5 Preparación de los ensayos.

Las concentraciones de los reactivos durante los ensayos fueron las siguientes:

**Tabla 13. Preparación de los ensayos.**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final aproximada
Sol. Patrón de ADN (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	300	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Tris- HCl (0.4M)	750	0.1 M
Bromuro de etidio (0.72mM)	20	5 $\mu\text{M}$
Agua desionizada	1630	---

*El volumen final de cada ensayo fue de 2.7 mL antes de la adición de las soluciones de los compuestos. El volumen al final de cada prueba fue de aproximadamente 3 mL.*

Previo a las determinaciones se permitió la homogeneización de la mezcla durante unos segundos mediante agitación magnética. Posteriormente se inició la lectura de fluorescencia y cada 30 segundos se agregaron alícuotas de la solución stock del compuesto a evaluar de la siguiente manera:

**Tabla 14. Adición y volumen de las alícuotas**

Tiempo(seg)	Vol( $\mu\text{L}$ )
0	0
30	10
60	10
90	10
120	20
150	20
180	20
210	30
240	30
270	30
300*	50
330*	50

*\*Compuesto X y AHMA.*

Todos los compuestos excepto el X y AHMA presentaron problemas de solubilidad, por lo cual sólo se realizó la prueba hasta la adición de 180  $\mu\text{L}$  (270 seg) de la solución stock del compuesto. Después de este punto, los registros de fluorescencia no son confiables debido a la interferencia de las partículas suspendidas. Para cada serie de ensayos, se corrieron tres blancos con DMSO para eliminar los efectos de la dilución.

Para cada compuesto se realizaron 6 repeticiones del ensayo descrito anteriormente. Se hizo un promedio de los datos obtenidos de las 6 repeticiones y los resultados se ajustaron a la ecuación de una hipérbola cuadrada de la cual se obtuvieron los valores de  $Q_{max}$  (quenching máximo) y  $Q_{50}$  (concentración necesaria para lograr el 50% del quenching máximo) de cada compuesto.

## 7. Conclusiones

- Se lograron sintetizar seis de los siete derivados novedosos de tiazolo[5,4-b]quinolina propuestos con buenos rendimientos.
- El rendimiento obtenido para el compuesto X es moderado por lo que queda pendiente la optimización de la técnica de obtención del compuesto.
- La metodología utilizada para la síntesis del compuesto XIV no es la adecuada, por lo que queda pendiente su obtención.
- Se aisló y caracterizó un nuevo intermediario (compuesto XII) y se simplificó la purificación del compuesto XIII.
- Los seis derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina obtenidos fueron caracterizados mediante sus constantes físicas y datos espectroscópicos.
- Los derivados sintetizados tienen menor afinidad al ADN y menor eficiencia para intercalarse entre los pares de bases del mismo que sus análogos no fluorados.
- En general los resultados de las pruebas de intercalación en ADN de los derivados sintetizados sugieren que éstos no son buenos agentes intercalantes.
- El ensayo por desplazamiento de bromuro de etidio no resultó adecuado para determinar las propiedades intercalantes del compuesto IX.

Quedan pendientes los estudios de actividad citotóxica que complementen a los estudios de unión al ADN para conocer los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antitumoral de los compuestos y ayuden a dilucidar su mecanismo de acción.

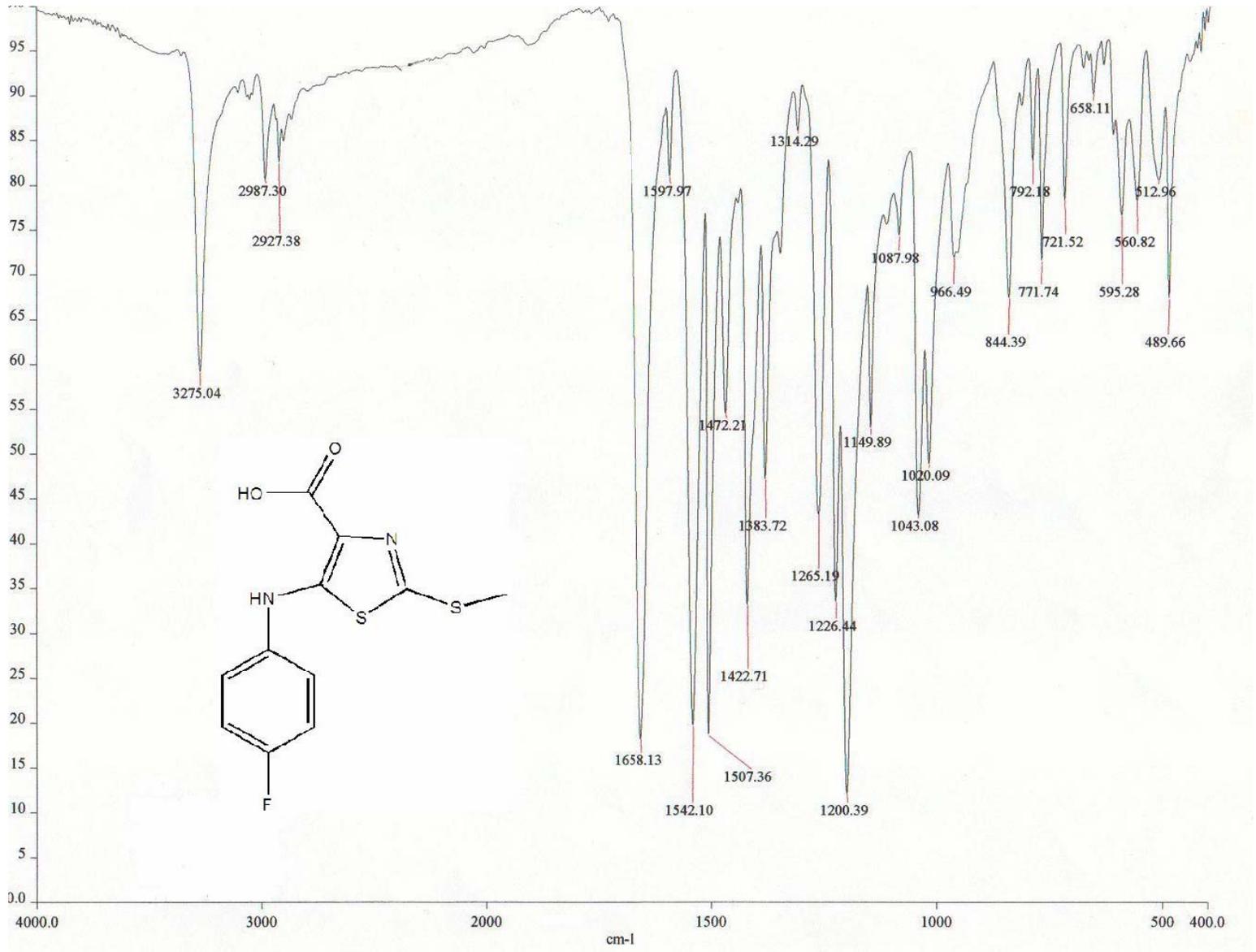
---

## 9. Bibliografía.

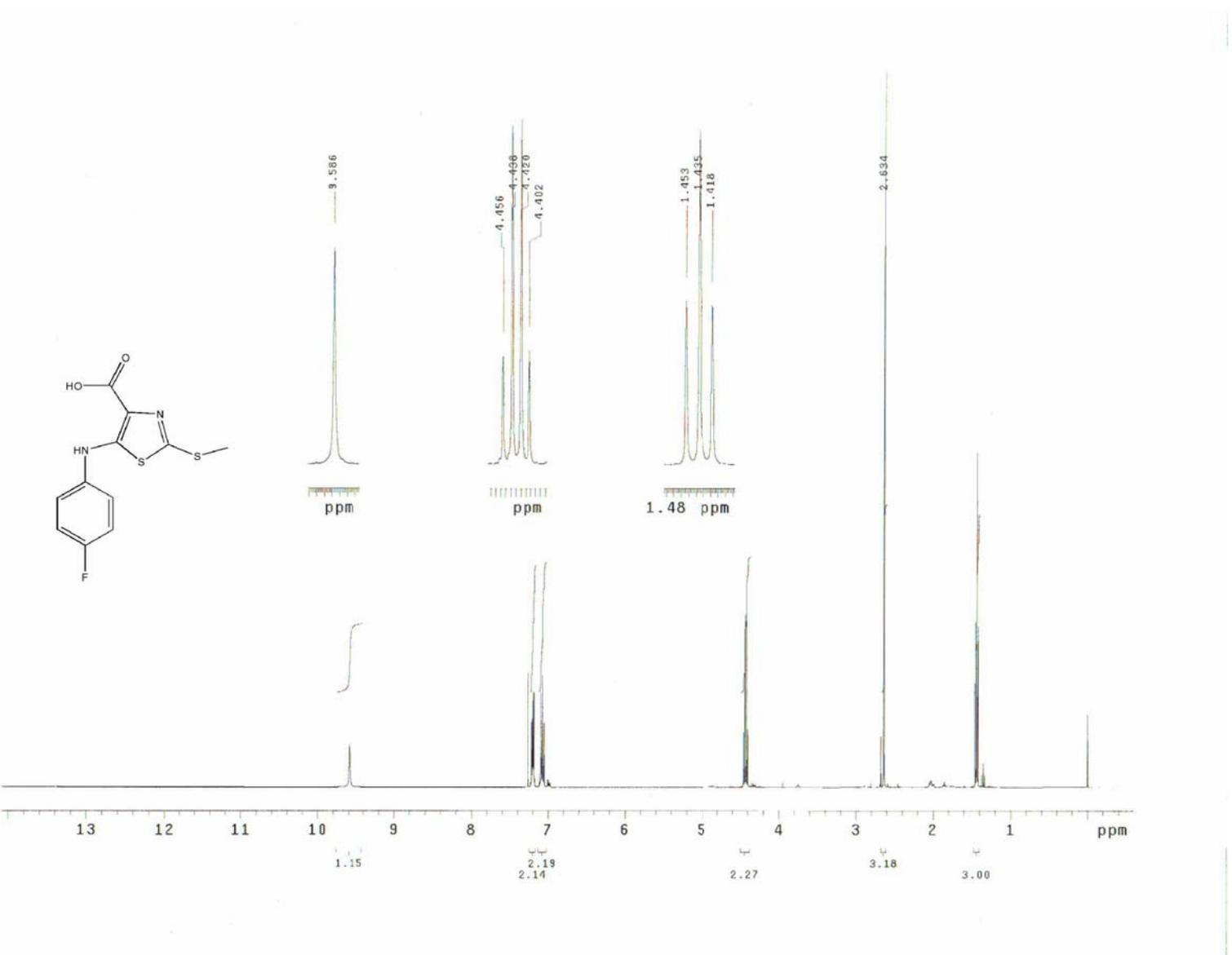
1. Datos del Sistema Nacional de Información en Salud. Secretaría de Salud. México.  
<http://sinais.salud.gov.mx>
2. Lodish H.; Berk A.; Zipursky L.; Matsudaira P.; Baltimore D.; Darnell J.; Biología celular y Molecular, 4ª edición, 2000 NY USA. **2002**
3. W.H. Freeman and company, España. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 24, Cáncer. Pp. 1054- 1082.
4. Pastor J. et. al. Journal of Organic Chemistry, **1997**, 62, 5476-5486.
5. Cory, M.; Tidwell, R. R.; Fairley, T. A.; Journal of Medicinal Chemistry, **1992**, 35,431.
6. MicroCalorimetry News, Nucleic acid-drug Interaction, Issue 3, **2003**, 2, 1-6.
7. Leng F.; Chaires J.; Waring M.; Nucleic Acids Research, **2003**, 31, 6191-6197.
8. Gago F.; A Companion to Methods in Enzymology, **1998**, 14, 277-292
9. Cahen P.; Luhmer M.; Fontaine C.; Morat C. ; Reisse J. ; Bartik K. ; Biophysical Journal ; **2000** ; 78, 1059-1079.
10. Johnson M. ; Kumar B. ; Malathi R. ; Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, **2003**, 20, 677-685
11. A.W. McConnaughie, T.C. Jenkins, Journal of Medicinal Chemistry, **1995**, 38, 3488-3401
12. Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. 2ª edición. **2001**. McGraw Hill. Pp.532-573.
13. Medline Plus, Temas de salud, Radioterapia. Recurso en línea, **2005**,  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/radiationtherapy.html>
14. Manual Merck de Información Médica, recurso en línea, sección 15, capítulo 166, **2005**, Tratamiento del cáncer.  
[http://www.msd.es/publicaciones/mmerck\\_hogar/seccion\\_15/seccion\\_15\\_166.html](http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_15/seccion_15_166.html)
15. Park J; Benz C, Immunotherapy Cancer Treatment, **2001**, Sourceboock, recurso en línea; <http://www.cancersupportivecare.com/immunotherapy.html>
16. Nogrady T. Medicinal Chemistry, a Biomedical Approach, 2ª edición. **1988**, Oxford University Press, pp. 407-419.

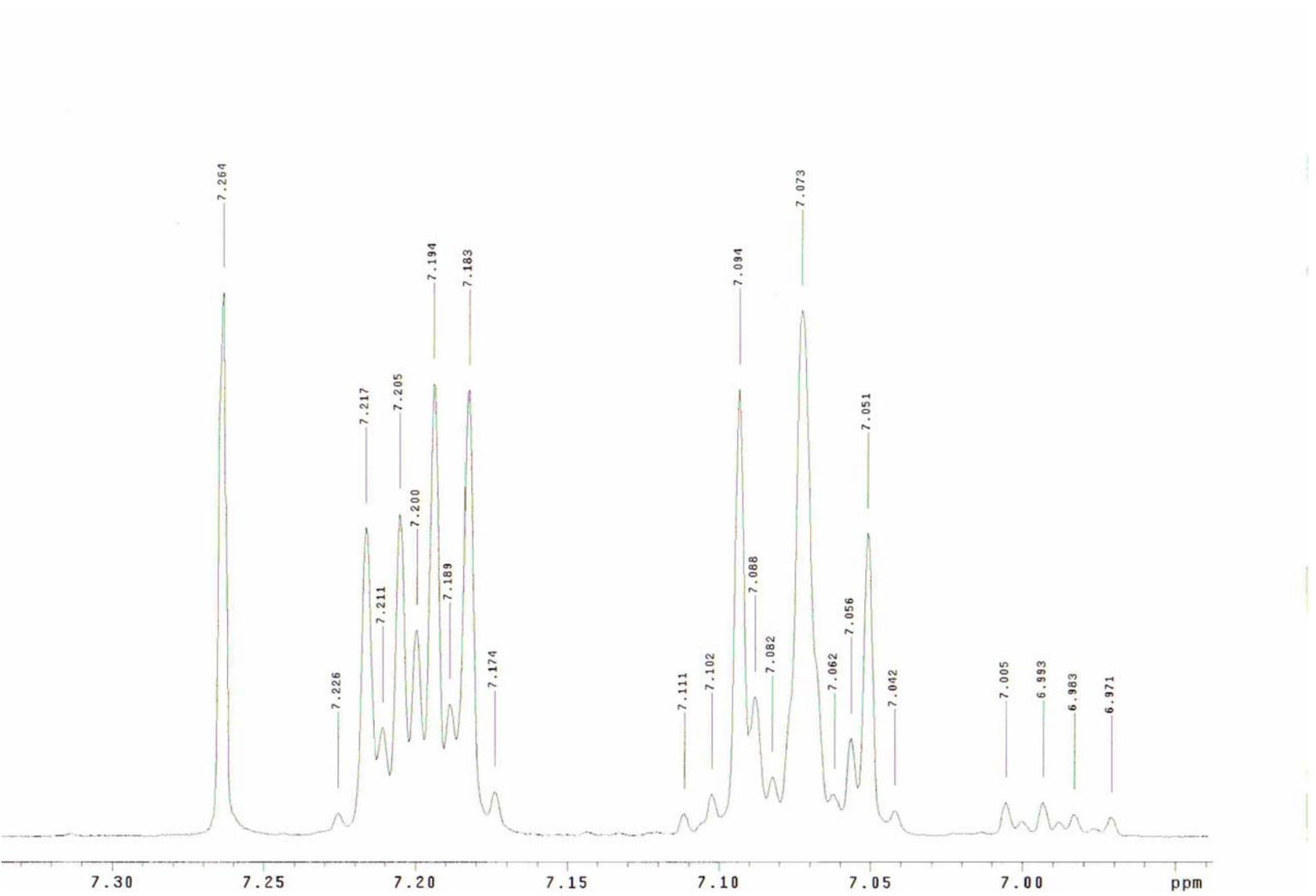
- 
17. Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 20<sup>th</sup> edition, **2001**, International edition. Pp 1381-1445.
  18. Wade L.G. Química Orgánica, 2a edición, **1993**, Pearson Educación., pp. 1159-1163
  19. Demeunykck M, Charmantray F, Martelli A. Current Pharmaceutical Design, Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy, **2001**, pp 1703-1724
  20. Long E; Barton J. Accounts of Chemical Research, **1990**, 23, 271-273.
  21. Austin C.; Marshal K.; BioEssays, **1998**, 20, 215-226.
  22. Corbett A.H.; Regulation of the catalytic cycle of topoisomerase II; **1992**; Thesis (PhD.).
  23. The Oral Cancer Foundation, recurso en línea, [www.oralcancerfoundation.org](http://www.oralcancerfoundation.org)
  24. Holand; Frei. Cancer Medicin, 5a edición, **2000**, American Cancer Society, recurso en línea.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=cmed.TOC&depth=2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=cmed.TOC&depth=2)
  25. Alvarez-Ibarra C., Fernández G.R., Quiroga M.L., Carbonell A. Journal of Medicinal Chemistry 40, **1997**, 668-676.
  26. Rodríguez-Loaiza M.P. Síntesis de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas como potenciales intercaladores del DNA. Tesis de Maestría. UNAM, México, 2000.
  27. Rodríguez-Loaiza M. P., Quintero A., Rodríguez S.R., Solano J., Lira R.A. European Journal of Medicinal Chemistry, 39, **2004**, 5-10.
  28. Loza Mejía M.A. Síntesis de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina como potenciales antitumorales. Tesis de Licenciatura. Universidad La Salle, México, 2002
  29. Loza Mejía M.A. Síntesis y análisis de relación estructura actividad citotóxica de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. Tesis de Maestría, UNAM, México, 2004.
  30. Olvera Vázquez S. Síntesis de 2-(N',N'-alquil-N-trimetilamina)-9-anilino tiazolo[5,4-b]quinolinas como potenciales antitumorales. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, 2005

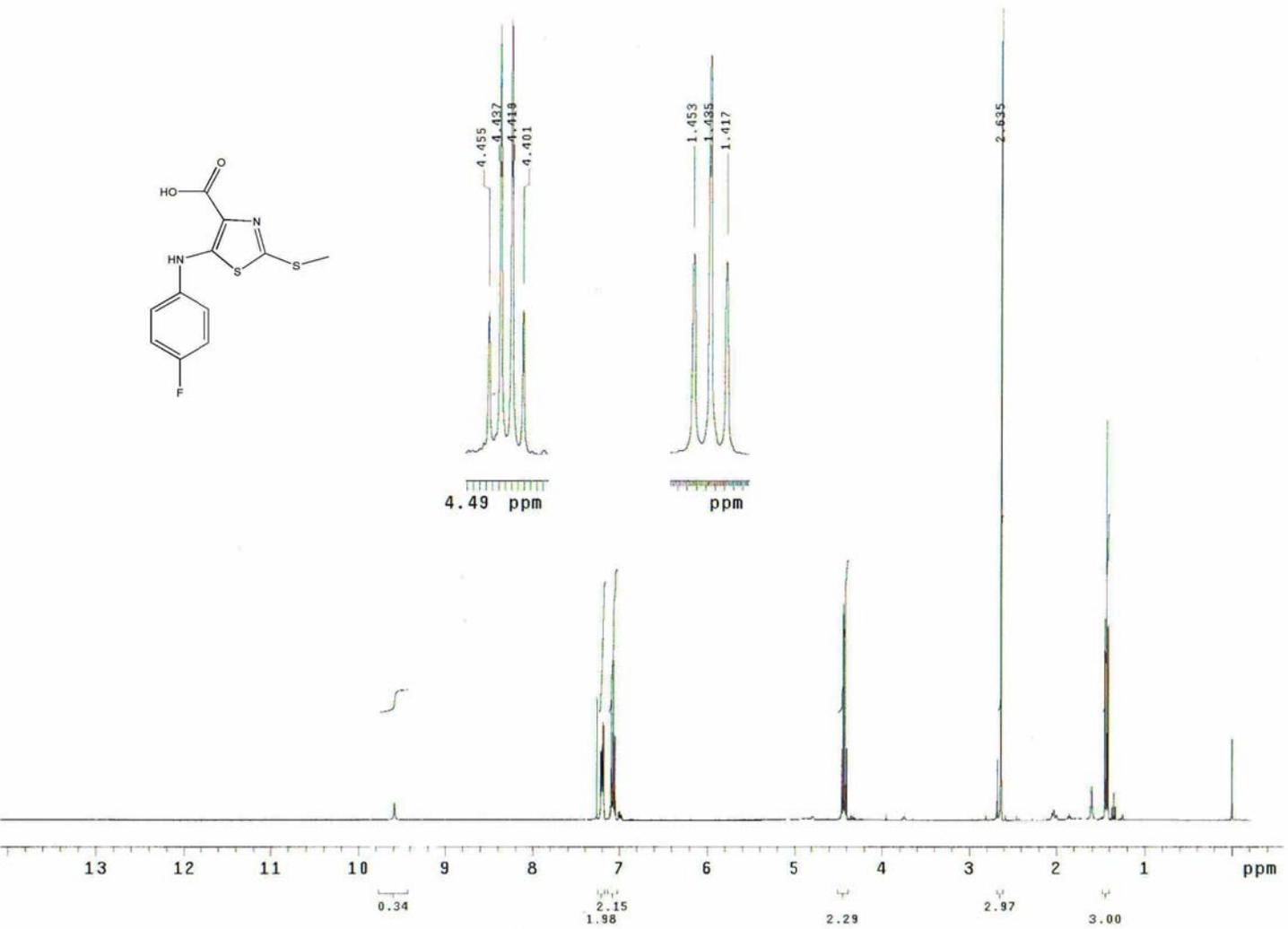
Espectro 1. Espectro de IR del compuesto III.

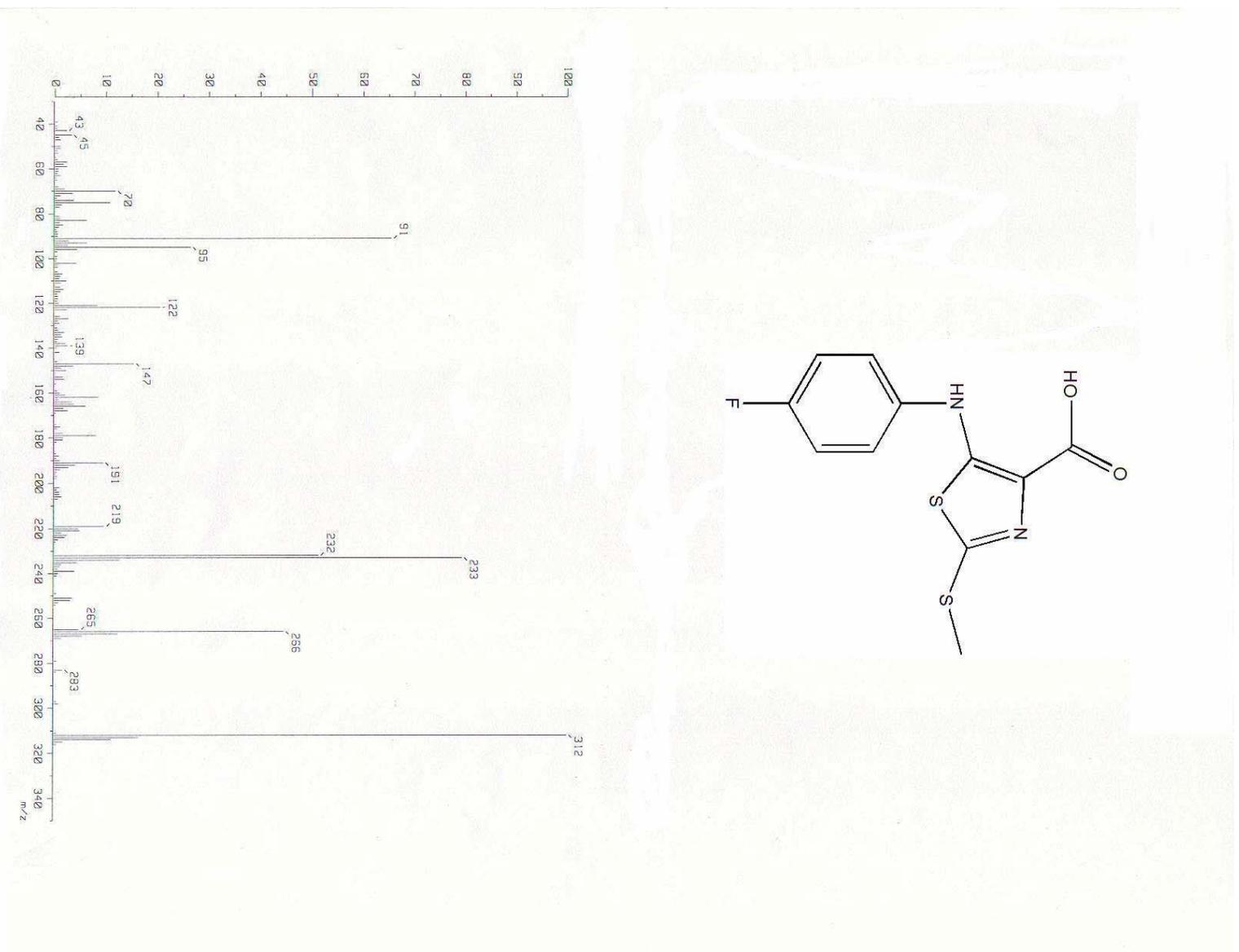


## 8. Espectros

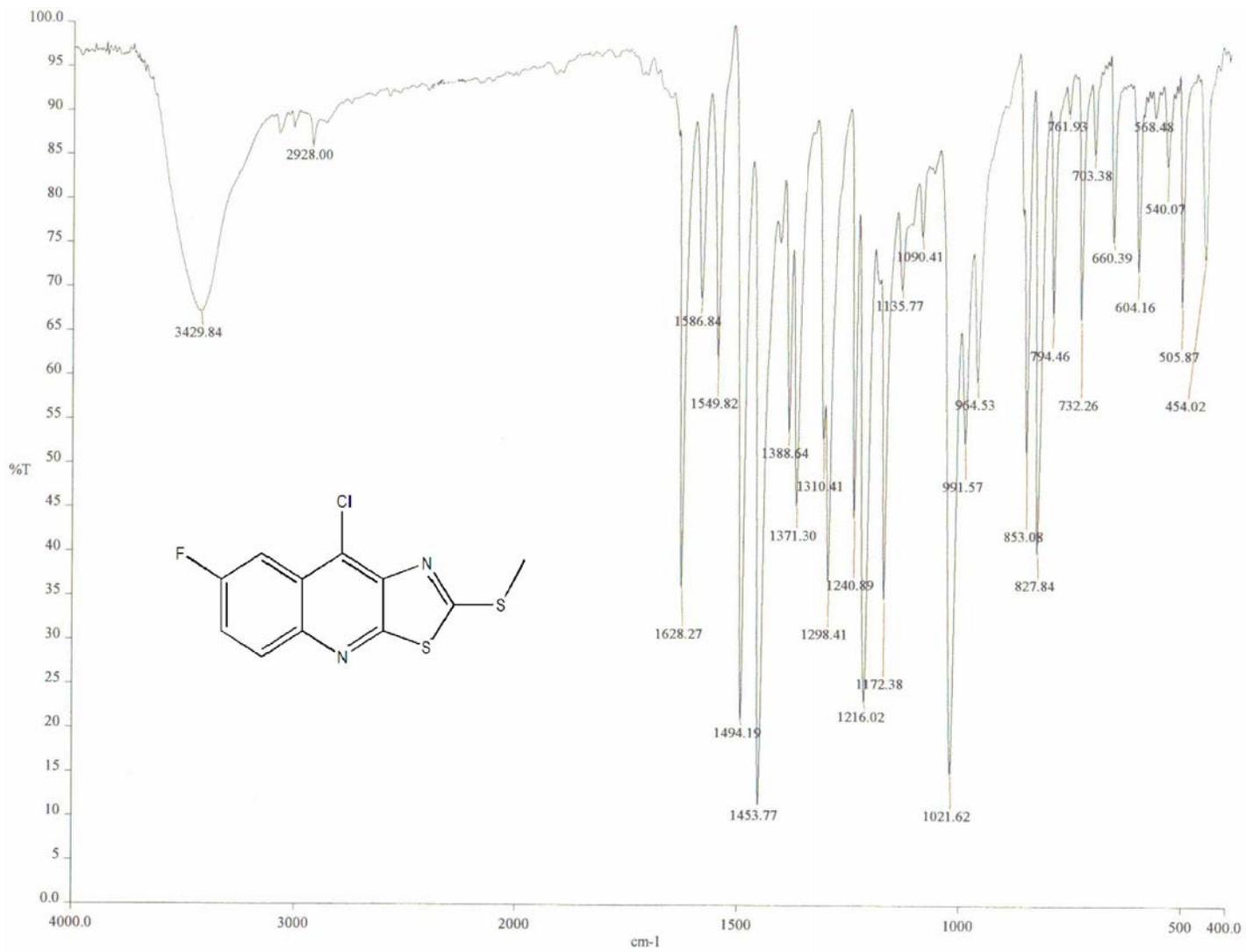
Espectro 2. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto III ( $\text{DMSO-d}_6$ )

Espectro 2. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto III ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación.

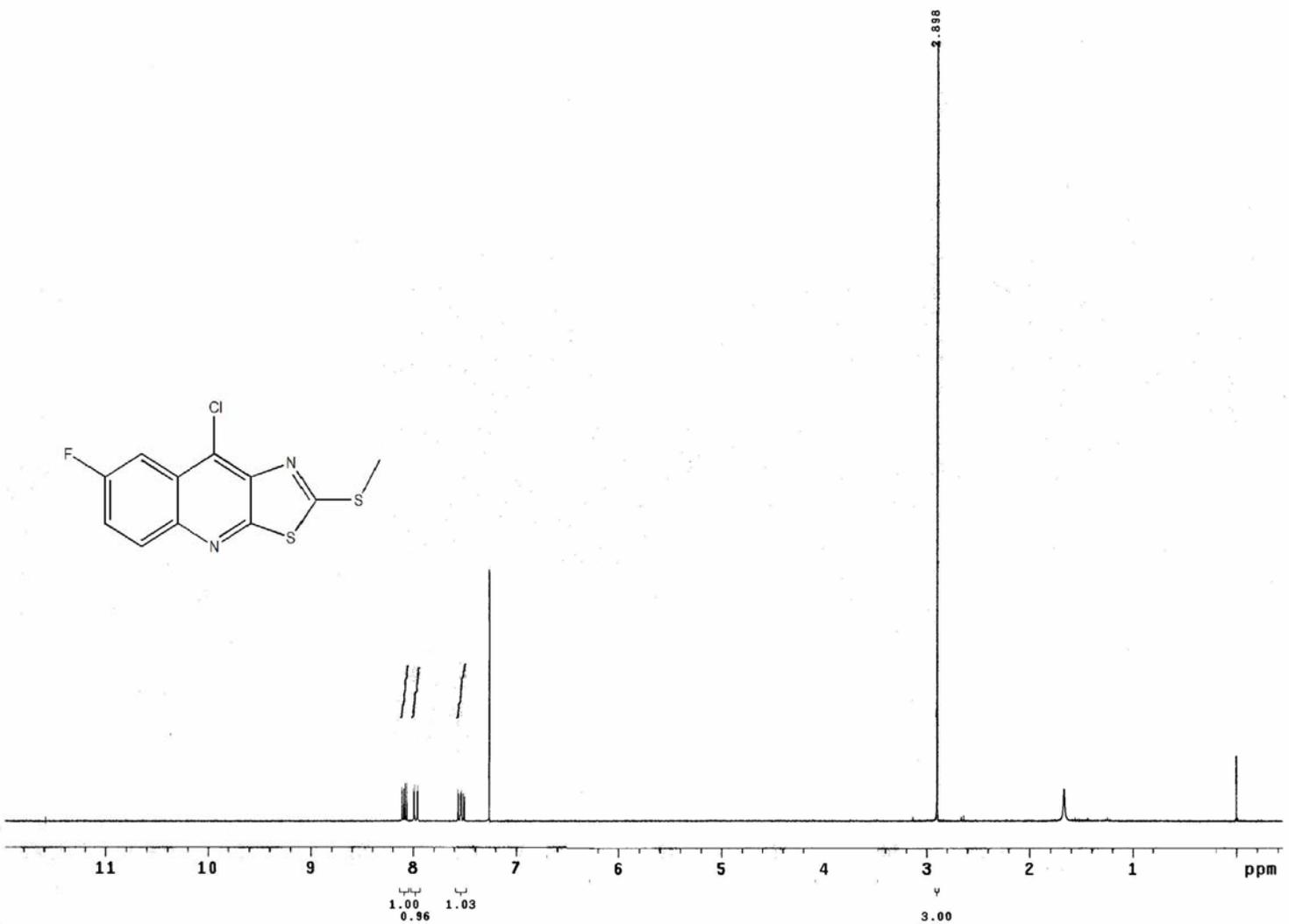
Espectro 2. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto III Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$

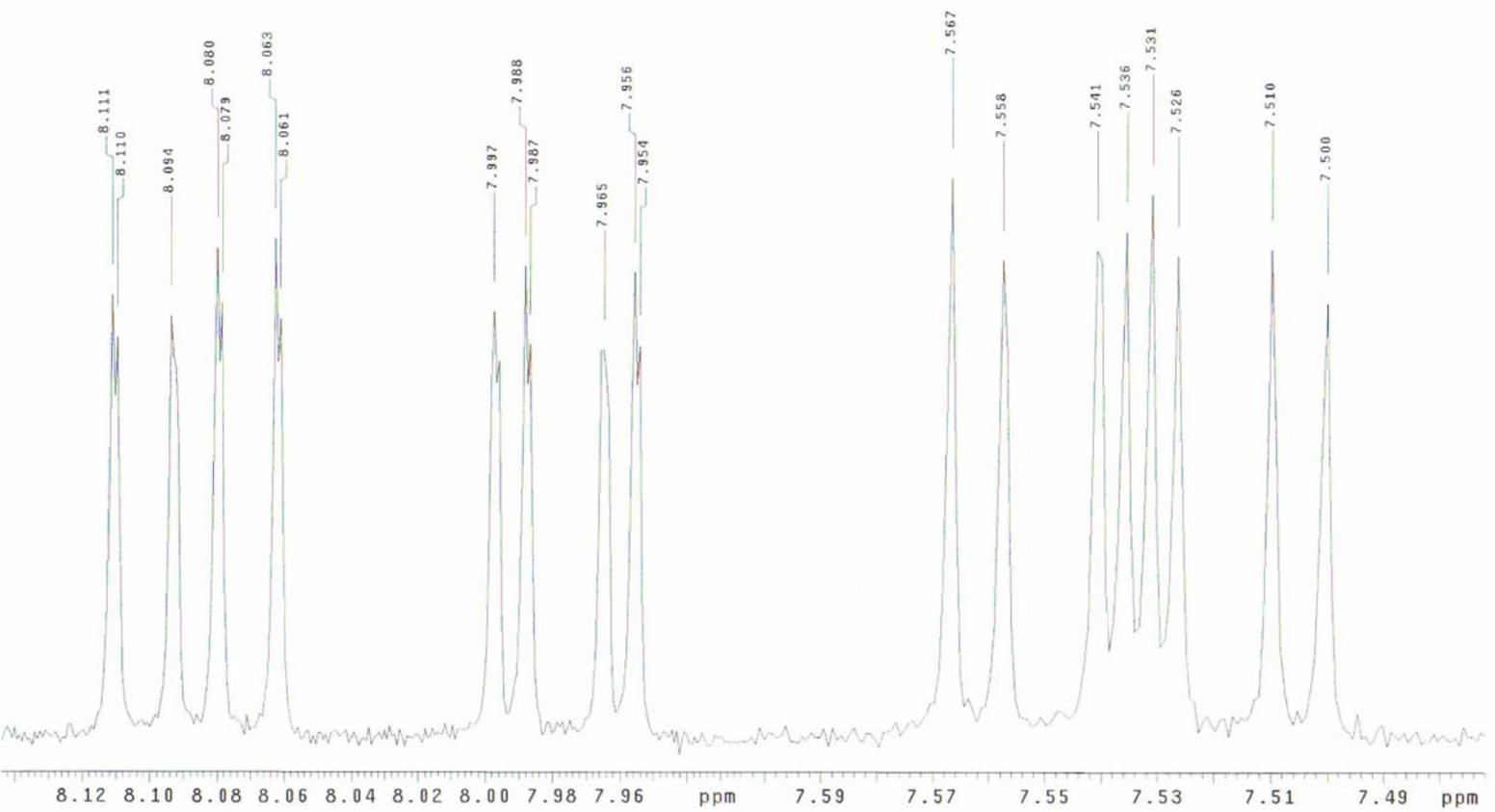


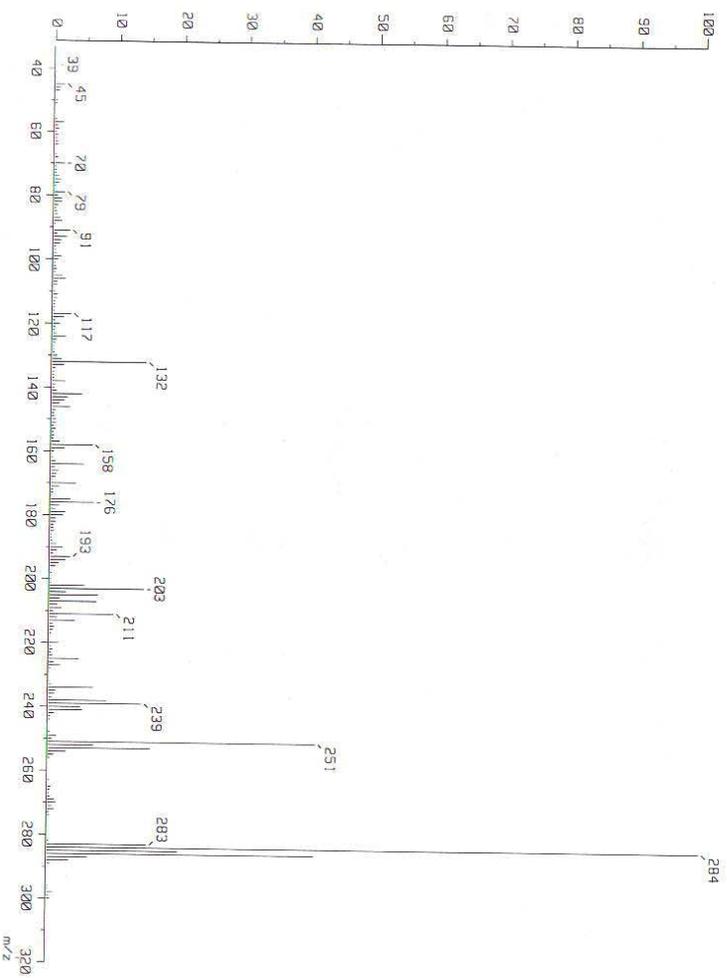
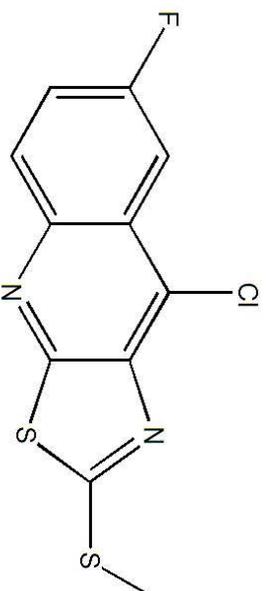
Espectro 3. Espectro de masas del compuesto III (EI)



Espectro 4. Espectro IR del compuesto IV

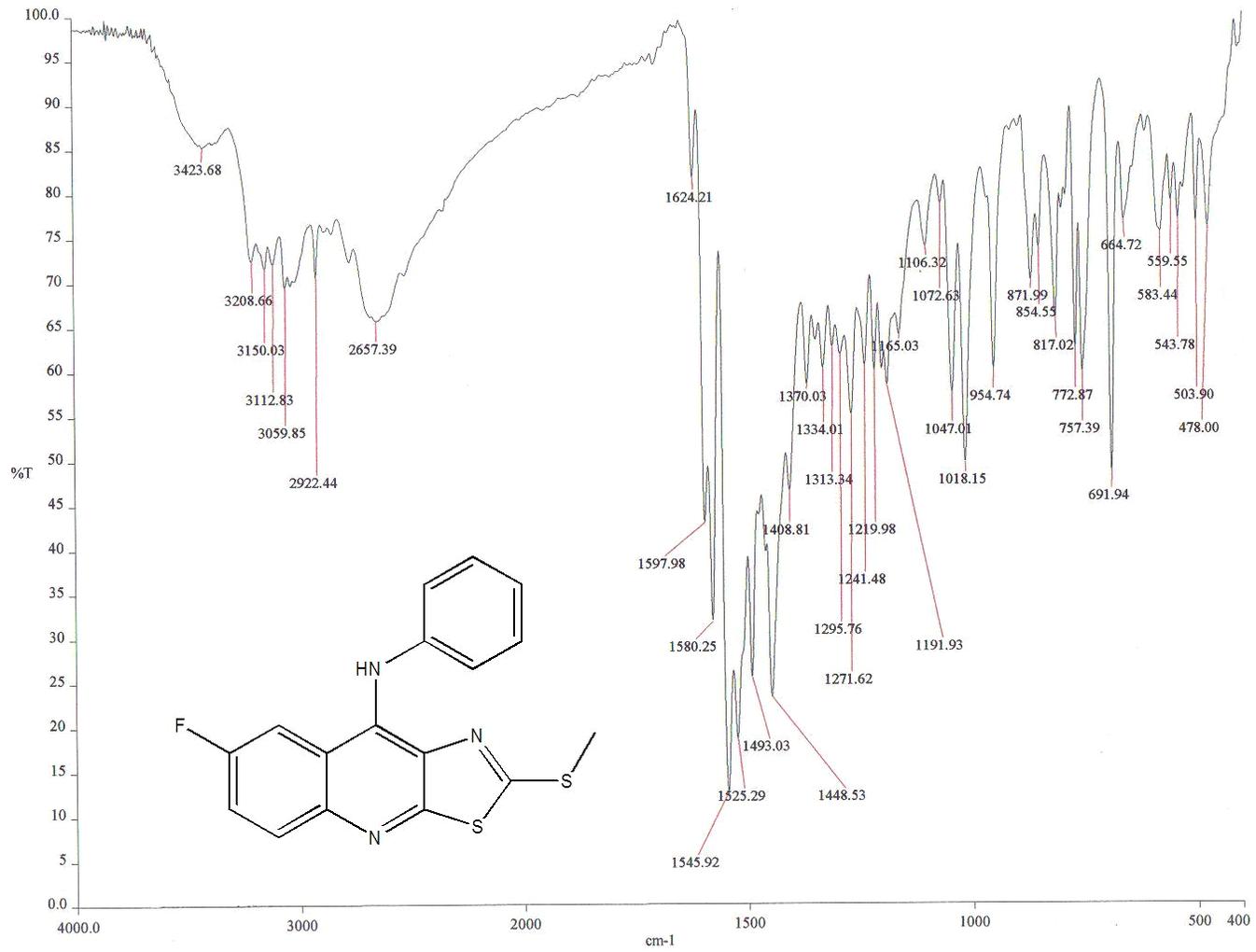
Espectro 5. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto IV ( $\text{DMSO-d}_6$ )

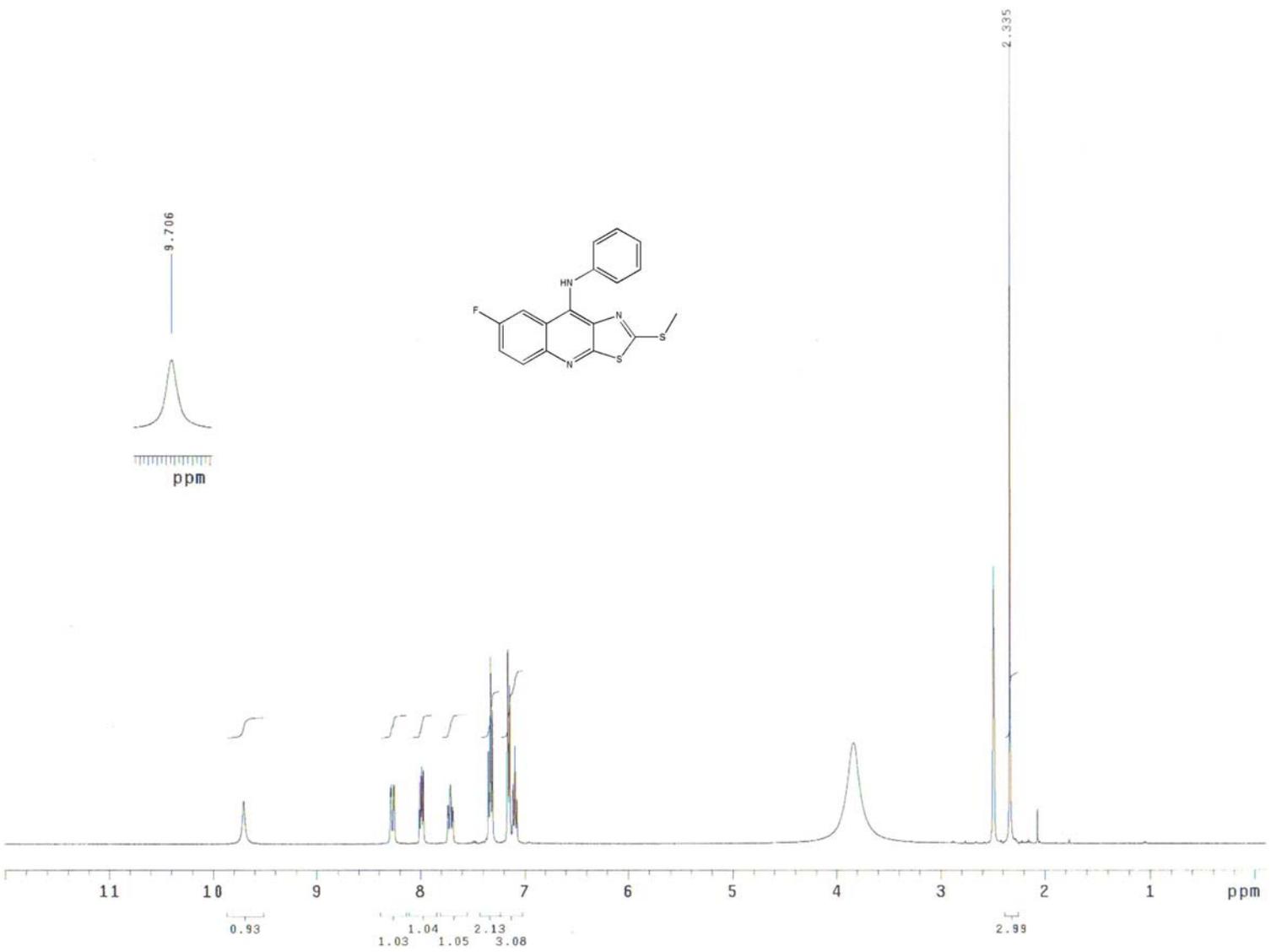
Espectro 5. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto IV ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

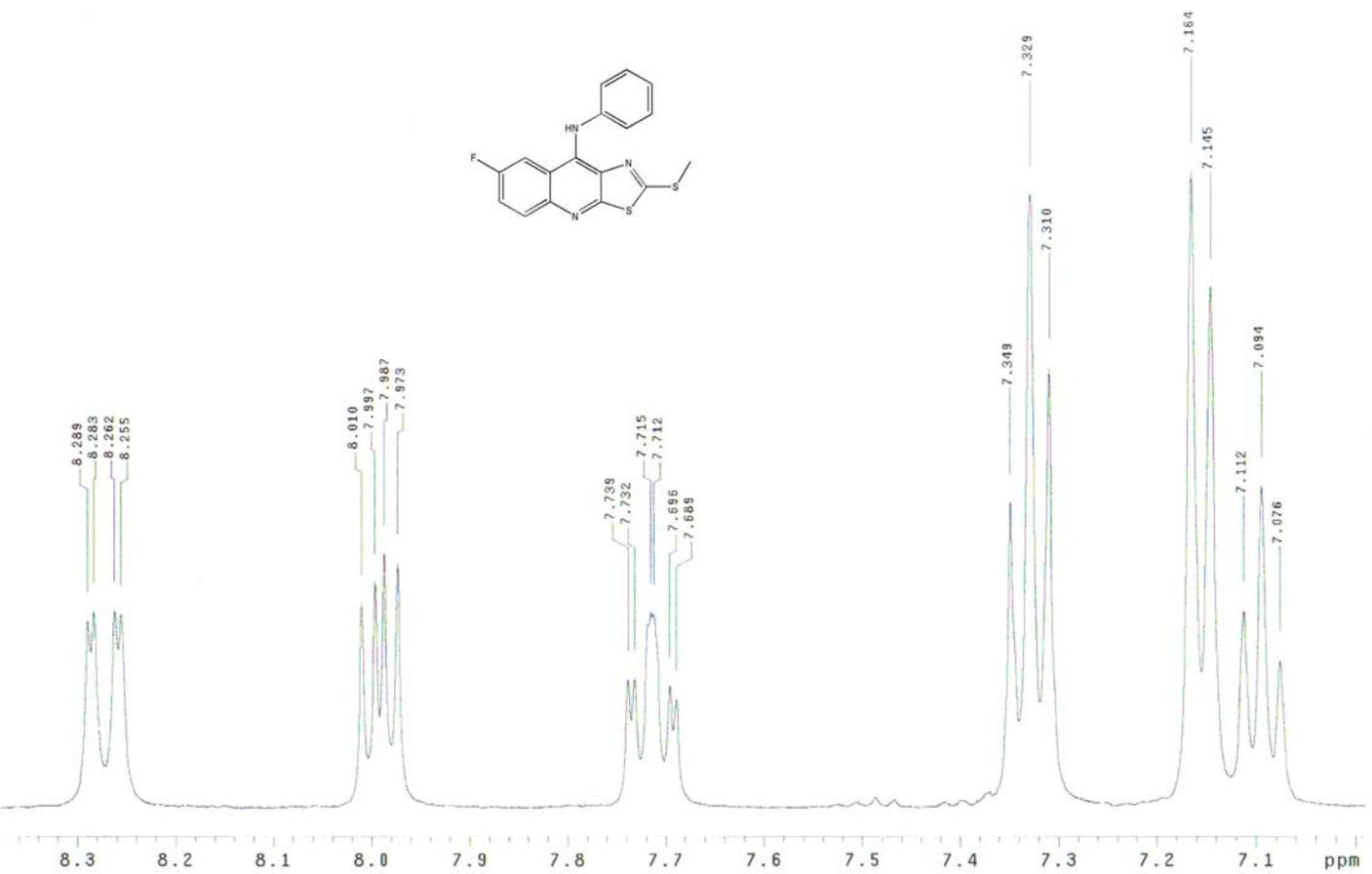


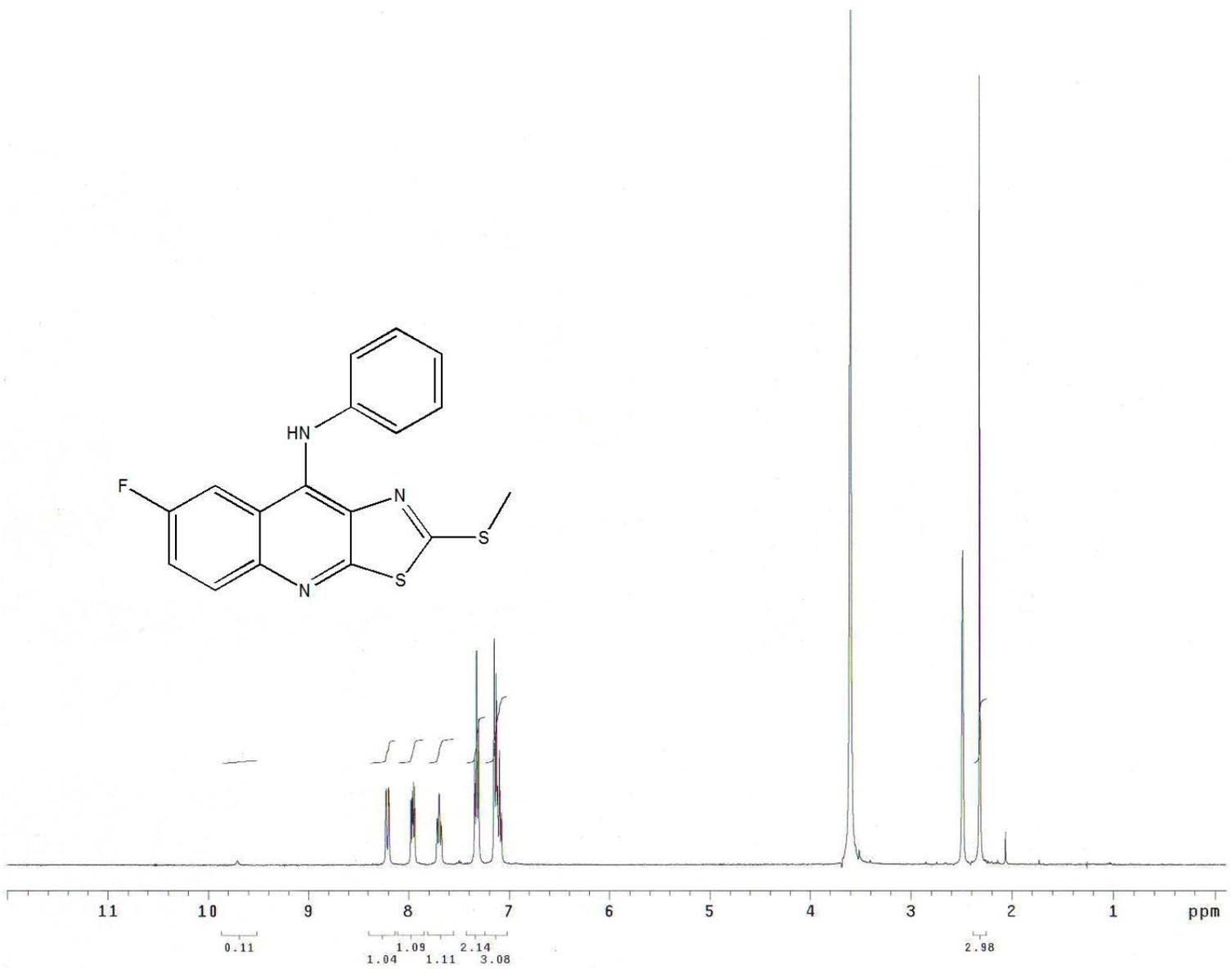
Espectro 6. Espectro de masas del compuesto IV (FAB)

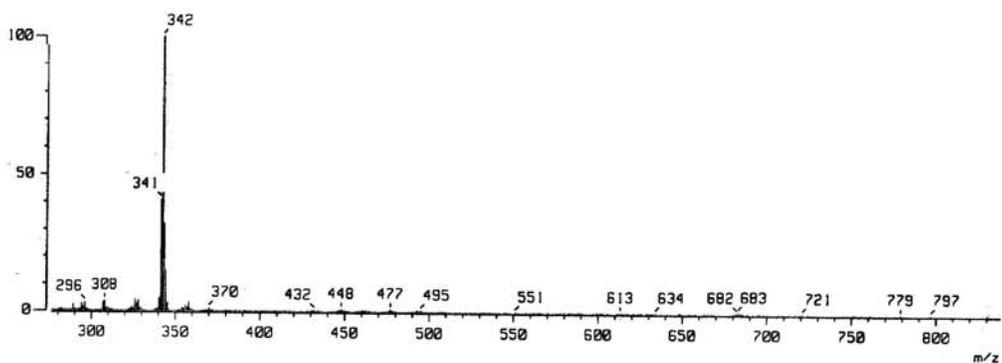
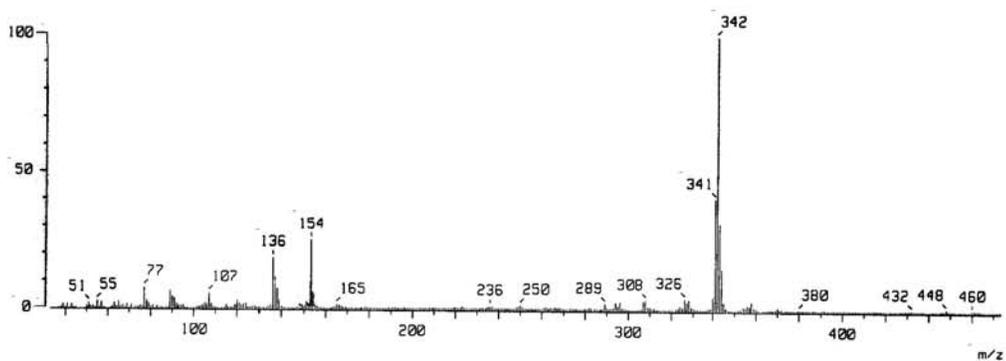
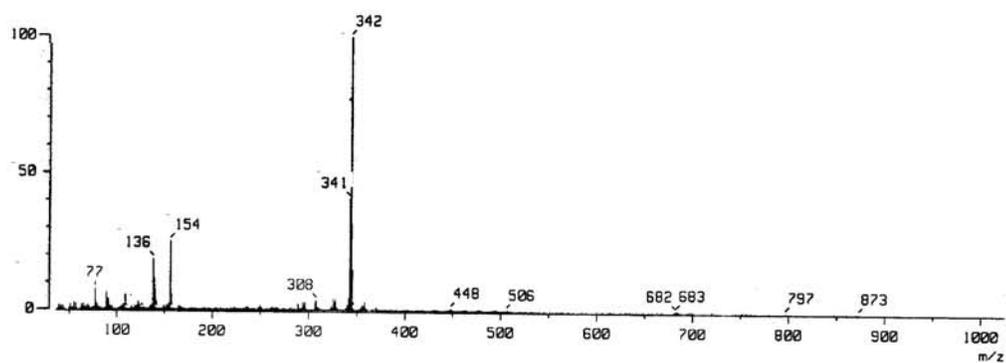
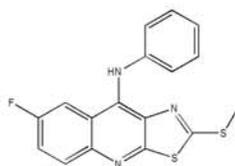
Espectro 7. Espectro de IR del compuesto V



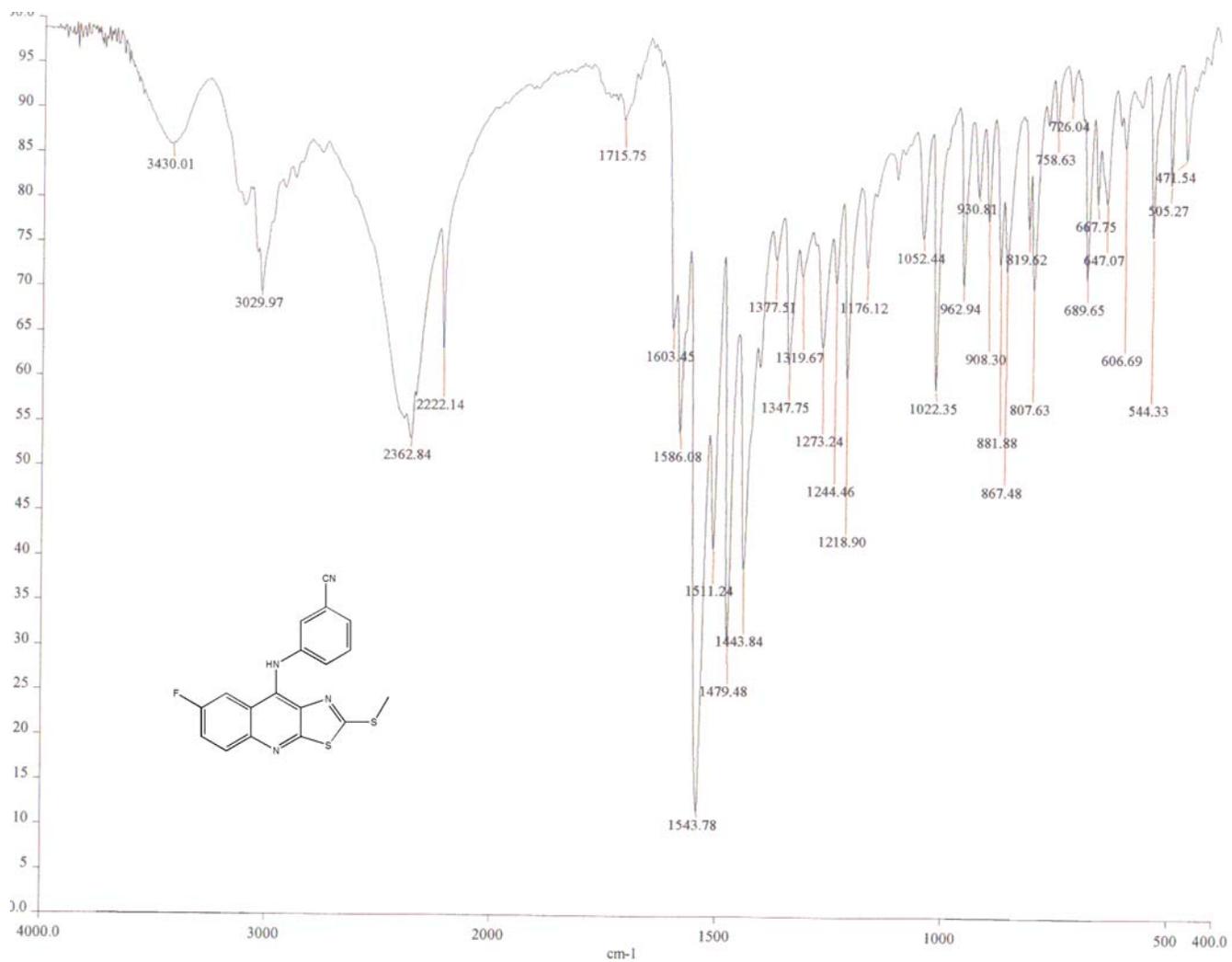
Espectro 8. Espectro de RMNI del compuesto V ( $\text{DMSO-d}_6$ )

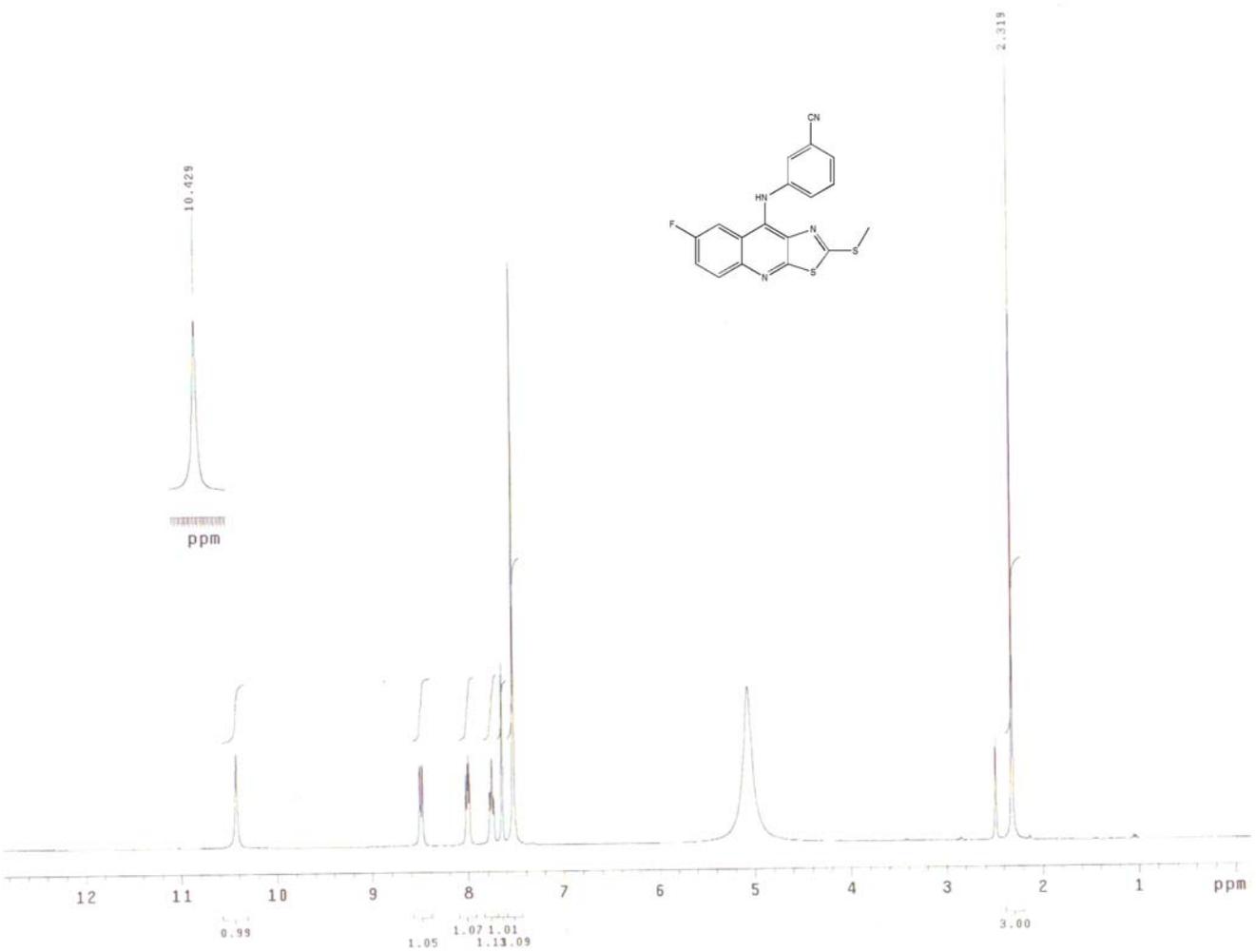
Espectro 8. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto V ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

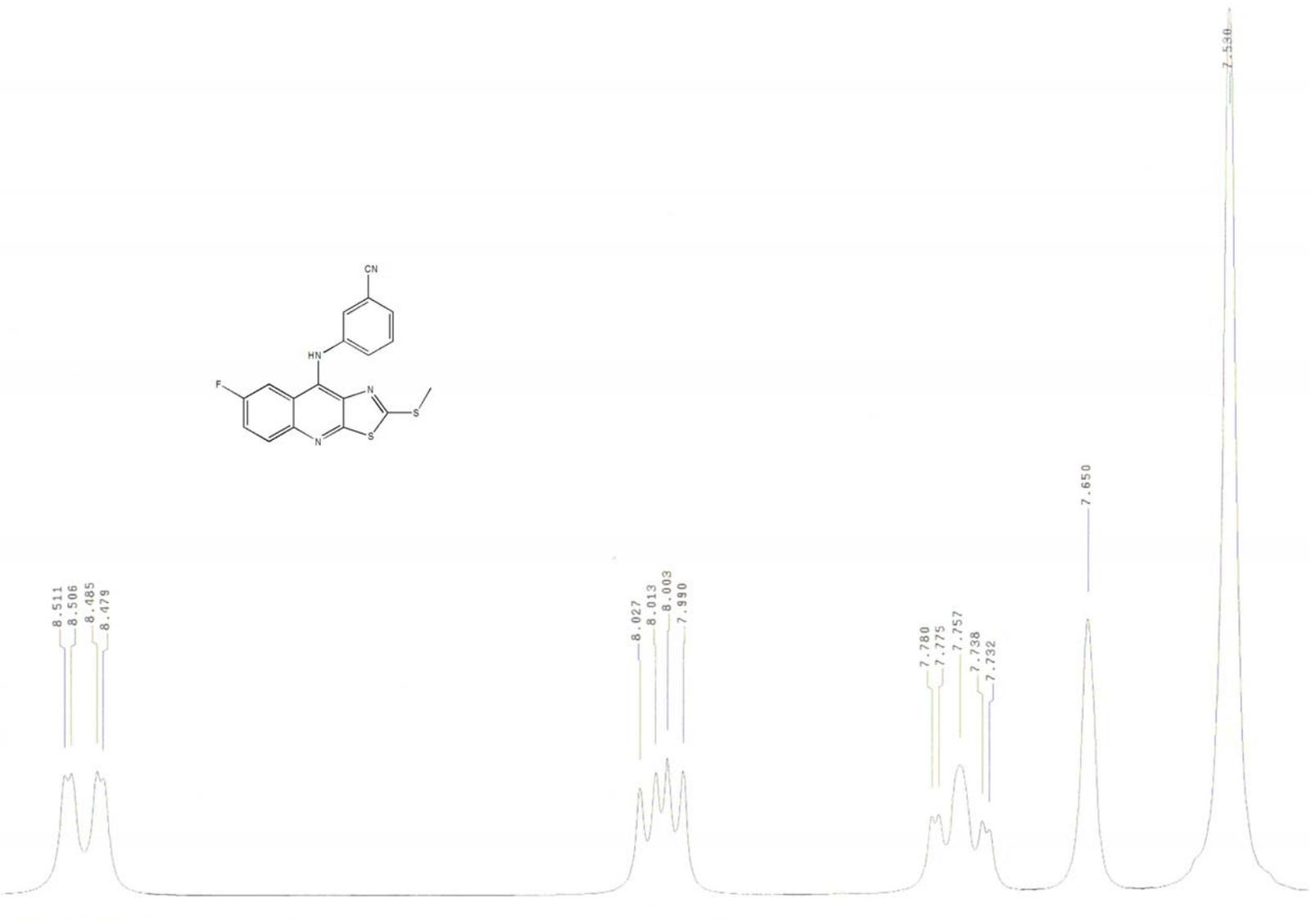
Espectro 8. Espectro de RMN<sup>1</sup> del compuesto V Intercambio con D<sub>2</sub>O

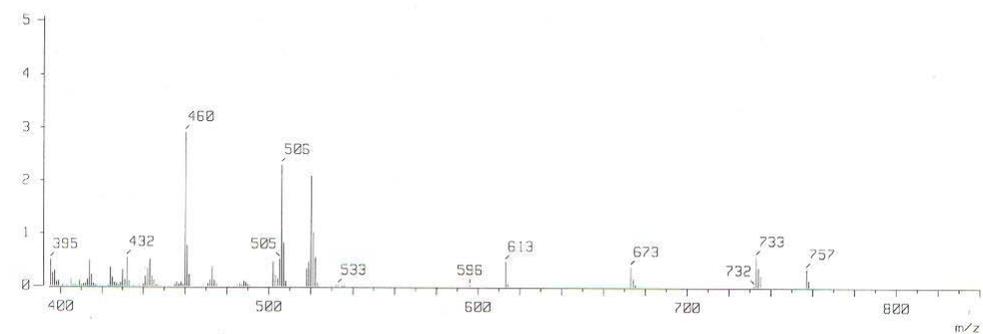
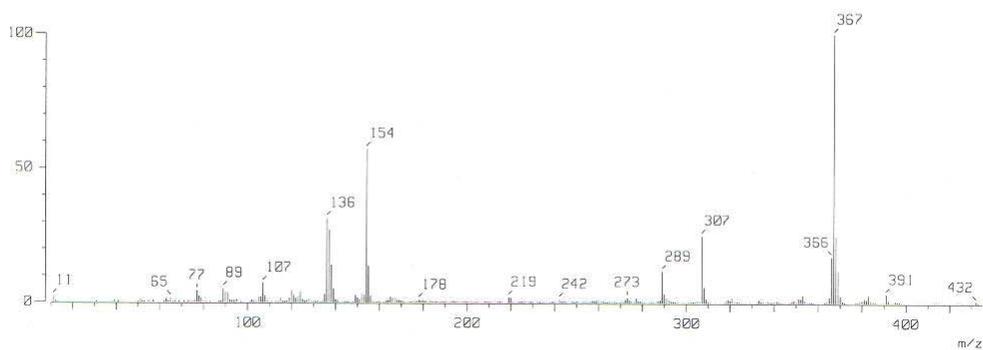
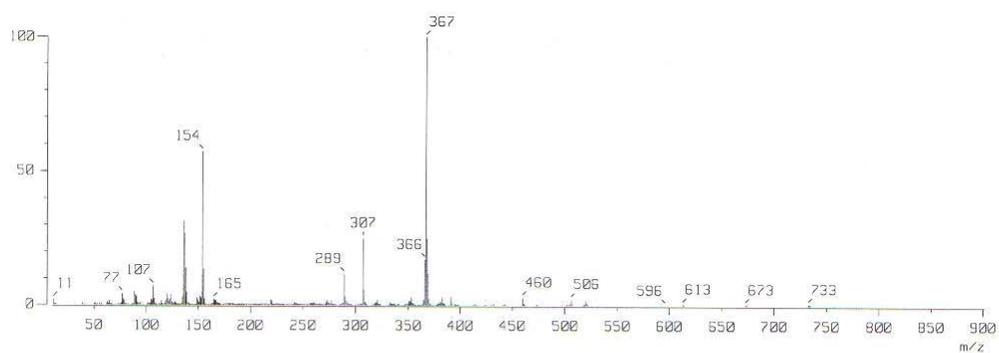
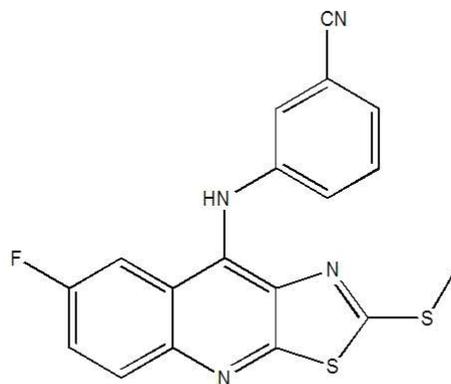


Espectro 9. Espectro de masa del compuesto V (FAB)



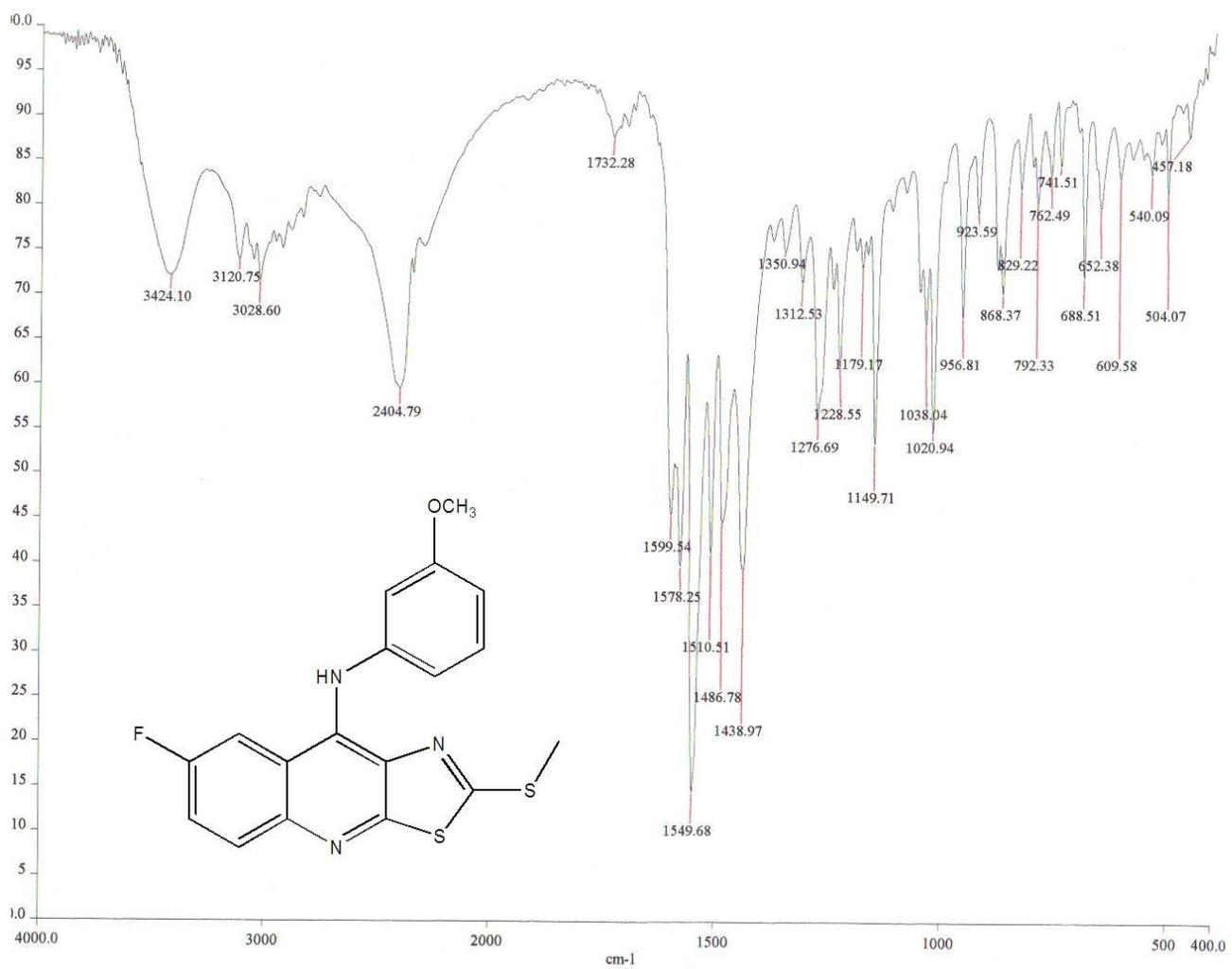
Espectro 11. Espectro de compuesto RMN<sup>1</sup> VI (DMSO-d<sub>6</sub>)

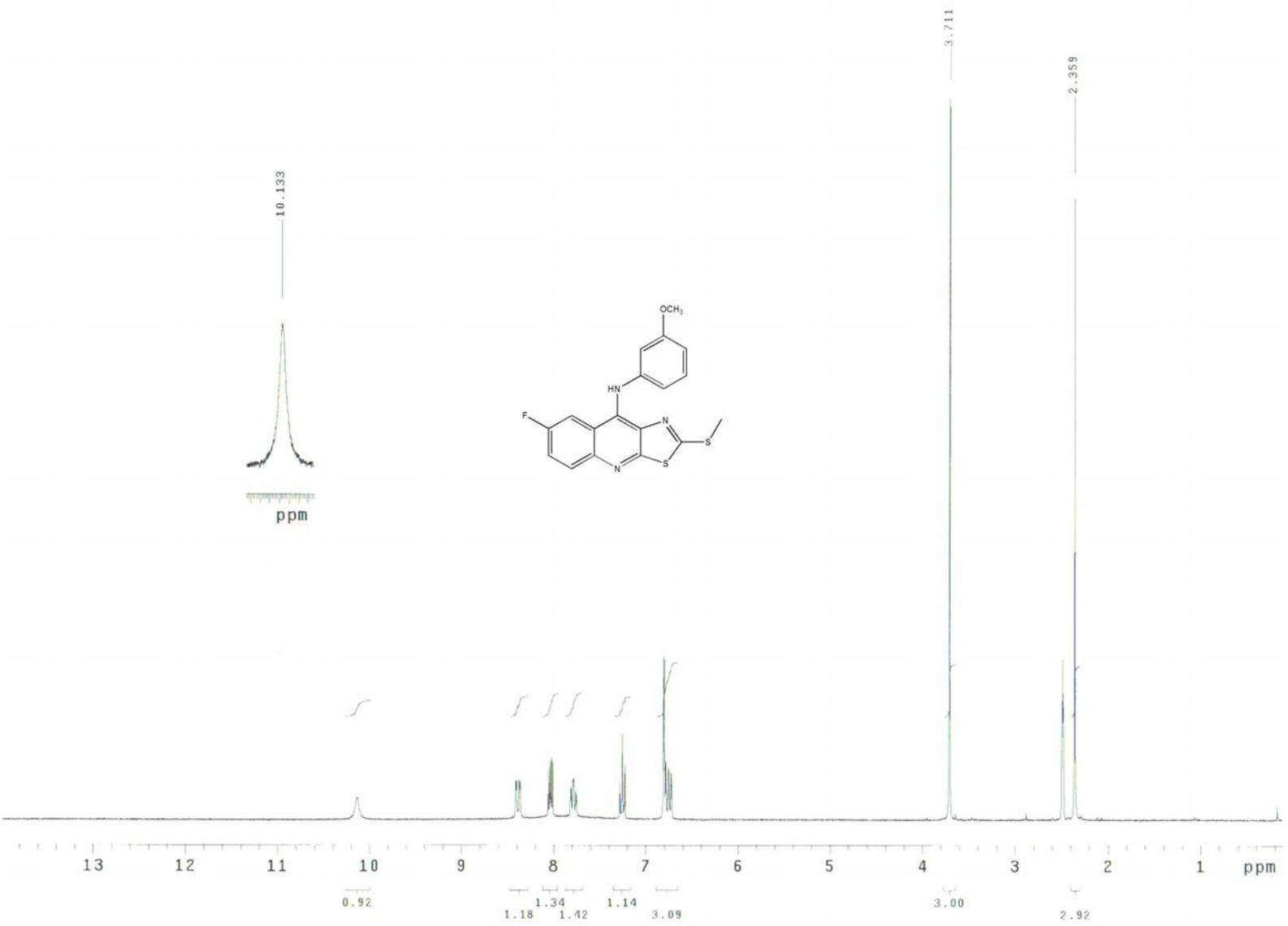
Espectro 11. Espectro de compuesto  $\text{RMN}^1$  VI ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

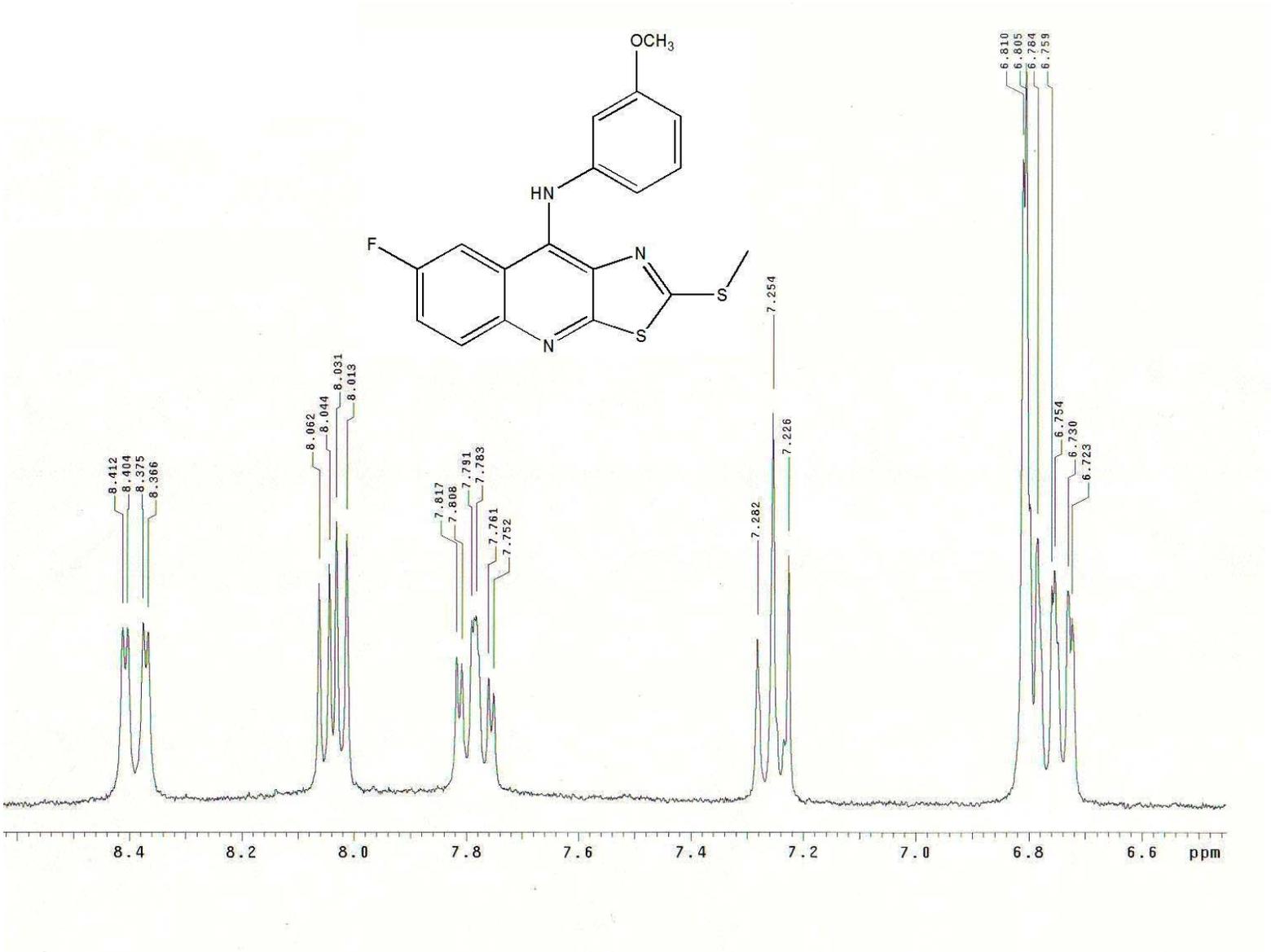


Espectro 12. Espectro de masas del compuesto VI (FAB)

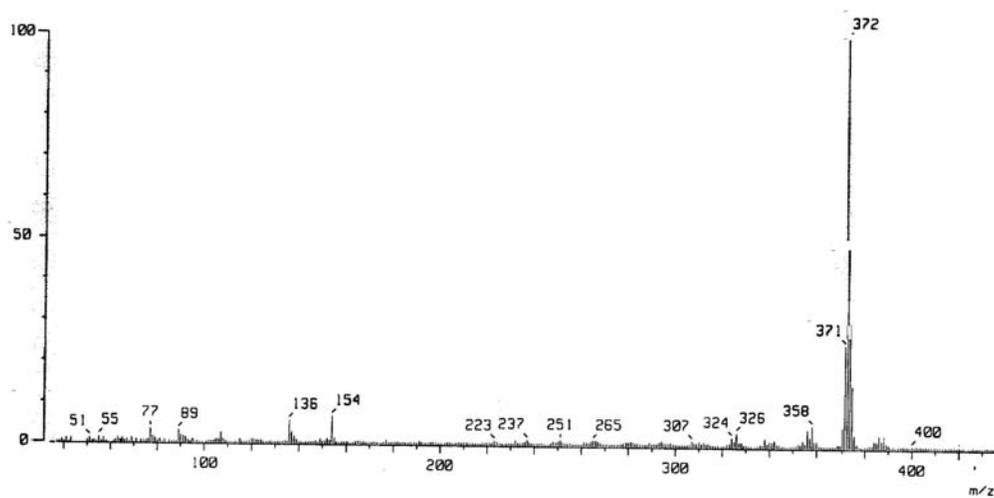
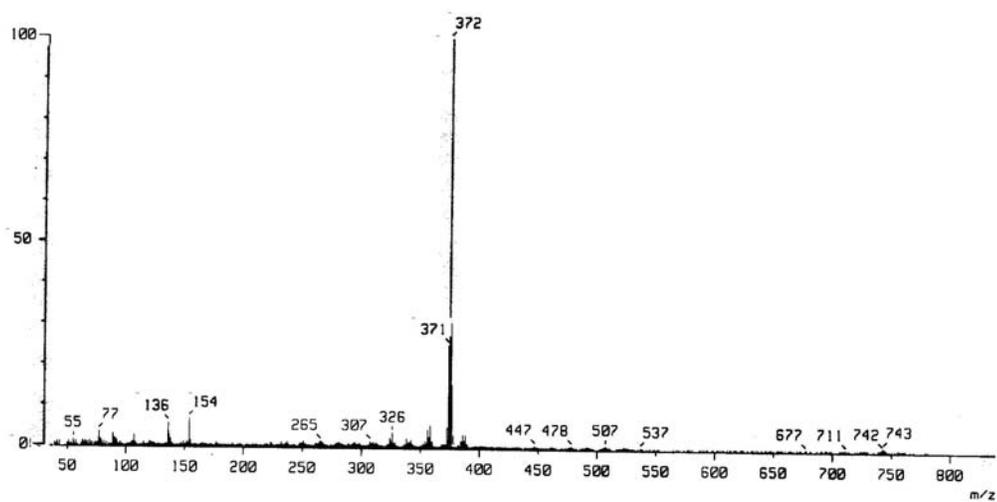
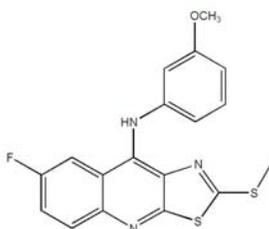
Espectro 13. Espectro de IR del compuesto VII



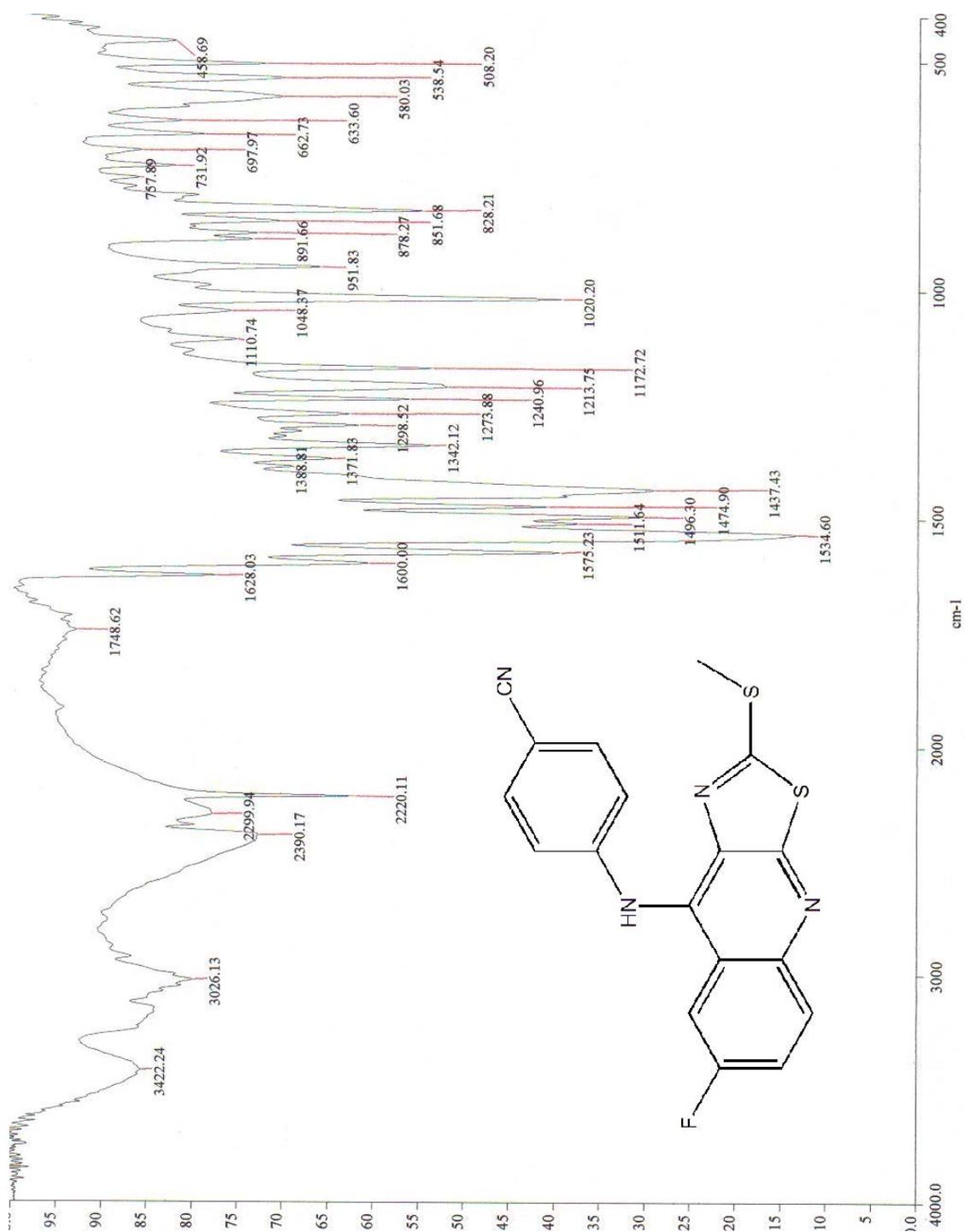
Espectro 14. Espectro de compuesto  $\text{RMN}^1$  VII ( $\text{DMSO-d}_6$ )

Espectro 14. Espectro de compuesto RMN<sup>1</sup> VII (DMSO-d<sub>6</sub>) Ampliación

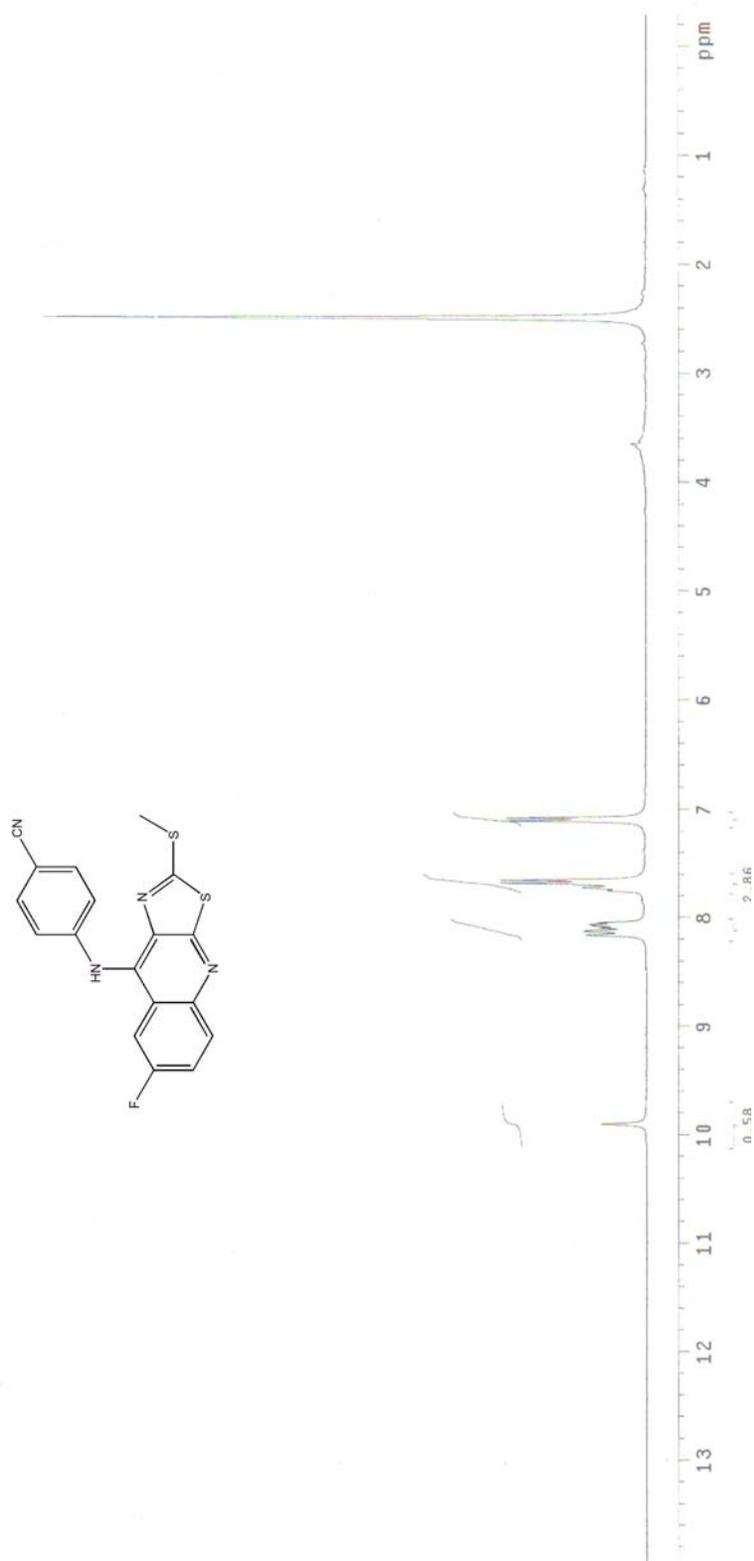
Espectro 14. Espectro de compuesto  $\text{RMN}^1$  VII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$

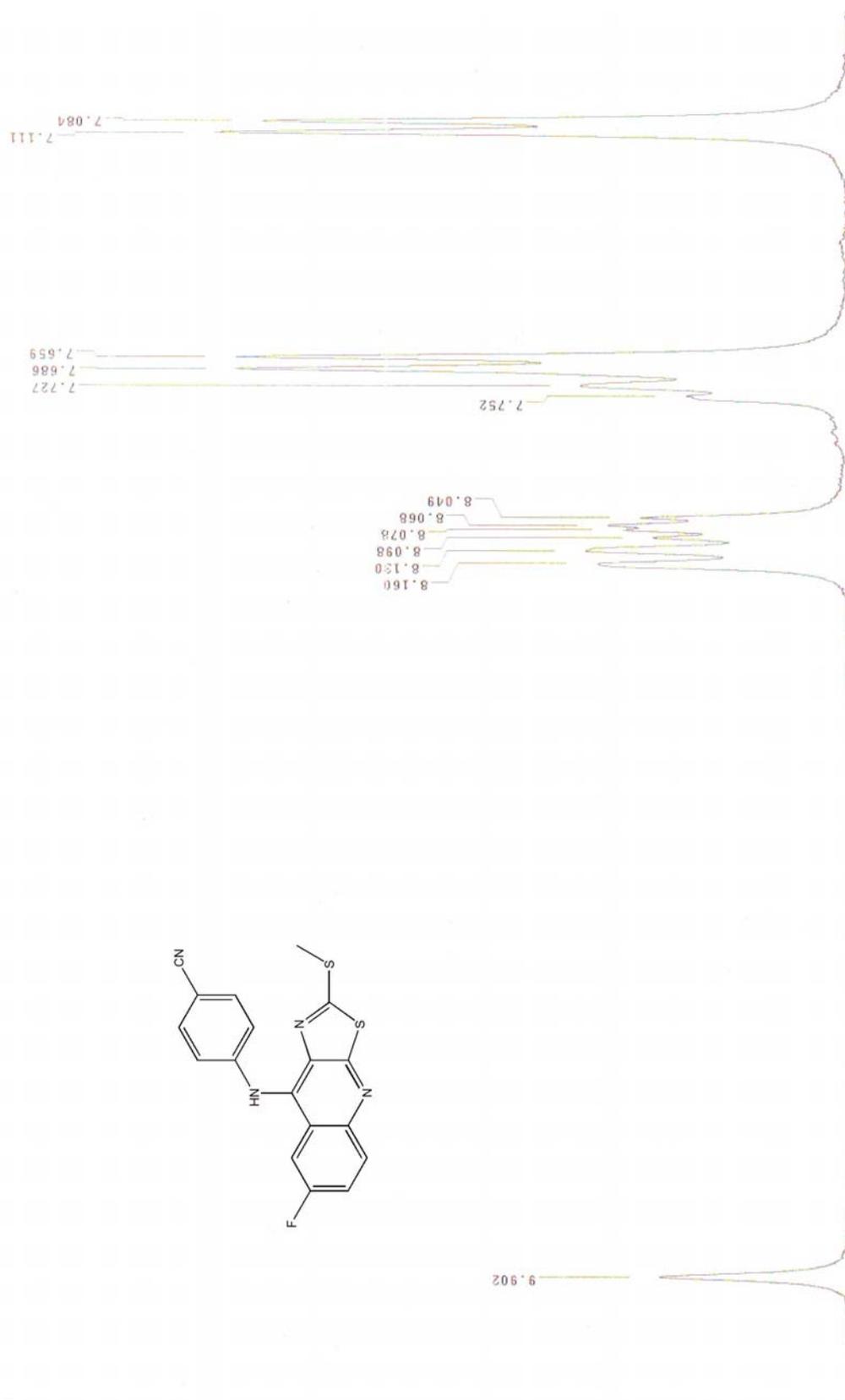


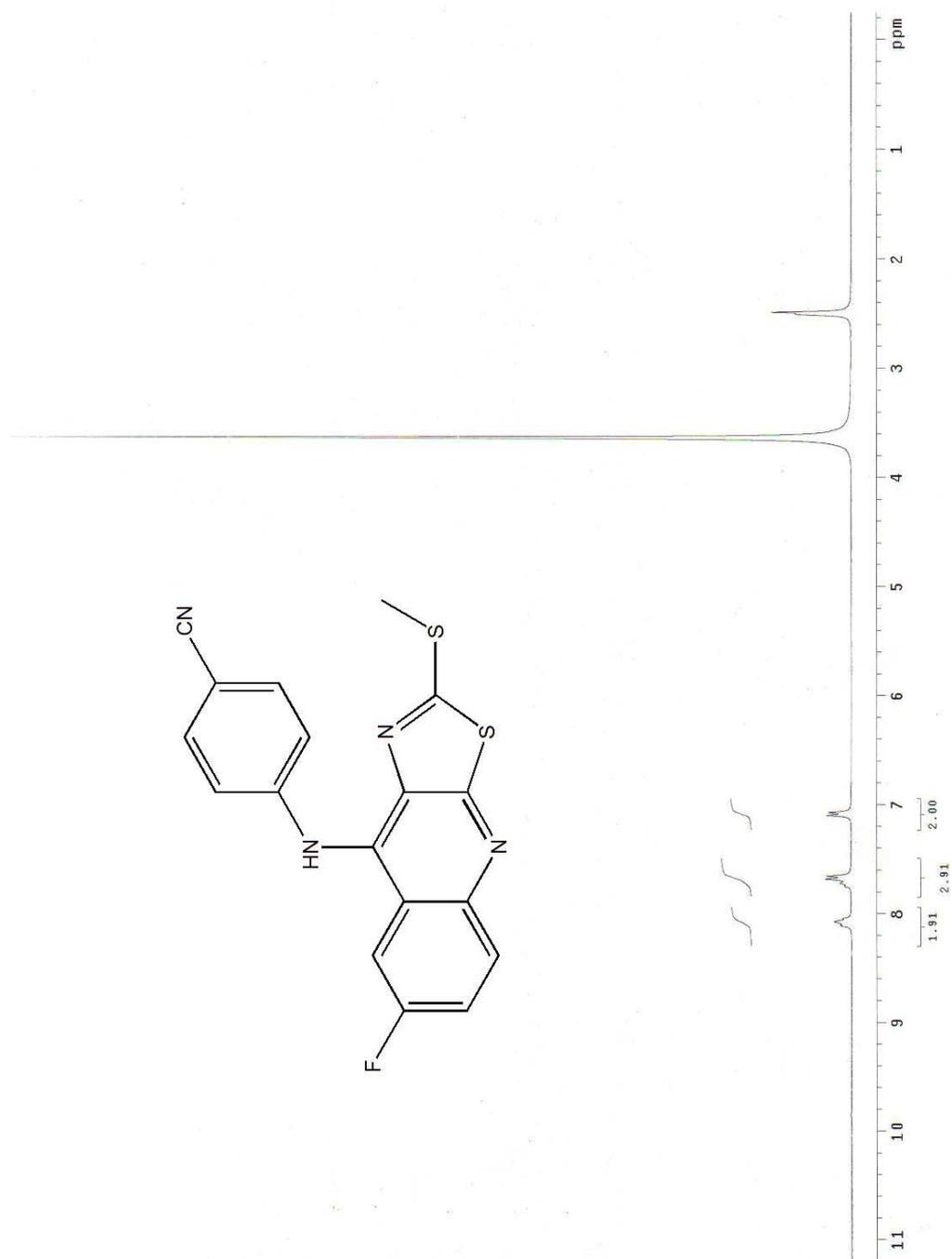
Espectro 15. Espectro de masas del compuesto VII (FAB)

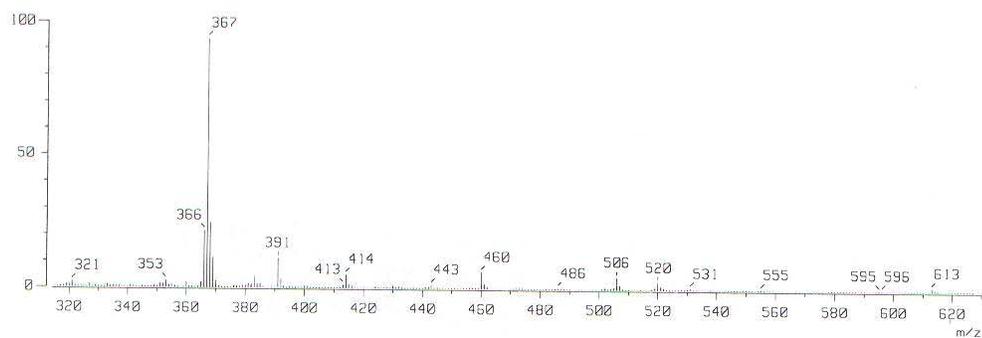
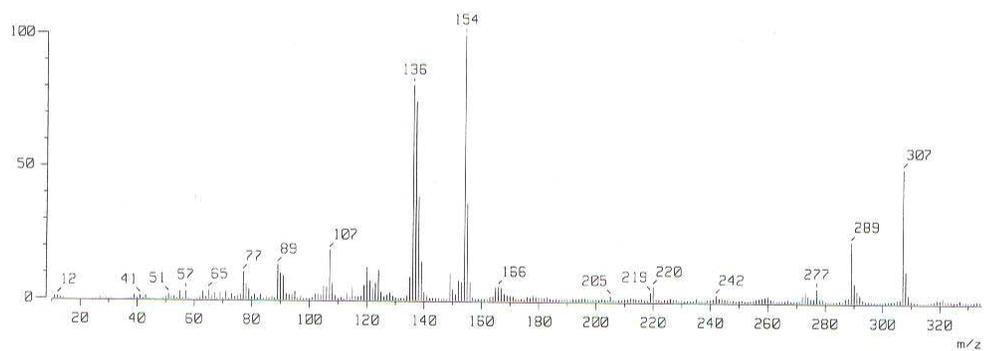
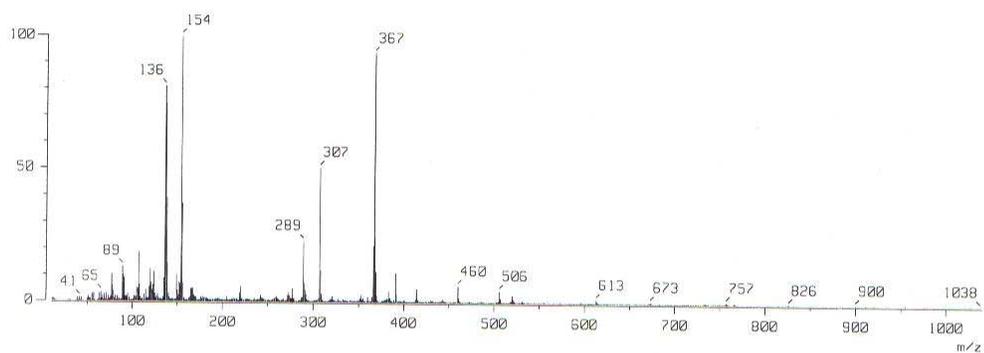
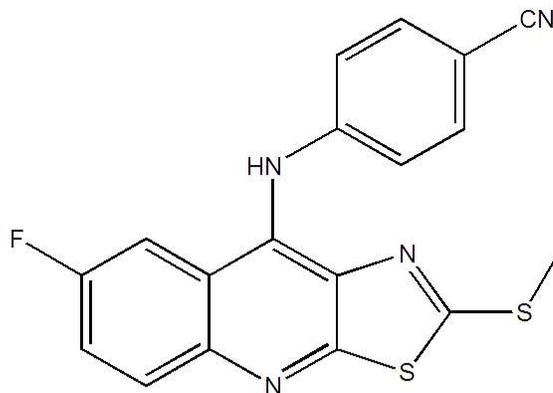


Espectro 16. Espectro de IR del compuesto VIII

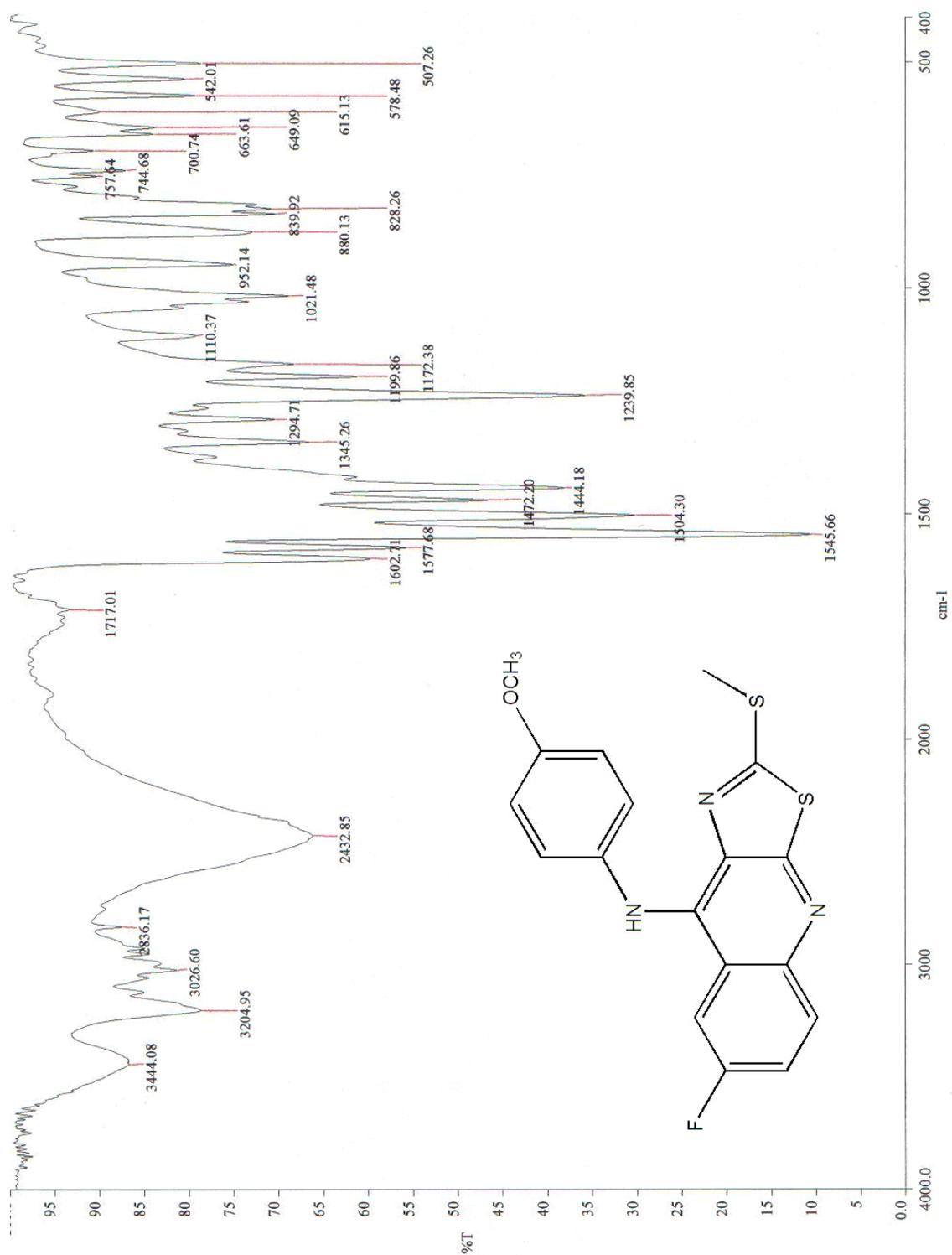
Espectro 17. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto VIII ( $\text{DMSO-d}_6$ )

Espectro 17. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto VIII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

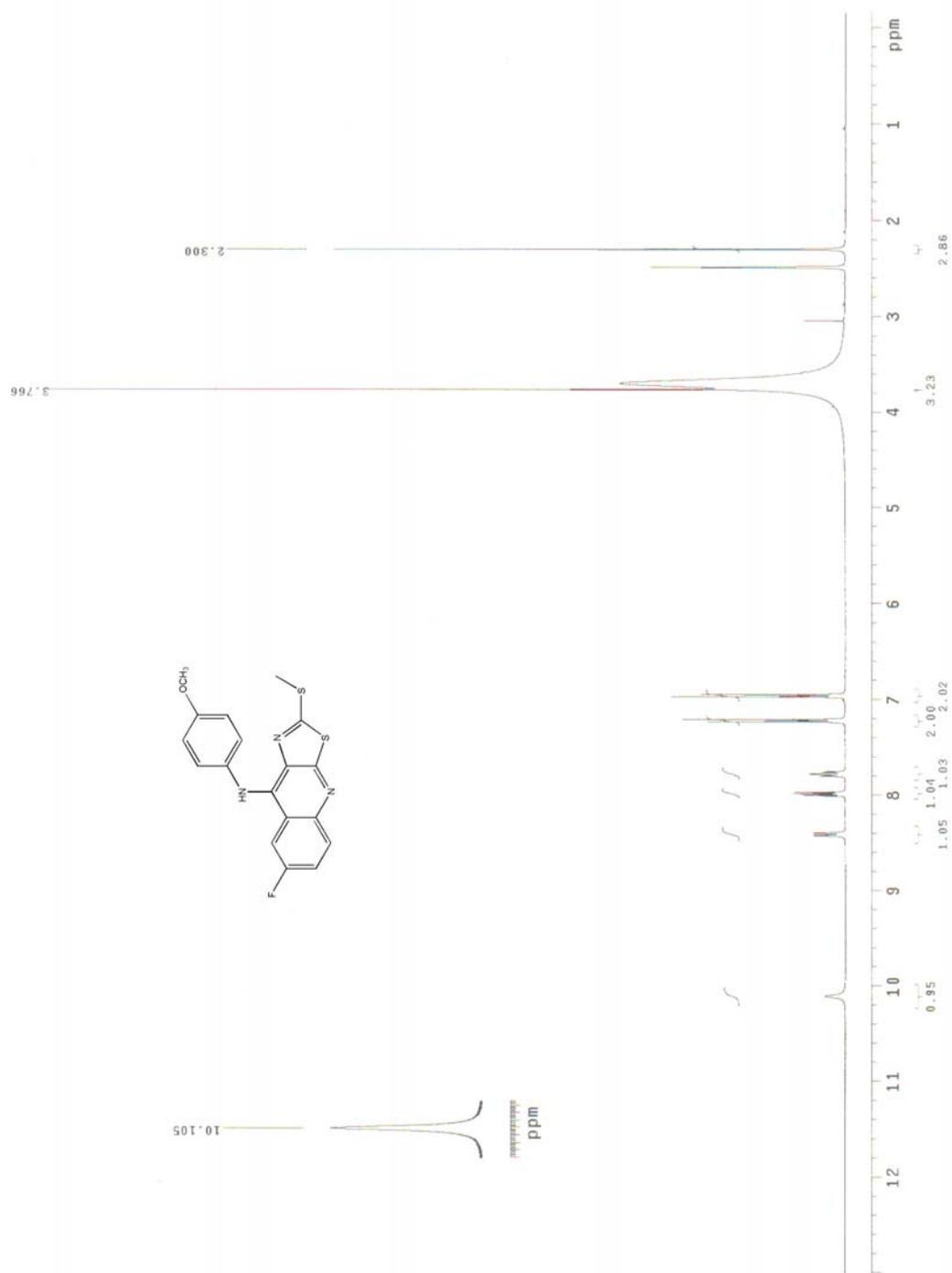
Espectro 17. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto VIII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$

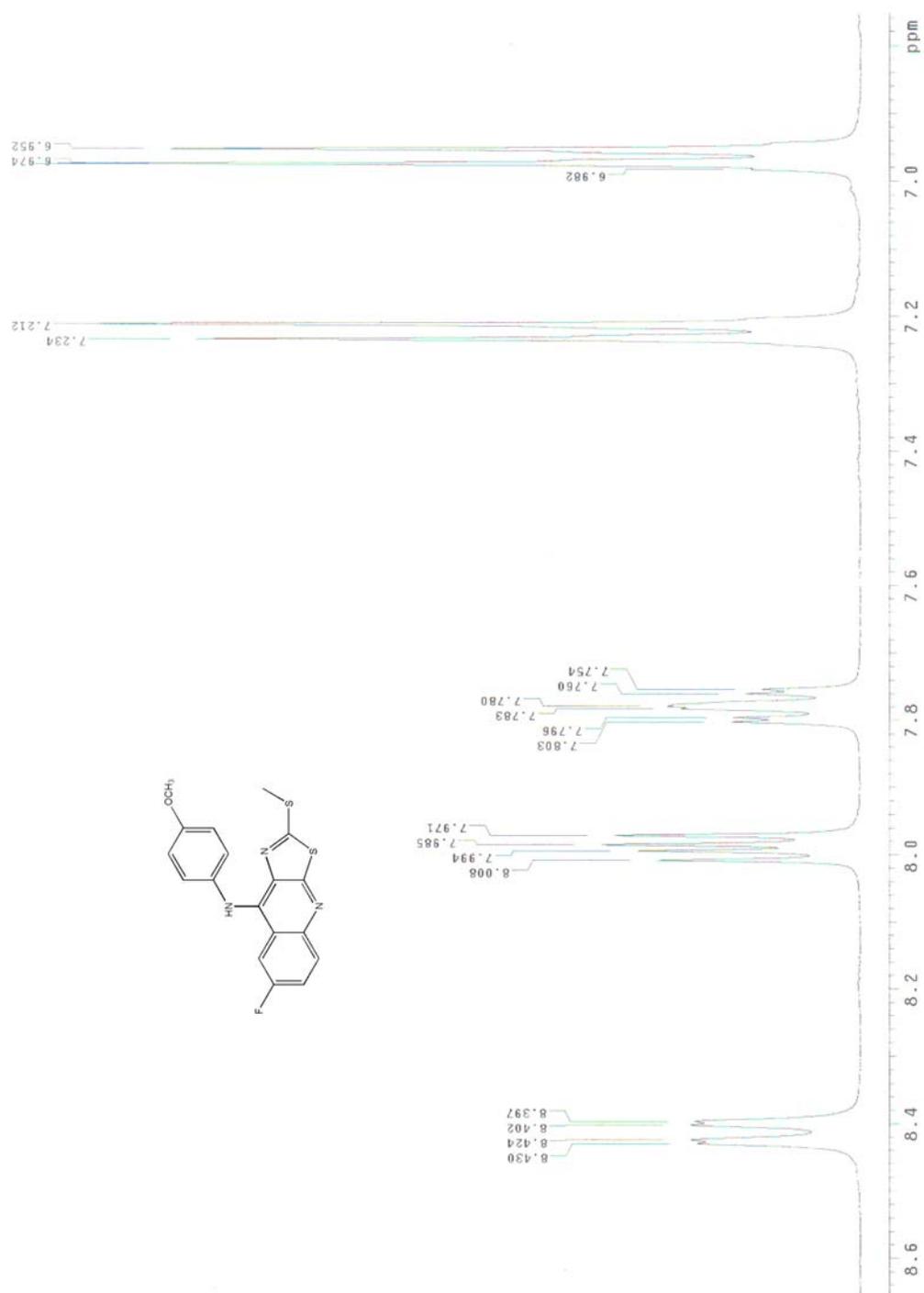


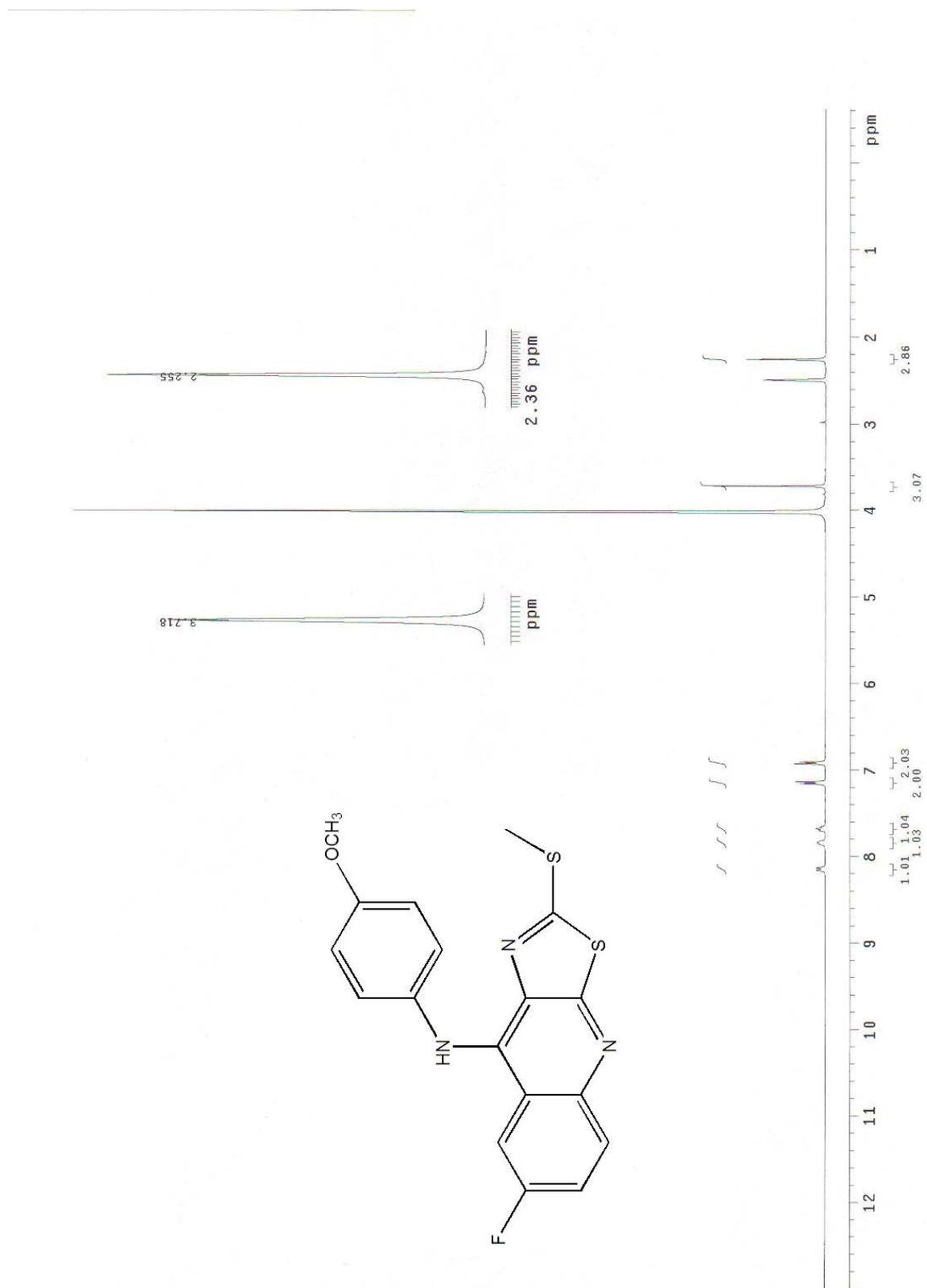
Espectro 18. Espectro de masas del compuesto VIII (FAB)

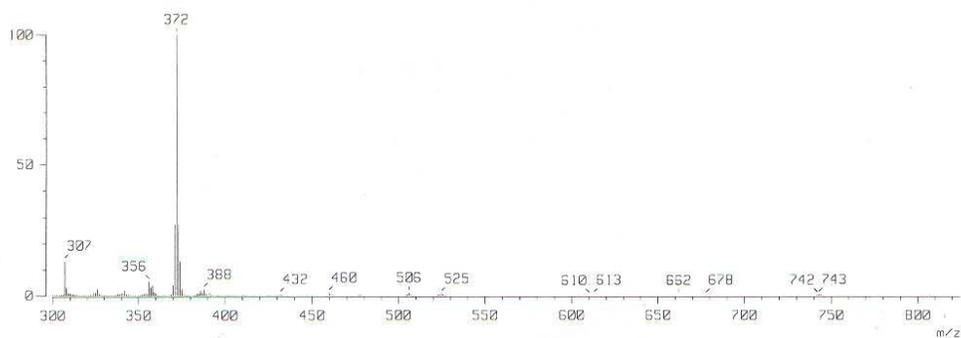
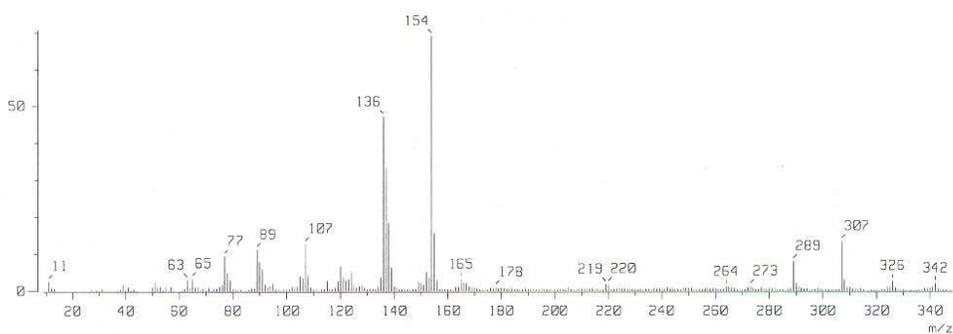
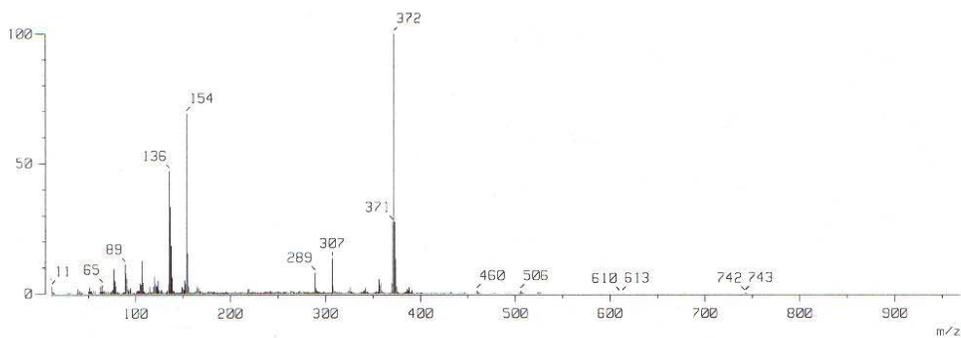
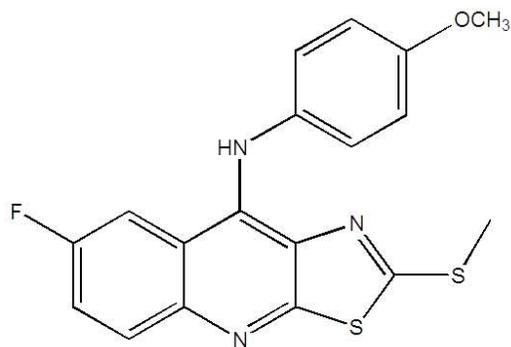


Espectro 19. Espectro de IR del compuesto IX

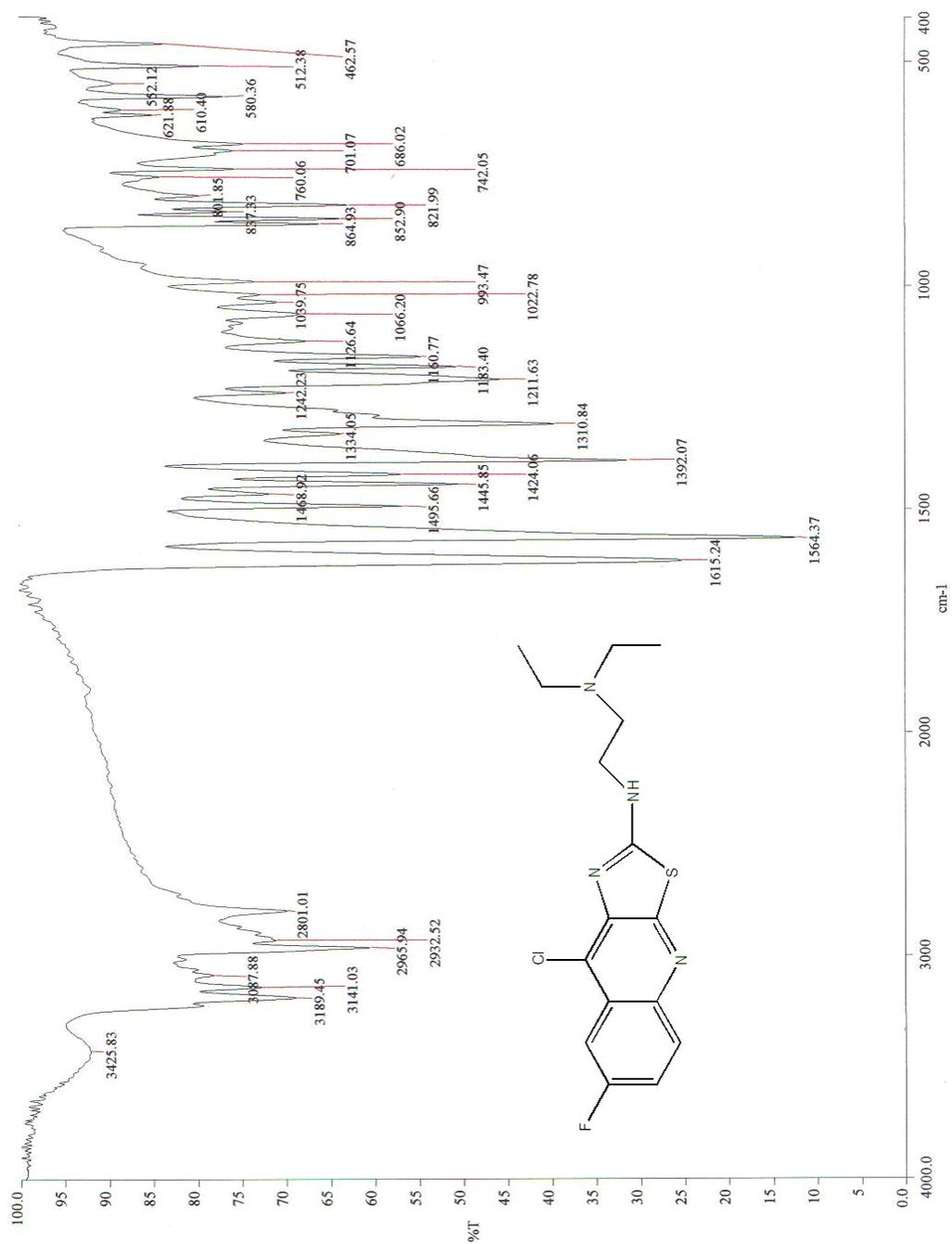
Espectro 20. Espectro de RMN<sup>1</sup> del compuesto IX (DMSO- $d_6$ )

Espectro 20. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto IX ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

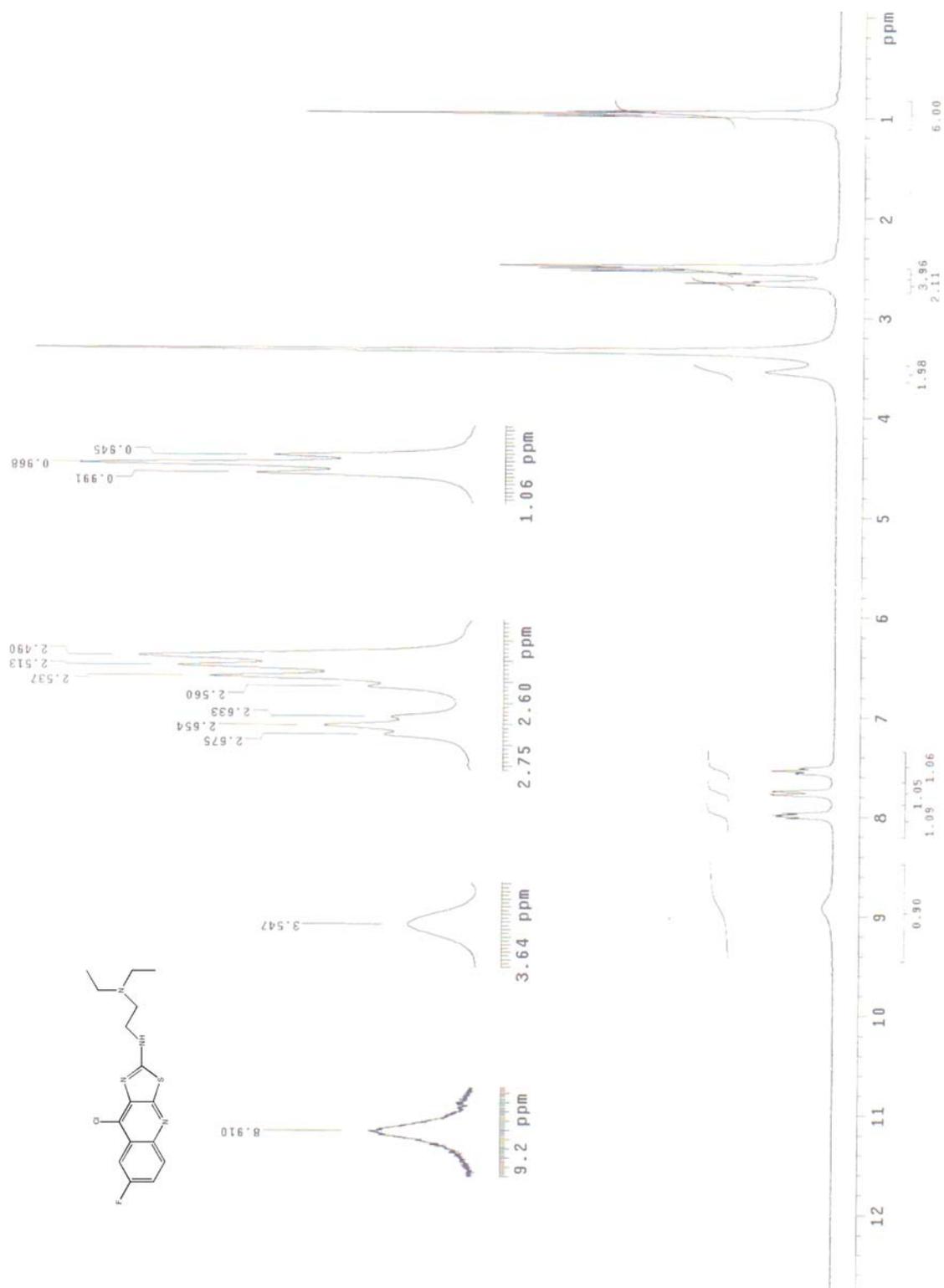
Espectro 20. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto IX ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$

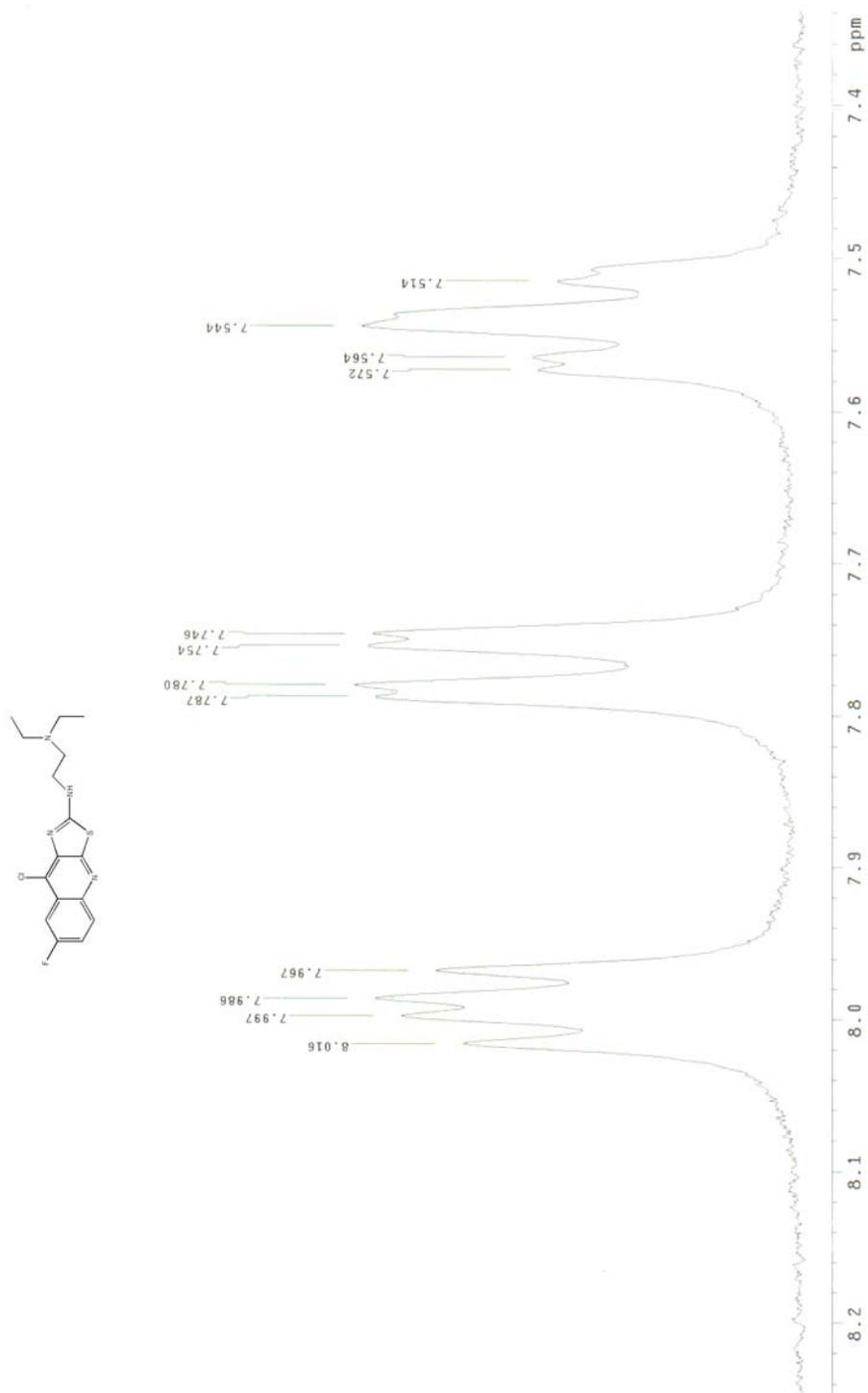


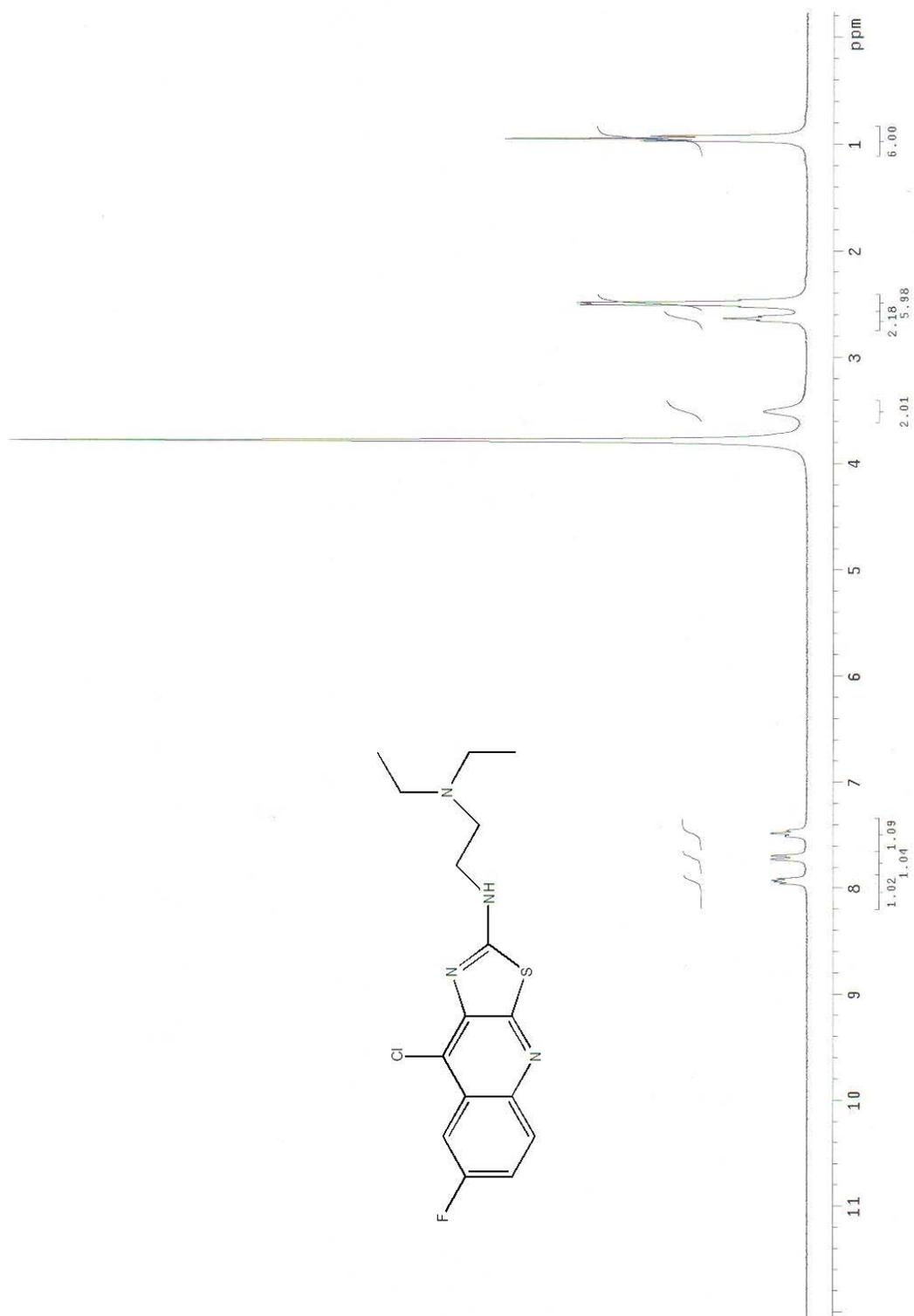
Espectro 21. Espectro de masas del compuesto IX (FAB)

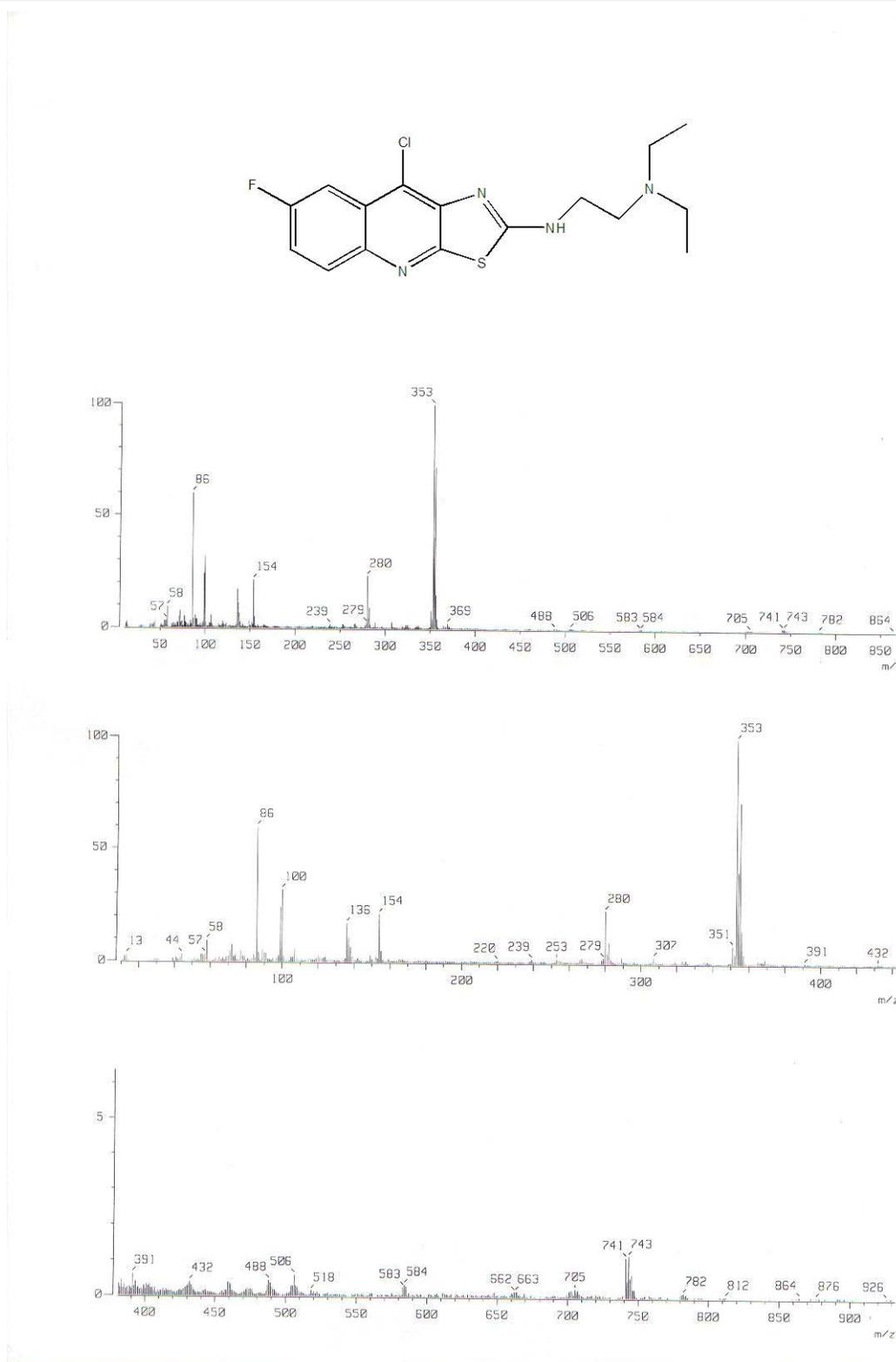


Espectro 22. Espectro de IR del compuesto X

Espectro 23. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto X ( $\text{DMSO-d}_6$ )

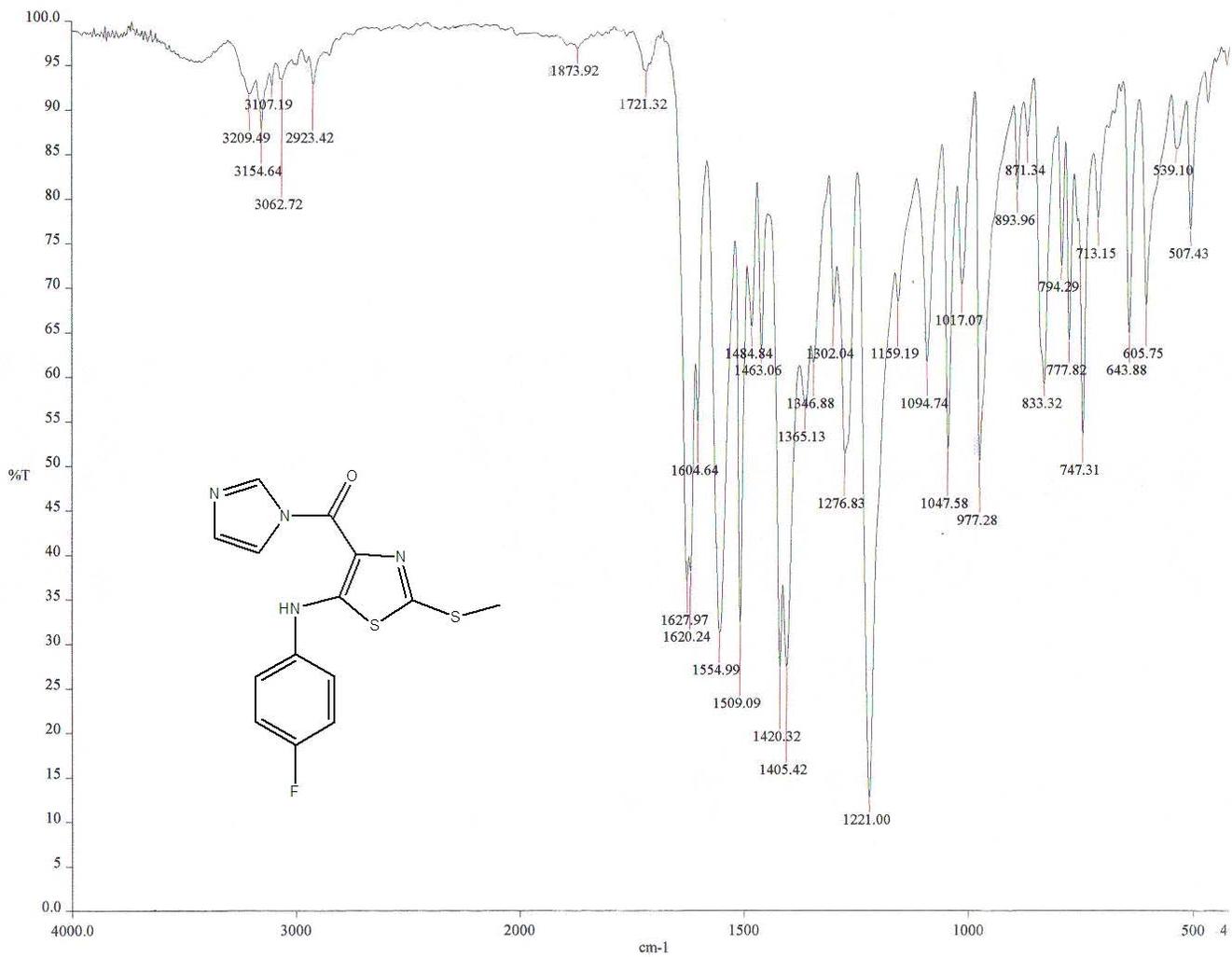
Espectro 23. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto X ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

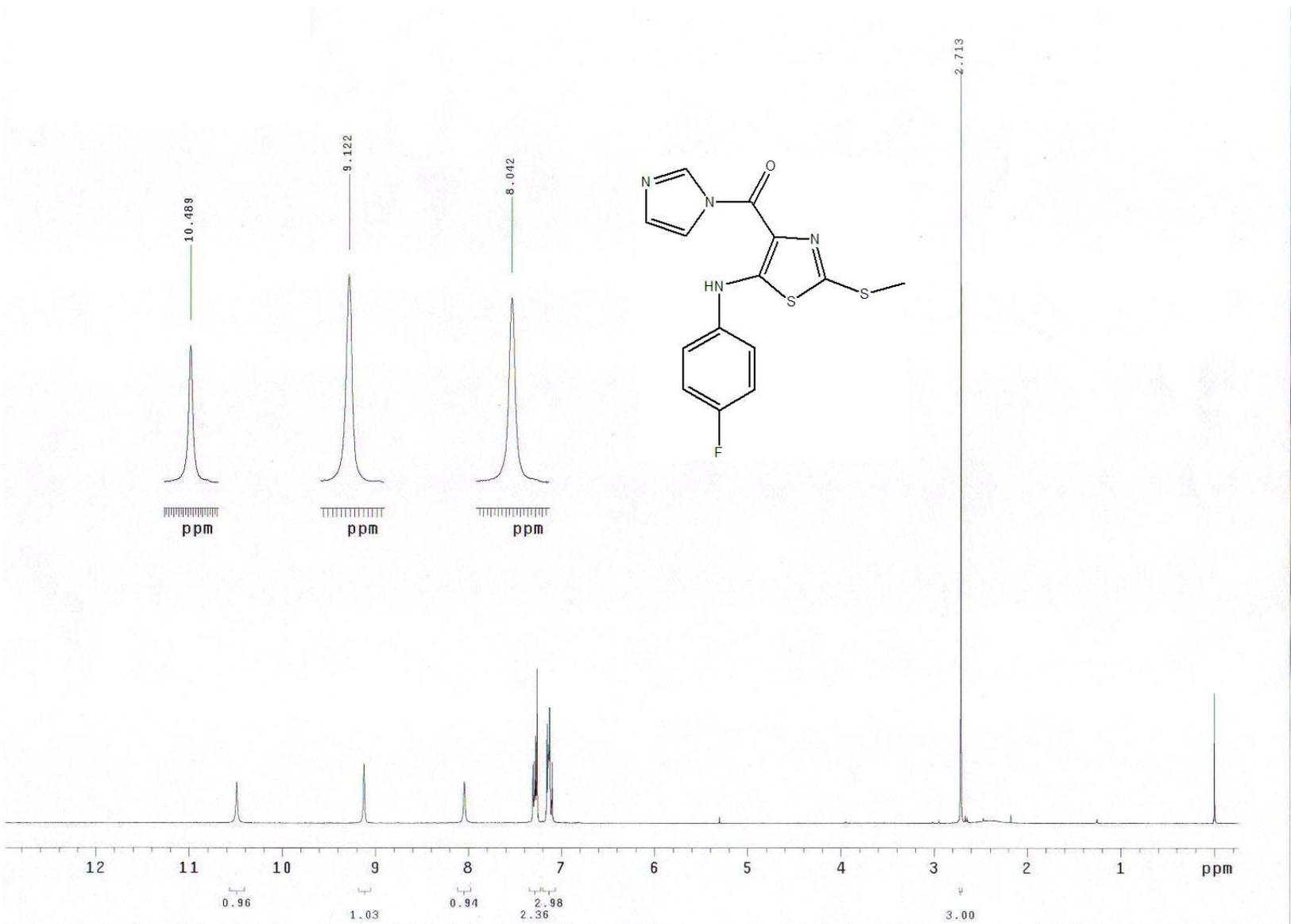
Espectro 23. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto X ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$

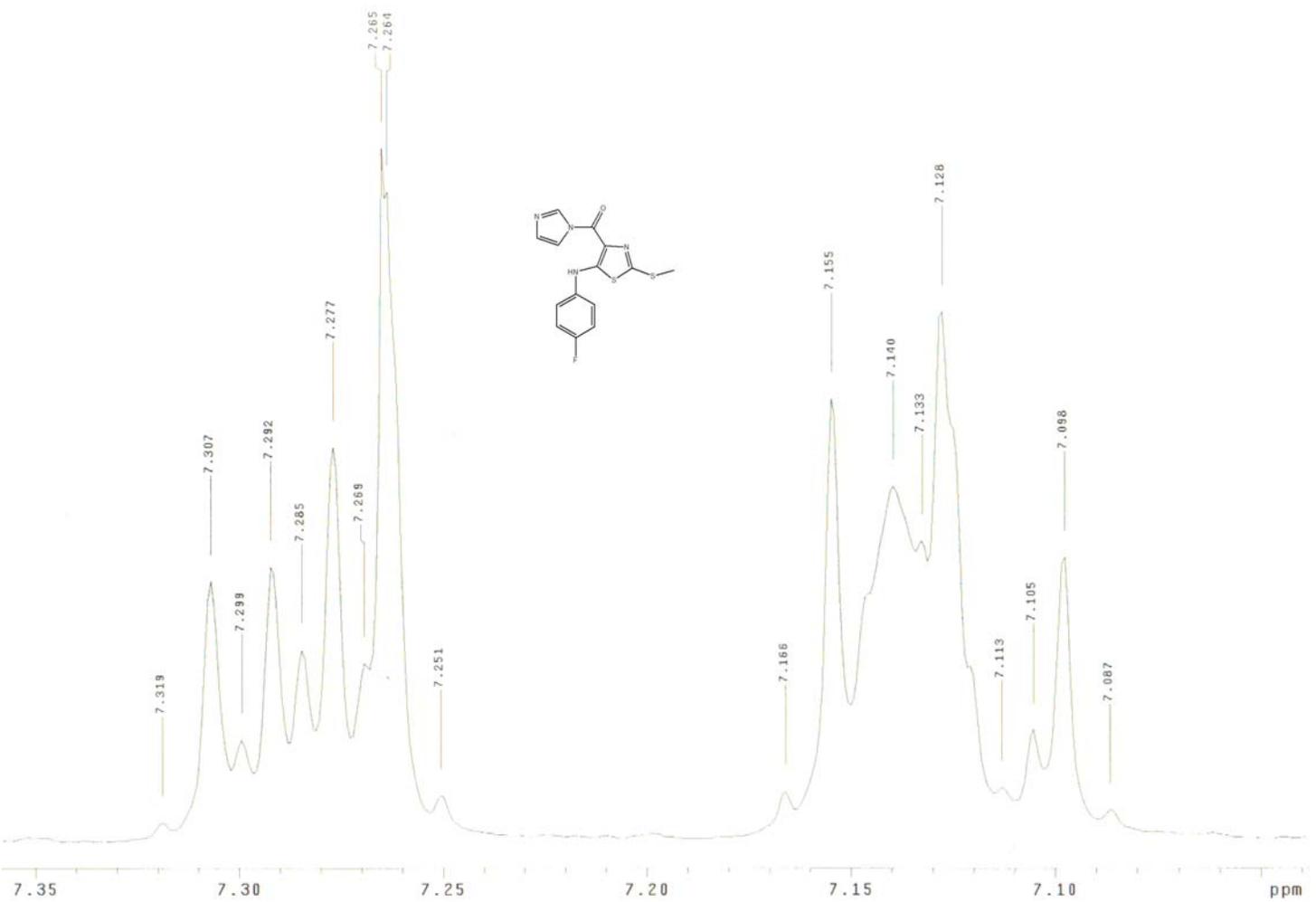


Espectro 24. Espectro de masas del compuesto X (FAB)

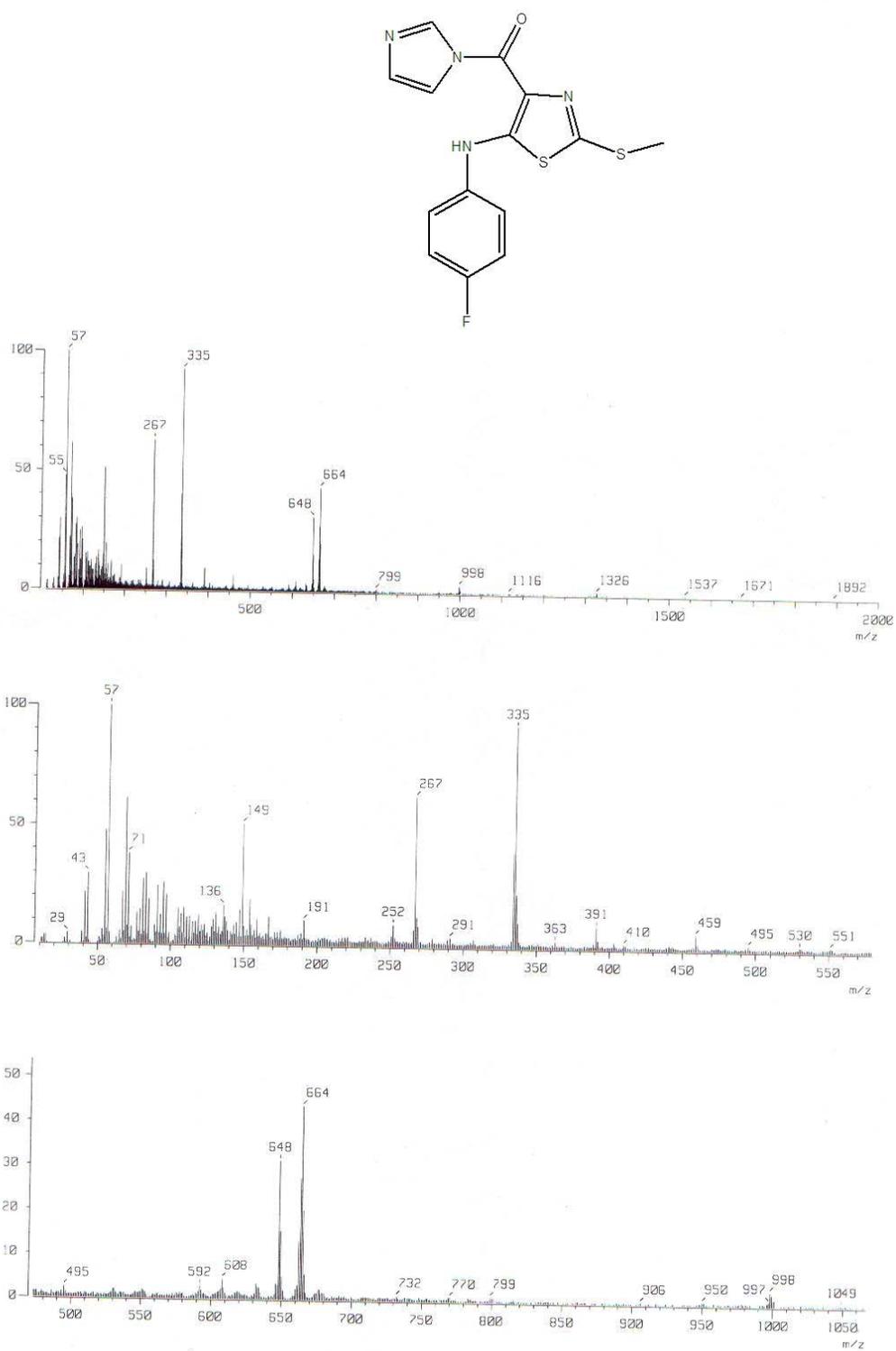
Espectro 25. Espectro de IR del compuesto XII



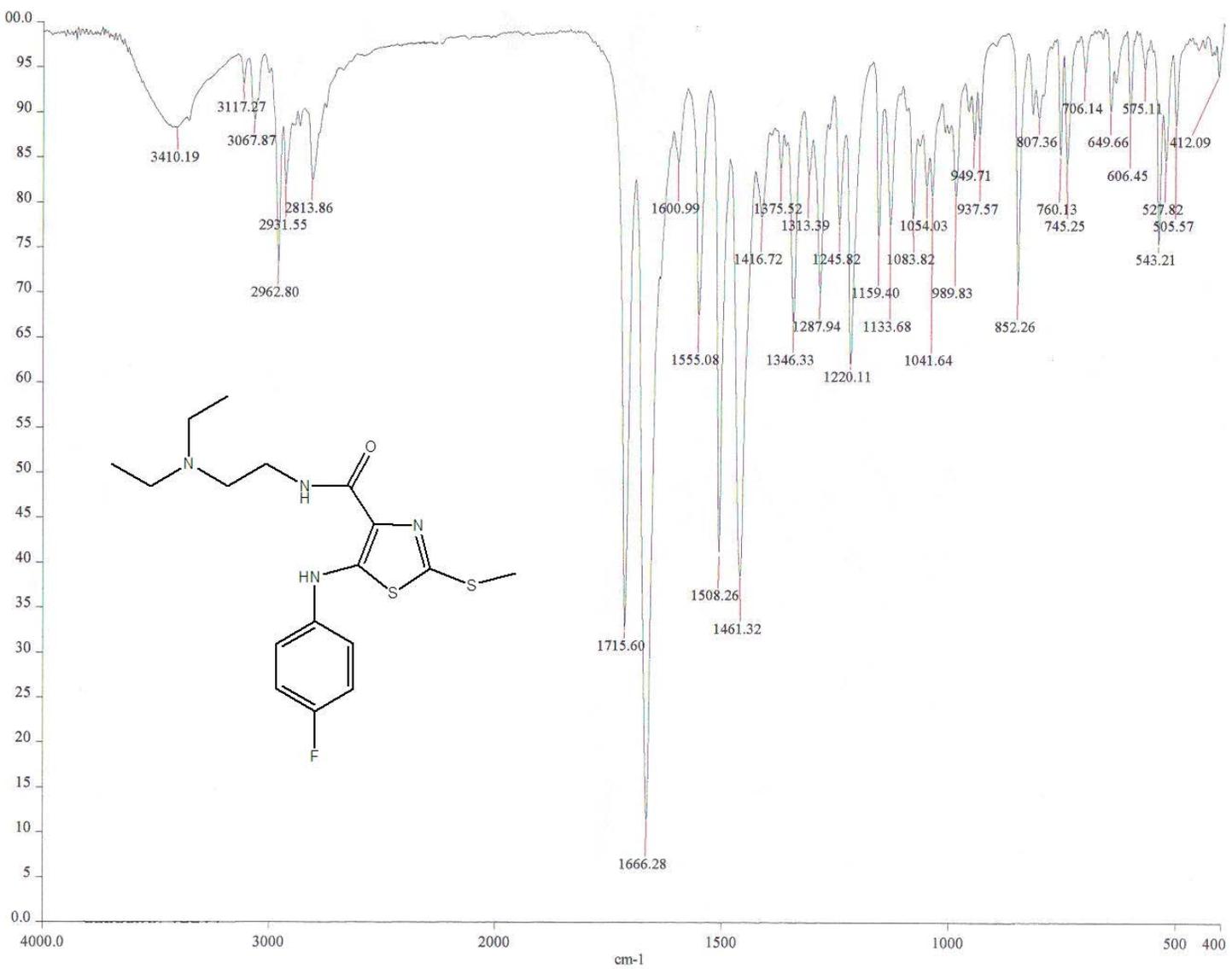
Espectro 26. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto XII ( $\text{DMSO-d}_6$ )

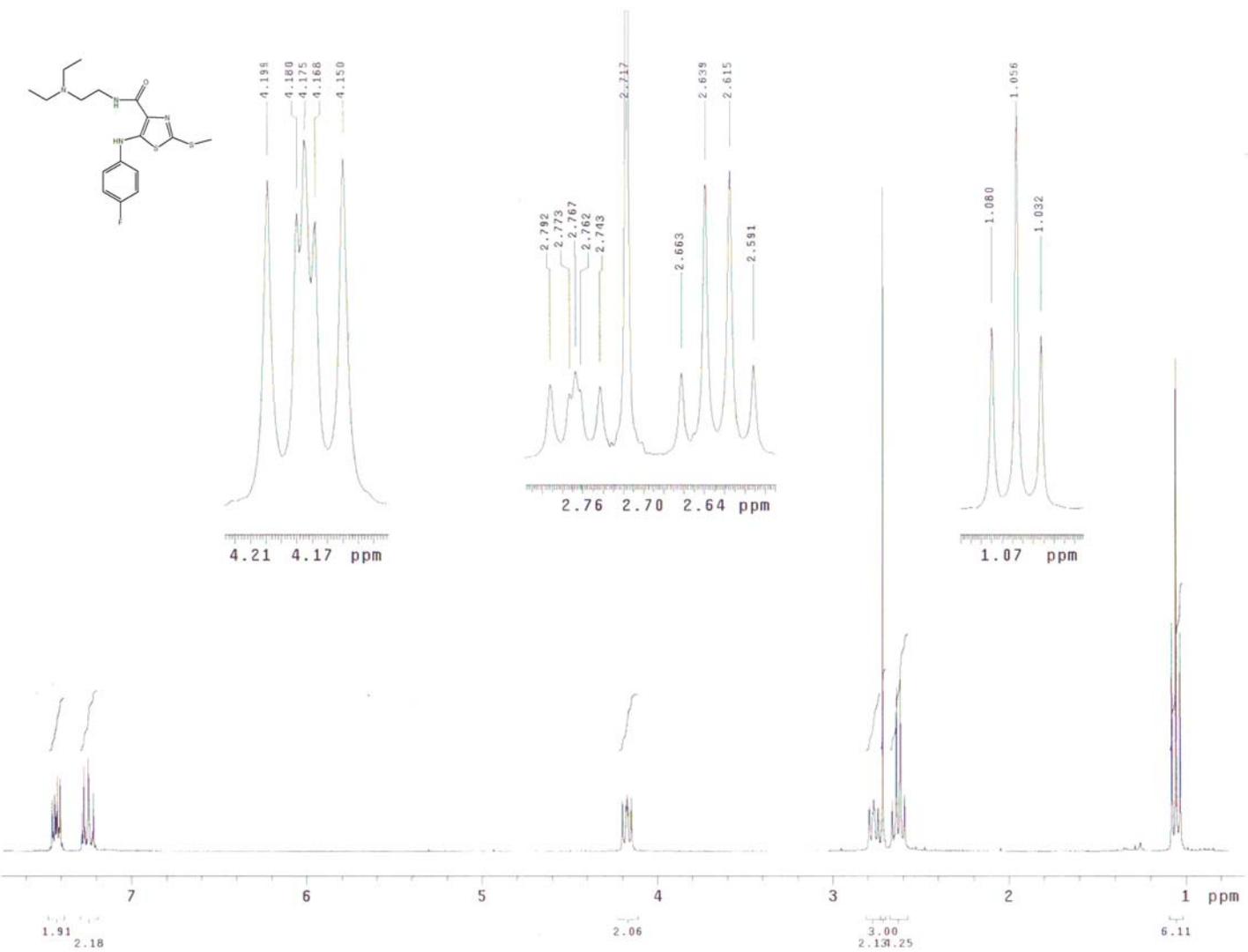


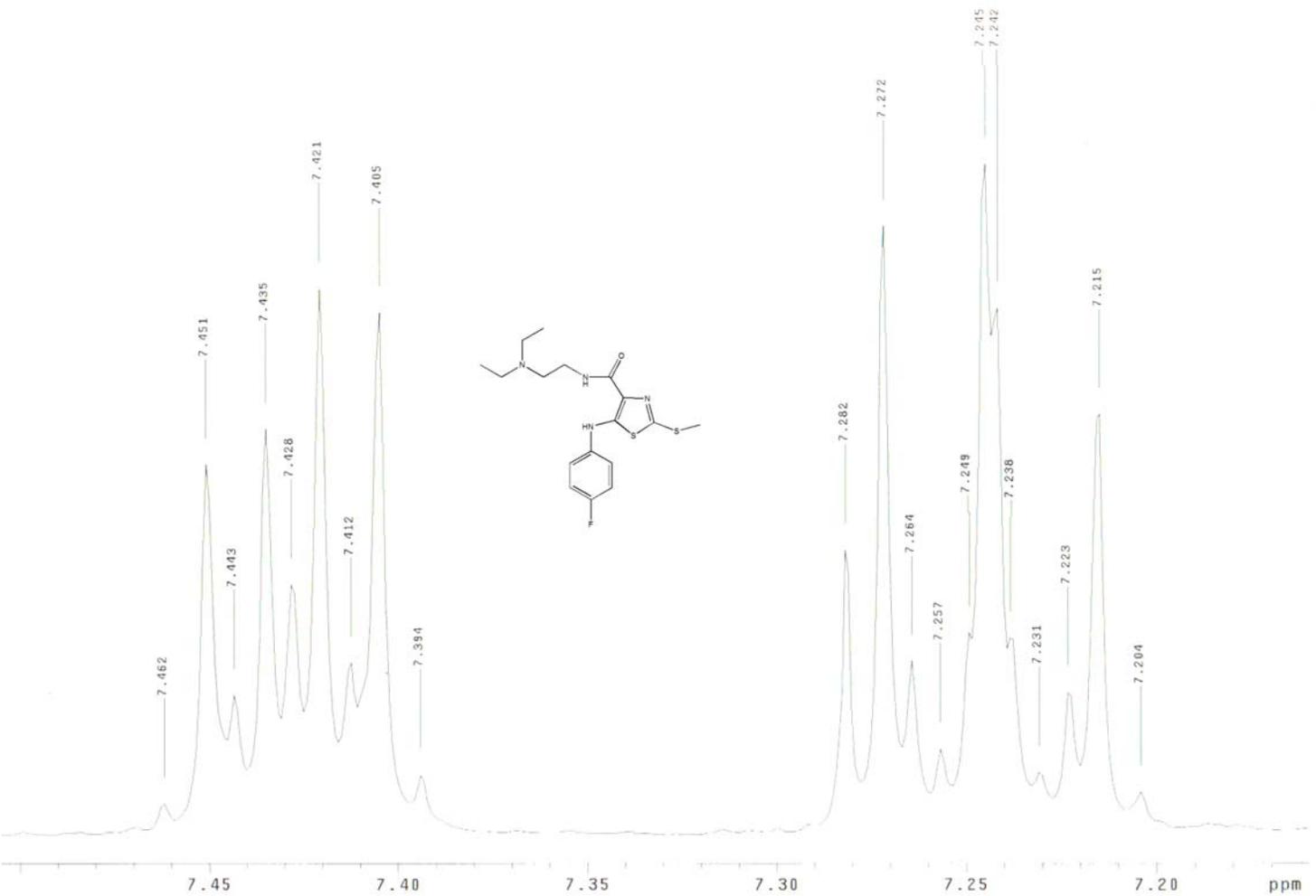
Espectro 26. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto XII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación

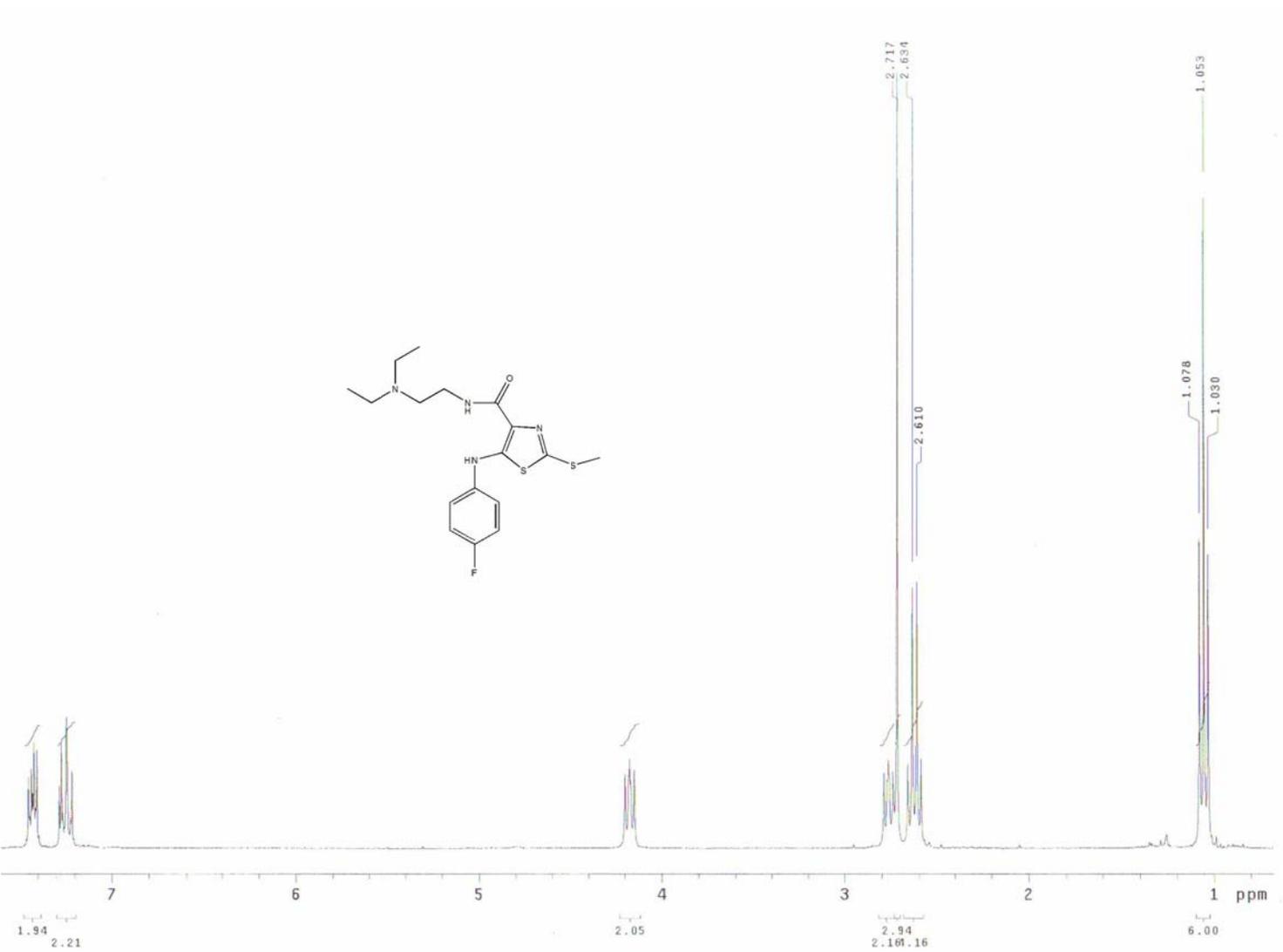


Espectro 27. Espectro de masas del compuesto XII (FAB)

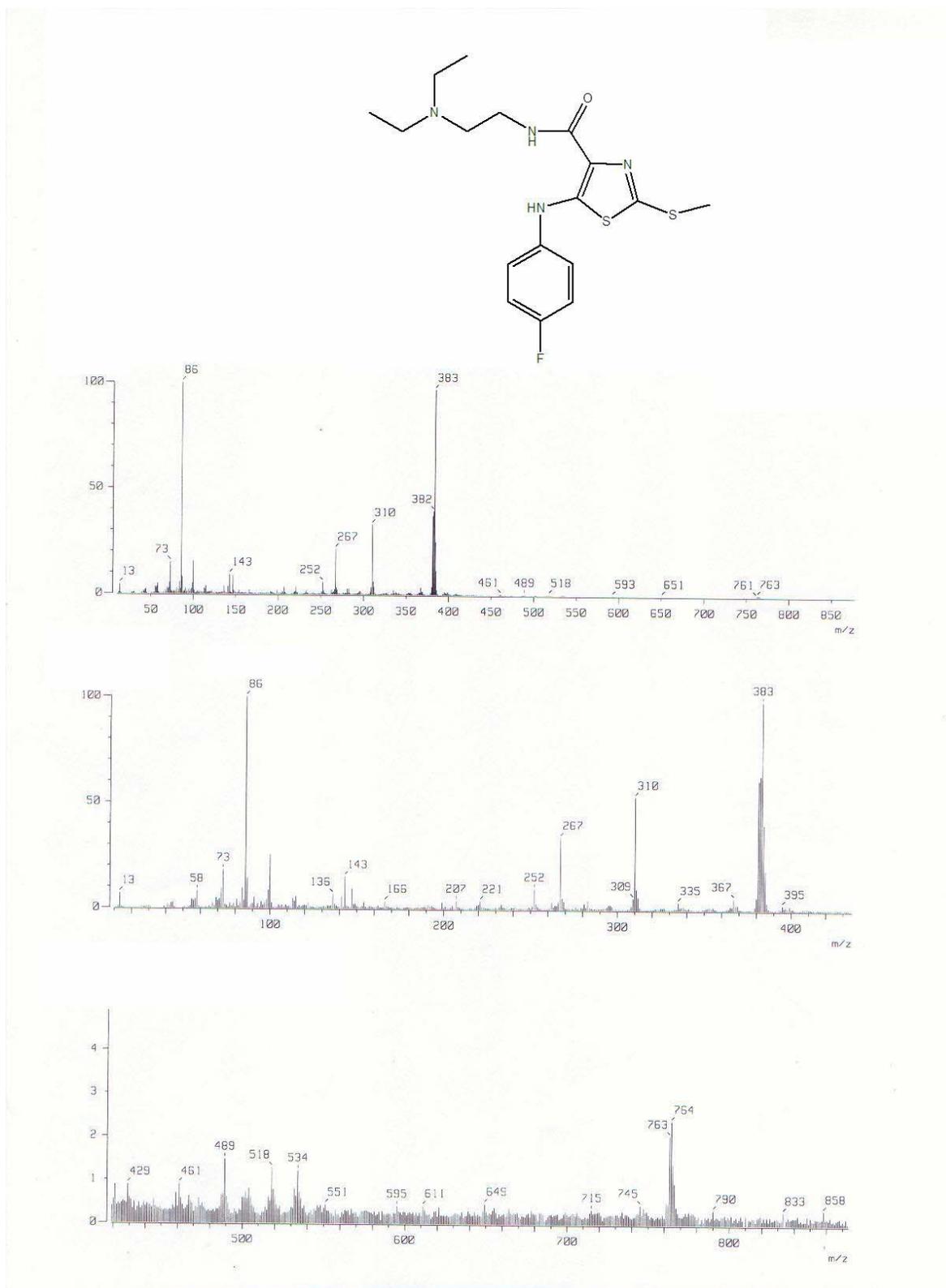


Espectro 29. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto XIII ( $\text{DMSO-d}_6$ )

Espectro 29. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto XIII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Ampliación



Espectro 29. Espectro de  $\text{RMN}^1$  del compuesto XIII ( $\text{DMSO-d}_6$ ) Intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$



Espectro 30. Espectro de masas del compuesto XIII (FAB)