



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para evaluar su potencial actividad antioxidante”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARCELA ALEJANDRA LÓPEZ SÁNCHEZ

**TUTOR: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para evaluar su potencial actividad antioxidante”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Marcela Alejandra López Sánchez



TUTOR: Dr. Francisco Hernández Luis AÑO:2015

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Vocal	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Vocal	Dr. Benjamín Noguera Torres
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Este trabajo se realizó en los laboratorios 121 y 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Conjunto E), bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis.

Parte de este trabajo se presentó en el 49° Congreso Mexicano de Química celebrado del 17 al 21 de septiembre del 2014 en Mérida Yucatán, bajo la modalidad de cartel con el título de "Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina, diseñados como citotóxicos y predicción de metabolismo *in vivo* mediante METAPRINT2D".

Así mismo, también se presentó en el QUIMIUNAM 2015, celebrado del 22 al 24 de abril del 2015, en Ciudad Universitaria, México, bajo la modalidad de cartel con el título de "Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para evaluar su potencial actividad antioxidante"

ASESOR

Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE

Q.F.B. Marcela Alejandra López Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser el lugar en donde he encontrado todo y más de lo que imaginé. Siempre estaré mas que agradecida por todo lo que nos brinda.

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM**, por su apoyo para la asistencia a congresos y durante los procedimientos administrativos.

A la Dirección General del Personal Académico, UNAM por el financiamiento recibido para la compra de reactivos y materias primas dentro del proyecto **PAPIIT-UNAM IN213914**.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca (No. de becario 308822, periodo 2014-2 a 2015-2) otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo proporcionado a través del Proyecto de Ciencia Básica **SEP-CONACyT 220664** para la compra de materiales de los estudios enzimáticos.

A la Unidad de Servicios Analíticos (**USAI**) de la Facultad de Química, UNAM y a su personal, que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales y Minerva Monroy); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Gutiérrez Franco) y Espectrometría de Masas (Georgina Duarte Lisci). Adicionalmente, a Rosa Isela del Villar Morales le agradezco capacitarme para usar el equipo de RMN de 300 MHz y su apoyo en las dudas que tenía.

Al Laboratorio de Espectrometría de Masas del **Instituto de Química, UNAM**, en específico al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y el I.Q. Luis Velasco Ibarra por la realización de los espectros de masas de baja y alta resolución. Así mismo, al Laboratorio de Pruebas Biológicas de la misma entidad y a su personal, por las pruebas de actividad citotóxica.

A todos los miembros del jurado por las valiosas aportaciones al presente trabajo. Muchas gracias por su tiempo y dedicación para proporcionarme comentarios y sugerencias para enriquecer esta tesis.

A mi tutor, el Dr. Francisco Hernández Luis, por todo el apoyo y confianza que me brindo durante todo el desarrollo de este proyecto. Por sus consejos desde que quise formar parte de su grupo de investigación. Por no dudar en apoyarme para iniciar mis estudios de maestría, y por todo el ánimo que me transmitió en sus clases.

A la Dra. María Elena Bravo Gómez, por enseñarme el fundamento del método de evaluación de actividad antioxidante utilizado, y por mostrarme todo su entusiasmo por la enseñanza.

Por que formaron parte muy significativa día a día durante la realización de este trabajo, agradezco al Dr. Rafael Castillo, a la Dra. Alicia Hernández y al Dr. Alfonso Lira, así como a mis compañeros del laboratorio 121 y 122; entre ellos, mencionó especialmente a Salvador Matus, por su ayuda inicial para desarrollar este proyecto y a María Elena Arreola, por apoyarme durante su SS. También agradezco a Verónica Ávila y Daniela Álvarez por su tiempo y ayuda en las pruebas de FOX y XO preliminares durante su estancia corta.

De la misma forma, enfatizó mi agradecimiento a Rodrigo Aguayo, por su apoyo con la realización de los estudios de docking. Así mismo a Pedro Trejo y Miguel Velázquez, por toda su ayuda.

Por que han sido y serán parte de todo lo que soy, reiteró mi más profundo agradecimiento a toda mi familia. Por que siempre me han dado todo el cariño, apoyo y más de lo que podría necesitar. Por que siempre están conmigo. Y por que son mi mayor motivo para seguir.

También agradezco a Fabiola Angélica López, por acompañarme y por ayudarme desde el momento en que las dos iniciamos la aventura de la maestría. Pero sobre todo, por ser mi amiga. Y a Sandybel Salgado, por que desde que llegue al laboratorio, compartió conmigo su pasión por lograr sus metas a base de esfuerzo y constancia, así como su amistad.

A mis amigos, Alicia Fernández, Diana Rivera – Luis Hernández, Geovanni Sánchez, Jhony Sánchez, Javier Moreno, Marco Luna, Montse González, Pablo Ramírez, Thalía Arévalo, Adriana López, Belén Campos, Katia García y Liz Mares les agradezco por compartir más que las clases conmigo.

Finalmente, mi agradecimiento a los que fueron mis maestros, y los que aún hoy lo siguen siendo. Es poco probable que en una lista enumeré a todas las personas que me han enseñado cosas valiosas que espero no olvidar. Muchas gracias.

Índice

Índice de figuras	v
Abreviaturas	vii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1. El cáncer y su importancia en la actualidad	3
2.2 Estrés oxidativo y su relación con la carcinogénesis	4
2.3 Estrés oxidativo como mecanismo quimioterapéutico	7
2.4 Inhibición de la enzima Dihidrofolato Reductasa	10
2.5 Derivados de quinazolin-2,4,6-triamina y su actividad quimioterapéutica	12
2.6 Búsqueda de compuestos con efecto antioxidante	13
2.7 Núcleo catecolico y de pirogalol. Propiedades antioxidantes de estos bloques sintéticos	14
2.8 Evaluación del efecto antioxidante	15
2.9 Características de la Xantina Oxidasa	16
2.9.1 Método de XO-NBT para evaluar el atrapamiento de radical superóxido (O ₂ ⁻)	18
2.10 Empleo de técnicas de predicción del metabolismo in vivo, para estimar biodisponibilidad y para contribuir en el diseño de fármacos	19
3. Planteamiento del problema	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos particulares	21
6. Metodología	
6.1 Consideraciones en el diseño de los derivados sintetizados	22
6.1.1 Elección de la quinazolin-2,4,6-triamina como núcleo	22

6.1.2 Elección de moléculas que pueden producir un efecto prooxidante/antioxidante y predicción del metabolismo que las moléculas podrían sufrir, mediante METAPRINT2D-React (Adams, 2010)	23
6.1.3 Diseño de derivados de quinazolina sin los grupos aminos en 2 y 4, (N-[4-(4-acetilanilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y N-[4-(3-acetilanilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	25
6.2 Síntesis de los compuestos	
6.2.1 Síntesis de ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (AMB)	27
6.2.1 Síntesis de N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas	27
6.2.3 Síntesis de las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)	28
6.2.4 Síntesis de (N-[4-(4-acetilanilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y N-[4-(3-acetilanilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	28
6.2.5 Caracterización espectroscópica	29
6.3 Evaluación biológica	
6.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante	30
6.4 Estudio de acoplamiento molecular de la Xantina Oxidasa de <i>Bos taurus</i> con las moléculas sintetizadas	
6.4.1 Preparación de los ligandos	35
6.4.2 Preparación de la proteína	35
6.4.3 Acoplamiento molecular	35
6.5 Evaluación de actividad citotóxica de B1 y B3	35
7. <i>Discusión de resultados</i>	
7.1 Síntesis de los compuestos	
7.1.1 Elección de ruta de síntesis de las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)	36
7.1.2 Elección de la metodología de síntesis de N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas (A1-A14)	40
7.1.3 Caracterización espectroscópica del ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (AMB), y las N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas. (A1-A14)	43
7.1.4 Ciclación de las N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas para formar las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)	53
7.1.5 Caracterización espectroscópica de las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)	55
7.1.6 Caracterización espectroscópica de 2-amino-6-(3,4-ciclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (MG12)	65

7.1.7 Síntesis de (<i>N</i> -[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y <i>N</i> -[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	68
7.1.8 Caracterización espectroscópica de (<i>N</i> -[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y <i>N</i> -[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	69
7.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el sistema XO-NBT	
7.2.1 Actividad de atrapamiento de superóxido, mediante el sistema XO-NBT	73
7.2.2 Actividad de inhibición de xantina oxidasa	74
7.2.3 Determinación de la concentración inhibitoria media de B1, B3 y MG12	75
7.3 Estudio de acoplamiento molecular de la Xantina Oxidasa de <i>Bos taurus</i> con las moléculas sintetizadas	76
7.4 Estudios de actividad citotóxica	77
8. Conclusiones	78
9. Referencias	79
<i>Apéndice I: Metodología de síntesis de los derivados</i>	
1. Ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (AMB)	86
2. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas (A1-A14)	87
3. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14, MG12)	94
4. <i>N</i> '-(2-ciano-4-nitrofenil)- <i>N,N</i> -dimetilformamidina (C0)	102
5. <i>N</i> -(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C1)	102
6. Ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico (C2)	103
7. <i>N</i> -(3-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C3)	104
8. 1-{4-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino]fenil}etanona (D1)	105
9. Ácido 3-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino] benzoico (D2)	106
10. 1-{3-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino]fenil}etanona (D3)	106
11. <i>N</i> -[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)	107
12. <i>N</i> -[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	108
<i>Apéndice II: Caracterización espectroscópica de los derivados</i>	
1. Ácido 2-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (AMB)	109
2. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (A1)	110
3. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida (A2)	111

4. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (A3)	113
5. (2E)- <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (A5)	115
6. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxamida (A6)	117
7. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida (A7)	118
8. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxamida (A8)	119
9. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (A11)	120
10. (2E)- <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12)	121
11. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (A13)	123
12. <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida (A14)	124
13. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)	125
14. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)	134
15. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)	142
16. (2E)- <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)	150
17. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)	157
18. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1 <i>H</i> -benzimidazol-5-carboxamida (B8)	164
19. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)	169
20. 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidropirimidin-4(3 <i>H</i>)-ona (MG12)	176
21. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)	183
22. <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)	192
23. <i>N</i> -(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C1)	200
24. Ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico (C2)	202
25. <i>N</i> -(3-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C3)	204
26. <i>N</i> -[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)	205
27. <i>N</i> -[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)	208
<i>Apéndice III: Metodología de los ensayos de actividad de atrapamiento de radical superóxido y de inhibición de la enzima Xantina Oxidasa Bovina</i>	209
<i>Apéndice IV: Datos de ensayos de actividad y tratamiento estadístico de las pruebas de atrapamiento de radical superóxido y de inhibición de la enzima Xantina Oxidasa Bovina</i>	216
<i>Apéndice V: Predicción de metabolismo in vivo mediante METAPRINT2D y METAPRINT2D-React</i>	232

Índice de Figuras

Nombre de figura / Capítulo	Página
Figura 2.1 <i>Las líneas vitales para el desarrollo de cáncer</i>	3
Figura 2.2 <i>Generación de distintos tipos de ROS por reducción secuencial univalente del oxígeno en estado basal triplete.</i>	4
Figura 2.3 <i>Red de defensa in vivo contra el estrés oxidante</i>	5
Figura 2.4 <i>Relación de los niveles de ROS y cáncer</i>	7
Figura 2.5 <i>Mecanismos moleculares que producen el efecto Warburg.</i>	9
Figura 2.6 <i>Reacción catalizada por la DHFR y participación en el ciclo de formación de Monofosfato de timidina (TMP) a partir de Monofosfato de Desoxiuridina (dUMP)</i>	10
Figura 2.7 <i>Comparación del modo de unión del ácido dihidrofolico y el metotrexato al centro activo de la dihidrofolato reductasa.</i>	10
Figura 2.8 <i>Diferencias en los patrones de donación y aceptación de puente de hidrógeno en el dihidrofolato (DHF) cuando está en una orientación similar al metotrexato (MTX), y cuando la orientación permite que coincidan los patrones de donación y aceptación de puente de hidrógeno del MTX.</i>	11
Figura 2.9 <i>Orientación relativa de los cofactores en la XOR de Bos taurus. Y diagrama mostrando la oxidación de la hipoxantina y xantina, catalizada por la XOR (Tipificando los sustratos más comunes) en el sitio de la molibdopteridina, y la oxidación del NADH en el sitio del FAD. La reducción del NAD⁺ o el oxígeno molecular también tiene lugar en el sitio del FAD.</i>	17
Figura 2.10 <i>Representación semitransparente de la unión del NAD⁺ a la XDH de Bos taurus (i) y a la XO (ii). El FAD, Fe/S I y Fe/S II se muestran con el propósito de orientación en la enzima. La superficie del loop entre los aminoácidos 423-433 es mostrada en azul, y muestra la oclusión de la unión entre el NAD y la XO, lo cual no sucede en la XDH.</i>	18
Figura 6.1 <i>Metodología llevada a cabo para el desarrollo del proyecto de esta tesis.</i>	22
Figura 6.2 <i>Scaffold o andamio estructural común en los derivados sintetizados</i>	23
Figura 6.3 <i>Carboxamidas de quinazolin-2,4,6-triamina propuestas para sintetizarse en este proyecto</i>	26
Figura 6.4 <i>Derivados de quinazolina sin grupos aminos en posiciones 2 y 4, propuestos para sintetizarse</i>	26
Figura 6.5 <i>Porcentaje de atrapamiento de superóxido en la prueba XO-NBT</i>	30
Figura 6.6 <i>Datos de porcentaje de inhibición de las muestras</i>	31
Figura 6.7 <i>Curva porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración</i>	32
Figura 6.8 <i>Regresión lineal de inversos de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs inversos de concentración, con intervalos de confianza del 95%</i>	33
Figura 6.9 <i>Curva de promedio de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración mediante ajuste con método de Hill, calculada en GraphPad Prism 6.0</i>	33
Figura 6.10 <i>Análisis estadístico de Hill para calcular CI₅₀ obtenido de GraphPad Prism 6.0</i>	34
Figura 7.1 <i>Rutas retrosintéticas propuestas para los derivados sintetizados.</i>	36
Figura 7.2 <i>Mecanismo de reacción de la DCC para la síntesis de amidas.</i>	37
Figura 7.3 <i>Mecanismo de reacción de la DIC para la síntesis de amidas.</i>	38
Figura 7.4 <i>Mecanismo de reacción del CDI para la síntesis de amidas.</i>	38
Figura 7.5 <i>Espectro de RMN ¹H de isómeros de N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida</i>	39
Figura 7.6 <i>Ruta C, propuesta para la síntesis de N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas</i>	40

<i>Figura 7.7</i> Condiciones de reacción probadas para la síntesis de las carboxamidas.	41
<i>Figura 7.8</i> Mecanismo de reacción de CC para la síntesis de cloruros de acilo.	40
<i>Figura 7.9</i> Mecanismo de reacción de TCICA para la síntesis de cloruros de acilo.	42
<i>Figura 7.10</i> Notación usada para describir la sustitución en los anillos aromáticos (R= carboxamida)	44
<i>Figura 7.11</i> Valores típicos de constantes de acoplamiento en anillos aromáticos.	44
<i>Figura 7.12</i> Constantes de acoplamiento heteronuclear y homonuclear y valores de desplazamiento químico de los protones en un anillo monosustituido por flúor	45
<i>Figura 7.13</i> Fragmento del espectros de RMN ¹ H de A11 y asignación de las señales.	46
<i>Figura 7.14</i> Fragmento del espectros de RMN ¹ H de A13, y asignación de las señales.	46
<i>Figura 7.15</i> Fragmento del espectro de RMN ¹ H de A14, y asignación de las señales.	47
<i>Figura 7.16</i> Fragmento del espectro de RMN ¹⁹ F de A2, y asignación de las señales.	47
<i>Figura 7.17</i> Fragmento del espectro de RMN ¹⁹ F de A14, y asignación de las señales.	48
<i>Figura 7.18</i> Características de los intermediarios, e información espectroscópica	49
<i>Figura 7.19</i> Propuesta del mecanismo de reacción de la formación de la 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona	54
<i>Figura 7.20</i> Nomenclatura de asignación de posiciones de sustitución del núcleo de quinazolina	55
<i>Figura 7.21</i> Regiones de la molécula con un patrón de sustitución 1,3,4 en anillo aromático de carboxamida y núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina.	55
<i>Figura 7.22</i> Fragmento de la zona aromático del espectro de RMN ¹ H y COSY de B14, y correlaciones encontradas y asignadas a la molécula.	56
<i>Figura 7.23</i> Fragmento del espectro NOESY de B1, y correlaciones observadas	57
<i>Figura 7.24</i> Fragmento del espectro HSQC de B13, y correlaciones observadas	58
<i>Figura 7.25</i> Fragmento del espectro HMBC de B11, y correlaciones observadas	59
<i>Figura 7.26</i> Características de las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carboxamidas e información espectroscópica	60
<i>Figura 7.27</i> Fragmento del espectro de RMN ¹ H de MG12 y COSY	65
<i>Figura 7.28</i> Espectro de RMN ¹³ C de MG12 y fragmento de espectro de HSQC donde se observa la correlación de 2 protones diastereotópicos	66
<i>Figura 7.29</i> Espectro EM-FAB de MG12	67
<i>Figura 7.30</i> Resumen de características de espectroscópicas de MG12	68
<i>Figura 7.31</i> Sistemas de acoplamiento similares en las señales de RMN ¹ H de E11	69
<i>Figura 7.32</i> Fragmento del espectro de RMN ¹ H de E11	70
<i>Figura 7.33</i> Sistemas de acoplamiento similares en las señales de RMN ¹ H de E31	70
<i>Figura 7.34</i> Fragmento del espectro de RMN ¹ H de E11	71
<i>Figura 7.35</i> Características espectroscópicas de los productos E11 y E31	72
<i>Figura 7.36</i> Promedio de porcentaje de atrapamiento de superóxido de las muestras (C=59.1 μM)	73
<i>Figura 7.37</i> Promedio de porcentaje de inhibición de XO de las muestras	74
<i>Figura 7.38</i> Concentraciones inhibitorias medias de los compuestos evaluados.	75
<i>Figura 7.39</i> Interacciones de los residuos de aminoácidos de la xantina oxidasa bovina con B1	76

Abreviaturas

δ	Desplazamiento químico en resonancia magnética nuclear
λ	Longitud de onda
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CAT	Catalasa
CC	Cloruro cianúrico (2,4,5-tricloro-1,3,5-triazina)
ccf	Cromatografía de capa fina
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonildiimidazol
COSY	Espectroscopia de resonancia magnética de correlación de acoplamiento spin-spin (H^1-H^1) en 2 dimensiones. (<i>Correlated Spectroscopy</i>)
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCU	<i>N,N'</i> -Diciclohexilurea
DHF	Ácido dihidrofólico (Dihidrofolato)
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMA	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetil-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMF-DMA	<i>N,N</i> -Dimetilformamida dimetilacetal
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EM (DART)	Espectrometría de masas mediante análisis en tiempo real
EM (ESI) ⁺	Espectrometría de masas, mediante ionización por electrospray
EM (FAB) ⁺	Espectrometría de masas, mediante ionización por bombardeo rápido de átomos y detección de iones positivos
EM (IE) ⁺	Espectrometría de masas, mediante ionización por impacto electrónico
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina (Forma oxidada)
FADH ₂	Dinucleótido de flavina y adenina (Forma reducida)
Fe/S I	Clúster de hierro y azufre (Fe ₂ S ₂) proximal a MPT
Fe/S II	Clúster de hierro y azufre (Fe ₂ S ₂) distal a MPT

FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
HMBC	Espectroscopia de correlación de dos o tres enlaces heteronucleares de distancia (<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HSQC	Espectroscopia de correlación de 1 enlace heteronuclear de distancia (<i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i>)
*J	Constante de acoplamiento a X átomos de distancia
MPT	Molibdopteridina (Cofactor de enzima XOR)
MTX	Metotrexato
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (Forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (Forma reducida)
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NOESY	Espectroscopía de correlación de núcleos a través del espacio (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PTR	Pteridin reductasa
R_f	Coefficiente de retención en ccf (Distancia recorrida/Distancia eluida)
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear del isótopo de carbono 13
RMN ¹⁹F	Resonancia magnética nuclear del isótopo de flúor 19
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Especies reactivas oxidativas (<i>Reactive Oxidative Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido Dismutasa
SMILES	Notación simplificada para la descripción de la naturaleza y topología de las moléculas (<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>)
TAQ	Quinazolin-2,4,6-triamina
TCICA	Ácido tricloroisocianúrico (1,3,5-tricloro-2,4,6-triazinatrina)
U	Unidades de actividad enzimática (μM de sustrato consumido/minuto)
XDH	Xantina Deshidrogenasa
XO	Xantina Oxidasa
XOR	Xantina Oxidoreductasa

Resumen

En este trabajo, se sintetizaron 12 derivados de quinazolin-2,4,6-triamina (**B1-B3, B5, B7-B8, B11, MG12, B13-B14, E11, E31**) diseñados como agentes antioxidantes. La consideración para estudiar este comportamiento en el sistema XO-NBT es que la sobreexpresión de la enzima XO genera estrés oxidante por la producción de radical superóxido, desencadenando un proceso de carcinogénesis y de progresión de tumores cuando dicho radical reacciona con el óxido nítrico, una molécula endógena para procesos vitales en el organismo. Por lo tanto, se esperaba que los derivados sintetizados puedan ocasionar un efecto preventivo de dichos procesos.

En el diseño también se incluyó un estudio computacional para explorar el posible metabolismo de dichas moléculas para establecer que no se biotransformen a compuestos con perfiles tóxicos en el ser humano, o que en condiciones *in vivo*, pudiesen generar metabolitos antioxidantes.

El comportamiento antioxidante de las moléculas sintetizadas se evaluó con el sistema xantina oxidasa-nitroazul de tetrazolio (XO-NBT), y se realizó mediante el monitoreo de la producción de formazán, generado por la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) al oxidarse el radical superóxido; éste último se produce cuando la xantina se oxida a ácido úrico mediante la catálisis de la XO. Un compuesto sería considerado antioxidante cuando disminuyera la producción de formazán. Este comportamiento puede ser causado por dos mecanismos diferentes; el primero (directo) sería reaccionar con el anión superóxido y el segundo (indirecto) al inhibir a la enzima XO.

Los resultados obtenidos mostraron que tres de los derivados inhibieron a la XO con la misma potencia que el compuesto de referencia (alopurinol). Adicionalmente, se realizó el docking de todos los derivados de quinazolina sintetizados frente a la XO para establecer el posible modo de interacción entre los compuestos y la proteína, y correlacionarlo con los datos experimentales de inhibición. Se encontró que existen al menos 5 interacciones posibles entre el sitio de unión y los compuestos.

Por otra parte, adicionalmente dos de los compuestos inhibidores de XO fueron ensayados frente a la línea celular HCT-15, donde presentaron actividad citotóxica menor que la del metotrexato y el cisplatino (fármacos de referencia).

Los resultados obtenidos colocan a estos compuestos como estructuras prototipos (lead) para seguir estudiándolos posteriormente.

Abstract

In this work, one set of 12 new quinazoline-2,4,6-triamine derivatives designed as antioxidants were synthesized (**B1-B3**, **B5**, **B7-B8**, **B11**, **MG12**, **B13-B14**, **E11**, **E31**). It was used the XO-NBT system to evaluate this property on the basis that overexpression of xanthine oxidase increases the production of superoxide radical that is related with oxidative stress, and also starts carcinogenesis and tumor progression when superoxide reacts with nitric oxide, an endogenous cellular signaling molecule involved in many physiological processes. Therefore, it is expected that derivatives synthesized produce preventive effects of that processes.

In the design, also a computational study was done for explore the possible metabolism of the derivatives, and assure to determinate that biotransformation won't lead to a toxic profile compounds, but also if *in vivo* it could be generated antioxidant metabolites.

The antioxidant properties were evaluated with xanthine oxidase - nitroblue tetrazolium system (XO-NBT) by measuring the formazan production, because is the product of the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) with the oxidation of radical superoxide. This radical was generated by the oxidation of xanthine to uric acid catalized with xanthine oxidase (XO). A compound was considered antioxidant when diminished formazan production were obtained. The possible mechanism of this activity were 2 different methods; first (direct) by scavenging superoxide and second (indirect) by XO enzymatic inhibition.

The data showed that three of the synthesized compounds inhibited XO with the same effectivity as allopurinol, the reference compound. Also, docking of all the derivatives with XO was done, for propose a binding mode that could correlate with the biologic activity measured. There was at least 5 different possible interactions of xanthine oxidase aminoacid residues and the compounds.

Morover, two of the XO inhibitors were tested against HCT-15 cell line and lower cytotoxic activity than methotrexate and cisplatin (reference compounds) were determinated.

The obtained results state this compounds as prototypes structures for further studies.

1. Introducción

Actualmente, existe un creciente interés en el estudio del estrés oxidante como parte de la etiología de padecimientos tan diversos, como son enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas, así como su participación en la patogénesis del cáncer y los procesos propios del envejecimiento. (Limón & Gonsebatt, 2009)

El estrés oxidante se define como un desequilibrio causado por que la producción de especies reactivas oxidantes (ROS) rebasa la capacidad de defensa de los mecanismos antioxidantes que dispone un organismo. La complejidad de este desequilibrio radica en que se debe tener en cuenta que dichas especies son un mecanismo necesario para la homeostasis redox. (Holmström & Finkel, 2014)

Por otra parte, las propiedades de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina son de especial interés en nuestro grupo de investigación, debido a la actividad citotóxica atribuida a este tipo de moléculas.

El mecanismo de acción que más ampliamente se ha investigado respecto a la actividad observada de dichos derivados esta relacionado con la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa, tanto en humanos como en parásitos, así como la pteridin reductasa en protozoarios patógenos. (Gilbert, 2002)

En los antecedentes se presentará brevemente algunos rasgos del tema en el que potencialmente los derivados sintetizados en este trabajo tienen una perspectiva de aplicación terapéutica, es decir, en la prevención de procesos carcinogénicos producidos por las especies ROS, así como evitar la progresión de tumores.

La hipótesis de este trabajo radica en que la moléculas diseñadas tienen potencialmente 2 mecanismos de acción. En el primero, la inhibición de la enzima xantina oxidasa, da lugar a una disminución en la producción de radical superóxido para evitar la reacción con óxido nítrico endógeno y que se produzca peroxinitrito, un carcinógeno al que se le atribuye que la infección crónica por *Helicobacter pylori*, y los virus de Hepatitis C o del Papiloma Humano produzcan cáncer. (Niles, Wishnok, & Tannenbaum, 2006)

La inducción de la citotoxicidad en células tumorales recae en el hecho de que los derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina potencialmente podrían inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa. Adicionalmente, en células tumorales, el atrapamiento de especies ROS podría desencadenar una ruta alterna para producir peróxido de hidrógeno (Sirota, Gibson, & Kohen, 2015), que sería un mecanismo para producir citotoxicidad en células tumorales, debido a que por ciertos rasgos atribuidos al metabolismo característico para su rápida proliferación (metabolismo de Warburg), los sistemas de defensa antioxidante se encuentran disminuidos. (Fang, Seki, & Maeda, 2009)

También se estimo el posible metabolismo que sufrirían las moléculas mediante un estudio computacional, para cerciorarse que los metabolitos no sean tóxicos, pero también para explorar la posibilidad de que los grupos metoxilos se biotransformen por una O-desalquilación a hidroxilos, dando lugar a compuestos fenólicos que presenten actividad atrapadora de especies ROS.

En la metodología se explicará, de forma general, el trabajo realizado para alcanzar el objetivo general y los objetivos particulares. Los detalles sobre los procedimientos de síntesis, los espectros adquiridos para la caracterización completa de las moléculas, las gráficas de predicción de metabolismo obtenidas mediante METAPRINT2D y METAPRINT2D React, así como los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante y su tratamiento estadístico pueden consultarse en los apéndices anexados al final de este informe de tesis.

El análisis de resultados principalmente se enfocará a explicar cómo se seleccionó la ruta de obtención y por qué se planteó la síntesis de otras moléculas distintas al núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina, así como algunas conclusiones planteadas con base a la reactividad de los derivados para la posterior aplicación de esta ruta en la síntesis de otros derivados. También se revisarán las principales características espectroscópicas que permiten determinar que se obtuvieron las moléculas planteadas, así como una parte del análisis quimioinformático que se llevó a cabo para explicar los resultados de inhibición de la xantina oxidasa.

Finalmente, los resultados obtenidos abren la pauta para hacer consideraciones para el diseño de moléculas con una mayor actividad biológica y abren otra perspectiva de aplicación terapéutica para los compuestos de este proyecto.

2. Antecedentes

2.1 El cáncer y su importancia en la actualidad

La Organización Mundial de la Salud ha establecido que el término cáncer incluye un amplio conjunto de enfermedades que afectan cualquier parte de un organismo, y cuya característica principal es la rápida multiplicación de células anormales que terminan por diseminarse. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, ya que hasta el 2012, se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones relacionadas con este padecimiento. (WHO Media Centre, 2015) La OMS estima que el número de nuevos casos aumente en una proporción del 70% en aproximadamente 20 años. (WHO Media Centre, 2015).

Según el Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, las células cancerosas difieren de las células normales principalmente en que ignoran las señales de muerte celular programada o apoptosis, siendo capaces de modificar el microambiente que las rodea, para inducir la formación de vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes, al tiempo que desarrollan mecanismos para evitar la respuesta inmune del organismo. (Instituto Nacional del Cáncer, 2015) En la figura 2.1, se ilustran algunas capacidades desarrolladas durante la progresión de un tumor.

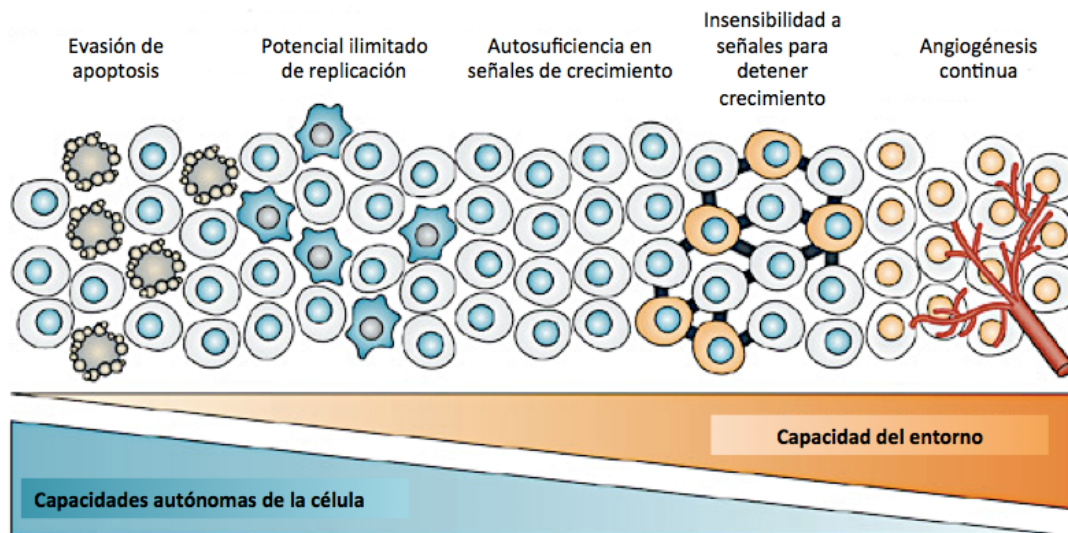


Figura 2.1 Las líneas vitales para el desarrollo de cáncer. Los tumores adquieren una multitud de características que promueven el crecimiento. Algunos de estas son capacidades celulares autónomas (triángulo azul), como el escape de la apoptosis o la envejecimiento celular (mediante un potencial de replicación ilimitado). Las capacidades autónomas adicionales no celulares reflejan la adquisición gradual de propiedades de crecimiento que son proporcionados por el entorno del tumor, como la autosuficiencia en las señales de crecimiento y la inducción de la angiogénesis (triángulo naranja). Sin embargo, no todas estas capacidades son esenciales para la inducción del fenotipo maligno. Adaptación del esquema de (Schmitt, 2003)

El crecimiento descontrolado es una de las principales características atribuidas al cáncer. En las células normales, los procesos de división celular y replicación de ADN son rigurosamente regidos por controles del ciclo celular, al tiempo que poseen mecanismos para corregir irregularidades pequeñas o producir efectos deletéreos como la muerte celular por apoptosis o una detención irreversible del ciclo celular, nombrado también como envejecimiento celular. En este contexto, las células tumorales adoptan capacidades que les permiten superar los mecanismos descritos anteriormente. (Schmitt, 2003)

En la actualidad, se sabe que existen cientos de mutaciones puntuales, translocaciones, amplificaciones y deleciones que contribuyen al desarrollo del cáncer. Adicionalmente, existe una gran variedad de mutaciones que difieren incluso entre tumores histopatológicamente idénticos. Análisis bioinformáticos sugieren que dichas mutaciones afectan a más de una docena de rutas de señalización y procesos responsables de la formación de los tumores. (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

Si bien, a grandes rasgos, estas son algunas características que se conocen con respecto a este grupo de padecimientos, la complejidad de los mismos ha hecho que gran parte de la investigación que se desarrolla, se enfoque en torno a estos aspectos.

2.2 Estrés oxidativo y su relación con la carcinogénesis

Las especies oxidantes reactivas, (ROS: *Reactive Oxidative Species*), se producen durante el funcionamiento de algunas enzimas deshidrogenasas en un organismo, o mediante la interacción de peróxidos con metales, como en la reacción de Fenton. Pueden encontrarse en forma de radical libre, -radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), así como derivados de oxígeno neutros, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)- o en forma neutra -peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete, peróxidos de alquilos, entre otros. En la figura 2.2 se muestran algunos ejemplos.

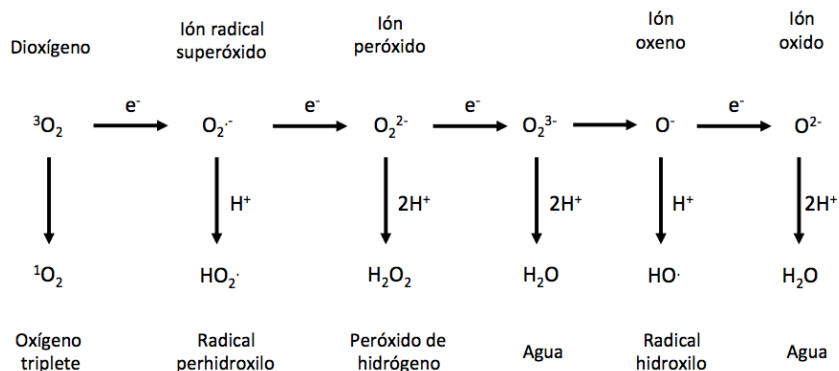


Figura 2.2 Generación de distintos tipos de ROS por reducción secuencial univalente del oxígeno en estado basal triplete. Adaptado de: (R. & R., 2005)

En el artículo de revisión de (Limón & Gonsebatt, 2009), se describe que el estrés oxidativo ocurre cuando la capacidad de todos los sistemas antioxidantes de un organismo se ven rebasados por la producción de especies reactivas oxidantes durante los procesos endógenos de catabolismo para obtención de energía; o bien, gracias a factores exógenos al organismo, como pueden ser la alimentación, exposición a radiación ionizante, metales, pesticidas, compuestos orgánicos tóxicos con exposición persistente, así como ciertos fármacos.

El estrés oxidativo produce envejecimiento en el organismo, y al mismo tiempo, se le relaciona con otras patologías crónicas, como el cáncer, desordenes neurológicos, diabetes, el síndrome de isquemia/reperfusión los cuáles a su vez, se relacionan con la intolerancia a la glucosa, la activación de procesos inflamatorios, el incremento de la actividad de la NADPH oxidasa, así como la inducción de la actividad de la xantina oxidasa (XO).

En la figura 2.3, se observa la relación que se tiene entre las ROS y los mecanismo de defensa del organismo.

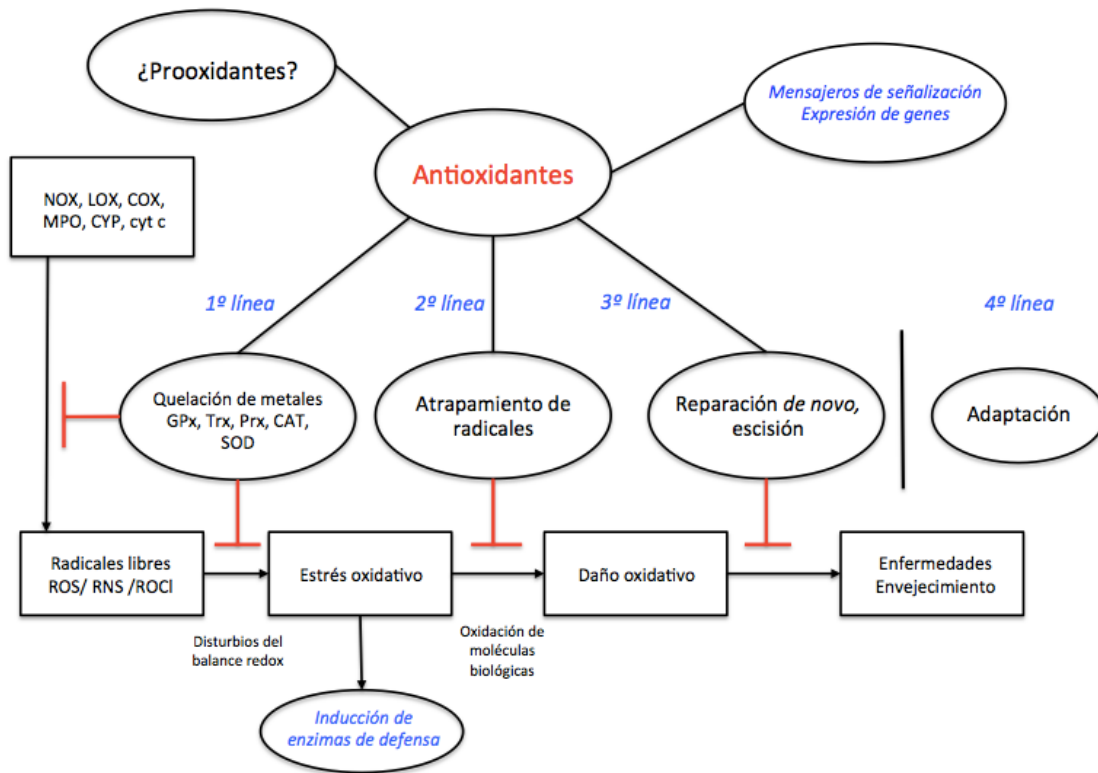


Figura 2.3 Red de defensa in vivo contra el estrés oxidativo. (Niki, 2010)

Adicionalmente, se describe en la revisión de (Limón & Gonsebatt, 2009), que los sistemas de defensa desarrollados, también llamados antioxidantes, son cruciales para la supervivencia del organismo.

Algunos mecanismos antioxidantes son:

I.- Remoción y neutralización de radicales libres y/o especies reactivas mediante catálisis. Algunos ejemplos incluyen a la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas, entre otros.

II.- Quelación de iones metálicos prooxidantes como el hierro o cobre, por proteínas tales como la transferrina, metalotioneína, haptoglobinas y caeroplasmina.

III.- Protección contra el daño macromolecular, por proteínas de “estrés” o de “calor de choque”.

IV.- Reducción de los radicales libres por grupos electrodonadores, como el glutatión (GSH), la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), la bilirrubina y el ácido úrico.

Con respecto al cáncer, se conoce la participación de ROS como los causales de daño a ADN, produciendo mutaciones, reacciones inflamatorias y promoción de células proliferativas. La carcinogénesis se puede presentar durante niveles de estrés oxidativo bajos o intermedios en ciertas condiciones como son la infección crónica por *Helicobacter pylori*, y los virus de Hepatitis C o del Papiloma Humano.

En los casos mencionados, las especies reactivas de nitrógeno (RNS, de *Reactive Nitrogen Species*) como el óxido nítrico (NO), reaccionan con el superóxido producido por el incremento en la actividad de la XO, para formar peróxinitrito (ONOO⁻), al cual se le atribuye ser el principal causante de la carcinogénesis. (Niles, Wishnok, & Tannenbaum, 2006)

Finalmente, las ROS han estado implicadas en la expansión de clonas de células mutadas por la activación de genes relacionadas con la proliferación, así como su participación como moduladores de cascadas de señalización redox y activación de factores de transcripción como:

- Cascada del factor de crecimiento epidérmico o epidérmico (EGF), relacionado con la división celular descontrolada cuando existen mutaciones.
- Fosforilación de tirosina
- Cascada de la familia de proteína cinasa C (PKC)
- Factor NF- κ B, un complejo que se encarga de regular la transcripción de ADN
- Proteína activadora 1 (AP-1), reguladora de la transcripción de genes para procesos celulares como la diferenciación, proliferación y apoptosis.
- Factor relacionado a NF-E2 (Nrf2), un factor de transcripción encargado de regular la transcripción y expresión de proteínas de protección antioxidante.
- Cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), miembro de la familia de las MAPKKK, responsable de:
 - Activación de p38, una cinasa de respuesta ante estímulos de estrés involucrada en la diferenciación celular y apoptosis
 - Activación de cinasa N-terminal c-Jun (JNK), implicada en procesos de diferenciación de linfocitos T y en procesos de apoptosis.

Todas las cascadas mencionadas inducen una amplia variedad de respuestas celulares tales como la proliferación, diferenciación, senectud y apoptosis. (Fang, Seki, & Maeda, 2009)

Adicionalmente, se ha establecido que el efecto de las ROS en las células está directamente relacionado con la proporción a la cuál son expuestas. Bajos niveles (Fase amarilla en la figura 2.4) pueden proporcionar un efecto favorable para el tumor, pues promueven la proliferación y la activación de rutas para la supervivencia de las células.

Mediante mutaciones y mecanismos de adaptación, la célula tumoral cáncerosa puede sobrevivir a un exceso de ROS producidas por el incremento del metabolismo energético aberrante o efecto Warburg (explicado en la siguiente sección) y la traducción de proteínas (Fase azul en la figura 2.4), aunque también puede experimentar procesos mutágenos. No obstante, si los niveles de ROS se vuelven excesivos, y los mecanismos antioxidantes se ven rebasados, el estrés oxidativo lleva a la muerte celular (Fase morada en figura 2.4). (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

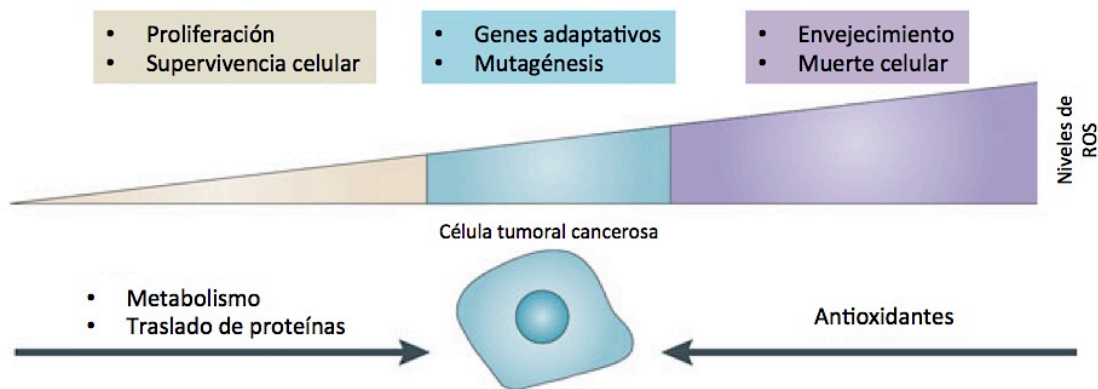


Figura 2.4 Relación de los niveles de ROS y cáncer (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

2.3 Estrés oxidativo como mecanismo quimioterapéutico

Una de las alternativas usadas para la búsqueda de compuestos que afecten a las células cancerosas se basa en la toxicidad de las ROS, pues por el "efecto de Warburg", las células tumorales pueden ser más susceptibles de ser atacadas por estas entidades químicas. (Fang, Seki, & Maeda, 2009)

El efecto de Warburg es el fenotipo metabólico característico de las células tumorales, que consiste en la generación de ATP mediante glucólisis anaeróbica, incluso durante concentraciones de oxígeno normales. El microambiente, con bajas concentraciones de oxígeno, glucosa y pH ácido, que rodea al tumor juega un papel fundamental para que se exprese este fenotipo. (Hess & Khasawneh, 2015)

Para tratar de explicar este fenotipo, inicialmente se propuso que en las células tumorales existen alteraciones mitocondriales causales del efecto Warburg; sin embargo, recientemente se ha observado que éstas células conservan la capacidad de realizar la fosforilación oxidativa, es raro encontrar defectos mitocondriales, y el consumo de oxígeno llega a ser similar al de células normales. (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

La adaptación metabólica observada también tiene otros efectos importantes como cubrir las necesidades de construcción de bloques macromoleculares (carbohidratos, nucleótidos, proteínas y lípidos) para la rápida multiplicación celular, así como el mantenimiento del balance redox. En este caso, un ejemplo es el cofactor NADPH que se produce durante el metabolismo alterado, ya que tiene dos funciones; proporcionar su potencial reductor en muchas reacciones importantes para la síntesis de material para proliferar, así como de defensa contra las ROS generadas. La regeneración de moléculas antioxidantes de defensa como el glutatión (GSH) y la tioredoxina (TRX) son fundamentalmente auxiliadas por el poder reductor del NADPH.

Este mecanismo es de vital importancia para la célula tumoral, ya que la pérdida de la funcionalidad de p53 (observada en la figura 2.5) inactiva el mantenimiento del equilibrio redox, a causa de que inactiva a p21, y origina que Nrf2 (un factor del que se discutirá más adelante) se degrade e impida la transcripción de genes de proteínas de defensa antioxidante. (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

Es decir, el mantenimiento del equilibrio redox recae ahora, principalmente, en el NADPH, para regenerar los sistemas de defensa ya existentes, pues la transcripción de enzimas antioxidantes está impedida, y por ello, las células tumorales son más vulnerables al estrés oxidativo. Con estas bases, se ha propuesto la administración de enzimas generadoras de ROS directamente a tejidos tumorales, para que, mediante el efecto EPR (*Enhanced permeability and retention*), las macromoléculas se acumulan en una mayor proporción en tumores sólidos y debido a la alta densidad vascular, se logre una actividad más selectiva hacia los tumores. Algunas de estas enzimas son la xantina oxidasa y la D-aminoácido oxidasa (DAO), formuladas con conjugados de polietilenglicol. (Fang, Seki, & Maeda, 2009)

En este caso, es necesario que se tenga un ajuste controlado en la “dosis” de ROS a administrar en el tumor, pues se puede correr el riesgo de promover el avance de la enfermedad si la toxicidad de dichas especies no logra producir la citotoxicidad deseada. Por ello, aún es controversial este tipo de mecanismo de acción. (Sporn & Liby, 2012)

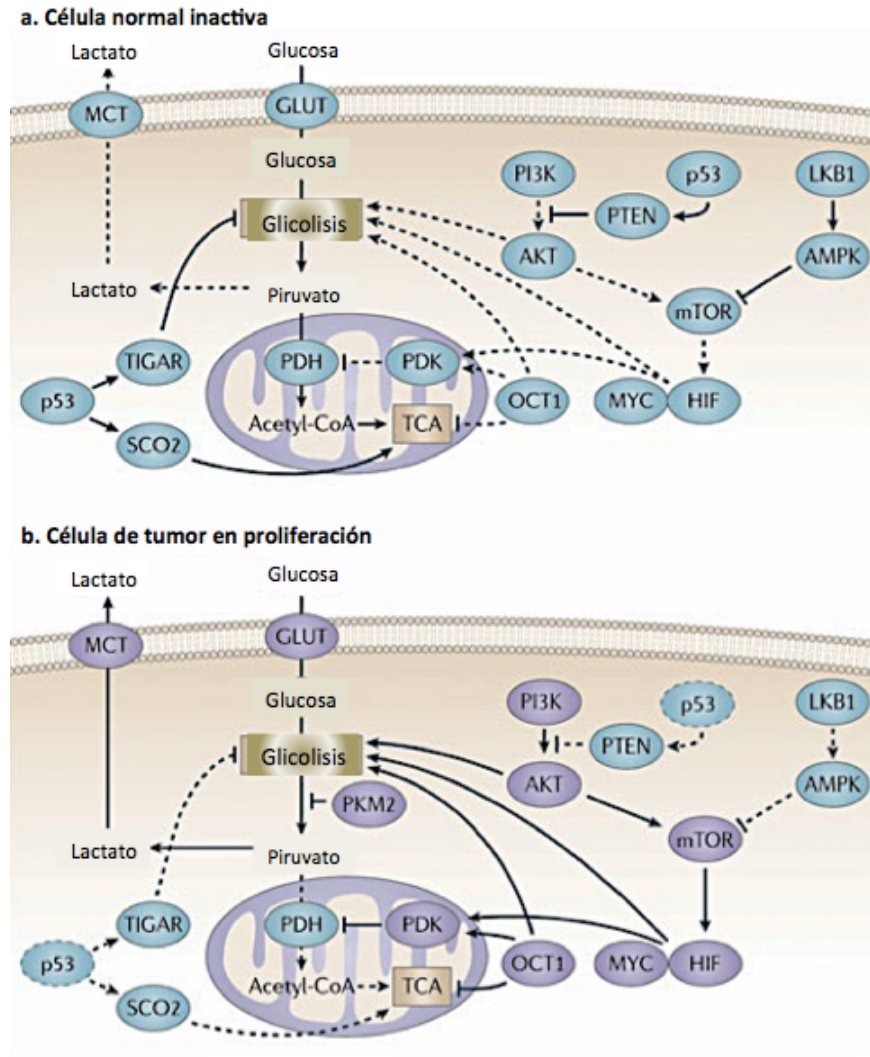


Figura 2.5 Mecanismos moleculares que producen el efecto Warburg. Respecto a las células normales (parte a del esquema), el cambio a glicolisis anaeróbica en células tumorales (parte b) es llevado a cabo por múltiples rutas oncogénicas de señalización. PI3K activa AKT, que estimula la glicolisis directamente al regular enzimas de dicha ruta y activa mTOR. Normalmente, la cinasa LKB1 a través de activación por la AMPK se opone al fenotipo glicolítico, inhibiendo a mTOR. mTOR altera el metabolismo glicolítico e induce la actividad del factor 1 de hipoxia inducible (HIF1), el cuál, al mismo tiempo incrementa la expresión de los transportadores de glucosa GLUT, enzimas glicolíticas, así como la piruvato cinasa deshidrogenasa (PDK1), la cuál bloquea el ingreso al piruvato al ciclo de ácidos tricarboxílico (TCA). MYC coopera con HIF, y activa genes que codifican proteínas de la glicolisis, pero también incrementa el metabolismo mitocondrial. El supresor de tumores p53 normalmente se opone al fenotipo glicolítico suprimiendo la glicolisis mediante TIGAR, incrementando el metabolismo mitocondrial con SCO2 y ayudando a la expresión de PTEN. OCT1 normalmente actúa de manera opuesta a la transcripción de genes que controlan la glicolisis y suprimen la fosforilación oxidativa. El cambio de la isoforma de la piruvato cinasa M2 (PKM2) afecta la glicolisis, disminuyendo la velocidad de la reacción de la piruvato cinasa y desvía los sustratos a la alternativa biosintética y a las rutas de generación de NADPH mediante la conversión de piruvato a lactato. MCT, es el transportador de monocarboxilatos; PDH es la piruvato deshidrogenasa. Las líneas punteadas indican la pérdida de función de p53. (Cairns, Harris, & Mak, 2011)

2.4 Inhibición de la enzima Dihidrofolato Reductasa

La enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR) es una enzima clave en la biosíntesis de ácido tetrahidrofólico, un proceso común en bacterias y células eucariotas, mediante la reducción del dihidrofolato a tetrafolato, usando al cofactor NADPH, con el fin de completar el ciclo de síntesis del Timidilato. El ciclo detallado, se describe en la figura 2.6

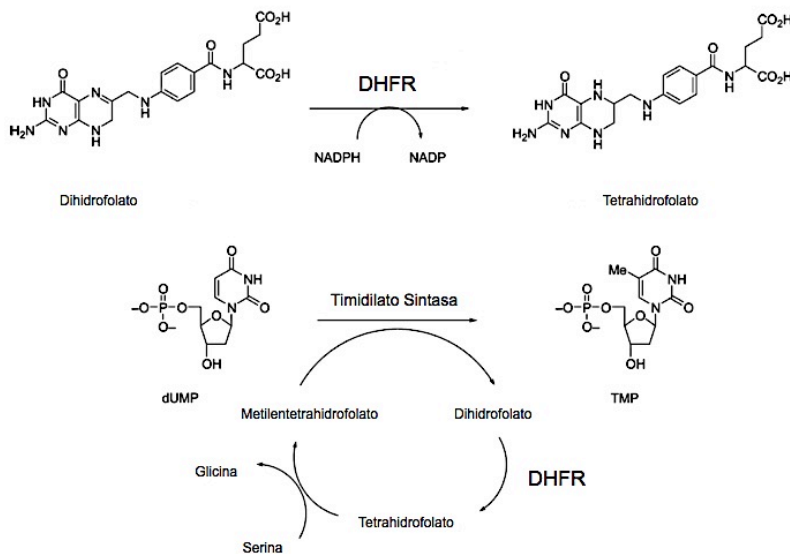


Figura 2.6 Reacción catalizada por la DHFR y participación en el ciclo de formación de Monofosfato de timidina (TMP) a partir de Monofosfato de Desoxiuridina (dUMP) (Gilbert, 2002)

La inhibición de esta enzima da lugar al agotamiento de las reservas celulares de tetrahidrofolato; con ello, el cese en la producción de timidilato y consecuentemente de timidina, por lo que la célula se vuelve incapaz de producir más ADN, dando como resultado que se detiene la proliferación celular. (Hess & Khasawneh, 2015) Adicionalmente, la inhibición logra acumular NADPH que puede estimular la producción de GSH.

Un ejemplo de clásico de la inhibición de esta enzima, es el uso del metotrexato (MTX) en el tratamiento de cáncer. En la figura 2.7 se observa una propuesta del modo de unión en el sitio activo de la DHFR.

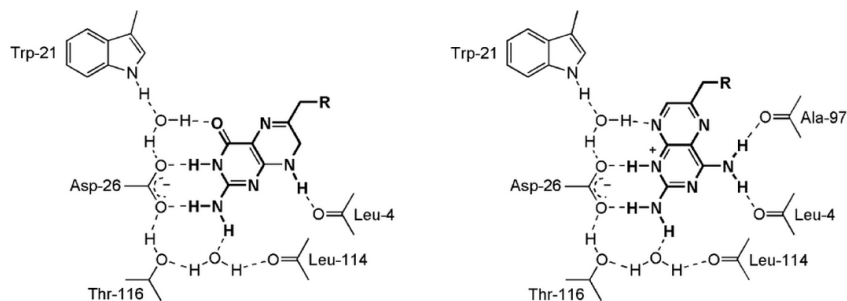


Figura 2.7 Comparación del modo de unión del ácido dihidrofólico (izquierda) y el metotrexato (derecha) al centro activo de la dihidrofolato reductasa. (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2015)

En este caso, a pesar de la similitud de la estructura de ambas moléculas, la formación de puentes de hidrógeno con algunos residuos del sitio de unión es diferente, por lo cuál la orientación del ligando es distinta, y esta es una de las principales diferencias a las que se puede atribuir la inhibición, como se indica en la figura 2.8. (Kubinyi, 2001)

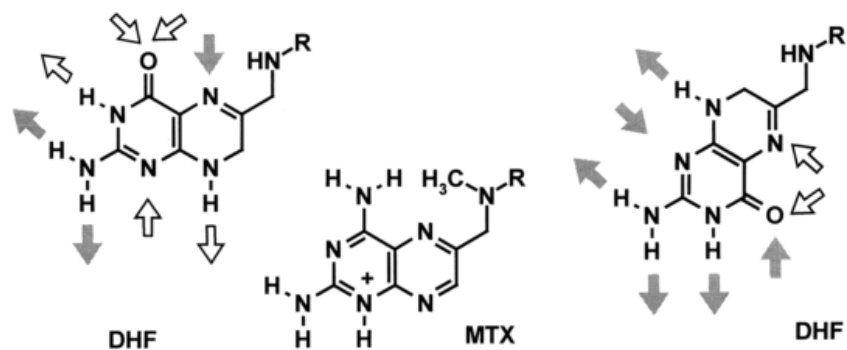


Figura 2.8 Diferencias en los patrones de donación y aceptación de puente de hidrógeno en el dihidrofolato (DHF) cuando está en una orientación similar al metotrexato (MTX) (Izquierda), y cuando la orientación permite que coincidan los patrones de donación y aceptación de puente de hidrógeno del MTX (Derecha).

Aunque aún sigue en discusión si la inhibición de esta enzima es una de las principales formas de limitar el ciclo de síntesis del timidilato, esta ha sido uno de los blancos principales para la búsqueda de agentes antibacterianos, antiparasitarios y antitumorales. (Bailey, 2010)

En el desarrollo de este tipo de compuestos, también llamados antifolatos, se trató de modificar sus propiedades para producir una mayor selectividad celular. Por una parte, un mayor carácter lipofílico favorecería la selectividad hacia las células de parásitos y/o bacterias. Estos organismos no poseen mecanismos de transporte activo para los antifolatos, como las células humanas, y por lo tanto, los compuestos ingresarían al interior de la célula mediante difusión pasiva. (Gangjee & ál., 1998)

Desde este mismo enfoque, una mayor selectividad hacia células tumorales se lograría con un carácter más polar, en el que análogos al metotrexato, de tipo polianiones, serían transportados más eficientemente por transporte activo, dado el incremento de la expresión de mecanismos para el transporte de folatos observado en células transformadas a tumorales y embrónicas. (Gonen & Assaraf, 2012)

Sin embargo, también se observó que los mecanismos de transporte de MTX eran más eficientes en células de leucemia en modelos murinos, respecto a los de tumores sólidos en el mismo modelo. De ahí que a los antifolatos se les asociara una mayor actividad prospectiva como agentes para el tratamiento de leucemia. (Jackman, 1999)

Adicionalmente, se ha reportado que el metotrexato no inhibe únicamente a la dihidrofolato reductasa, pues también se reporta su participación en la inhibición de otras enzimas NADP deshidrogenasas, tales como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD),

6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa.

Por lo tanto, se ha propuesto que la inhibición de estas enzimas, también interfiere con el mecanismo de producción de metabolitos capaces de amortiguar los efectos de estrés oxidativo al que están siendo sometidas las células tumorales durante el efecto Warburg. (Hess & Khasawneh, 2015)

Así, se sugiere que otros posibles mecanismos de acción de este fármaco podrían estar relacionados con las complejas interacciones del metabolismo celular, la función mitocondrial y los mecanismos de equilibrio redox celular.

Sin embargo, uno de los inconvenientes en el uso del metotrexato actualmente, consiste en el desarrollo de resistencia a este fármaco, por el incremento en los transportadores de reflujo, como el RFC, MRP1-5 y BCRP. (Gonen & Assaraf, 2012)

2.5 Derivados de quinazolin-2,4,6-triamina y su actividad quimioterapéutica.

En 1970, el grupo de investigación de John Davoll reportó la síntesis de derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina, con el fin de explorar sus uso como antifolatos para el tratamiento de leucemia. (Davoll & Johnson, 1970)

Posteriormente, en 1972 el mismo grupo reportó dos nuevos conjuntos de derivados con actividad antiparasitaria contra *Plasmodium berghei* en ratones, *P. Cynomolgi* en monos rhesus, *Trypanosoma cruzi* en embriones de pollo y ratones así como *Streptococcus faecalis* resistente a metotrexato, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus cerevisiae*. (Davoll, Johnson, H., O., J., & E., 1972) y (Elslager, Bird, Clarke, S., Worth, & Davoll, 1972) con lo cuál comenzó a explorarse más la actividad antiparasitaria de estos derivados.

En 1989, un estudio de actividad antiparasitaria con *Leishmania major* y *L. Mexicana* de algunos de los derivados sintetizados anteriormente por el grupo de Davoll, se exploró la actividad inhibidora de la enzima dihidrofolato reductasa, para establecer si este era el posible mecanismo de acción.

Aunque se encontró que la actividad inhibidora de la DHFR no está directamente relacionada con la actividad antiparasitaria *in vitro*, se concluyó que de alguna manera, estas moléculas interferían con el metabolismo de folatos, esenciales para la supervivencia de dichos parásitos. (Berman, King, & Edwards, 1989)

Estudios posteriores, se enfocaron en diseñar moléculas con propiedades lipofílicas, similares a las de antifolatos no clásicos, como el trimetoprim (TMP), trimetrexato (TMX), y la pirimetamina; que, a diferencia del metotrexato (MTX), no requeriría transporte activo para ingresar a las células, con el objetivo de lograr una mayor actividad antiparasitaria.

En un intento por lograr esto, en 1999 en el grupo de investigación de Aleem Gangjee, se diseñaron y sintetizaron derivados de 2,4,6-triaminquinazolina, que fueron evaluados contra *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Lactobacillus casei* y *Escherichia coli*, observándose que la actividad inhibidora de DHFR perdía selectividad contra los parásitos, respecto a derivados pirido[2,3-*d*]pirimidinas que habían desarrollado anteriormente.

Adicionalmente, se evaluó la inhibición de la DHFR humana, observándose concentraciones inhibidoras nanomolares, por lo que posteriormente se exploraron las propiedades citotóxicas de estos compuestos. (Gangjee & ál., 1998)

Estudios posteriores de este mismo grupo de investigación se centraron en la obtención de inhibidores de la DHFR con una mayor selectividad hacia *Pneumocystis carinii* y *Toxoplasma gondii*. Algunos rasgos distintivos para obtener dicha selectividad se relacionan con la introducción de un grupo más voluminoso en los derivados N9-sustituídos. (Gangjee, Adair, Pagley, & Queener, 2008) y retomar como núcleo base a las pirido[2,3-*d*]pirimidinas. (Gangjee, Namjoshi, Raghavan, Queener, Kisliuk, & Cody, 2013).

Otros estudios también han evaluado la posibilidad de que los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina puedan ser inhibidores de otros blancos tales como la MurD ligasa de *Escherichia coli* (Tomašić, et al., 2009), mientras que recientemente en el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis, se ha desarrollado la síntesis de derivados con actividad antiparasitaria en *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Plasmodium berghei* mediante la potencial inhibición de la DHFR y la PTR (Mendoza C. , 2009) (Mendoza, et al., 2015), (Mendoza, et al., 2015), (Matus, 2013) y recientemente se ha explorado la potencial actividad citotóxica en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario de derivados sintetizados por (Rosales, 2015).

2.6 Búsqueda de compuestos con efecto antioxidante.

Debido a que actualmente se sabe la participación de las ROS en el origen de múltiples enfermedades, la búsqueda de moléculas con actividad antioxidante ha sido un área de investigación de gran interés en los últimos 30 años, sin embargo, únicamente se ha reportado la llegada al mercado de 2 nuevos fármacos de este tipo (Idebenona y Edavarona), de acuerdo a la base de datos *MDL Drug Data Report*, en la búsqueda realizada por (Li, Gao, & Zhang, 2009).

Si bien, existen numerosos reportes de moléculas de origen natural o sintético con propiedades antioxidantes de *scavenging* o atrapamiento de radicales libres, en las que el núcleo catecólico o fenólico son una característica en común; la limitante principal que se tiene en las perspectivas de aplicación de dichas moléculas es su pobre biodisponibilidad, un factor que limita su actividad, causado principalmente por la gran capacidad de estas

moléculas para formar puentes de hidrógeno y rodearse de moléculas de agua, con lo cuál se impide el atrapamiento mediante el mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*).

Por ello, la búsqueda de moléculas con un mecanismo antioxidante multipotencial ha sido una de los objetivos planteados recientemente. En dicho término, también se incluyen moléculas con propiedades farmacológicas completamente diferentes a las propiedades antioxidantes que también se buscan. Uno de los objetivos es limitar la oxidación de sustratos biológicos por ROS en cualquiera de sus fases, iniciación, propagación y terminación.

Cuando las moléculas tienen como función evitar la producción mediante la inhibición de enzimas generadoras de ROS o mediante la quelación de metales de transición que catalizan su formación, se les asigna el término de antioxidantes preventivos y cuando impiden la propagación por la neutralización de las ROS, se les asigna el término de antioxidantes bloqueadores de cadena.

Adicionalmente, existen antioxidantes que promueven el incremento de los niveles de antioxidantes endógenos mediante la activación de la expresión de genes que codifican a la SOD, CAT o glutatión peróxidasa. Se debe resaltar que los mecanismos mencionados no son mutuamente excluyentes, es decir, algunas moléculas pueden potencialmente actuar por más de un mecanismo. (Zhang, Yang, & Tang, 2006)

2.7 Núcleo catecolico y de pirogalol. Propiedades antioxidantes de estos bloques sintéticos

Varios estudios han explorado la actividad del catecol y el pirogalol como núcleos útiles para el atrapamiento de radicales libres por la estabilización por puentes de hidrógeno intramoleculares así como por las propiedades electrodonadoras del hidroxilo en orto, una vez que el mecanismo HAT ha sucedido, sumado a sus propiedades quelantes de iones metálicos. Por ello, se han considerado núcleos de partida para el desarrollo de moléculas antioxidantes multipotenciales. (Zhang, Yang, & Tang, 2006)

Por otra parte, también es conocida la participación de los polifenoles en la prevención de cáncer mediante la activación de la ruta Nrf2/Keap1 y sus propiedades antioxidantes.

Respecto a lo mencionado, un estudio reciente de (Sirota, Gibson, & Kohen, 2015) ha concluido que el atrapamiento de ROS por parte de moléculas como el ácido cafeico, no producen un efecto antioxidante importante para proteger a las células, sin embargo, una vez que ocurre dicho proceso, la molécula similar a la quinona resultante es un electrófilo que promueve la producción de peróxido de hidrógeno, y con ello, sucede la oxidación de los grupos tiol de la proteína Keap 1, para así inducir la transcripción de enzimas del metabolismo de Fase II, en la que se realiza la conjugación de moléculas electrofílicas con ligandos endógenos como el glutatión y el ácido glucurónico.

El resultado en suma, es que en líneas tumorales, este tipo de antioxidantes promueven la resistencia a la quimioterapia. Por ello, es importante explorar la actividad antioxidante previamente o preveer sus posibles indicaciones terapéuticas. (Sporn & Liby, 2012)

2.8 Evaluación del efecto antioxidante

La elección de un método para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* es un paso muy importante en la determinación del potencial terapéutico de un compuesto. Las técnicas *in vitro*, a grandes rasgos se pueden clasificar como:

- *Reacciones con radicales libres estables.* Ejemplos incluyen métodos como el uso del radical galvinoxilo, DPPH, ABTS y nitróxido. Algunas ventajas que poseen es que los reactivos están comercialmente disponibles, son estables, fáciles de manejar, y tienen una gran absorción en el espectro visible con un alto coeficiente de extinción por lo que la reacción puede ser fácilmente monitoreada en un espectrofotometro de luz UV/visible. Debe resaltarse que la capacidad obtenida en esta evaluación no debe generalizarse como posible de efectuarse *in vivo*, dado que las condiciones a estimar en los sistemas biológicos pueden diferir.
- *Evaluación por métodos de competencia.* En estos tipos de métodos, se debe tener un compuesto sonda que se consuma por su reacción directa con radicales que son producidos en el sistema y medidos por métodos espectrofotometricos en UV o visible, o por fluorescencia, quimioluminiscencia, o espectroscopia de Resonancia Paramagnética Nuclear. Algunas desventajas pueden ser que la observación de una disminución del consumo del compuesto sonda puede ser atribuido tanto a que el antioxidante pudo atrapar a los radicales, o bien pudo reducir directamente a la sonda, sin interactuar con los radicales.
- *Evaluación por reducción de iones metálicos.* Frecuentemente, un buen antioxidante tiene una buena capacidad reductora, y por ello, se desarrollaron métodos como el FRAP o el CUPRAC, en los cuales se estima la tasa de reducción de iones de hierro Fe^{3+} o cobre Cu^{2+} , y se monitorea mediante la formación de un complejo colorido en espectroscopia visible. Algunas desventajas de la interpretación de los resultados como capacidad antioxidante, son que los iones reducidos (Fe^{2+} y Cu^{+}) pueden actuar como prooxidantes *in vivo* debido a la reacción de Fenton, en la cuál se descompone peróxidos en radicales más reactivos, como el hidroxilo, o el hidroperoxilo. De cualquier manera, existen argumentos que sugieren que por ejemplo, el efecto prooxidante observado *in vitro* de la mezcla de hierro con ácido ascórbico no sucede en *in vivo*, dado que existen proteínas que secuestran a dichos iones de una manera eficiente. (Niki, 2010)

Según el tipo de estudio, incluso se pueden obtener resultados muy diferentes, como los del estudio de (Tai, Sawano, Yazama, & Ito, 2010) sobre la actividad de la vainillina como antioxidante, con métodos como el atrapamiento de radical DPPH, de radical galvinoxilo, y ABTS, y los de capacidad antioxidante total como el ORAC y OxHLIA (*Oxidative Hemolysis Inhibition Assay*).

De acuerdo a sus resultados, se observó que la vainillina no producía efecto de atrapamiento en 2 ensayos, el de DPPH y el de radical galvinoxilo, sin embargo, se observó un efecto significativamente mayor al observado con los controles de trolox y ácido ascórbico en todos los demás ensayos.

De acuerdo a (Niki, 2010), el atrapamiento de radicales hidroxilo y peroxilo es poco probable que suceda eficientemente *in vivo*, ya que la concentración de lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN es significativamente mayor, esto a pesar de que la definición más aceptada de un antioxidante es que sea un compuesto capaz de prevenir, neutralizar o reparar el daño producido por radicales libres, en una concentración menor al sustrato susceptible de reaccionar. Adicionalmente, la mayoría de los métodos de evaluación no consideran todos los siguientes puntos para ser considerado como una molécula con una capacidad antioxidante eficiente.

- a) La reactividad química de la molécula frente a los radicales libres y la estequiometría requerida para que se lleve a cabo esta reacción, o lo que es lo mismo, la velocidad de atrapamiento de radicales y el número de moléculas atrapadas.
- b) La estabilidad de la molécula antioxidante radicalaria formada por la reacción de atrapamiento.
- c) La interacción con otros antioxidantes, sea para regenerarse o estabilizarse.
- d) La concentración y transporte de la molécula para lograr el efecto.
- e) La absorción, distribución, metabolismo y excreción de la molécula.

El autor recomienda la evaluación de la actividad antioxidante con métodos para estimar la peroxidación de lípidos, o bien, lo más similares a las condiciones fisiológicas posibles. Por ello, se abordarán las principales características del método de evaluación antioxidante que se consideró para las moléculas sintetizadas en este proyecto.

2.9 Características de la Xantina Oxidasa

En el artículo de revisión de (R. H. , 2002) y de (Okamoto, Kusano, & Nishino, 2013) se explica que la Xantina Oxidoreductasa es una molibdoflavoenzima compleja, que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina, y la xantina a ácido úrico. Su actividad ha sido detectada en múltiples especies, incluidas las bacterias, y en tejidos de mamíferos, su actividad es ampliamente distribuida, encontrándose los niveles más altos en intestino e hígado.

En todos los casos, la XOR es un homodímero de aproximadamente 300kDa. Cada subunidad posee 4 centros redox, un cofactor de molibdeno, uno de FAD, y dos clúster de hierro y azufre (Fe_2S_2). El cofactor de molibdeno consiste en un derivado de la pteridina, que contiene un ditioleno ciclizado. El Molibdeno está pentacoordinado con los dos átomos de azufre del ditioleno, y otros 2 oxígenos así como otro azufre.

Las dos formas existentes, la Xantina Oxidasa y la Xantina Deshidrogenasa pueden ser interconvertidas reversiblemente por agentes sulfhidrilo, e irreversiblemente mediante proteólisis. La XDH es la forma predominante *in vivo*, que prefiere reducir al NAD⁺, en comparación con la XO, que prefiere reducir al oxígeno para producir superóxido y peróxido de hidrógeno. En la figura 2.10 se presenta un esquema mostrando dicho proceso.

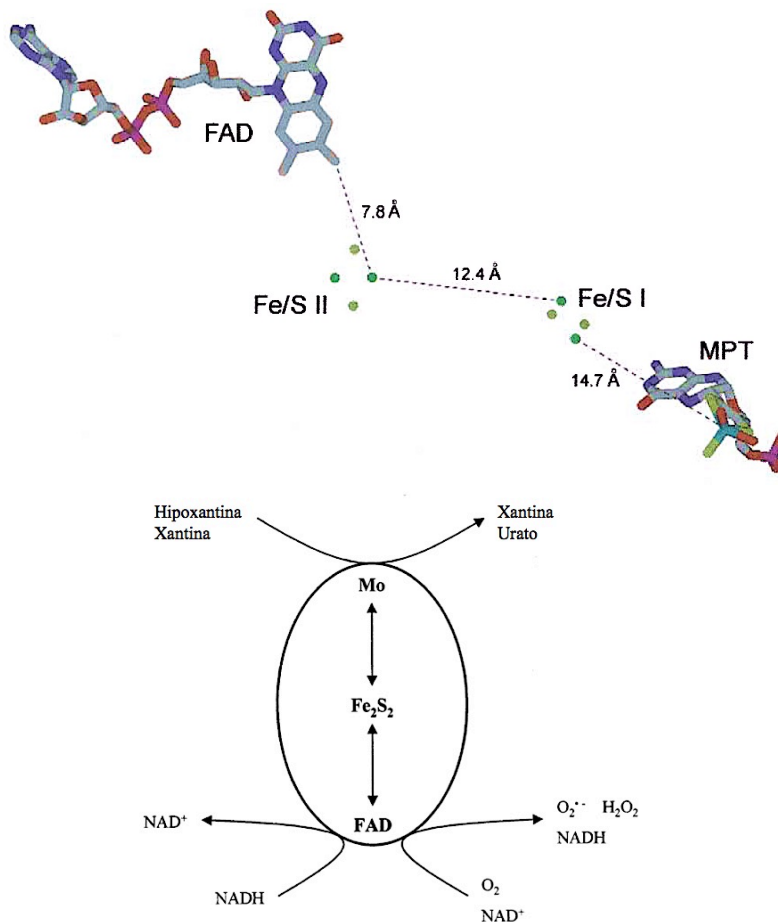


Figura 2.9 Arriba, orientación relativa de los cofactores en la XOR de *Bos taurus*. (Molibdeno: Azul cyan, Hierro: Verde bandera, Azufre: Verde Mostaza, Fósforo: Rosa, Nitrógeno: Morado, Oxígeno: Rojo, Carbono: Gris). Abajo, diagrama mostrando la oxidación de la hipoxantina y xantina, catalizada por la XOR (Tipificando los sustratos más comunes) en el sitio de la molibdopteridina (MPT y Mo en esquemas, respectivamente), y la oxidación del NADH en el sitio del FAD. La reducción del NAD⁺ o el oxígeno molecular también tiene lugar en el sitio del FAD.

Esta enzima no solo cataliza la hidroxilación de la hipoxantina y xantina, sino también una amplia variedad de sustratos como los aldehídos y los N-heterocíclos. Su inhibición es una forma de controlar la producción de ácido úrico en una patología como la enfermedad de la gota, sin embargo, el Alopurinol, que es el inhibidor más ampliamente usado, no produce un efecto dosis-dependiente, pues a mayores dosis, la molécula se vuelve sustrato de la enzima y produce superóxido, lo que exagera la severidad de los síntomas de la enfermedad. (Galbusera, Spector, Orth, Fedida, & Ezrin, 2005)

2.9.1 Método de XO-NBT para evaluar el atrapamiento de radical superóxido

En este método para evaluar el atrapamiento de superóxido se emplea a la enzima xantina oxidasa para la producción del radical, debido a que durante la oxidación de la xantina, para producir ácido úrico, la ausencia de NAD^+ que recibe los electrones obtenidos en la oxidación, aunada al hecho de que la forma oxidada de la xantina oxidoreductasa posee un loop que evita que entre en contacto con el FAD, propicia que el oxígeno presente en el medio sea el aceptor de los electrones, y por tanto se produzca el radical superóxido. (R. H. , 2002) En la figura 2.10 se observan algunas diferencias entre las dos tipos de isoformas de la enzima.

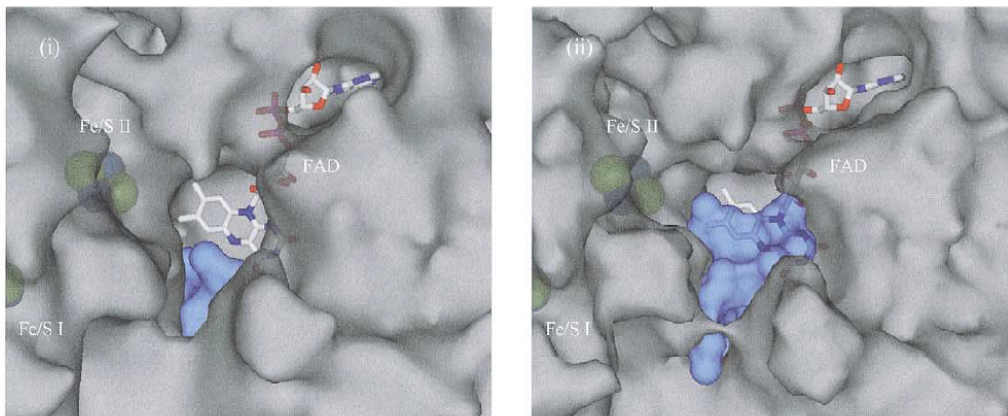


Figura 2.10 Representación semitransparente de la unión del NAD^+ a la XDH de *Bos taurus* (i) y a la XO (ii). El FAD, Fe/S I y Fe/S II se muestran con el propósito de orientación en la enzima. La superficie del loop entre los aminoácidos 423-433 es mostrada en azul, y muestra la oclusión de la unión entre el NAD^+ y la XO, lo cual no sucede en la XDH. Imagen generada por SPOCK, de datos de Enroth et ál. (R. H. , 2002)

De esta manera, la producción del radical libre es controlada, y la molécula sonda es el nitroazul de tetrazolio (NBT), que se reduce cuando reacciona con el superóxido. Así, la molécula que esta siendo evaluada tiene 2 posibles mecanismos de acción para evitar la propagación del radical.

- a) La inhibición de la enzima XO para evitar la producción del radical.
- b) El atrapamiento del superóxido por parte de la molécula evaluada, evitando la reducción del NBT.

Por ello, cuando se realiza esta prueba, se evalúa si la molécula produce inhibición de la XO, midiendo espectrofotométricamente la producción de ácido úrico (a 295nm) y estableciendo la proporción de inhibición con base a una referencia que es un control positivo. En el caso del atrapamiento de radical superóxido, se monitorea la producción de formazán, la forma reducida del NBT, espectrofotométricamente a 560nm, y se determina la proporción de atrapamiento en base a un control positivo, que se considera que produce el 100% de formazán en condiciones libres de otros compuestos a evaluar. (Bravo, Castañeda, & Quijano, 2012)

2.10 Empleo de técnicas de predicción del metabolismo *in vivo*, para estimar biodisponibilidad y para contribuir en el diseño de fármacos.

Silverman menciona que cerca de tres cuartas partes de los candidatos a fármacos no logran pasar las pruebas preclínicas, debido a problemas relacionados con la farmacocinética en animales, y también que menos del 10% de los candidatos a fármacos que ingresan a pruebas clínicas se vuelven productos en el mercado. Así mismo, menciona que cerca del 40% de las moléculas que fallaron en las pruebas clínicas, lo hicieron a causa de problemas farmacocinéticos, como una biodisponibilidad oral limitada o una vida media plasmática corta.

Tener una falla tardía en el proceso de descubrimiento de una molécula candidato a fármaco es un gran desperdicio de tiempo y recursos, por lo que una tendencia reciente es tratar de examinar los aspectos de la farmacocinética de una molécula tan temprano como sea posible en este proceso. (Silverman, 2004)

La toxicología computacional ha desarrollado, reglas, modelos y algoritmos para poder realizar una mejor aproximación en la estimación de los principales problemas relacionados con el metabolismo que pueden sufrir los compuestos al ser administrados *in vivo*. La predicción de los metabolitos y los sitios en los que sucedera este proceso es de suma importancia, dado que incluso dichas moléculas pueden producir efectos mas severos, tanto beneficios como deleteréos, que los compuestos originalmente planteados para administrar. (Ekins, 2014)

Hasta ahora, han sido desarrollados múltiples métodos basados en la potencial interacción con los citocromos importantes para el metabolismo, como el CYP3A4, sin embargo, METAPRINT2D y METAPRINT2D React, idea planteada inicialmente por (Boyer & Zamora, 2002), posteriormente desarrollada por (Boyer, Arnby, Carlsson, Smith, Stein, & Glen, 2007) y finalmente adecuada por (Adams, 2010) es un método que ha sido comparado en cuanto a rapidez con otros algoritmos y es más genérico en el aspecto de no enfocarse en la interacción con una enzima del metabolismo, sino en el análisis de una base de datos histórica de metabolitos para así formular una predicción de las reacciones que potencialmente podría sufrir la molécula, de acuerdo a sus *fingerprints* o descriptores de átomos y enlaces en las regiones de una molécula, mediante un procedimiento que se detalla en el apéndice V.

Así, puede plantearse una propuesta de los sitios que tienen una mayor probabilidad de sufrir reacciones de metabolismo de fase I, mediante METAPRINT2D, y también que otras reacciones pueden sufrir las moléculas, así como el metabolito formado, mediante METAPRINT2D-React.

Estos resultados pueden ayudar a reconsiderar aspectos importantes en el diseño fármacos, y así, evitar efectos adversos o una baja eficacia terapéutica.

3. Planteamiento del problema

Durante los últimos años se ha informado que el estrés oxidante en la células, provocado por un incremento en la concentración de las especies oxidantes (ROS), es un fenómeno implicado en ocasionar daño a las mismas. Sin embargo, las ROS son elementos indispensables para mantener los procesos de señalización celular indispensables para regular los procesos vitales. Esto llegó a establecer que las células deben mantener un estatus redox donde las ROS son esenciales para la sobrevivencia.

Actualmente existen reportes de que la alteración del estatus redox de las células cancerosas las puede llevar a su muerte. Esta alteración se puede dar si se incrementan las concentraciones de ROS, o si se disminuyen, provocando fallas en el funcionamiento celular.

Una de las enzimas directamente relacionadas con el mantenimiento del estatus antes mencionado es la xantina oxidasa (XO). La sobreexpresión de esta enzima genera estrés oxidante por la producción de radical superóxido durante su funcionamiento, y desencadena la carcinogenesis, así como la progresión de tumores cuando dicho radical reacciona con el óxido nítrico, una molécula endógena señalizadora de procesos vitales en el organismo. Por lo tanto, una molécula que afecte el funcionamiento de la enzima XO podría modificar el equilibrio redox celular.

Con toda la información descrita anteriormente, ¿será posible contar con moléculas que alteren el estatus redox celular para que produzcan citotoxicidad en células mutadas y para lograr detener el proceso carcinogénico o disminuir la viabilidad de tumores ya caracterizados como malignos?

4. Hipótesis

Siendo la quinazolina una estructura privilegiada capaz de participar en reacciones de oxido-reducción y con un anillo de pirimidina, como el que presenta el alopurinol (inhibidor de XO), su modificación al adicionarle diversas porciones estructurales dará lugar a compuestos con posibilidades de alterar el estatus redox de las células comprometiendo su viabilidad.

5. *Objetivos*

5.1 *Objetivo General*

Sintetizar derivados de quinazolin-2,4,6-triamina diseñados para generar metabolitos no tóxicos al humano y que puedan actuar sobre el sistema xantina oxidasa-nitroazul de tetrazolio para presentar un comportamiento antioxidante con repercusiones en la viabilidad de células cancerosas.

5.2 *Objetivos particulares*

- Sintetizar las carboxamidas de quinazolin-2,4,6-triamina (**B1-B3**, **B5**, **B7-B8**, **B11-B14**) así como las carboxamidas **E11** y **E31**, indicadas en la figura 6.3 y 6.4, a una escala de 200mg.
- Caracterizar y/o elucidar la estructura de los intermediarios y productos finales mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (Técnicas monodimensionales: ^1H , ^{13}C , ^{19}F y Técnicas bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC, NOESY), Infrarrojo (FT-IR) y Espectrometría de masas (FAB, o Impacto electrónico).
- Explorar mediante el programa METAPRINT, la predicción del metabolismo de Fase I y II de las moléculas a sintetizar.
- Evaluar el atrapamiento de radical superóxido de las moléculas sintetizadas, mediante el sistema xantina oxidasa - nitroazul de tetrazolio
- Determinar la actividad inhibidora de la enzima xantina oxidasa, para elucidar el posible mecanismo de actividad observado en la prueba anteriormente mencionada.
- Evaluar la actividad citotóxica en la línea celular tumoral HCT-15.

6. Metodología

Las fases de la metodología llevada a cabo en el presente trabajo pueden observarse resumidas en el esquema 1. Posteriormente se describirá de forma general las actividades estipuladas, y detalladamente en los apéndices correspondientes.

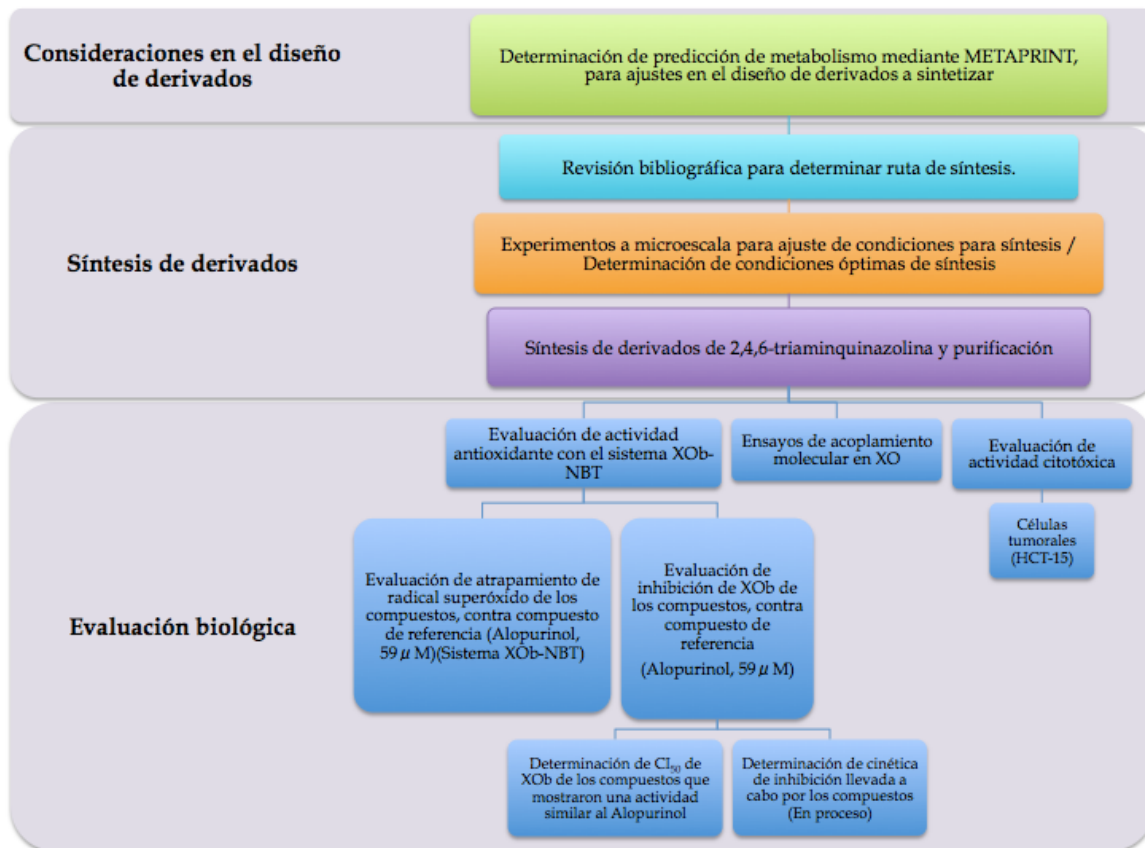


Figura 6.1. Metodología llevada a cabo para el desarrollo del proyecto de esta tesis.

6.1 Consideraciones en el diseño de los derivados sintetizados

6.1.1 Elección de la quinazolin-2,4,6-triamina como núcleo

En la sección 2.5 de los antecedentes se describió la estrecha relación que existe entre los efectos antiparasitarios y citotóxicos de compuestos con la quinazolin-2,4,6-triamina como núcleo, y los múltiples estudios que atribuyen dichos efectos a la inhibición de la enzima DHFR.

Por ello, algunos rasgos generales que pueden plantearse para la utilización de dicho núcleo como base en el diseño de las moléculas propuestas recae en el hecho de que los derivados que poseen un carácter más hidrofílico presentaron una mayor actividad inhibidora de la DHFR humana, de acuerdo a lo reportado por (Gangjee & ál., 1998).

Adicionalmente, se debe de notar que los derivados descritos en todos los reportes, son del tipo aminas, y no se encuentran reportados en ningún caso carboxamidas. Bajo esta observación y en base a una metodología que sigue el principio de "Andamios estructurales" o "Scaffold Hopping", se consideró para el diseño de las moléculas propuestas que el núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina posee una actividad citotóxica tanto en células tumorales como en una amplia gama de parásitos mediante la potencial inhibición de la enzima DHFR y también la Pteridin Reductasa según lo observado en parásitos, por lo cuál este sería el andamio estructural. (Böhm, Flohr, & Stahl, 2004)

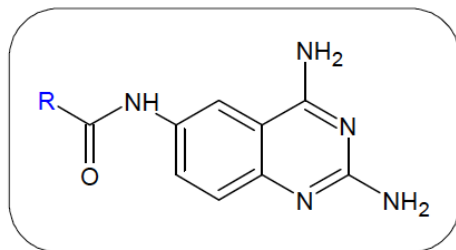


Figura 6.2 Scaffold o andamio estructural común en los derivados sintetizados

6.1.2 Elección de moléculas que pueden producir un efecto prooxidante/antioxidante y predicción del metabolismo que las moléculas podrían sufrir, mediante METAPRINT2D-React (Adams, 2010).

Para elegir las moléculas que potencialmente tienen propiedades para modular efectos redox, y que serían los sustituyentes en el andamio estructural planteado se explicaran los rasgos generales considerados para la elección de dichos grupos. La clave de las moléculas propuestas para sintetizarse, se muestra en la figura 6.3.

- *Derivado monosustituido en la posición 4 bencílica: N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)*

Este derivado se sintetizó debido a que anteriormente en el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis, se había sintetizado por (Mendoza, et al., 2015) el derivado N⁶-(4-trifluorometoxibencil)quinazolina-2,4,6-triamina para explorar su actividad como antiparasitario en *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Plasmodium berghei*, debido a que para prevenir el metabolismo de desalquilación, y para conservar el carácter lipofílico antiparasitario de la molécula, el grupo trifluorometoxilo era un isómero adecuado.

La actividad biológica antiparasitaria de dicho compuesto fue superior, en algunos casos, a la de los compuestos de referencia, pero adicionalmente, se obtuvo en un experimento de atrapamiento de radical ABTS⁺ la mayor actividad comparada con todos los derivados evaluados en el estudio.

Por ello, fue considerado como un candidato idóneo para llevar a cabo su síntesis, pues adicionalmente, (Rosales, 2015) reporta que este derivado tiene una CI_{50} en células de la línea MCF-7 menor al cisplatino.

- *Derivados B1, B2, B3, B5 con similitud estructural al catecol; derivados B11 y B13 con similitud estructural al pirogalol; y derivados B5 y B12 con un linker o conector vínilico y sustituidos en las posiciones bencílicas 3 y 4.*

Una de las principales características de los derivados propuestos para sintetizarse con similitud estructural al catecol y al pirogalol es que la probabilidad de que exista la O-desalquilación *in vivo* es superior al 66%, de acuerdo a la búsqueda de la predicción del metabolismo en humanos, con METAPRINT2D y METAPRINT2d-React. Para más detalles, se puede revisar el apéndice V.

Esta es una característica que podría resultar favorable en su acción como antioxidante, por que entonces una vez metabolizadas las moléculas, éstas podrían ejercer un efecto antioxidante directo, por la reacción de atrapamiento de radicales libres, y posteriormente indirecto, al formar peróxido de hidrógeno, para activar la transcripción de proteínas del sistema de defensa antioxidante, como lo descrito anteriormente en la sección 2.7, por lo cuál, éstas moléculas tienen una perspectiva de aplicación como preventivas a la carcinogénesis por estrés oxidante.

Sin embargo, la actividad citotóxica no necesariamente podría verse afectada, como en el caso de la observación de la actividad atrapadora de radical ABTS-, antiparasitaria y citotóxica del derivado N⁶-(4-trifluorometoxibencil)quinazolina-2,4,6-triamina, mencionada en el apartado anterior.

Debe señalarse que **B11** es un derivado que ya está reportado en la literatura como una molécula patentada, pero sin ninguna actividad biológica atribuida. Sin embargo, con el fin de explorar el efecto de un derivado más lipofílico, se planeo incluirlo en la evaluación biológica realizada en este proyecto. La síntesis corrió a cargo de la alumna de servicio social María Elena Arreola, y la caracterización fue llevada a cabo por la autora de este informe.

- *Derivado B7, con quinoxalina*

Las quinoxalinas son un núcleo ampliamente utilizado como base de diseño de fármacos dada la amplia variedad de actividades biológicas. (Ajani, 2014)

En general, una gran mayoría de las quinoxalinas sustituidas en las posiciones 1, 2, 3 y 4 son estructuras preferidas para el diseño de nuevos fármacos, pero no existe disponible información relacionada con actividades biológicas cuando la quinoxalina es sustituida en la posición 6. Por ello, se decidió usar al ácido 6-quinoxalínico para explorar la actividad que podría observarse.

- *Derivado B8, sustituido con 2-metil-1H-bencimidazol*

Existen reportes del grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis (García, 2010), en los que se informa que ésteres con grupos voluminosos del ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico, como el *N*-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il) carbonil] histidinato de metilo y *N*-[(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)carbonil] aspartato de dibencilo tienen una actividad biológica importante contra *Trypanosoma cruzi*, respecto al compuesto de referencia Benzimidazol.

Adicionalmente, se tienen reportes de que complejos metálicos de la 2-metil-1H-bencimidazol-5-carbohidrazida producen actividad citotóxica en al menos tres tipos distintos de líneas celulares. (Galal, et al., 2009)

Si bien, en este caso, la actividad prooxidante de los iones metálicos de los complejos puede ser el principal mecanismo de acción, el indicio de la participación del núcleo bencimidazólico en la actividad citotóxica de ambos tipos de células fue suficiente para considerar la síntesis de dicho derivado.

6.1.3 Diseño de derivados de quinazolina sin los grupos aminos en 2 y 4 (*N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y *N*-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)

El diseño de estas moléculas (Figura 6.4) se planteó con el fin de contar con compuestos que son estructuralmente diferentes a las quinazolin-2,4,6-triamina, es decir sin los grupos aminos en las posiciones 2 y 4, para así poder posteriormente hacer un análisis en el que se obtenga mayor información sobre la importancia de dichos grupos para la actividad biológica.

Adicionalmente, las quinazolininas sustituidas en la posición 4 por anilinas con grupos electroattractores poseen propiedades antitumorales mediante la inhibición del receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR). (Li, Li, Lu, Xu, & Zhu, 2012)

Figura 6.3 Carboxamidas de quinazolin-2,4,6-triamina propuestas para sintetizarse en este proyecto

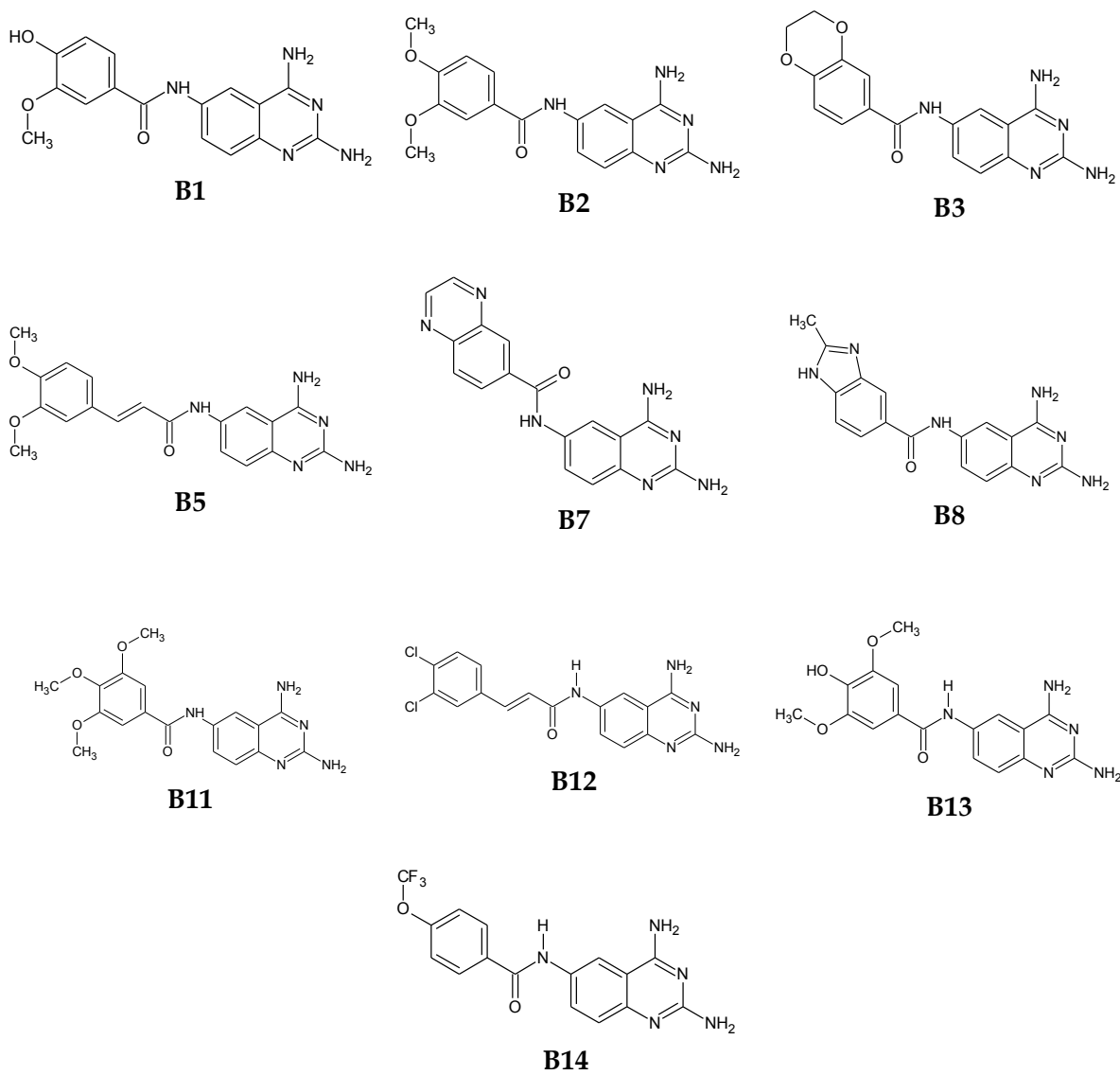
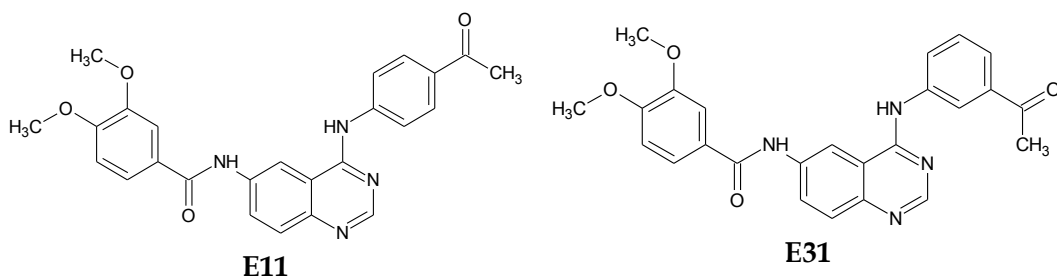
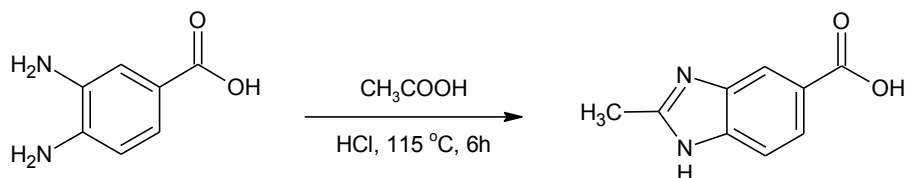


Figura 6.4 Derivados de quinazolina sin grupos aminos en posiciones 2 y 4, propuestos para sintetizarse



6.2 Síntesis de los compuestos

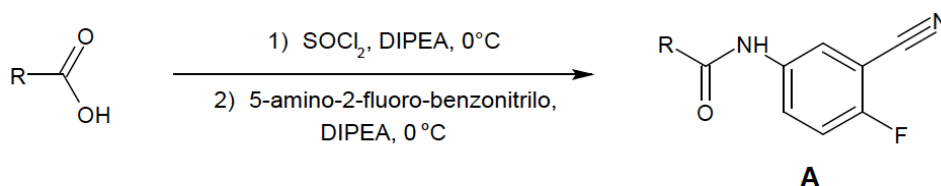
6.2.1 Síntesis de ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (AMB)



Una de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina cuya síntesis fue propuesta, requería como materia prima al ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico, por lo cuál, si bien es un reactivo comercialmente disponible, su síntesis es sencilla (Phillips, 1928), y ya había sido estandarizada, según lo reportado en la tesis de (García, 2010), mediante la condensación del ácido 3,4-diaminobenzoico con ácido acético en condiciones de catálisis ácida.

La purificación con carbón activado para eliminar residuos de ácido 3,4-diaminobenzoico permitió la obtención del ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico puro, y su caracterización mediante RMN ¹H permitió su utilización en el siguiente paso.

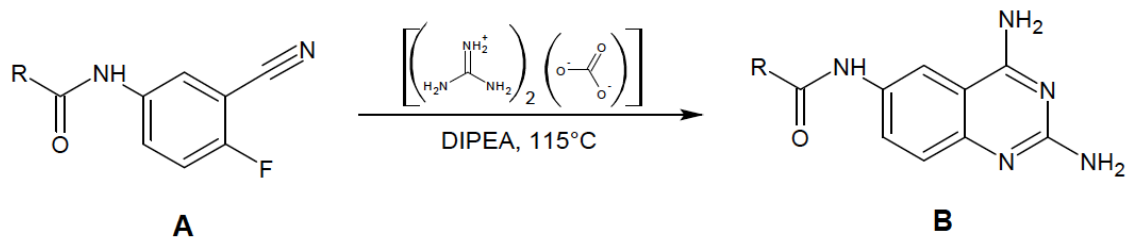
6.2.2 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas.



Para la síntesis de las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas se requirieron 2 etapas. En la primera, se formo el cloruro de acilo, mediante la reacción con cloruro de tionilo del carboxilato, producto de la neutralización previa del ácido con DIPEA. Esto, con el fin de facilitar el ataque nucleofílico del oxígeno del carboxilato al SOCl₂ y para evitar la producción de ácido.

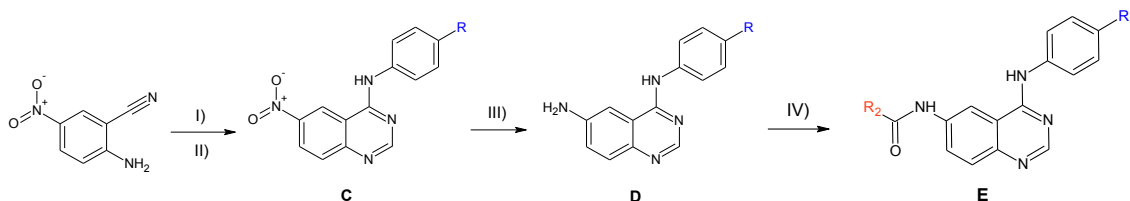
Una vez que se realizó la destilación azeotrópica del exceso de cloruro de tionilo con tolueno anhidro, se procedió con la siguiente etapa, que consistió en la reacción del cloruro de acilo con el 5-amino-2-fluorobenzonitrilo en medio básico; con DIPEA específicamente. Esto último, para que reaccione con la sal cuaternaria de amonio y de lugar a la formación de la carboxamida.

6.2.3 Síntesis de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)



Para la síntesis de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas, se partió de las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)carboxamidas sintetizadas previamente, mediante la reacción en un paso con guanidina formada *in situ* de la neutralización con DIPEA del carbonato de guanidina; en una ciclocondensación que implica una sustitución nucleofílica aromática y el ataque de la guanidina al carbono sp del nitrilo.

6.2.4 Síntesis de *N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y *N*-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)



R: 1) 4-COCH₃, 2) 3-COOH 3) 3-COCH₃

R₂: 3,4-dimetoxibencilo

I) DMF/DMA, 100°C

II) ArNH₂, AcOH, reflujo, 3h

III) H₂, Pd/C 10%, 2h

IV) Cloruro de 3,4-dimetoxibencilo, DIPEA

El primer paso, consistió en condensar la DMF/DMA con el grupo amino del 5-nitro-2-aminobenzonitrilo para producir la *N*'-(2-ciano-4-nitrofenil)-*N,N*-dimetilformamidina que posteriormente, en medio ácido, reacciona con la anilina correspondiente para formar la 6-nitro-4-anilinoquinazolina y dimetilamina.

Posteriormente, se redujo el grupo nitro mediante hidrogenación catalizada por paladio adsorbido en carbono activado, para formar finalmente la carboxamida con el cloruro de 3,4-dimetoxibencilo en medio básico.

6.2.5 Caracterización espectroscópica

La caracterización espectroscópica de los intermediarios N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas (**A1-A14**) y ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico así como los compuestos (N-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (**E11**) y N-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (**E31**) se llevó a cabo únicamente mediante espectros de RMN de ^1H y en caso necesario de espectros de RMN de ^{19}F (intermediarios **A1-A14**), adquiridos en el espectrómetro de RMN de 7.2 Varian-Unity Inova de la USAI, FQ, UNAM, previa capacitación de uso por la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales.

La caracterización espectroscópica de las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (**B1-B14**) se llevó a cabo mediante los espectros elaborados por el personal de la USAI, FQ UNAM mediante RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, NOESY y experimentos de intercambio con agua deuterada en el espectrómetro de RMN de 9.4 T Varian-VNMRS y/o en el espectrómetro de RMN de 9.4 T Varian-MR.

Los espectros de IR fueron elaborados por Q. Maricela Gutierrez Franco en el equipo FTIR/FIR 400 de Perkin-Elmer. (Reflectancia atenuada ATR). Los espectros de masas mediante IE o FAB de baja resolución fueron realizados a su vez en el espectrómetro de masas Thermo de la USAI por la Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci, y los de los compuestos A12, B1, B13, B14 y E11 de baja resolución, y alta resolución de todos los compuestos sintetizados se realizaron en el laboratorio de espectrometría de masas del Instituto de Química, mediante la técnica de DART (*Direct Analysis in Real Time*) por el Dr. Francisco Javier Pérez Flores y el I.Q. Luis Velasco Ibarra.

En particular, la asignación de los protones en las moléculas en el espectro de RMN de ^1H se realizó mediante la correlación de las constantes de acoplamiento observadas en el mismo espectro, así como la correlación observada en el espectro bidimensional COSY debido a que los patrones de sustitución 1,3,4 son los mismos en el núcleo de la quinazolin-2,4,6-triamina (posiciones 5, 7 y 8) y casi todos los derivados bencénicos utilizados.

La asignación de los protones de las carboxamidas y los aminos se llevó a cabo mediante los experimentos de intercambio con agua deuterada, y NOESY, mientras que la asignación en los carbonos de la moléculas en el espectro de RMN de ^{13}C se llevó a cabo mediante la correlación de dicho espectro con los espectros de HSQC y HMBC.

6.3 Evaluación biológica

6.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó en el laboratorio 121, en las siguientes etapas.

1. Evaluación del atrapamiento de radical superóxido mediante el sistema XO-NBT (B1, B2, B13, y Alopurinol a una concentración de 59 μM)

Se evaluó la actividad atrapadora de radicales libres de los compuestos que potencialmente podrían presentar una mayor actividad antioxidante debido a ser derivados fenólicos. **B2**, no tenía en su estructura ningún grupo hidroxilo, sin embargo, se planteó evaluarlo para observar si existía una potencial actividad atrapadora por parte de la porción estructural de la quinazolina. Así se decidiría también si el resto de los compuestos sintetizados se someterían a esta prueba. En la figura 6.5 se observan los datos de porcentaje de atrapamiento de superóxido en esta prueba.

Figura 6.5 Porcentaje de atrapamiento de superóxido en la prueba XO-NBT

Prueba (C=59 μM)	% Atrapamiento de superóxido (n=3)	
	Promedio	Desviación estándar
B1	98.7	4.9
B2*	82.1	11.7
B13*	87.5	8.0
Alopurinol*	69.4	-

No existen diferencias significativas entre el porcentaje de atrapamiento de superóxido de B2, B13 y alopurinol, a una concentración = 59 μM (ANOVA, post hoc: Dunnet, P = 0.005, GraphPad Prism 6.0)

2. Evaluación de la inhibición de XO producida por los compuestos de la serie B y E11. (Concentración 59 μM)

Para poder establecer si los compuestos producen el atrapamiento anteriormente descrito, es necesario determinar si esto se debe a la interacción directa del superóxido con las moléculas evaluadas, o debido a que los compuestos inhiben a la enzima, con lo cuál no hay producción de dicha especie ROS.

Como puede observarse en la siguiente tabla, se calculó el porcentaje de inhibición que producen los compuestos a la misma concentración de alopurinol que fue evaluada en la etapa anteriormente descrita (C=59.1 μM).

Por ende, se realizó la correspondiente comparación estadística mediante un ANOVA con un $\alpha = 0.05$, calculado mediante GraphPad Prism, y una vez que se estableció que existían diferencias significativas entre todas las varianzas de las pruebas (95% de confianza), se realizó un análisis *post hoc* de Dunnet, en el que se compararon las medias de cada compuesto probado contra el alopurinol, que es el compuesto de referencia respecto a la inhibición de esta enzima, y que además sirvió de control en todos los experimentos. De nueva cuenta el cálculo se realizó mediante GraphPad Prism, con un $\alpha = 0.05$, y los resultados del tratamiento de datos se observan en la tabla de la figura 6.6.

Se puede observar que 6 compuestos presentaron actividad inhibidora de la xantina oxidasa similar a la del compuesto de referencia, el alopurinol; por ello, con el fin de estimar de una manera más precisa un parámetro para comparar la actividad de dichas moléculas, se procedió a determinar la concentración inhibitoria media, en este caso, únicamente de **B1**, **B3** y **MG12**, debido, a que, si bien, todos los 6 compuestos indicados en la tabla son estadísticamente similares al alopurinol, la actividad inhibidora de **B2**, **B5** y **B11** es menor al 90%, por lo cuál no fueron compuestos de prioridad para evaluarse, sin embargo, se planea completar estos experimentos a corto plazo.

Figura 6.6 Datos de porcentaje de inhibición de las muestras

Corrida	% de inhibición de XO												
	B1	B2	B3	B5	B7	B8	B11	MG12	B13	B14	E11	TAQ	Alopurinol
1			90.9	86.7	87.8	80.8	86.3	97					98.4
2			89.9	81.6	72.2	70.0	79.7						96.6
3								93.6					94.9
4			84.1	91.5	77.5	83.2	89.9	95.8					96.4
5			90.2	79.3	74.9	65.5	77.3	95.5					94.3
6	96	88.3							91.4	74.1	6.5	65.7	92.6
7	89.9	81.8							84.4	69.3	15.4	62.8	
8	100	84.7							83.2	78.1	0	42.3	92.5
PROMEDIO	95.3	84.9	88.8	84.8	78.1	74.9	83.3	95.5	86.3	73.8	7.3	56.9	95.1
Desviación estándar	5.1	3.3	3.1	5.4	6.8	8.5	5.8	1.4	4.4	4.4	7.7	12.8	2.2
Sin diferencia significativa vs Alopurinol (P=0.05)	*	*	*	*			*	*					*

- Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la XO de los compuestos cuya actividad fue similar al Alopurinol, que fue el compuesto de referencia.

Una vez que se realizó la determinación del porcentaje de inhibición de producción de ácido úrico de la xantina oxidasa bovina con 5 concentraciones distintas, se realizó el tratamiento de resultados, en el que inicialmente se gráfico dicho porcentaje según la concentración evaluada. (Figura 6.7)

Para determinar la concentración inhibitoria media, dicha gráfica no es de utilidad, así que se realizaron los cálculos para determinar el mejor modelo de ajuste con los datos experimentales para determinar dicho valor.

En el apéndice IV, se presentan todos los modelos que se probaron, y mediante dos modelos se obtuvo una mejor correlación (R^2 mayor a 0.99) en el de modelo de efecto máximo y en el modelo de Hill (efecto máximo sigmoide).

En el primer modelo, el ajuste se realiza mediante una regresión lineal, y consecuentemente, se puede calcular la CI_{50} mediante la ecuación de la recta obtenida (figura 6.8), mientras que en el modelo de Hill, en cambio, el ajuste se realiza mediante una regresión no lineal (figura 6.9).

Si bien, todos los datos tienen un mejor ajuste en el modelo de efecto máximo (usando el coeficiente de correlación como base), uno de los problemas que existen al realizar la transformación de los datos para ajustar mediante regresión lineal es que se asume que los datos dispersos alrededor del modelo linear calculado tiene una distribución gaussiana y que las desviaciones estándar son las mismas en cada punto evaluado, lo cual no es necesariamente así. (Motulsky & Christopoulos, 2004) Por esa razón, se uso el modelo de Hill para calcular la CI_{50} , y la tabla de los resultados de dicho análisis se muestra en la figura 6.10.

Figura 6.7 Curva porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración

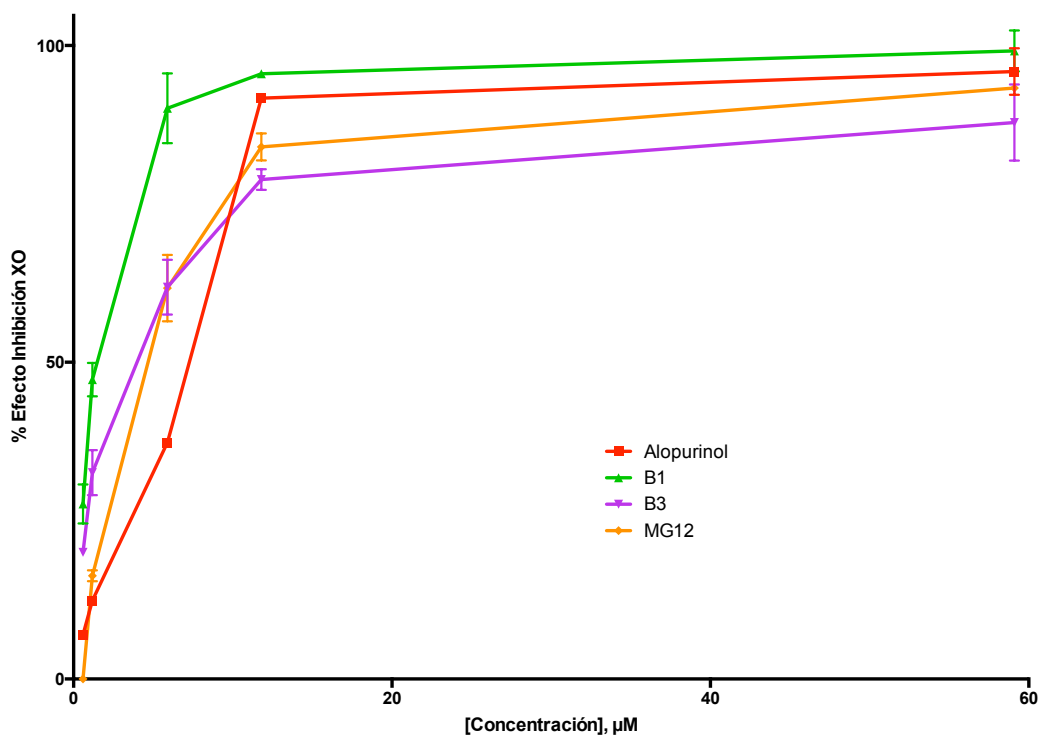


Figura 6.8 Regresión lineal de inversos de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs inversos de concentración, con intervalos de confianza del 95%

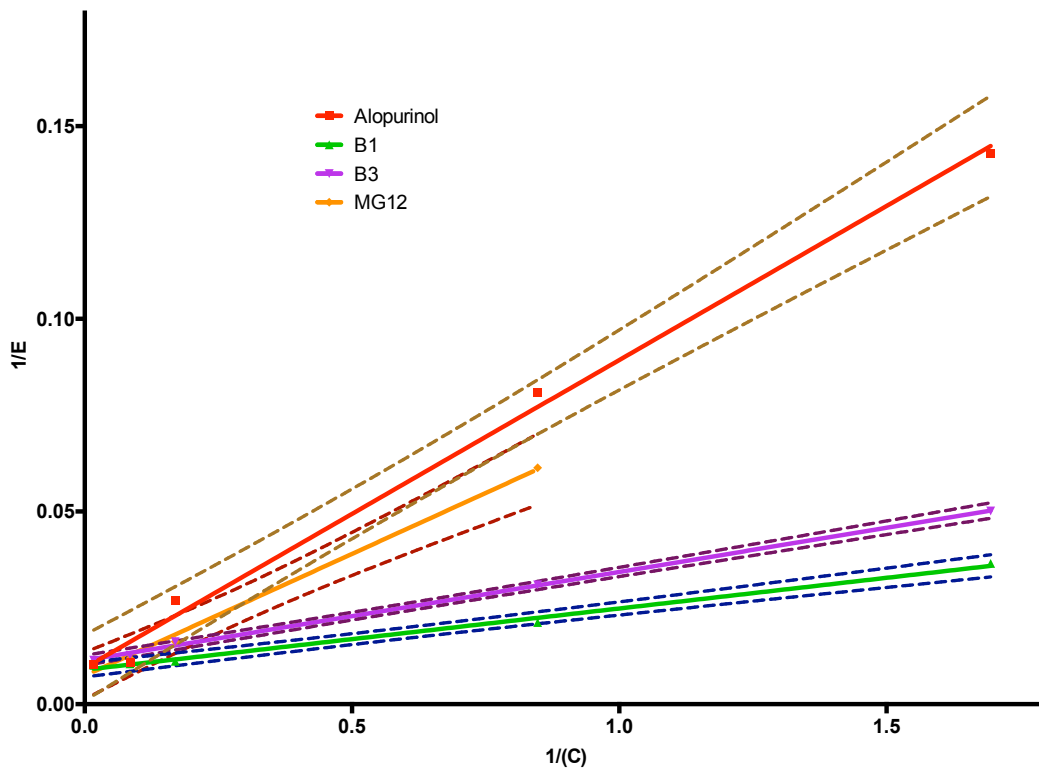


Figura 6.9 Curva de promedio de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración mediante ajuste con metodo de Hill, calculada en GraphPad Prism 6.0

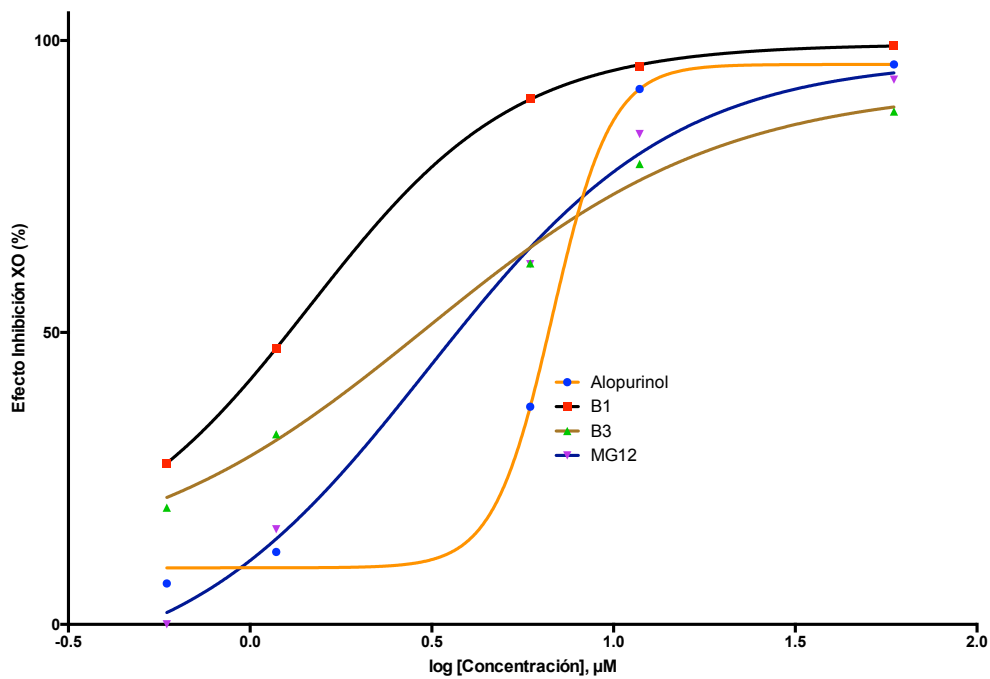


Figura 6.10 Análisis estadístico de Hill para calcular CI_{50} obtenido de GraphPad Prism 6.0

	Alopurinol	B1	B3	MG12
log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)				
Best-fit values				
Bottom	9.695	9.741	9.285	-9.428
Top	95.91	99.37	92.12	96.85
LogIC50	0.8318	0.1647	0.4846	0.4892
HillSlope	5.367	1.532	1.054	1.278
IC50	6.788	1.461	3.052	3.085
Span	86.21	89.63	82.84	106.3
Std. Error				
Bottom	2.650	9.188	18.81	12.44
Top	2.650	1.875	5.883	4.032
LogIC50	0.02488	0.06932	0.2144	0.1108
HillSlope	1.618	0.2673	0.4060	0.2889
Span	3.751	10.19	22.89	14.82
95% Confidence Intervals				
Bottom	-1.706 to 21.10	-11.04 to 30.53	-36.74 to 55.31	-41.40 to 22.55
Top	84.50 to 107.3	95.13 to 103.6	77.73 to 106.5	86.48 to 107.2
LogIC50	0.7247 to 0.9388	0.007853 to 0.3215	-0.03995 to 1.009	0.2045 to 0.7740
HillSlope	-1.596 to 12.33	0.9276 to 2.137	0.06019 to 2.047	0.5353 to 2.021
IC50	5.305 to 8.686	1.018 to 2.096	0.9121 to 10.21	1.601 to 5.943
Span	70.07 to 102.4	66.58 to 112.7	26.82 to 138.8	68.18 to 144.4
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	2	9	6	5
R square	0.9969	0.9927	0.9805	0.9922
Absolute Sum of Squares	28.06	84.78	120.0	83.86
Sy.x	3.746	3.069	4.473	4.095
Number of points				
Analyzed	6	13	10	9

Finalmente, todos los detalles referentes al fundamento de la prueba para evaluar la actividad antioxidante, el modo de cálculo de la respuesta antioxidante, la preparación de los reactivos, soluciones, así como las condiciones del ensayo, se pueden consultar en el apéndice III. Los resultados de absorbancia de cada prueba y el tratamiento de los datos para el cálculo de la respuesta antioxidante, así como el análisis estadístico se pueden consultar en el apéndice IV.

6.4 Estudios de acoplamiento molecular de la Xantina Oxidasa de Bos taurus con las moléculas sintetizadas.

Los estudios de docking fueron llevados a cabo por el M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz, mediante el *Soft122* (un programa basado en el lenguaje Linux, con scripts desarrollados por integrantes del grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo Bocanegra), en el equipo Juchiman del laboratorio 122 del conjunto E de la Facultad de Química.

6.4.1 Preparación de los ligandos

Las estructuras fueron construidas en Spartan 10, y su conformación energética mínima fue optimizada mediante el método semiempírico PM3 en el mismo programa. Adicionalmente, se calcularon las cargas y adicionaron los hidrógenos polares mediante el programa Maestro 9.6 de Schrödinger antes de obtener el archivo en formato [.pdbqt] para realizar el cálculo de acoplamiento en el sitio de unión.

6.4.2 Preparación de la proteína

La proteína utilizada fue obtenida del Protein Data Bank, con el número de identidad 3NVW y fue elegida por contener una estructura cocrystalizada (guanina) que guarda similitud estructural con las moléculas sintetizadas en este proyecto respecto al patrón de átomos donadores de puente de hidrógeno en las posiciones 2 y 4.

Para realizar la minimización de la proteína, fueron necesarias consideraciones especiales, debido a la proximidad del sitio de acoplamiento con el molibdeno del cofactor molibdopteridina. Detalles referentes a este proceso están en revisión para la posterior publicación de la información obtenida de este proyecto en un artículo.

6.4.3 Acoplamiento molecular

Una vez que se tenía lista la proteína y los ligandos, mediante el *Soft122* se realizó el estudio de docking con el sitio de unión rígido y los ligandos flexibles. El grid o las coordenadas donde se situó la caja de 26.25 x 26.25 x 30 Å fueron: [X: 88.8383, Y: 9.1405, Z: 12.722]. El software que realizó los cálculos fue AutoDock 4.2, y posteriormente, para el análisis de resultados referente a la visualización de la conformación de las moléculas en el sitio de unión, se utilizó Pymol 0.9. Otra manera de visualizar los resultados fue utilizando diagramas bidimensionales generados por el software PoseView de la Universidad de Hamburgo.

6.5 Estudios de actividad citotóxica de B1 y B3

Se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas del IQ, UNAM con la línea celular HCT-15 a una concentración 100 micromolar, siguiendo el protocolo del INC de los EUA.

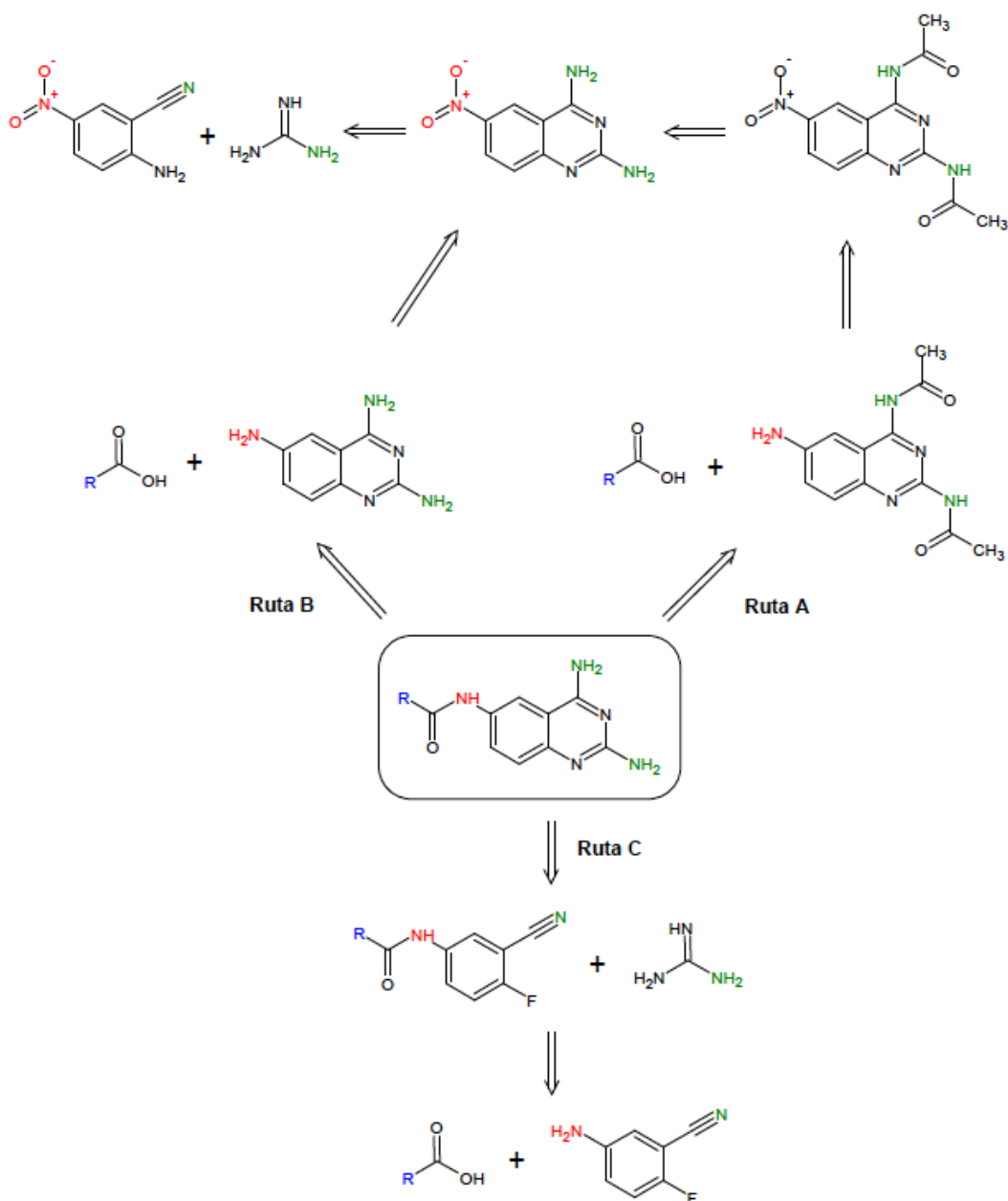
7. Discusión de resultados

7.1 Síntesis de los compuestos

7.1.1 Elección de ruta de síntesis de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)

Existen diferentes rutas de síntesis para obtener las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamida que se plantearon anteriormente. En este caso, en la figura 7.1 se muestran algunas de las rutas planteadas.

Figura 7.1 Rutas retrosintéticas propuestas para los derivados sintetizados.



Un punto a considerar, es que para la síntesis de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos, se debe utilizar un agente activador del grupo carboxilo con el fin de volver al carbono sp^2 de este grupo, un electrófilo susceptible de ser atacado por la amina.

La primera propuesta se realizó en función de la existencia de una metodología estandarizada por (Mendoza, 2009) y (Matus, 2013) para la obtención del núcleo de la *N*-[2,4-(diacetilamino)-6-aminoquinazolina], pues permite tener la certeza de que sólo el grupo amino en la posición 6 reaccionaría.

El siguiente requisito era activar al grupo carboxilo, por lo que se planteó el uso de agentes acoplantes como la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI). Sin embargo, el inconveniente observado fue que el grupo amino de la *N*-[2,4-(diacetilamino)-6-aminoquinazolina] no era un grupo nucleofílico suficientemente reactivo, debido a que el avance de la reacción era prácticamente nulo, pues se observaba un consumo de todo el ácido en la reacción, pero no de la *N*-[2,4-(diacetilamino)-6-aminoquinazolina]. Una de las razones, es que durante el proceso de activación, existe la formación de intermediarios más estables por parte de los ácidos con los agentes acoplantes.

En el caso concreto de la DCC, como puede observarse en el mecanismo de reacción de la figura 7.1, una vez que se protona el nitrógeno de la carbodiimida de la DCC con el ácido carboxílico, forma el carboxilato que ataca al carbono de la carbodiimida para producir el intermediario *O*-acilurea. Así, posteriormente, el grupo amino ataca al grupo carbonilo de dicho intermediario para que, después de una transferencia de protón de la sal cuaternaria recién formada hacia la DCU, se produzca la carboxamida.

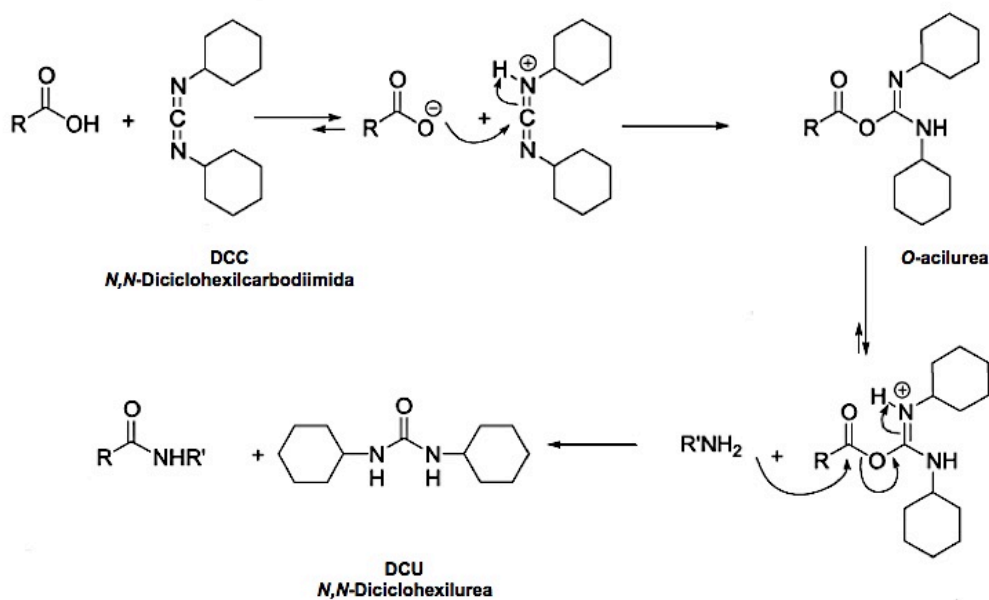


Figura 7.2 Mecanismo de reacción de la DCC para la síntesis de amidas. Adaptado de (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005)

Está reportado que el uso de las carbodiimidas para la síntesis de ésteres y amidas tiene como inconveniente que cuando el grupo nucleofílico no ataca lo suficientemente rápido al intermediario *O*-acilurea, dicha molécula sufre un rearrreglo en el cuál el nitrógeno sp^2 de la carbodiimida ataca al carbonilo y produce una *N*-acilurea (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005). En la figura 7.3 se puede observar como ejemplo, el mecanismo de reacción de la *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) y como, para evitar la formación de ese subproducto, se añade como catalizador hidroxibenzotriazol (HOBt). Aunque se utilizó la DMAP al 10% como catalizador, en la reacción con la *N*-[2,4-(diacetilamino)-6-aminoquinazolina] como nucleofílo no se obtenían rendimientos cuantitativos.

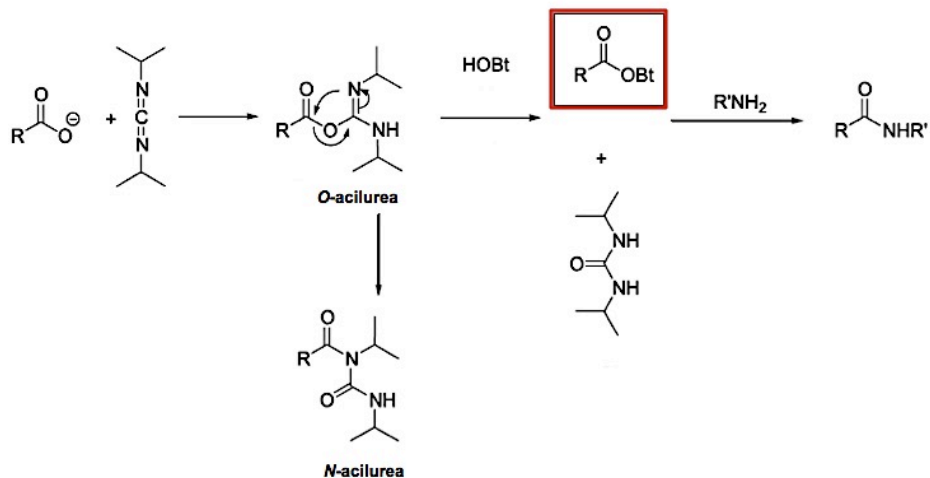


Figura 7.3 Mecanismo de reacción de la DIC para la síntesis de amidas. Adaptado de (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005)

Por ello otro agente acoplante que se utilizó, fue el CDI, pero por la misma razón, es decir la baja nucleofilicidad de la *N*-[2,4-(diacetilamino)-6-aminoquinazolina], el intermediario imidazólico que se señala en el recuadro naranja fue el que se produjo con un mayor rendimiento.

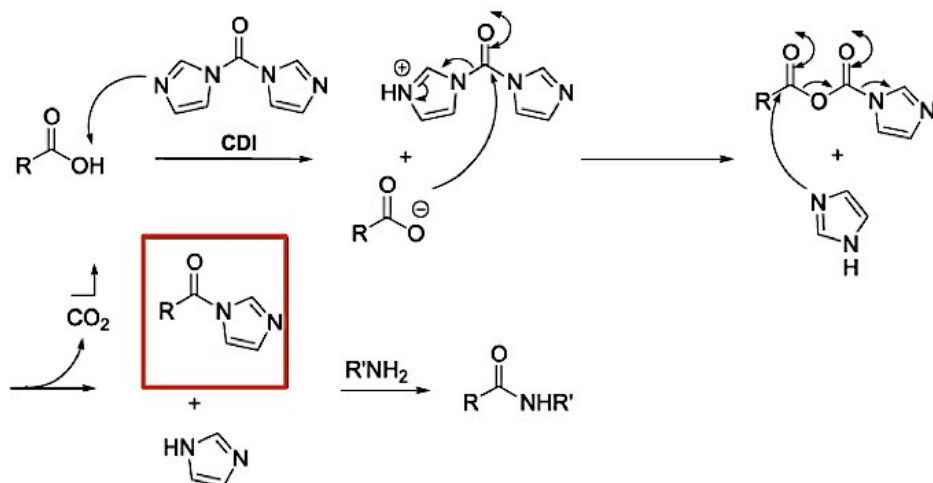


Figura 7.4 Mecanismo de reacción del CDI para la síntesis de amidas. Adaptado de (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005)

Adicionalmente, la mezcla de reacción presentaba la formación de múltiples subproductos, debido a que el grupo acetilo de la posición 4 es muy lábil, y susceptible de sufrir hidrólisis, debido a que es el sitio con una menor densidad electrónica, según lo reportado en la tesis de (Matus, 2013). Por ello, finalmente se descartó esa ruta, y se realizaron algunos intentos de reacción directamente con la quinazolin-2,4,6-triamina; es decir sin los grupos protectores acetilo en los aminos de las posiciones 2 y 4 (Ruta B de la figura 6.1).

La reacción de la quinazolin-2,4,6-triamina con el cloruro de 3,4-dimetoxibenzoilo produjo muy buenos rendimientos, por lo que entonces se descarto el uso de los agentes acoplantes para la síntesis de todos los derivados, sin embargo, debe señalarse que aunque previamente se había considerado que los grupos aminos en dichas posiciones no eran reactivos por la tautomería que se esta llevando a cabo, y que ha sido una de las bases por la cuál en la síntesis de los derivados mediante aminación reductiva no se requiere la protección en los aminos de dichas posiciones según lo informado en los reportes de la sección 2.5 de los antecedentes, cuando se intentó la ruta B de síntesis, se observó la formación de al menos un isómero en RMN ^1H , incluso después de la purificación mediante placa preparativa.

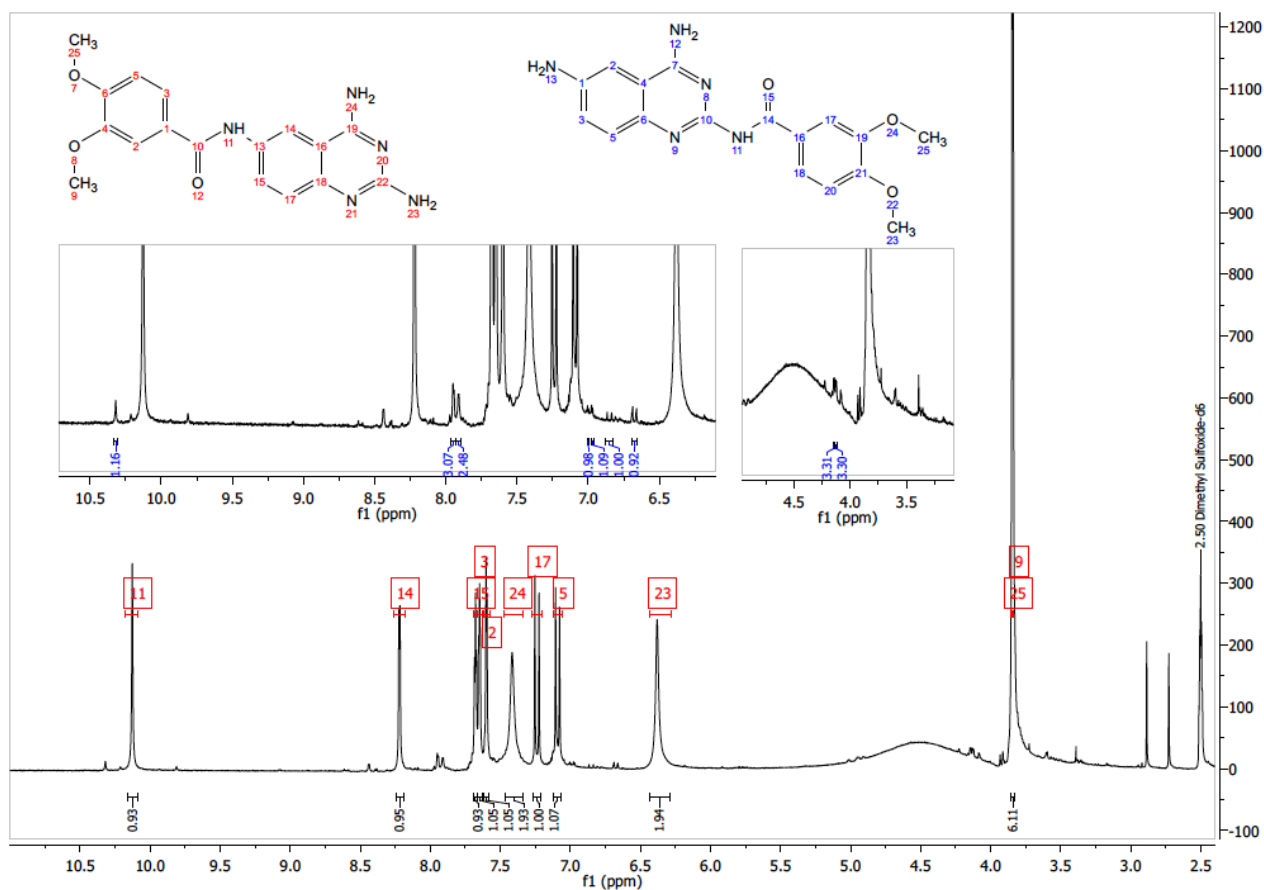


Figura 7.5 Espectro de RMN ^1H de isómeros de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida

De esta manera, con estas bases, se buscó un ruta que permitiera la formación inequívoca de la carboxamida en la posición 6 de la quinazolin-2,4,6-triamina. Por ello, se planteó seguir la ruta C de la figura 6.1 que a continuación se muestra.

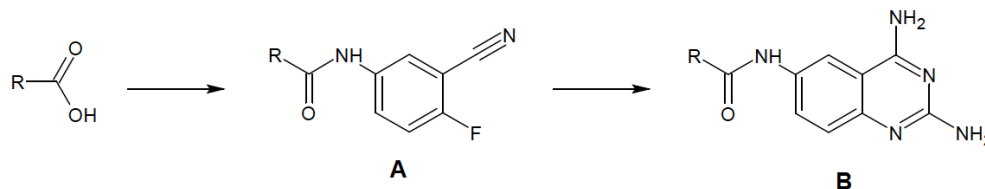


Figura 7.6 Ruta C, propuesta para la síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas

7.1.2 Elección de la metodología de síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas.

Una vez que se decidió que la mejor ruta de síntesis era la opción C, se procedió a plantear las condiciones para la formación de las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas (A1-A14) requeridas como intermediarios. La activación, en la tabla de la figura 7.7 de la siguiente página, se refiere a la reacción del ácido carboxílico con el reactivo para formar cloruros de acilo. Como puede notarse en las observaciones y los rendimientos, las condiciones más factibles para la síntesis de las carboxamidas se lograron con el cloruro de tionilo, pese a ser un reactivo que produce ácido clorhídrico y es altamente corrosivo.

En el caso del 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina ó cloruro de cianuro (CC), el mecanismo de reacción implica una sustitución nucleofílica aromática, en la cuál se produce un éster activado que es atacado por el cloruro liberado anteriormente. En la figura 7.8 se muestra el mecanismo.

La purificación se complica debido a que una vez que se completa la formación del cloruro, se añade el nucleofilo deseado para formar la carboxamida, pero según lo observado, el nucleofilo también puede reaccionar directamente con el CC, debido a que 1 mol de CC tiene la posibilidad de reaccionar 3 veces. (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005) Este control es difícil de establecer, puesto que en ensayos de reacción en los que por cada mol de ácido a activar se añadían 0.33 moles de CC, la reacción avanzaba muy lentamente, debido a que después de que la triazina queda hidroxilada, desactiva la posición 3, y así sucesivamente.

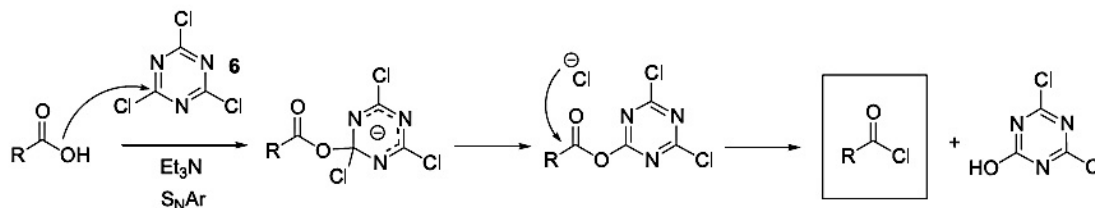
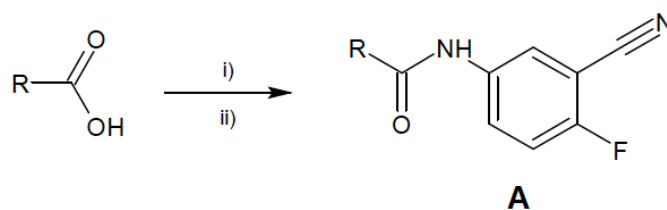


Figura 7.8 Mecanismo de reacción de CC para la síntesis de cloruros de acilo. Adaptado de (Montalbetti, Falque, Park, & Ox, 2005)

Figura 7.7 Condiciones de reacción probadas para la síntesis de las carboxamidas.



i) Condiciones de activación probadas ii) 5-amino-2-fluorobenzonitrilo (0.95 eq.), DIPEA (1.1 eq.), 12 h.

R	Condiciones de Activación probadas			Rendimiento	Observaciones
	Reactivo	Disolvente	Temperatura / Tiempo		
	 (3 eq. de CC y 1.2 eq. de DIPEA)	CHCl ₃	i) T.amb / 18 horas	-	Formación de muchos subproductos
	+ Ph ₃ P (1.1 eq. de TCICA y 1.1 eq. de Ph ₃ P)	CH ₂ Cl ₂	i) 0°C / 30 minutos	< 10%	Rendimiento bajo y requiere purificación mediante cromatografía en columna, para quitar subproducto óxido de Ph ₃ P
	SOCl ₂ (5.5 equivalentes de SOCl ₂ y 1.1 eq. de DIPEA)	Tolueno	i) 0°C / 2 h, Destilación del exceso de SOCl ₂	76%	-

El segundo método que se utilizó para formar el cloruro de acilo requerido implicaba 3 pasos que se ilustran en la figura 7.9, en los que primero debía reaccionar la trifenilfosfina con el ácido tricloroisocianúrico (TCICA) para producir un catión de cloruro de fosfonio. Posteriormente, al añadir el ácido, este forma un carboxilato al transferir su protón al ión del ácido dicloroisocianúrico, y con esto, el oxígeno del carboxilato reacciona con el cloruro de fosfonio para que, mediante un rearrreglo concertado en una sustitución nucleofílica en el carbono sp² del carboxilato, se produzca óxido de trifenilfosfina y el cloruro de acilo correspondiente.

En este sentido, uno de los problemas que se tuvo fue que el óxido de trifenilfosfina y la carboxamida tenían un R_f muy similar, por lo que su purificación resultaba poco práctica.

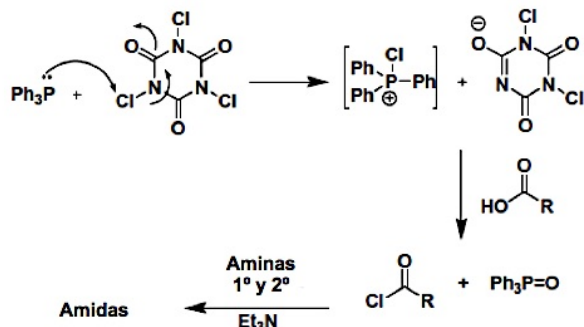


Figura 7.9 Mecanismo de reacción de TClCA para la síntesis de cloruros de acilo. Adaptado de (Rodrigues, Barros, & Lima, 2005)

Finalmente, se planteó utilizar el cloruro de tionilo pues el tratamiento de purificación sería mas sencillo respecto a los métodos anteriormente descritos debido a que los subproductos son gaseosos y el exceso de reactivo es fácil de eliminar, mediante destilación común o a presión reducida.

Aunque tradicionalmente para formar un cloruro de acilo se coloca a reflujo el SOCl_2 junto con el ácido carboxílico, se propuso utilizar una base (DIPEA) para generar el carboxilato, que atacaría más rápido al cloruro de tionilo en condiciones suaves, es decir, sin necesidad de calentamiento, pues incluso, la adición fue en baño de hielo y con ello, únicamente se produce dióxido de azufre.

En la literatura también esta reportado que es posible utilizar piridina como base, o bien, se puede usar DMF como catalizador, que genera al intermediario cloruro de dimetilcarbamoilo, también conocido como intermediario de Vilsmeier. Dicho intermediario es un potencial carcinógeno humano y por esta misma razón, se evito utilizar a la DMF, aunado a que los ácidos a utilizar son sustratos aromáticos activados susceptibles de formilarse. (Caron, 2011)

En promedio, la formación de los derivados A1-A14 tomo como máximo 3 horas, y una vez que se completo la conversión al cloruro, se destilo a presión reducida el exceso de cloruro de tionilo con tolueno anhidro, pues forma un azeótropo de ebullición mínima.

Una vez que se redisolvió el cloruro de acilo, en baño de hielo se adicionó gota a gota la solución de 5-amino-2-fluorobenzonitrilo y la base, que fue nuevamente la DIPEA por su carácter no nucleofílico, pero lo suficientemente básico para desprotonar la sal cuaternaria de amonio que se produce inmediatamente después del ataque nucleofílico de la amina al carbono sp^2 del cloruro de acilo.

Los rendimientos de la reacción fueron moderados (44-93%), pero se observó que la disminución fue a causa de que **A1** y **A13** tenían grupos fenólicos que les permiten tener una mayor solubilidad en las fases acuosas que se utilizaron para la purificación mediante extracción en medio básico.

7.1.3 Caracterización espectroscópica del ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (AMB), y las N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas. (A1-A14)

En la figura 7.18, al final de este análisis de resultados, se presenta una tabla en la cual se incluye la estructura del intermediario, el rendimiento obtenido y algunas constantes determinadas, como el R_f y el punto de fusión, así como las señales del espectro de RMN ¹H y RMN ¹⁹F asignadas. Los espectros completos adquiridos se encuentran en el apéndice II.

Una característica importante para asignar la estructura en los intermediarios se fundamentó en que se observó una señal ancha entre 10 y 11 ppm, correspondiente al protón de la carboxamida, pues este efecto es ampliamente conocido como ensanchamiento cuadrupolar de los protones unidos a un átomo de nitrógeno, causado también por el intercambio de ese protón con otras moléculas en el medio, así como la no equivalencia de dichos protones debido a la restricción en la rotación. (Pavia, Lampman, Kriz, & Vyvyan, 2009)

En el caso de los protones unidos directamente a nitrógeno de moléculas como el ácido 2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (AMB), e intermediarios como la N-(3-ciano-4-fluorofenil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (A6), N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida (A8), y la (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12), dichas señales no aparecieron con una integral proporcional a la de un protón de otras señales, debido a que todos los sustituyentes en las moléculas son grupos electroattractores, con lo cual se incrementa el carácter ácido de dichos protones, lo que causa que el intercambio del protón sea muy rápido, y con ello, no se alcanza a observar esa señal; sin embargo, en las carboxamidas, una manera indirecta de confirmar la presencia del enlace es mediante la relación proporcional en la integral de las señales.

En el caso del AMB se confirmó la estructura debido a que se comparó el espectro y las constantes de acoplamiento con dos reportes, el artículo de (Galal, et al., 2009) y la tesis de (García, 2010).

En todas las moléculas sintetizadas (A1-A14), pudieron asignarse las señales de los protones correspondientes al anillo aromático 3-ciano-4-fluorofenilcarboxamida debido al acoplamiento heteronuclear del ¹H y el ¹⁹F, a pesar de que el patrón 1,3,4 de sustitución (Figura 7.10) en el anillo aromático de la carboxamida en las moléculas A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8 y A12 es el mismo en los dos anillos que los componen.

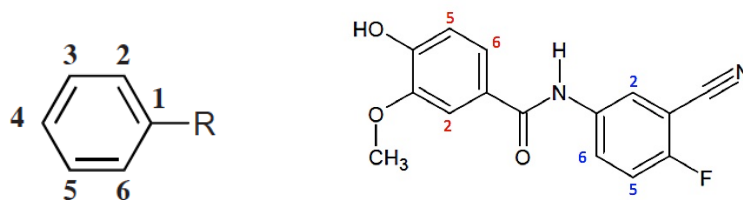


Figura 7.10 Notación usada para describir la sustitución en los anillos aromáticos (R= carboxamida)

Cuando no existe acoplamiento con flúor, se producen tres señales, que a continuación se describen.

1. El protón en la posición 2 produce una señal doble de doble (dd) con una constante de acoplamiento 4J (meta) con el protón en la posición 6 y 5J (para) con el protón en la posición 5. Lo observado en el espectro, por la capacidad de resolución del equipo fue una señal doble (d) con una constante de acoplamiento 4J .
2. El protón en la posición 5 produce una señal doble de doble (dd) con una constante de acoplamiento 3J (orto) con el protón en la posición 6 y 5J (para) con el protón en la posición 2. Como ya se mencionó, debido a la resolución del equipo, en los espectros aparece únicamente como una señal doble (d) con una constante de acoplamiento 3J .
3. El protón en la posición 6 produce una señal doble de doble (dd) con una constante de acoplamiento 3J (orto) con el protón en la posición 5 y 4J (meta) con el protón en la posición 2, que así fue observada en los espectros.

En la figura 7.11 se muestran valores típicos para las constantes de acoplamiento mencionadas.

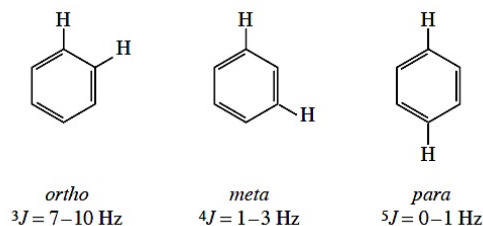


Figura 7.11 Valores típicos de constantes de acoplamiento en anillos aromáticos. (Pavia, Lampman, Kriz, & Vyvyan, 2009)

Como ya se mencionó, las señales del anillo aromático 3-ciano-4-fluorofenilcarboxamida no siguen el patrón de señales de sustitución aromática 1,3,4 descrito anteriormente, debido a que se producen los acoplamientos de ^1H y ^{19}F , pues este último tiene un número cuántico de spin $I = 1/2$ y prácticamente una abundancia isotópica del 100%. En la figura 7.12 se muestran los valores típicos de constantes de acoplamiento heteronuclear y homonuclear y el desplazamiento químico de los protones en un anillo monosustituido por flúor.

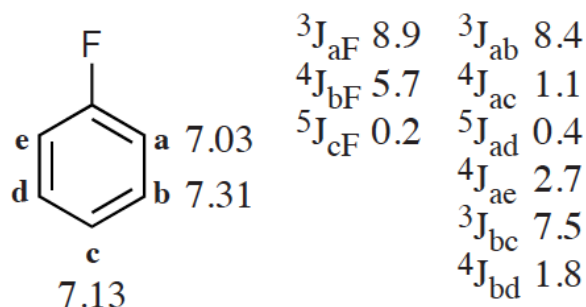


Figura 7.12 Constantes de acoplamiento heteronuclear y homonuclear y valores de desplazamiento químico de los protones en un anillo monosustituido por flúor (Pretsch, Bülmann, & Badertscher, 2009)

Se producen señales con las siguientes características:

1. El protón en la posición 2 produce una señal doble de doble de dobles (ddd) con una constante de acoplamiento 4J (meta) con el protón en la posición 6, 5J (para) con el protón en la posición 5 y una constante de acoplamiento heteronuclear 4J (meta) con el flúor de la posición 4. Lo observado en el espectro, por la capacidad de resolución del equipo fue un doble doblete (dd) con una constante de acoplamiento 4J de 1H y una constante de acoplamiento 4J de ${}^{19}F$.
2. El protón en la posición 5 produce una señal doble de doble de dobles (ddd) con una constante de acoplamiento 3J (orto) con el protón en la posición 6, una constante de acoplamiento heteronuclear 3J (orto) con el ${}^{19}F$ y una 5J (para) con el protón en la posición 2. Debido a la similitud en el valor de la constante 3J de 1H y ${}^{19}F$ en los espectros aparece únicamente una señal tipo triplete (t) con una constante de acoplamiento 3J (orto), que en realidad es producida por el solapamiento de los dobletes de las señales. De nueva cuenta, por la resolución, 5J no se observa.
3. El protón en la posición 6 produce una señal doble de doble de dobles (ddd) con una constante de acoplamiento 3J (orto) con el protón en la posición 5 y 4J (meta) con el protón en la posición 2 y una constante de acoplamiento heteronuclear 4J (meta) con flúor, que así fue observada en la mayoría de los espectros (ddd). (El desdoblamiento a veces no se observaba por la resolución del equipo).

En los espectros de **A11** y **A13** de la figura 7.13 y 7.14 que se analizaran a continuación, se puede ver un ejemplo de las señales observadas.

En el caso de los intermediarios *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**A11**) y *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (**A13**), la simetría en el patrón de sustitución ocasiona que los protones sean equivalentes química y magnéticamente, por lo cual, producen una señal simple que integra para dos protones, que fue lo observado en sus espectros de RMN 1H .

Figura 7.13 Fragmento del espectros de RMN ^1H de A11 y asignación de las señales.

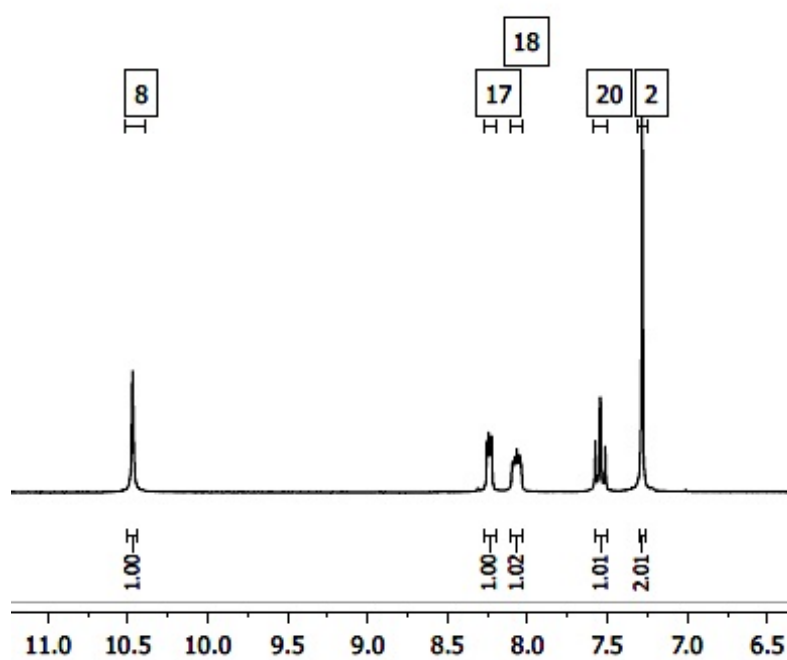
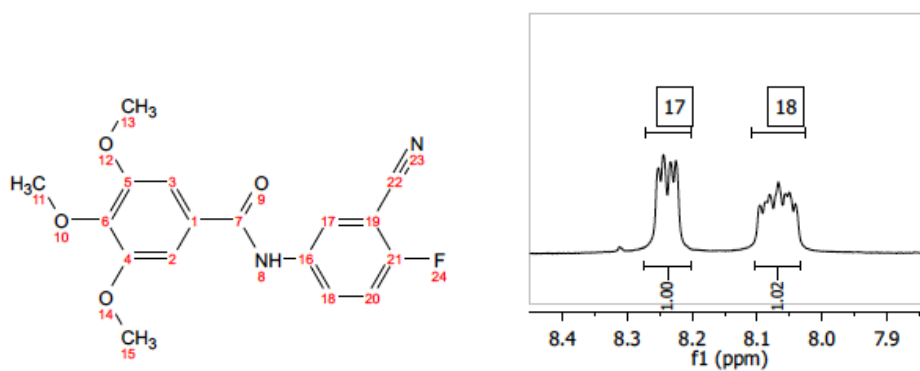
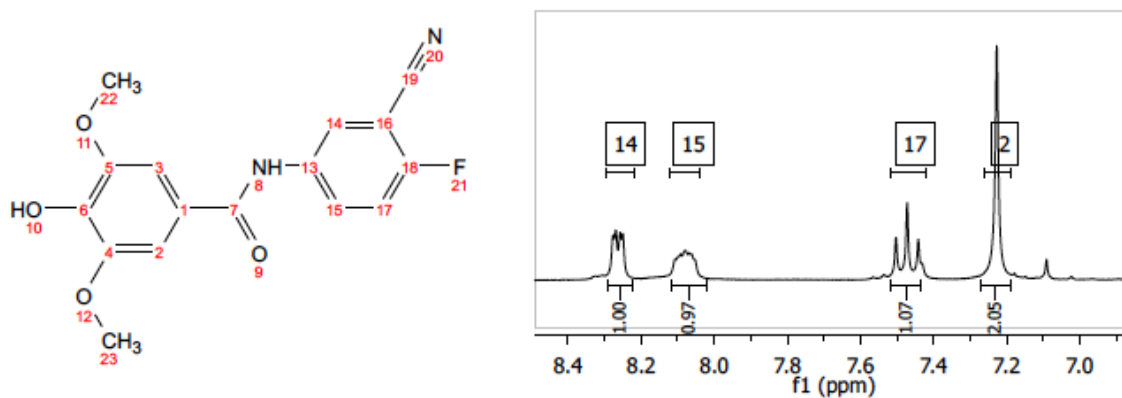
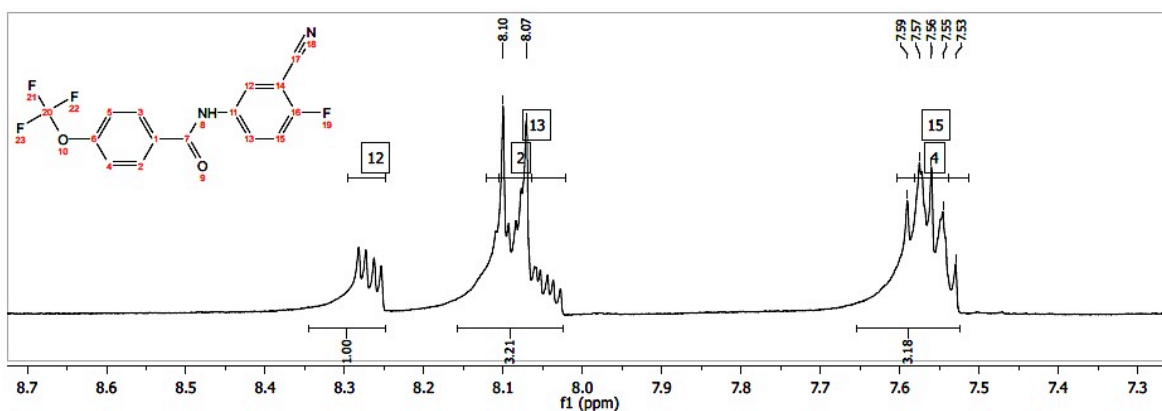


Figura 7.14 Fragmento del espectros de RMN ^1H de A13, y asignación de las señales.



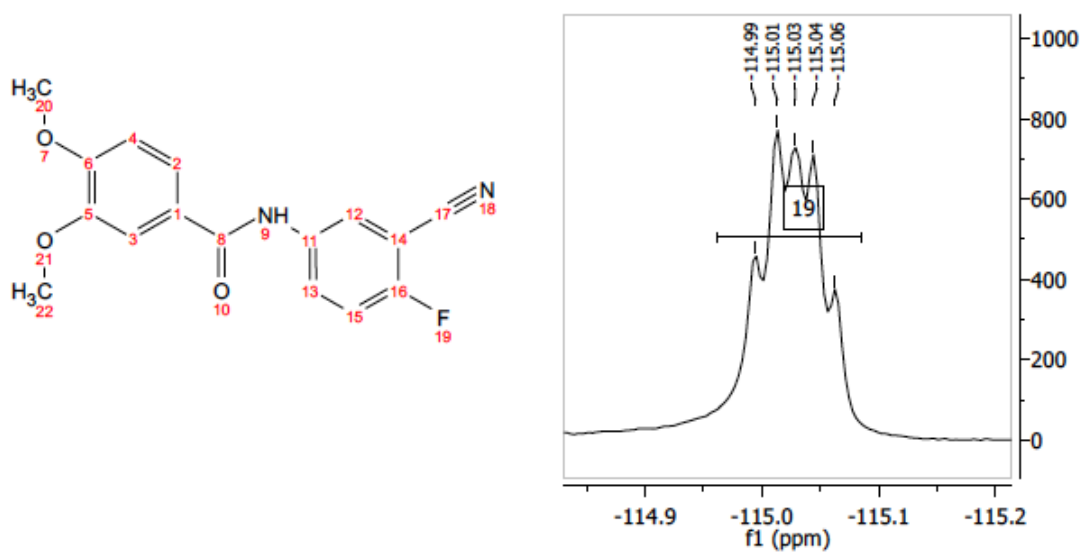
Los protones de la *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida (**A14**) pueden ser considerados como un sistema AA'BB', sin embargo, la constante de acoplamiento ${}^3J_{AB}$ es muy similar a la de acoplamiento ${}^3J_{A'B'}$ y con el traslape de las señales del anillo aromático 3-ciano-4-fluorofenilcarboxamida solo se puede observar en el espectro una señal de doblete ancho en el fragmento de la figura 7.15.

Figura 7.15 Fragmento del espectro de RMN ${}^1\text{H}$ de A14, y asignación de las señales.



Finalmente, en todos los derivados se pudo observar en los espectros de RMN ${}^{19}\text{F}$ que la señal de flúor tenía un acoplamiento con un protón 3J (orto), y con dos protones 4J (meta), cada uno con diferente constante de acoplamiento, pero por tener valores similares, al final la señal observada es un doble triplete (dt) solapado. En la figura 7.16 se presenta un ejemplo observado.

Figura 7.16 Fragmento del espectro de RMN ${}^{19}\text{F}$ de A2, y asignación de las señales.



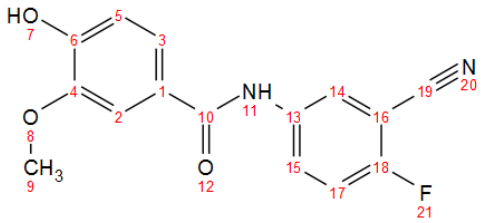
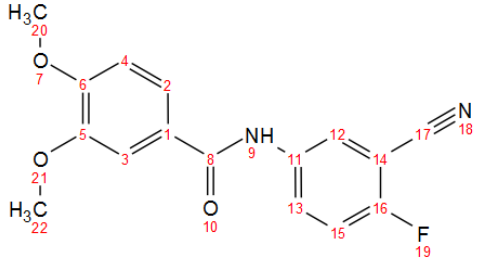
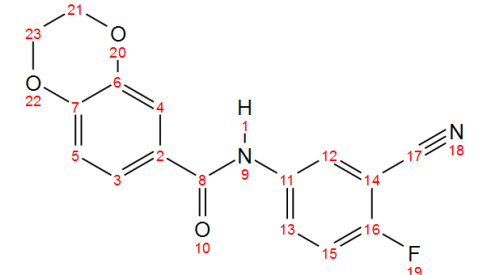
Adicionalmente se debe mencionar que en el espectro de ^{19}F de A14 (figura 7.17), por tener en su estructura al grupo trifluorometoxilo, se observo una señal adicional en -56.6 ppm, que es el desplazamiento estimado para este grupo, según lo calculado por las tablas de (Pretsch, Bülmann, & Badertscher, 2009).

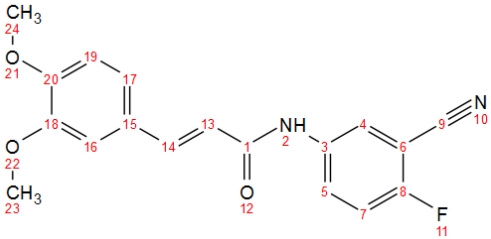
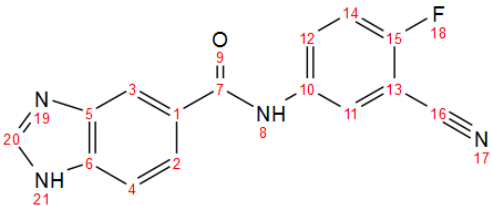
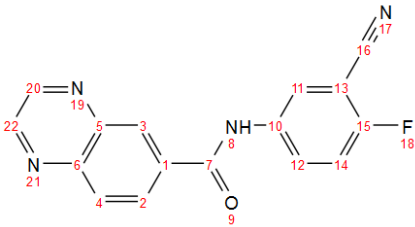


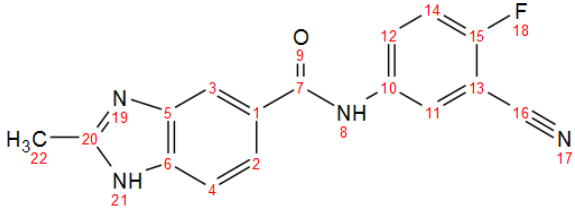
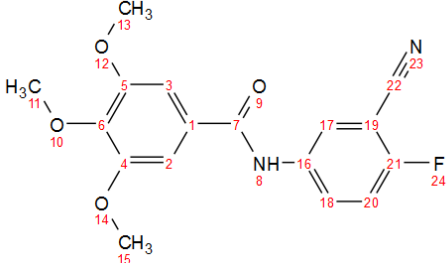
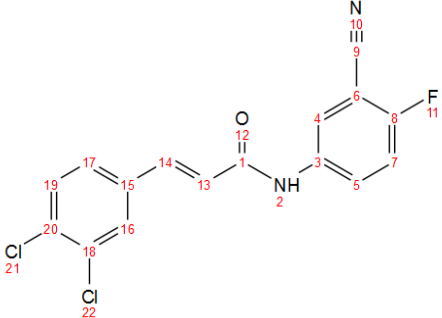
Figura 7.17 Fragmento del espectro de RMN ^{19}F de A14, y asignación de las señales.

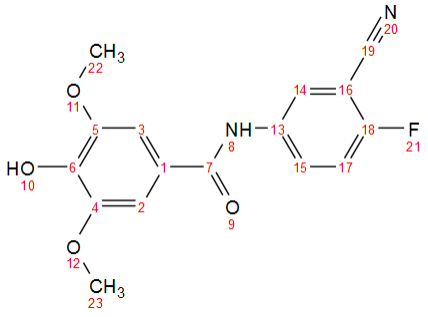
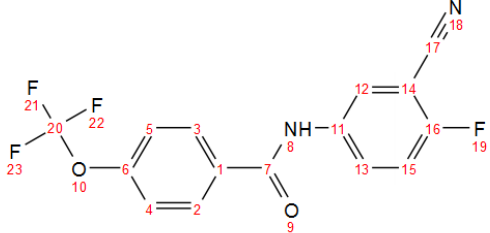
A2, A3 y A5 también fueron caracterizados mediante espectrometría de masas por impacto electrónico, con lo cuál se confirmó su peso molecular y que el enlace carboxamida efectivamente se formó. Adicionalmente, a estos intermediarios también se les caracterizó por espectroscopia de infrarrojo, con lo que también se puede confirmar que el grupo nitrilo no reaccionó en ningún paso o durante la purificación.

Figura 7.18 Características de los intermediarios, e información espectroscópica

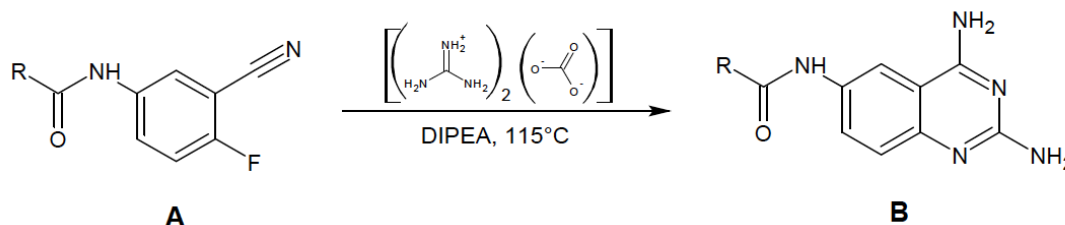
Derivado	Información espectroscópica
 <p style="text-align: center;">A1</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 286.26</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo color crema</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 44%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 206.4-209.3</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.51 (Sistema II)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.32 [(H₁₁)(s, 1H)], 8.25 [(H₁₄)(dd, J = 6.1_{(14-21(F))}, 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 8.05 [(H₁₅)(ddd, J = 7.81₍₁₅₋₁₇₎, 5.02_{(15-21(F))}, 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.55 [(H₁₇)(t, J = 9.2_{(17-15-21(F))} Hz, 1H)], 7.51 [(H₂)(s, 1H)] 7.49 [(H₃)(d, J = 7.8₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 6.89 [(H₅)(d, J=7.8 Hz, 1H)], 3.85 [(H₉)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.19 [(F₂₁)]</p>
 <p style="text-align: center;">A2</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 300.28</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo blanco mate</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 93%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 254.4-255.1</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.64 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3409, (-NH₂) 3402, 3409, (-CN) 2236, (C=O) 1670, (-OCH₃) 2844, 1269, 1158</p> <p style="text-align: center;">EM (IE)⁺ : (M⁺) 300</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.39 [(H₉)(s, 1H)], 8.25 [(H₁₂)(dd, J = 5.2_{(12-19(F))}, 3.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.06 [(H₁₃)(ddd, J = 8.3₍₁₃₋₁₅₎, 4.26_{(13-19(F))}, 3.7₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.62 [(H₂)(d_a, J = 8.4₍₂₋₄₎ Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₅)(dd, J = 9.9_{(15-19(F))}, 8.3₍₁₅₋₁₃₎ Hz, 1H)] 7.52 [(H₃)(s_a, 1H)], 7.10 [(H₄)(d, J = 8.4₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 3.84 [(H₂₀, H₂₂)(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.05 [(F₁₉)]</p>
 <p style="text-align: center;">A3</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 298.269</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo café claro, mate.</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 56.9 %</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 220.7-220.8</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.68 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3293, (-CN) 2239, (C=O) 1651, (-OCH₂) 2949, 2884, 1286, 1061</p> <p style="text-align: center;">EM (IE)⁺ : (M⁺) 339</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.38 [(H₁)(s, 1H)], 8.26 [(H₁₂)(dd, J = 5.8_{(12-19(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.06 [(H₁₃)(ddd, J = 7.8₍₁₃₋₁₅₎, 4.9_{(13-16(F))}, 2.7₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.53 [(H₁₅)(*t, J = 9.2_{(15-13-19(F))}, Hz, 1H)], 7.525 [(H₄)(d, J = 2.2₍₄₋₃₎ Hz, 1H)], 7.50 [(H₃)(dd, J = 8.4₍₃₋₅₎, 2.2₍₃₋₄₎ Hz, 1H)], 7.01 [(H₅)(d, J = 8.4₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 4.31-4.32 [(H₂₁₋₂₃)(Dos tripletes, J = 6.4 Hz, 4H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.02 [(F₁₈)]</p> <p>*Pseudotriplete, ver espectro.</p>

 <p>A5 (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida P.M.:326.32 Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 76% Punto de fusión: 257.1-258.4 Rf: 0.66 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3344, (H-C=C-H) 3071, (-CN) 2239, (C=O) 1685, (-OCH₃) 2964, 2839, 1256, 1138</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 326</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.56 [(H₂)(s, 1H)], 8.23 [(H₄)(dd, J = 5.8_{(4-11(F))}, 2.7₍₄₋₅₎ Hz, 1H)], 7.92 [(H₅)(ddd, J = 9.1₍₅₋₇₎, 4.9_{(5-11(F))}, 2.7₍₅₋₄₎ Hz, 1H)], 7.57 [(H₁₃)(d, J = 15.8₍₁₃₋₁₄₎ Hz, 1H)], 7.50 [(H₇)(dd, J = 9.1₍₇₋₅₎, 8.9₍₇₋₅₎ Hz, 1H)], 7.23 [(H₁₆)(d, J = 1.82₍₁₆₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.19 [(H₁₇)(dd, J = 8.3₍₁₇₋₁₉₎, 1.82₍₁₇₋₁₆₎ Hz 1H)], 7.02 [(H₁₉)(d, J = 8.3₍₁₉₋₁₇₎ Hz, 1H)], 6.66 [(H₁₄)(d, J = 15.8₍₁₄₋₁₃₎ Hz, 1H)], 3.82 [(H₂₃)(s, 3H)], 3.80 [(H₂₄)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.07 [(F₁₁)]</p>
 <p>A6 N-(3-ciano-4-fluorofenil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida P.M.: 280.26 Aspecto: Polvo café claro Rendimiento: 89% Punto de fusión: 245.2-245.8 Rf: 0.26 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 8.37 [(H₂₀)(s, 1H)], 8.33 [(H₁₁)(d, J = 5.8_{(11-18(F))}, 2.6₍₁₁₋₁₂₎ Hz, 1H)], 8.31 [(H₃)(d, J = 1.3₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 8.12 [(H₁₂)(ddd, J = 9.2₍₁₂₋₁₄₎, 4.9_{(12-18(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.83 [(H₂)(dd, J = 8.5₍₂₋₄₎, 1.6₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₄)(d, J = 8.5₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 7.55 [(H₁₄)(t, J = 9.2_{(14-12-18(F))}, 1H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.43 [(F₁₈)]</p>
 <p>A7 N-(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida P.M.: 292.27 Aspecto: Polvo café claro Rendimiento: 69% Punto de fusión: 230.8-231.1 Rf: 0.58 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.97 [(H₈)(s, 1H)], 9.08 [(H_{20, 22})(d, J = 4.1₍₂₀₋₂₂₎ Hz, 2H)], 8.78 [(H₃)(d, J = 1.9₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 8.36 [(H₁₁)(dd, J = 5.7_{(11-18(F))}, 2.1₍₁₁₋₁₂₎ Hz, 1H)], 8.34 [(H₂)(dd, J = 8.8₍₂₋₄₎, 1.9₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 8.25 [(H₄)(d, J = 8.8₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 8.14 [(H₁₂)(ddd, J = 9.1₍₁₂₋₁₄₎, 4.9_{(12-18(F))}, 2.8₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₄)(t, J = 9.1_{(14-12-18(F))} Hz, 1H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -114.16 [(F₁₈)]</p>

 <p>A8 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1<i>H</i>-benzimidazol-5-carboxamida P.M.: 294.28 Aspecto: Polvo blanco, crema Rendimiento: 72% Punto de fusión: 300.4-301.1 Rf: 0.34 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 10.12 [(H₁₁)(s, 1H)], 8.20 [(H₁₄)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₂)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.67 [(H₃)(dd, <i>J</i> = 2.0₍₃₋₂₎, 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 7.66 [(H₁₅)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎, 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.24 [(H₁₇)(d, <i>J</i> = 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.20 [(H₂₄)(s, 2H)], 7.13 [(H₅)(d, <i>J</i> = 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 5.94 [(H₂₃)(s, 2H)], 3.89 [(H₉)(s, 6H)], 3.88 [(H₂₅)(s, 6H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -115.15 [(F₁₈)]</p>
 <p>A11 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida P.M.: 330.31 Aspecto: Polvo blanco Rendimiento: 90% Punto de fusión: 211.0-212.7 Rf: 0.52 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 10.50 [(H₈)(s, 1H)], 8.27 [(H₁₇)(dd, <i>J</i> = 5.7_{(17-24(F))}, 2.4₍₁₇₋₁₈₎ Hz, 1H)], 8.14 [(H₁₈)(ddd, <i>J</i> = 8.9₍₁₈₋₂₀₎, 4.8_{(18-24(F))}, 2.76₍₁₈₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.58 [(H₂₀)(t, <i>J</i> = 9.1_{(20-18-21(F))} Hz, 1H)], 7.32 [(H_{3,2})(s, 1H)], 3.90 [(H_{13,15})(s, 6H)], 3.77 [(H₁₁)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -114.68 [(F₂₄)]</p>
 <p>A12 (2<i>E</i>)-<i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida P.M.: 335.16 Aspecto: Polvo blanco Rendimiento: 52.2% Punto de fusión: 250.0-251.2 Rf: 0.58 (Sistema I)</p>	<p>EM (ESI)⁺ : 335.01466</p> <p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 8.21 [(H₄)(dd, <i>J</i> = 5.8_{(4-11(F))}, 2.7₍₄₋₅₎ Hz, 1H)], 7.90 [(H₁₆)(d, <i>J</i> = 1.7₍₁₆₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.90 [(H₅)(ddd, <i>J</i> = 9.1₍₅₋₇₎, 4.96_{(5-11(F))}, 2.76₍₅₋₄₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₁₉)(d, <i>J</i> = 8.4₍₁₉₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.62 [(H₁₇)(dd, <i>J</i> = 8.4₍₁₇₋₁₉₎, 2.0₍₁₇₋₁₆₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₄)(d, <i>J</i> = 15.8₍₁₄₋₁₃₎ Hz, 1H)], 7.51 [(H₇)(t, <i>J</i> = 9.1_{(7-5-11(F))}, 1H)], 6.84 [(H₁₃)(d, <i>J</i> = 15.8₍₁₄₋₁₃₎ Hz, 1H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -114.68 [(F₂₄)]</p>

 <p>A13 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 316.28 Aspecto: Polvo café claro Rendimiento: 76% Punto de fusión: >350°C Rf: 0.13 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.15 [(H₈)(s, 1H)], 8.26 [(H₁₄)(dd, <i>J</i> = 5.4_{(14-21(F))}, 2.5₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 8.08 [(H₁₅)(ddd, <i>J</i> = 8.9₍₁₅₋₁₇₎, 4.8_{(15-21(F))}, 2.5₁₅₋₁₄ Hz, 1H)], 7.47 [(H₂₀)(t, <i>J</i> = 9.55_{(17-15-21(F))} Hz, 1H)], 7.23 [(H_{3,2})(s, 2H)], 3.71 [(H_{22,23})(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -116.70 [(F₂₁)]</p>
 <p>A14 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida P.M.: 324.23 Aspecto: Polvo rojo oscuro Rendimiento: 62% Punto de fusión: 139.5-144.5 Rf: 0.67 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.69 [(H₈)(s, 1H)], 8.27 [(H₁₂)(dd, <i>J</i> = 5.8_{(12-19(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.08 [(H_{3,2})(d, <i>J</i> = 8.82_{(2,3)-(5,4)} Hz, 2H)], [(H₁₃)(ddd, <i>J</i> = 7.63₍₁₃₋₁₅₎, 4.9_{(13-19(F))}, 2.76₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.56 [(H₁₅)(t, <i>J</i> = 9.1_{(15-13-19(F))} Hz, 1H)], 7.56 [(H_{4,5})(dq, <i>J</i> = 8.8_{(4,5)-(2,3)} Hz, 0.9_{[4,5]-[21(F), 22(F), 23(F)]}, 2H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -56.66 [(F_{21,22,23})], -114.37 [(F₂₄)]</p>

7.1.4 *Ciclación de las N-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas para formar las N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)*



Para llevar a cabo la ciclación entre las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas y la guanidina, se requerían condiciones que favorecieran la sustitución nucleofílica aromática, por lo que se planteó utilizar como disolventes apróticos polares como el DMSO y la DMA. En este caso, el DMSO se utilizó en la síntesis de los derivados que contenían un grupo hidroxilo, como en el caso de **B1** y **B13**, mientras que, para el resto de los derivados, la DMA fue el disolvente en el que se obtenía mejores rendimientos.

El DMSO tiene un punto de ebullición de 189°C, mientras que el de la DMA es de 165°C, por lo cuál fue seleccionada preferentemente para llevar a cabo la reacción, y así, durante la purificación se pudiera destilar a presión reducida más fácilmente.

Por otra parte, la DIPEA se eligió debido a que era necesario una base no nucleofílica para que reaccionará únicamente con el carbonato de guanidina, pues una base como el hidróxido de litio, si bien, es soluble en el medio, podría favorecer la hidrólisis del nitrilo.

Aunque inicialmente se había planteado usar una temperatura de 140°C según las condiciones planteadas por (Thurmond, et al., 2008) para la síntesis de 5-*O*-aril-quinazolin-2,4-diaminas, se eligió la de 115°C por que se observó una menor formación de subproductos mediante ccf. Estos subproductos tenían similitud con los rf's precursor del intermediario. El 5-amino-2-fluorobenzonitrilo producto de la hidrólisis de la amida se consumía produciendo quinazolin-2,4,6-triamina, con lo cuál se complicaba más la purificación, así que por ese motivo, el tiempo de reacción, si bien era largo (8-10hrs), no podía extenderse más. Esto explica los rendimientos moderados.

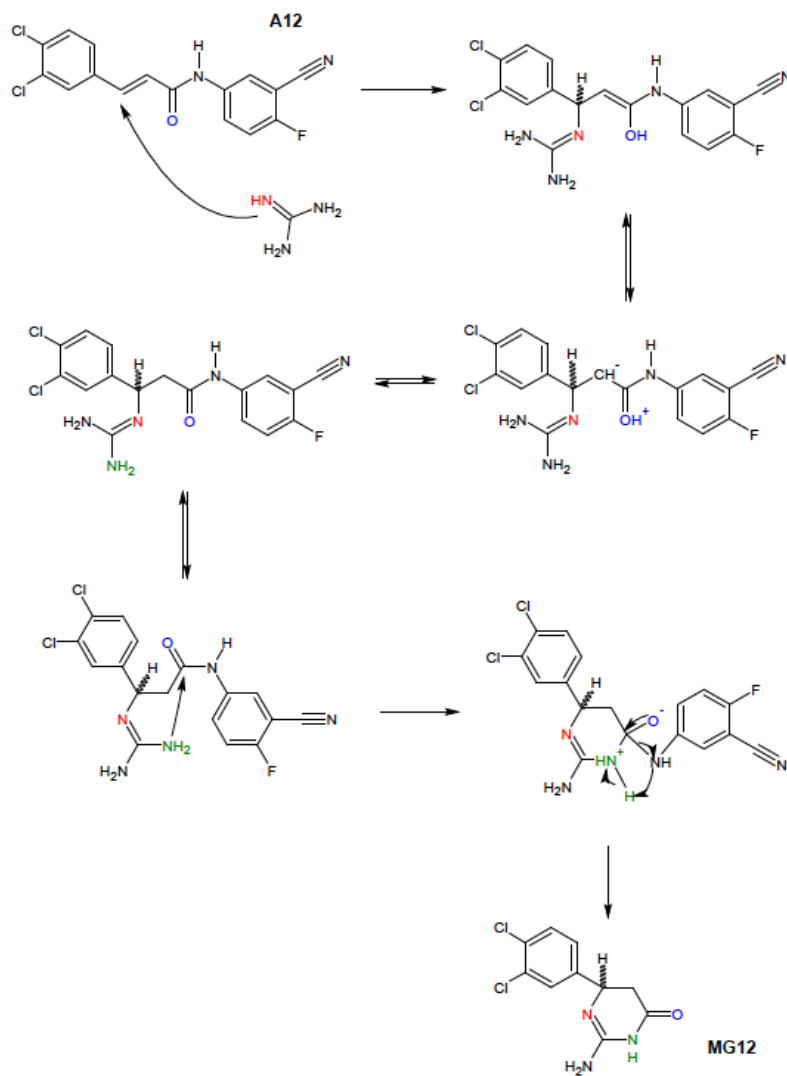
En general, las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas que tenían grupos electrodonadores requerían un mayor tiempo de calentamiento, y se obtenían rendimientos moderados (menores al 80%), sin embargo, en el caso de las moléculas con grupos electroattractores, se observó que incluso la guanidina realizaba el ataque selectivamente en otros sitios electrofílicos de la *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamida.

Este fue el caso del derivado **B12**, en el cual, la guanidina atacó la posición β de la (2*E*)-*N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (**A12**) como en una adición 1,4, para producir un enolato que adiciona un protón en la posición α, debido a que se forma un tautómero en la forma carbonílica más estable, y se propone que uno de los aminos de la guanidina esta cerca del carbono de la amida, así que al realizar un ataque al carbono

sp^2 , se produce una sustitución nucleofílica, en la que el grupo saliente es el grupo amino del 5-amino-2-fluorobenzonitrilo, pues abstrae un protón de la sal cuaternaria de amonio de este ataque. Adicionalmente, por el medio básico, se favorece la formación de la molécula 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona, un tautómero más estable, con una estereoquímica indeterminada, dado que en la adición nucleofílica, la guanidina pudo atacar por la cara *rhe* o *psi* de manera indistinta, puesto que no había ningún mecanismo auxiliar para la inducción de la quiralidad.

En el caso de la *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (**A6**), cuyo subproducto no se logro caracterizar, se explora la posibilidad de que la posición 2 del benzimidazol reaccionara con la guanidina, en lugar de llevarse a cabo la sustitución nucleofílica aromática y el ataque al nitrilo para formar la quinazoli-2,4,6-triamina.

Figura 7.19 Propuesta del mecanismo de reacción de la formación de la 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona

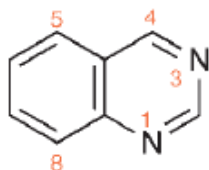


7.1.5 Caracterización espectroscópica de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)

Para realizar la caracterización espectroscópica de las moléculas, fundamentalmente se utilizó RMN ^1H y de ^{13}C , así como espectrometría de masas, en el que un indicio de que se sintetizó la molécula indicada es el peso molecular, que puede confirmarse por el patrón de fragmentación realizado. Finalmente, los espectros de infrarrojo sirvieron para confirmar que los grupos funcionales producían las bandas de absorción por los estiramientos característicos.

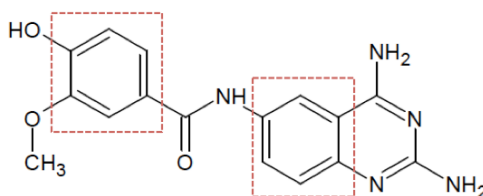
La nomenclatura referente a la posición de los protones del núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina es la misma a la cuál se hace referencia en el libro de (Joule & Mills, 2010). Así mismo los carbonos en las posiciones angulares, son designados con el número de carbono del átomo del que son precedidos, acompañados de la letra a.

Figura 7.20 Nomenclatura de asignación de posiciones de sustitución del núcleo de quinazolina



Se confirmó que la sustitución nucleofílica aromática del fluor por uno de los nitrógenos de la guanidina en las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas fue llevado a cabo, debido a que ninguna señal de protones aromáticos en RMN ^1H mostró acoplamiento con fluor como los observados en los intermediarios caracterizados anteriormente. Por ello se presento el mismo sistema de acoplamiento de protones en un anillo aromático 1,3,4 trisustituido de la carboxamida en las moléculas **B1**, **B2**, **B3**, **B5**, **B7** y **B8** con en el núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina (posiciones 5, 7 y 8). Para mayor claridad, en la figura 7.16 se señalan las regiones de la molécula que presentan el mismo patrón de acoplamiento.

Figura 7.21 Regiones de la molécula con un patrón de sustitución 1,3,4 en anillo aromático de carboxamida y núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina.



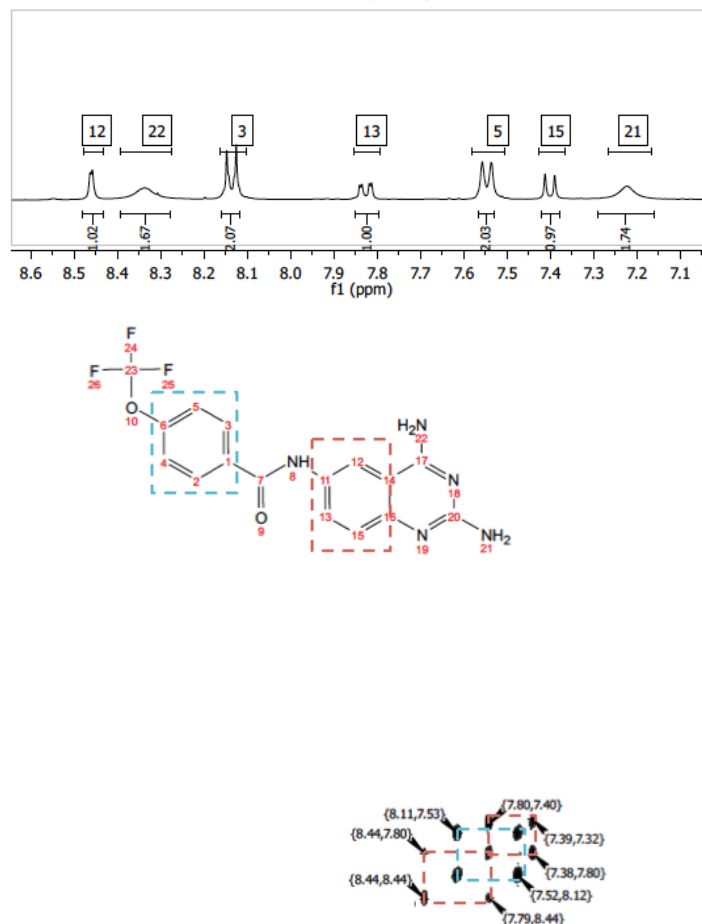
La asignación de protones de las moléculas se realizó mediante la medición de las constantes de acoplamiento de todas las señales, y mediante esto, se hizo la correlación de las señales que pertenecían al mismo núcleo aromático. Dicha correlación fue confirmada mediante los espectros bidimensionales COSY.

Una vez realizadas las correlaciones entre las tres señales, se agruparon, y se asignaron a cada uno de los anillos aromático dependiendo de las características electrónicas comparables entre dichos núcleos, así como las constantes de acoplamiento medidas en cada tipo de señal.

Por ejemplo, las moléculas con grupos electrodonadores, como **B1**, **B2**, **B3** y **B5** tenían un grupo de tres señales en una zona de campo bajo en el espectro, y entonces, fueron asignadas al núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina, debido a la anisotropia diamagnética, y a que dichos protones quedan más desprotegidos electrónicamente, por la resonancia de esta porción estructural. Las señales de campo alto, entonces, fueron asignadas presuntivamente al anillo aromático de la carboxamida, pues los protones de dicha porción estaban más protegidos respecto a la quinazolina por los grupos electrodonadores.

El ejemplo resuelto más sencillo, fue el necesario para confirmar las correlaciones de las constantes de acoplamiento del núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina y el de la porción de carboxamida del 4-trifluorometoxilo, y se muestra a continuación.

Figura 7.22 Fragmento de la zona aromático del espectro de RMN ^1H y COSY de B14, y correlaciones encontradas y asignadas a la molécula.



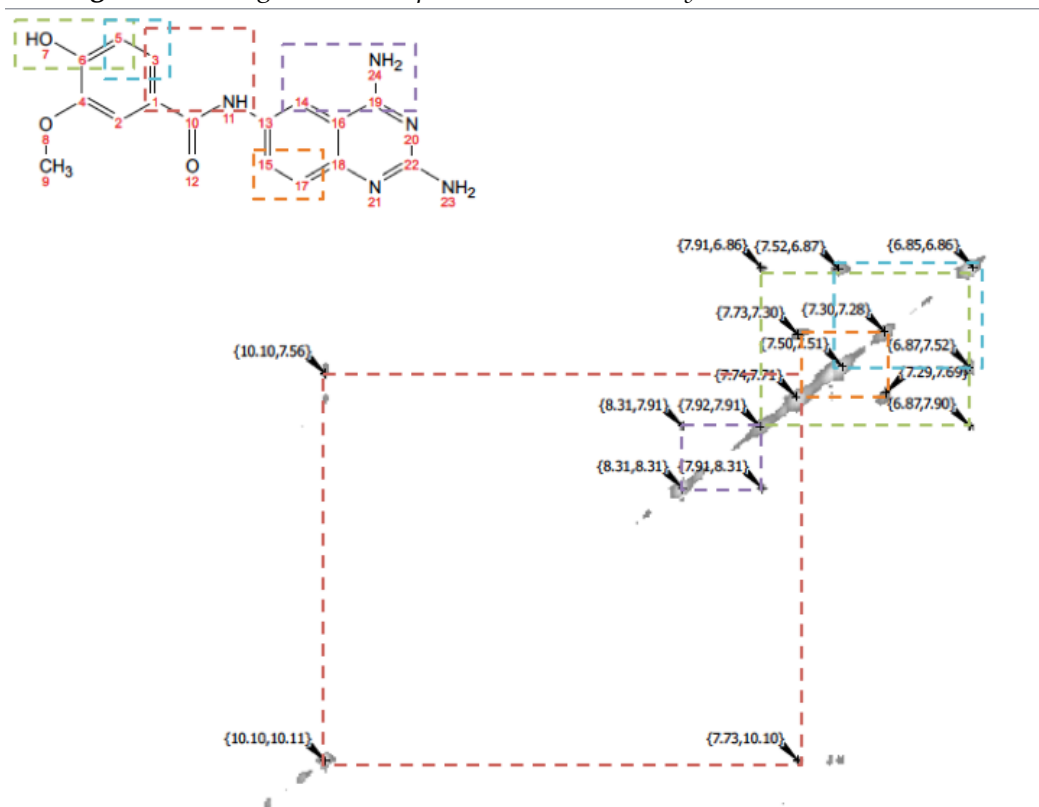
En el caso de **B11** y **B13**, las únicas correlaciones posibles en la zona de aromáticos eran las de las señales de la quinazolin-2,4,6-triamina, dado que no es posible que exista correlación entre los protones equivalentes, tanto del 3,4,5-trimetoxibencilo, como del 4-hidroxi-3,5-dimetoxibencilo que están representados por una sola señal en el espectro.

Los protones del grupo carboxamida fueron asignados a las señales anchas que aparecieron en la zona de entre 10 y 11 ppm, integraban para 1 protón, y adicionalmente desaparecían en los experimentos de intercambio con agua deuterada.

Los protones de los grupos aminos fueron asignados en función a que sus señales aparecieron entre 5.8 y 8 ppm, integraban para 2 protones, así como su desaparición total o parcial en el experimento de intercambio con agua deuterada.

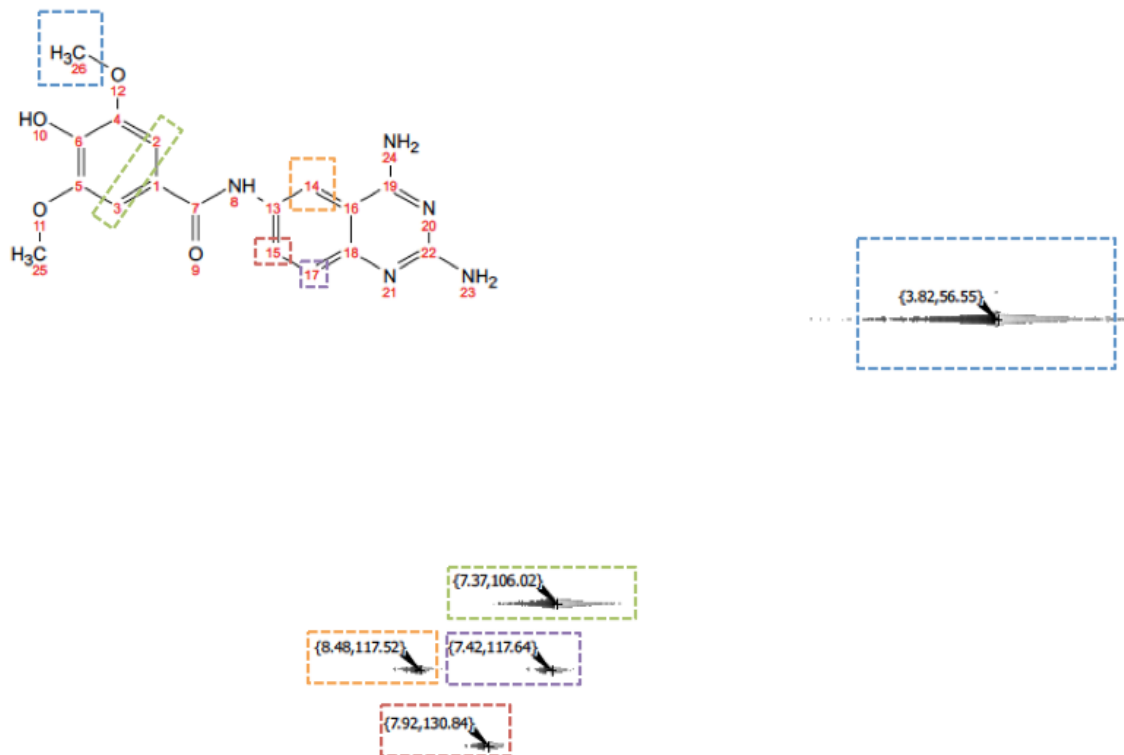
Adicionalmente, por la resonancia que está llevando a cabo el núcleo de quinazolina, el grupo amino de la posición 4 estaba más desprotegido (lo cuál concuerda con los efectos de resonancia debido al marcado efecto de baja densidad electrónica del carbono en la posición 2 de la quinazolina, así como lo concluido en el estudio de densidad electrónica *in silico* realizado por (Matus, 2013)), y en el espectro NOESY de **B1** y **B13**, en los cuales se observa la correlación a distancia del protón en la posición 5 de la quinazolina, con los dos protones del amino de la posición 4. En la figura 7.16 se observa un análisis de dichas correlaciones observadas en el espectro NOESY para la molécula **B1**.

Figura 7.23 Fragmento del espectro NOESY de B1, y correlaciones observadas



Posteriormente las señales del espectro de ^{13}C de los carbonos unidos a hidrógeno fueron asignadas en base a la correlación del espectro de HSQC. En la figura 7.19 puede observarse un ejemplo de la correlación observada en B13.

Figura 7.24 Fragmento del espectro HSQC de B13, y correlaciones observadas

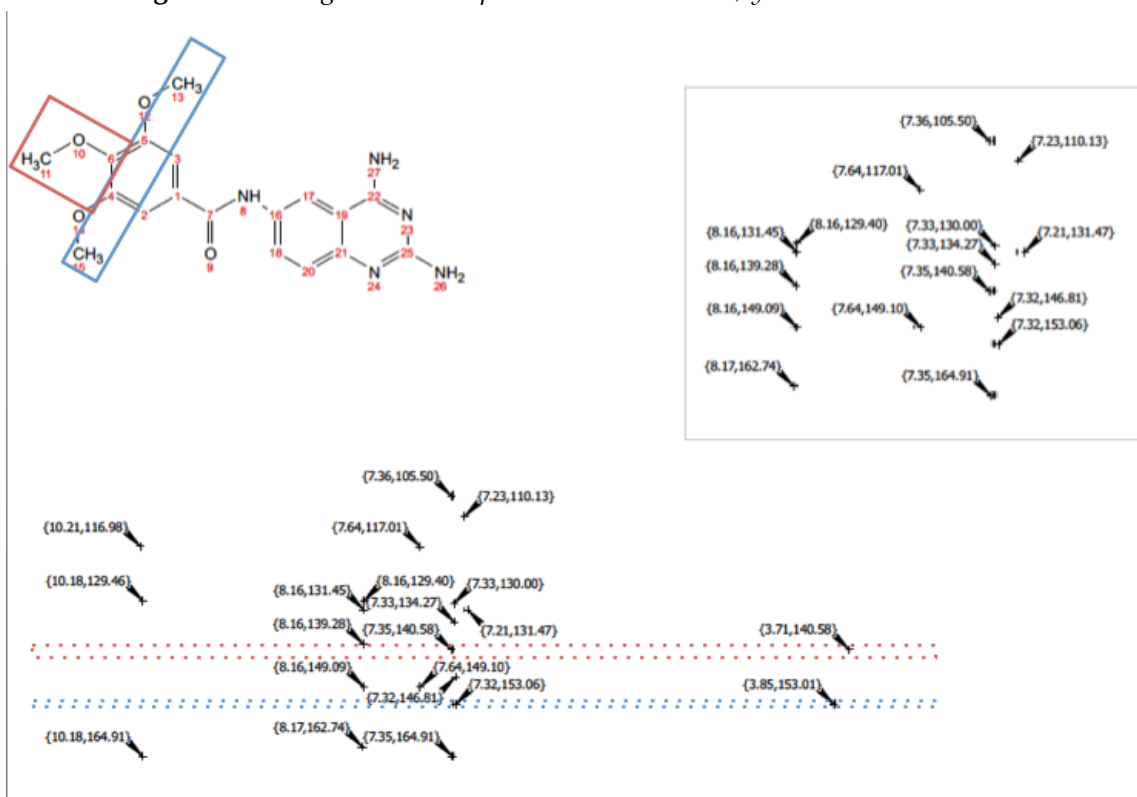


El resto, pudo determinarse gracias a las correlaciones a 3, 4 y hasta 5 enlaces, observadas mediante el espectro de HMBC y se confirmó que esto era correcto debido a que mediante los espectros de HMBC existía una correlación entre estas señales y las de los metoxilos de las moléculas (**B1**, **B2** y **B5**), o bien entre las de los carbonos del 2,3-dihidro-benzodioxanil y los carbonos base de esos grupos funcionales. En la figura 7.20 puede observarse un ejemplo.

Adicionalmente, en todos los casos en los espectros de HMBC se observaba una correlación entre el carbono de la posición 5 y la 7 del núcleo de la quinazolin-2,4,5-triamina, pero también con el carbono 8a. En el caso del carbono de la posición 7, también correlaciona con el de la posición 8a.

Finalmente el carbono de la posición 8, correlaciona con el de la posición 6 y el 4a. Y la asignación de los carbonos de la posición 2 se llevó a cabo de manera indirecta, pues no se observaba correlación con otros carbonos, a diferencia del de la posición 4, que correlaciona con el de la posición 5.

Figura 7.25 Fragmento del espectro HMBC de B11, y correlaciones observadas



El carbono de la posición 6, que era el que tenía el nitrógeno de la carboxamida, estaba localizado en los espectros de todas las moléculas en la zona de campo alto, dado que la densidad electrónica en esta zona es mayor, en comparación con los otros carbonos del núcleo de quinazolin-2,4,6-triamina.

Debe señalarse que respecto a **B5**, los carbonos propios del doble enlace fueron directamente asignados por la correlación directa que existe en el espectro HSQC de las señales características (con una constante de acoplamiento de valores semejantes a los esperados en enlaces de tipo trans es decir, cercano a los 19 Hz).

Adicionalmente, el protón vecino al grupo carboxamida poseía un valor de desplazamiento mayor al de la otra señal, debido a que estaba más desprotegido, y con ello entraba en resonancia a valores de campo bajo, respecto al otro protón.

Otra cuestión importante es que en todas las moléculas, el grupo metoxilo, por el mismo fenómeno descrito, producía señales desplazadas hacia campo bajo (3.8 - 4.0 ppm), respecto a la de grupos metilo como el del **AMB** (2.5 ppm).

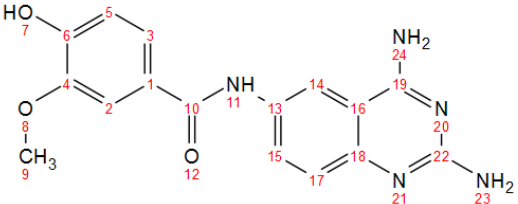
Mediante espectrometría de masas, puede observarse que los espectros de **B2**, **B3**, **B5** y **B11** fueron realizados mediante la técnica de impacto electrónico, y por lo tanto, fue posible identificar el ión molecular, y con ello, confirmar el peso molecular de los compuestos.

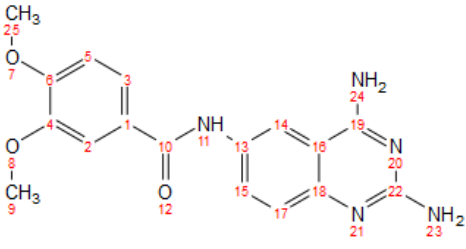
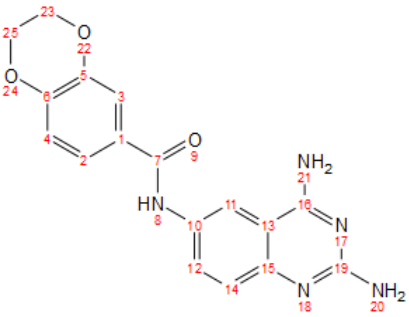
La fragmentación, puede plantearse en función al pico base, y en estos casos, pudo determinarse que en todos los espectros realizados por este tipo de técnica de ionización, las moléculas sufren una fragmentación con la consecuente pérdida de 174 unidades de masa, con lo cuál, resulta claro que el pico base detectado en estos casos fue el pseudocación del ácido del correspondiente derivado de la molécula analizada, debido a que el radical de la quinazolin-2,4,6-triamina, es más estable y posee la misma masa perdida.

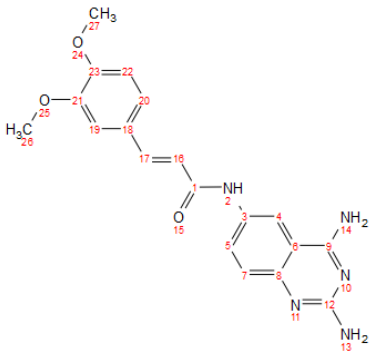
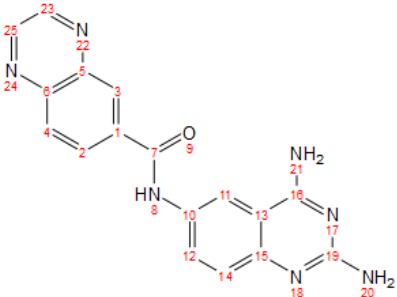
En los espectros de **B7** y **B8**, que fueron adquiridos mediante la técnica de FAB y mediante la detección de iones positivos, se pudo detectar el ión $M+1^+$, debido a que la matriz fue glicerol, e indirectamente se confirmó el peso molecular.

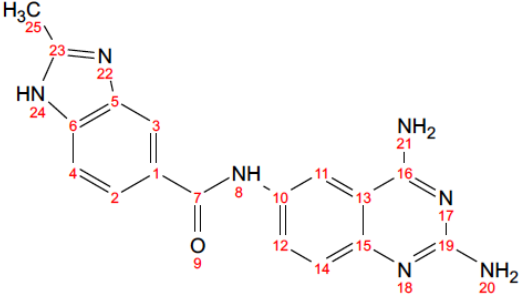
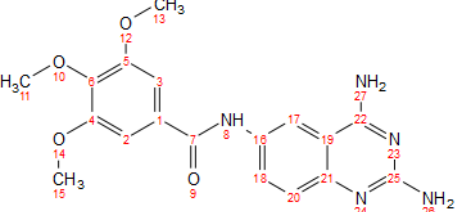
Finalmente, la información de los espectros de IR proporcionó la confirmación de la presencia de los grupos funcionales de los derivados sintetizados. En particular, los grupos aminos, el carbonilo de la carboxamida y los metoxilos fueron bandas características que pudieron observarse, debido a la absorción de energía para las vibraciones, o estiramientos característicos que los átomos de la molécula hacen.

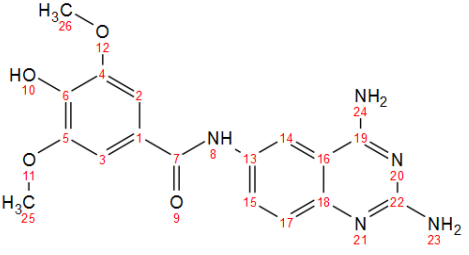
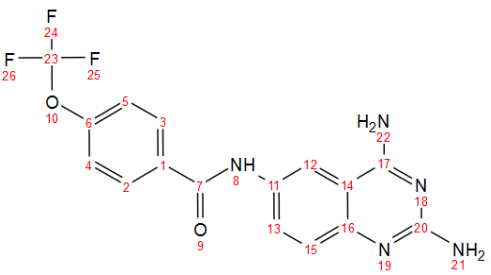
Figura 7.26 Características de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carboxamidas e información espectroscópica

Derivado	Información espectroscópica
 <p style="text-align: center;">B1 <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida P.M.: 325.32 Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 29% Punto de fusión: Mayor a 350°C Rf: 0.45 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3116, (-NH₂) 3338, (C=O) 1648, (-OCH₃) 2840, 1150±1070</p> <p>EM DART: (M+1⁺) 326, 100%, (M⁺) 325, 16%</p> <p>EM (ESI)⁺: (M+1⁺) 326.12453</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.13 [(H₁₁)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 8.32 [(H₁₄)(s, 1H)], 7.95 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 7.94 [(H₇)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 7.75 [(H₁₅)(d, J = 8.2₍₁₅₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₂)(s, 1H)], 7.54 [(H₃)(dd, J = 8.3₍₃₋₅₎, 1.6₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 7.32 [(H₁₇)(d, J = 8.2₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 6.97 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 6.89 [(H₅)(d, J = 8.3₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 3.86 [(H₉)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.84 (C₁₀), 162.59 (C₁₉), 157.60 (C₂₂), 150.05 (C₆), 147.25 (C₄), 143.13 (C₁₈), 133.01 (C₁₆), 129.47 (C₁₅), 125.18 (C₁), 121.36 (C₃), 120.80 (C₁₇), 116.56 (C₁₄), 114.97 (C₅), 111.61 (C₂), 109.51 (C₁₃), 55.76 (C₉)</p>

 <p style="text-align: center;">B2</p> <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-3,4-dimethoxybenzamide</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 339.35</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo brillante.</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 53%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 258.2-258.6</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.17 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3420, (-NH₂) 3592, (C=O) 1660, (-OCH₃) 2841, 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 339 (42%), 165 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 340.1414 (¹²C₁₇¹H₁₇¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.12 [(H₁₁)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 8.20 [(H₁₄)(d, J = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₂)(d, J = 2.2₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.67 [(H₃)(dd, J = 2.0₍₃₋₂₎, 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 7.66 [(H₁₅)(dd, J = 2.2₍₁₅₋₁₄₎, 8.9₍₁₅₋₁₇₎ Hz, 1H)] 7.24 [(H₁₇)(d, J = 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.20 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 7.13 [(H₅)(d, J = 8.5₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 5.94 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 3.89 [(H₂₅)(s, 3H)], 3.88 [(H₉)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 165.01 (C₁₀), 162.75 (C₂₂), 160.83 (C₁₉), 151.95 (C₆), 150.23 (C₁₈), 148.72 (C₄), 131.46 (C₁₆), 129.27 (C₁₅), 127.18 (C₁), 124.74 (C₁₇), 121.37 (C₃), 116.86 (C₁₄), 111.39 (C₁₃), 111.29 (C₂), 110.31 (C₁₃), 56.08 (C₉), 56.06 (C₂₅)</p>
 <p style="text-align: center;">B3</p> <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 337.33</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo opaco.</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 46%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 275.0-275.3</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.43 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3431, (-NH₂) 3481, (C=O) 1656, (-OCH₂) 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 337 (45%), 163 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 338.1246 (¹²C₁₇¹H₁₅¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.26 [(H₈)(s, Protón intercambiado en experimento con D₂O, 1H)], 8.41 [(H₁₁)(d, J = 2.2₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 8.12 [(H₂₁)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 7.78 [(H₁₂)(dd, J = 8.9₍₁₂₋₁₄₎, 2.2₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.57 [(H₃)(d, J = 2.3₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.56 [(H₂)(dd, J = 8.1₍₄₋₂₎, 2.3₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 7.35 [(H₁₄)(d, J = 8.9₍₁₂₋₁₄₎ Hz, 1H)], 6.99 [(H₄)(d, J = 8.1₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 6.98[(H₂₀)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 4.38 - 4.31 [(H₂₅ y H₂₃)(q, J = 4.9 Hz, 4H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.42 (C₇), 162.66 (C₁₉), 156.99 (C₁₆), 146.53 (C₆), 143.04 (C₅), 141.78 (C₁₀), 133.34 (C₁), 129.50 (C₁₂), 127.24 (C₁₅), 121.25 (C₂), 120.25 (C₁₄), 117.00 (C₄), 116.71 (C₃), 116.47 (C₁₁), 109.49 (C₁₃), 64.46 (C₂₅), 64.08 (C₂₃)</p>

 <p style="text-align: center;">B5</p> <p style="text-align: center;">(2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida P.M.: 365.39 Aspecto: Polvo amarillo. Rendimiento: 48% Punto de fusión: 287.8-289.4 Rf: 0.31 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3352, (-NH₂) 3252, (-HC=CH-) 3003, 2968, (C=O) 1504, (-OCH₃) 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 365 (34%), 191 (Pico base) EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 366.1573 (¹²C₁₉¹H₁₉¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.54 [(H₂)(s, Protón intercambiado en experimento con D₂O, 1H)], 8.56 [(H₁₄)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 8.47 [(H₄)(d, J = 2.0_[4-5] Hz, 1H)], 7.81 [(H₅)(dd, J = 8.9_[5-7], 2.0_[5-4] Hz, 1H)], 7.53 [(H₁₆)(d, J = 15.7_[16-17] Hz, 1H), 7.46 [(H₁₃)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 7.40 [(H₇)(d, J = 8.9_[7-5] Hz, 1H)], 7.20 [(H₁₉)(d, J = 2.0_[19-20] Hz, 1H)], 7.17 [(H₂₀)(dd, J = 8.3_[20-22], 2.0_[20-19] Hz, 1H)], 6.99 [(H₂₂)(d, J = 8.3_[22-20] Hz, 1H)], 6.81 [(H₁₇)(d, J = 15.7_[17-16] Hz, 1H)], 3.80 [(H₂₆)(s, 3H)], 3.78 [(H₂₇)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.40 (C₁), 163.17 (C₁₂), 155.63 (C₉), 150.91 (C₂₃), 149.37 (C₂₁), 140.85 (C₁₆), 138.05 (C₈), 135.18 (C₆), 128.75 (C₅), 127.88 (C₁₈), 122.19 (C₂₀), 120.05 (C₁₇), 118.92 (C₇), 115.09 (C₄), 112.22 (C₂₂), 110.65 (C₁₉), 109.85 (C₃), 56.03 (C₂₇), 55.91 (C₂₆)</p>
 <p style="text-align: center;">B7</p> <p style="text-align: center;">N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida P.M.: 331.3 Aspecto: Polvo naranja amarillento Rendimiento: 43% Punto de fusión: 288.3-289.1 Rf: 0.23 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3163, (-NH₂) 3346, (C=O) 1655</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 332 (7%), 55 (Pico base) EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 332.1261 (¹²C₁₇¹H₁₃¹⁴N₇¹⁶O₁)</p> <p>RMN ¹H (DMF-d₇, 400MHz): δ 10.68 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O,)], 9.10 [(H₂₅)(s, 2H)], 8.87 [(H₁₁)(s,1H)], 8.56 [(H₃)(s,1H)], 8.50 [(H₁₂)(d, J = 8.4 Hz, 1H)], 8.27 [(H₁₄)(d, J = 8.4 Hz, 1H)], 7.92 [(H₂)(d, J = 8.7 Hz, 1H)], 7.43 [(H₂₁)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O,)], 7.34 [(H₄)(d, J = 8.7 Hz, 1H)], 6.03 [(H₂₀)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O,)]</p> <p>RMN ¹³C (DMF-d₇, 100MHz): δ 164.43 (C₇), 163.05 (C₁₉), 161.11 (C₁₆), 150.44 (C₁₅), 147.18 (C₂₅), 146.84 (C₂₃), 144.02 (C₆), 142.21 (C₅), 136.44 (C₁), 131.79 (C₁₃), 129.65 (C₄), 129.00 (C₃), 128.85 (C₂), 127.79 (C₁₂), 125.06 (C₁₄), 115.18 (C₁₁), 110.30 (C₁₀)</p>

 <p style="text-align: center;">B8</p> <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-2-metil-1<i>H</i>-benzimidazol-5-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 333.35</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo color crema</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 46%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: Mayor a 350°C</p> <p style="text-align: center;">Rf: = 0.15 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3584, (-NH₂) 3145, (-CH₃) 3071, (C=O) 1654</p> <p>EM (FAB)⁺: (M+1⁺) 334 (6%), 55 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺: (M+1⁺) 334.1416 (¹²C₁₇¹H₁₅¹⁴N₇¹⁶O₁)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.24 [(H₈)(s,1H)], 8.16 [(H₂₄)(s, 1H)], 7.84 [(H₁₁)(d, J = 2.2 Hz,1H)], 7.81 [(H₃)(s,1H)], 7.66 [(H₁₂)(dd, J = 8.55, 2.2 Hz, 1H)], 7.60 [(H₂)(d, J = 9.1 Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₄)(d, J = 8.55 Hz, 1H)], 7.20 [(H₄)(d, J = 9.1 Hz, 1H)], 7.16 [(H₂₁)(s, 2H)], 5.89 [(H₂₀)(s, 2H)], 2.53 [(H₂₅)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 166.35 (C₇), 159.48 (C₁₉), 156.97 (C₁₆), 153.99 (C₂₃), 136.70 (C₁₅), 136.68 (C₁₀), 127.63 (C₅), 127.55 (C₆), 127.03 (C₁₄), 124.11 (C₂), 121.39 (C₁), 117.00 (C₄), 116.80 (C₁₂), 114.12 (C₁₃), 99.84 (C₁₁), 99.68 (C₃), 14.81 (C₂₅)</p>
 <p style="text-align: center;">B11</p> <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-3,4,5-trimetoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 369.37</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo color hueso</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: No determinado</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 178.4-179.2</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.43 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3346, (-NH₂) 3162, (C=O) 1538, (-OCH₃) 1123±1335</p> <p>EM (IE)⁺: (M⁺) 369 (47%), 195 (Pico base)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.20 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.17 [(H₁₇)(d, J = 2.2 Hz, 1H)], 7.65 [(H₁₈)(dd, J = 8.9₁₈₋₂₀, 2.2₁₈₋₁₇ Hz, 1H)], 7.35 [(H₂₇)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.34 [(H_{2,3})(s, 1H)], 7.23 [(H₂₀)(d, J = 8.9₂₀₋₁₈ Hz, 1H)], 6.08 [(H₂₆)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{13,15})(s, 6H)], 3.72 [(H₁₁)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.96 (C₇), 162.79 (C₂₅), 160.37 (C₂₂), 153.07 (C_{4,5}), 149.16 (C₂₁), 140.65 (C₆), 131.55 (C₁₉), 130.08 (C₁), 129.51 (C₁₈), 124.16 (C₂₀), 117.07 (C₁₇), 110.24 (C₁₆), 105.57 (C_{2,3}), 60.54 (C₁₁), 56.50 (C_{13,15})</p>

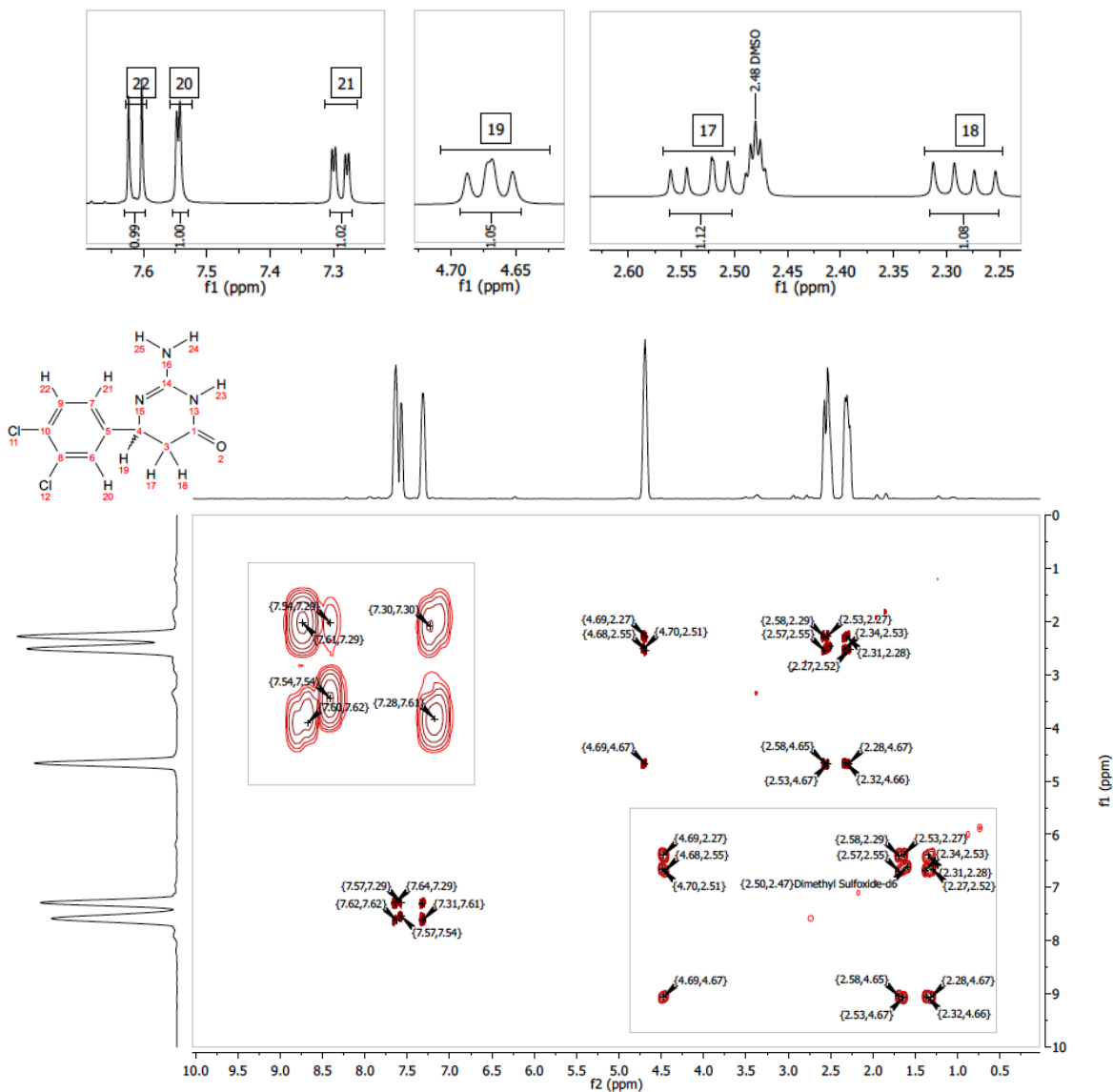
 <p style="text-align: center;">B13 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 71% Punto de fusión: Mayor a 350°C Rf: 0.44 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3321, (-NH₂) 3183, (C=O) 1643, (-OCH₃) 1113±1331</p> <p>EM (DART)⁺ : 356 (M+1⁺)</p> <p>EM (ESI)⁺ : (M+1⁺) 356.13676 (¹²C₁₇¹H₁₇¹⁴N₅¹⁶O₄)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.42 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 9.09 [(H₁₀)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.75 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 8.50 [(H₁₄)(d, J = 2.0₁₄₋₁₅ Hz, 1H)], 7.94 [(H₁₅)(dd, J = 8.9₁₅₋₁₇, 2.0₁₅₋₁₄ Hz, 1H)], 7.68 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.43 [(H₁₇)(d, J = 8.9₁₇₋₁₅ Hz, 1H)], 7.40 [(H_{2,3})(s,2H), 3.84 [(H_{25,26})(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 165.32 (C₇), 163.27 (C₂₂), 155.12 (C₁₉), 147.95 (C_{4,5}), 139.72 (C₆), 136.69 (C₁₈), 135.39 (C₁₆), 130.91 (C₁₅), 123.95 (C₁), 117.69 (C₁₇), 117.58 (C₁₄), 109.64 (C₁₃), 106.11 (C_{2,3}), 56.67 (C_{25,26})</p>
 <p style="text-align: center;">B14 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida P.M.: 363.3 Aspecto: Polvo color crema Rendimiento: 16% Punto de fusión: Mayor a 350°C Rf: 0.69 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3331, (-NH₂) 3184, (C=O) 1657, (-OCF₃) 1160±1258</p> <p>EM (DART)⁺ : 364 (M+1⁺)</p> <p>EM (ESI)⁺ : (M+1⁺) 364.10167 (¹²C₁₆¹H₁₂¹⁹F₃¹⁴N₅¹⁶O₂)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.58 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.44 [(H₁₂)(d, J = 2.0₁₄₋₁₅ Hz, 1H)], 8.30 [(H₂₂)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 8.11 [(H_{2,3})(d, J = 9.0_{2,3-4,5} Hz, 1H)], 7.81 [(H₁₃)(dd, J = 8.9₁₃₋₁₅, 2.0₁₃₋₁₂ Hz, 1H)], 7.52 [(H_{4,5})(d, J = 9.0_{4,5-2,3} Hz, 1H)], 7.38[(H₁₅)(d, J = 8.9₁₃₋₁₅, 1H)], 7.20 [(H₂₁)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.48 (C₇), 162.78 (C₁₇), 156.19 (C₁₆), 150.82 (C₁), 133.61 (C₂₀), 133.57 (C₁₄), 130.21 (C_{2,3}), 129.60 (C₁₃), 121.44 (C₂₃), 120.98 (C_{4,5}), 119.65 (C₁₅), 118.88 (C₆), 116.49 (C₁₂), 109.47 (C₁₁)</p>

7.1.6 Caracterización espectroscópica de 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (MG12)

Como se había descrito en el análisis de resultados, la reacción de la (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (**A12**) con la guanidina dio lugar a la formación de la molécula 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (**MG12**).

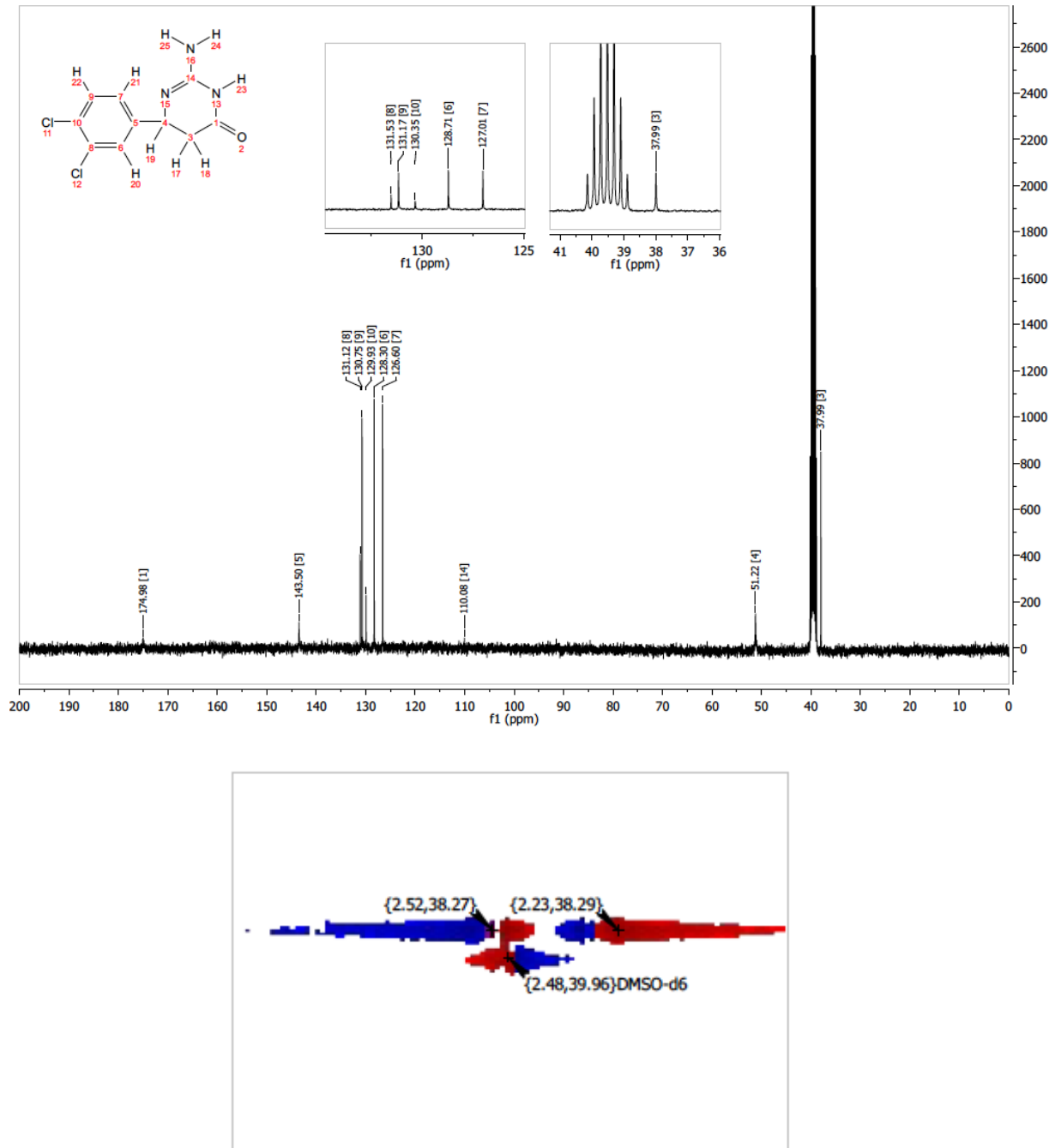
La interpretación de los espectros de RMN ¹H y COSY fueron los primeros indicios que se tuvieron para concluir que no se había logrado obtener la (2E)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida **B12** según lo planeado, a pesar de que el compuesto mostraba características muy similares a los otros derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina, como su R_f o color amarillo característico.

Figura 7.27 Fragmento del espectro de RMN ¹H de MG12 y COSY



Una característica que se pudo concluir del espectro HSQC fue que las señales de los protones en la zona de 2.2 a 2.6 ppm eran diasteróticos, pues estaban unidos al mismo carbono, pero presentaban una constante de acoplamiento diferente con respecto al protón del centro asimétrico de la posición 6 de la dihidropirimidin-4-ona, debido a la relación de Karplus y el ángulo dihedro que era distinta para cada protón, como se puede observar en la figura 7.23.

Figura 7.28 Espectro de RMN ^{13}C de MG12 y fragmento de espectro de HSQC donde se observa la correlación de 2 protones diasterotópicos



Con estas mismas bases, se pudo asignar la señal al protón que es sinperiplanar o antiperiplanar al protón 19 (según la numeración asignada en la figura 7.22, y posición 6 de la dihidropirimidin-4-ona), sin embargo, no es posible asignar la configuración al centro quiral de la molécula, o determinar si se obtuvo la mezcla racémica puesto que se requieren otro tipo de experimentos.

Así mismo, mediante EM (FAB)⁺ se determinó que el ión molecular era el correspondiente al de una masa de 258, debido al patrón isotópico de los dos átomos de cloro presentes en la molécula, es decir, la abundancia relativa del ión (M+2)⁺ en una intensidad relativa al 65.2% respecto a la señal (M)⁺.

Normalmente, en este tipo de experimentos, es común encontrar al ión (M+1)⁺ debido a que la matriz usada para dispersar la muestra previo al bombardeo de átomos para formar el ión que posteriormente se detecta, es más ácida que el analito. En este caso, esto no sucedió así, debido a que la basicidad del grupo amino de la molécula es baja, debido a los efectos de resonancia en los que disminuye la densidad electrónica por los grupos cercanos en la la dihidropirimidin-4-ona, y por ello, se detecto únicamente al ión molecular (M)⁺.

Así, se confirmó que no se había obtenido la (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (**B12**). Por otra parte, la estructura de la 2-amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona **MG12** que se caracterizó, ya había sido sintetizada previamente y tiene reportes respecto a la inhibición de la β-secretasa, una proteasa implicada en padecimientos como el Alzheimer (Edwards, et al., 2007). Es además una estructura que en las posiciones 2 y 4 tiene grupos capaces de formar puentes de hidrógeno, tal como la quinazolin-2,4,6-triamina, por lo cuál no se descartó como una molécula susceptible de ser evaluada.

Finalmente, se presenta en la figura 7.25 una tabla con las principales características físicas y espectroscópicas determinadas para el compuesto obtenido.

Figura 7.29 Espectro EM-FAB de MG12

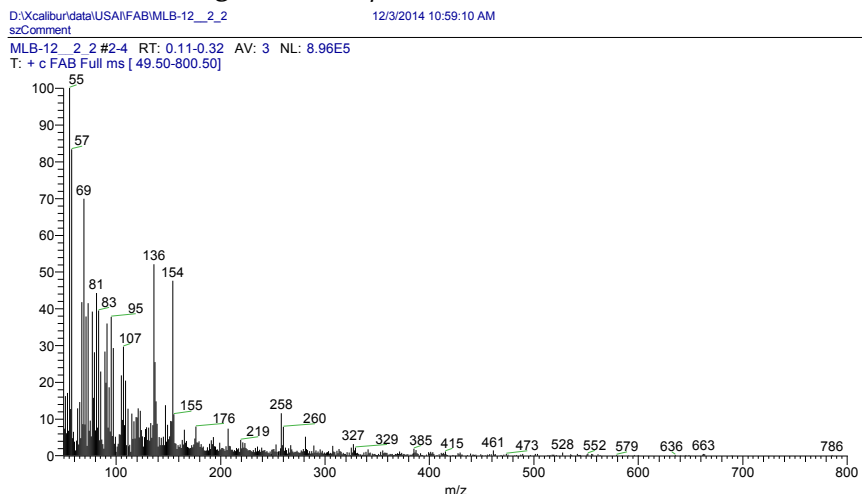
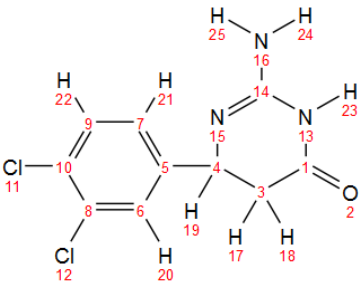
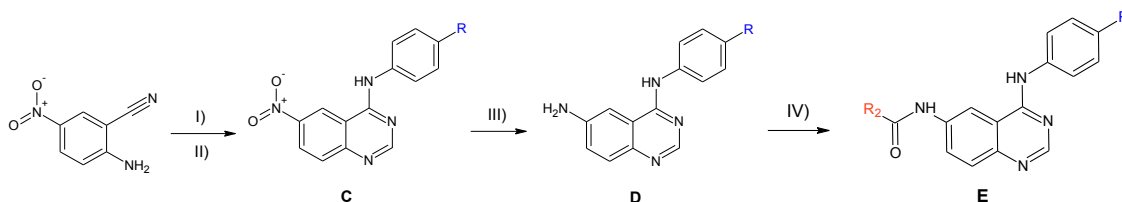


Figura 7.30 Resumen de características de espectroscópicas de MG12

 <p>MG12 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) P.M.: 258.1 Aspecto: Polvo amarillo brillante Rendimiento: 62% Punto de fusión: 243.7-244.4 Rf: 0.36 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH, -NH₂) 3319, (-CH₂) 2985, (C=O) 1640</p> <p>EM FAB (M⁺, cuasimolecular): 258(12%), 260 (8%, M+2⁺, patrón isotópico de dos cloros), 55 (Pico base)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 7.61 [(H₂₂)(d, J = 8.4₂₂₋₂₁ Hz, 1H)], 7.54 [(H₂₀)(d, J = 2.0₂₀₋₂₁ Hz, 1H)], 7.29 [(H₂₁)(dd, J = 8.4₂₁₋₂₂, 2.0₂₁₋₂₀ Hz, 1H)], 6.60 [(H_{23,24,25})(s, 3H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 4.67 [(H₁₉)(dd, J = 7.6₁₉₋₁₈, 6.3₁₉₋₁₇ Hz, 1H)], 2.53 [(H₁₇)(dd, J = 15.5₁₇₋₁₈, 6.3₁₇₋₁₉ Hz, 1H)], 2.28 [(H₁₈)(dd, J = 15.5₁₈₋₁₇, 7.6₁₈₋₁₉ Hz, 1H)],</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 175.40 (C₁), 143.97 (C₅), 131.53 (C₈), 131.17 (C₉), 130.35 (C₁₀), 128.71 (C₆), 127.01 (C₇), 110.49 (C₁₄), 51.63 (C₄), 38.41 (C₃)</p>
--	--

7.1.7 Síntesis de (N-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y N-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)



R: 1) 4-COCH₃, 2) 3-COOH 3)3-COCH₃

R₂: 3,4-dimetoxibencilo

I) DMF/DMA, 100°C II) ArNH₂, AcOH, reflujo, 3h III) H₂, Pd/C 10%, 2h

IV) Cloruro de 3,4-dimetoxibencilo, DIPEA

La ruta de síntesis de 5-nitro-4-anilinoquinazolininas reportada por (Li, Li, Lu, Xu, & Zhu, 2012) tiene como característica principal que permite la ciclación e incorporación del grupo anilino en dos pasos, con rendimientos entre un 80-90%. Por ello, fue la metodología de elección.

El primer paso, consiste en condensar la DMF/DMA con el grupo amino del 5-nitro-2-aminobenzonitrilo para producir la N'-(2-ciano-4-nitrofenil)-N,N-dimetilformamidina que posteriormente, en medio ácido, reacciona con la anilina correspondiente para formar la 6-nitro-4-anilinoquinazolinina y liberar dimetilamina.

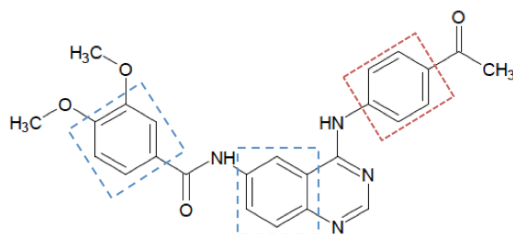
Posteriormente, se redujo el grupo nitro mediante hidrogenación catalizada por paladio adsorbido en carbono activado, al 10%, para finalmente, utilizarlo como núcleo en la formación de la carboxamida mediante el ataque nucleofílico al carbono sp^2 del cloruro de 3,4-dimetoxibencilo. La DIPEA se adicionó con función de desprotonar a la sal cuaternaria de amonio que se forma en el ataque anteriormente descrito, para así, finalmente dar origen a la carboxamida.

7.1.8 Caracterización espectroscópica de *N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11) y *N*-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)

La caracterización espectroscópica de **E11** y **E31** se llevó a cabo mediante sus espectros de RMN 1H , en los que se observó la correlación de las señales mediante las constantes de acoplamiento.

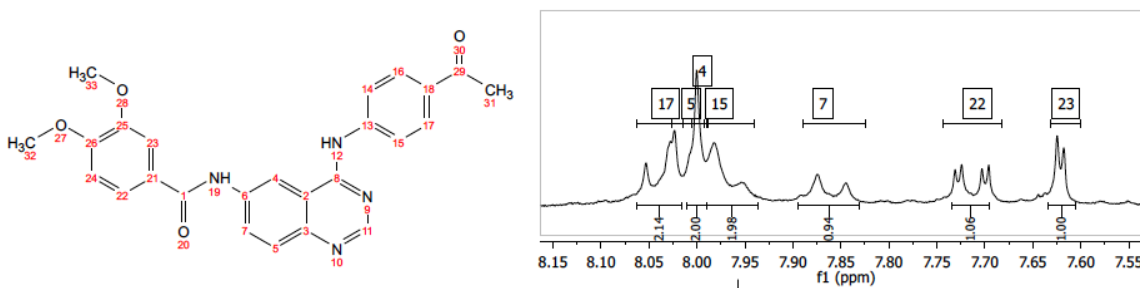
En el caso de E11, existen dos conjuntos de señales que pueden confundirse, debido a la 1,3,4-trisustitución (recuadros azul en figura 7.26). El conjunto de señales de la anilina que está sustituyendo la posición 4 de la quinazolina es un sistema AA'BB' (recuadro rojo en la figura 7.26) y por lo tanto es sencillo distinguirlo del resto de las señales. Una forma de distinguir las señales del anillo del 3,4-dimetoxibencilo fue que el sistema de estas señales está localizado en campo alto, respecto a las señales de los protones 5, 7 y 8 de la quinazolina, debido a que estos últimos están más desprotegidos por la resonancia de todo el núcleo de la quinazolina.

Figura 7.31 Sistemas de acoplamiento similares en las señales de RMN 1H de E11



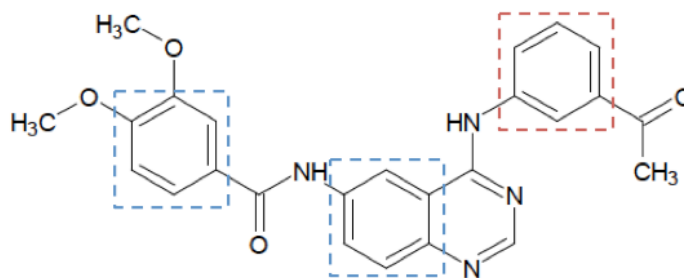
En el espectro, uno de los inconvenientes que se encontró, es que se sobreponen las señales del sistema AA'BB' de la anilina con 2 señales de la quinazolina, la correspondiente al doblete con una constante de acoplamiento 3J (orto) del protón de la posición 8, así como una señal que parece un singuete, pero que corresponde al protón de la posición 5, debido a que la resolución del equipo no fue suficiente para observar la separación en el doblete que tendría una constante de acoplamiento 4J (meta) y con un valor que oscila entre 1 y 2 hertz. La señal doble dobleteada (dd) correspondiente al protón de la posición 7 de la quinazolina fue observada como sólo un doblete ancho, debido a que la constante de acoplamiento 4J (meta) tampoco pudo observarse por la resolución del equipo.

Figura 7.32 Fragmento del espectro de RMN ^1H de E11



En el caso de E31, de nueva cuenta existen dos conjuntos de señales que pueden confundirse debido a la 1,3,4-trisustitución (recuadros azul en figura 7.28), pero que de nueva cuenta pudieron discriminarse gracias al efecto de anisotropia magnética, que provoca que las señales de la quinazolina se observen en la zona de campo bajo respecto a las señales del 3,4-dimetoxibencilo.

Figura 7.33 Sistemas de acoplamiento similares en las señales de RMN ^1H de E31



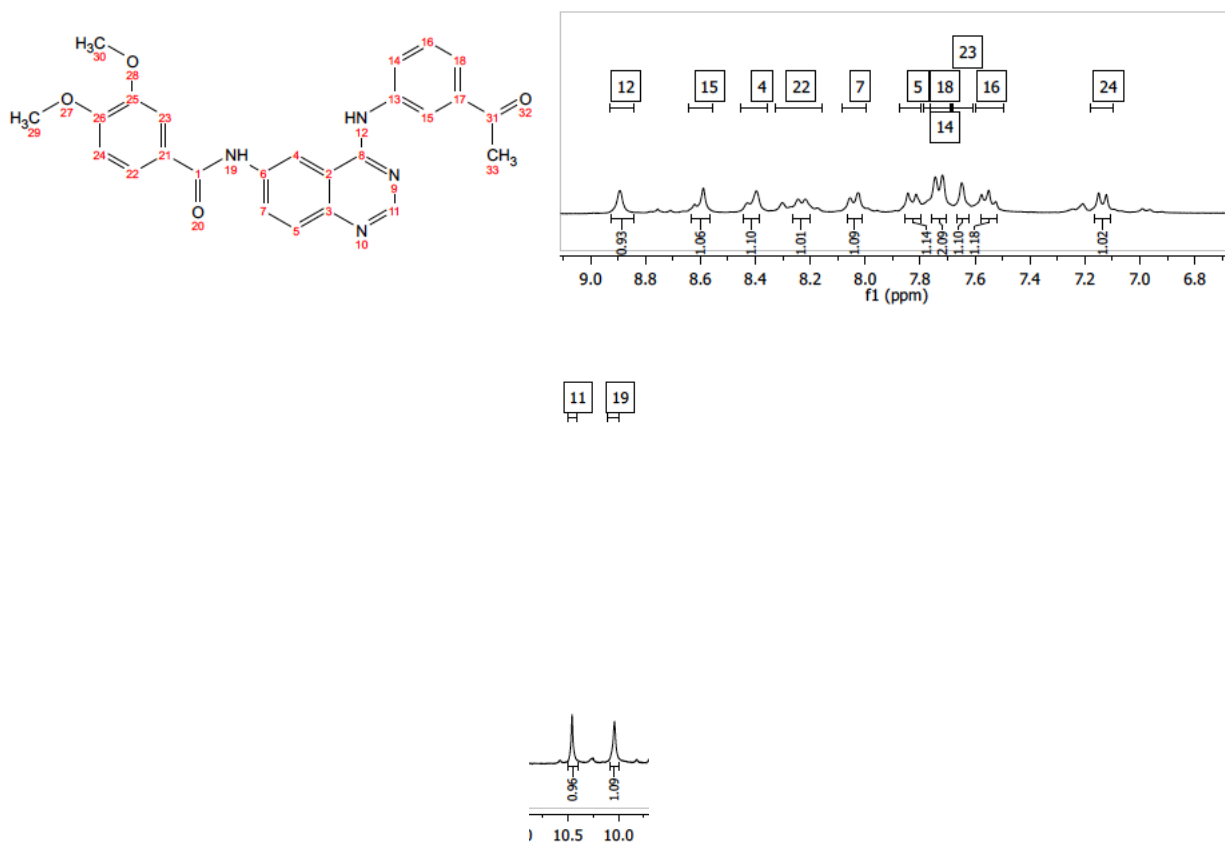
El conjunto de señales de la anilina es un sistema 1,3-disustituido, con lo cuál, se producen cuatro señales.

- La primera es un doble de dobles (dd) en el que se produce un acoplamiento con una constante 4J (meta) entre el protón de la posición 2 con el de la posición 4, al mismo tiempo que se produce un acoplamiento con una constante 4J (meta) entre el protón de la posición 2 con el de la posición 6. En el espectro (figura 7.29), se observa como una señal doble (d, protón 15), debido a que las constantes de acoplamiento son muy similares y la resolución del equipo no permite diferenciarlas, así que se ven ensanchadas dichas señales.
- La segunda señal, es un doble de doble de dobles (ddd) en el que se produce un acoplamiento con una constante 4J (meta) entre el protón de la posición 4 con el de la posición 2, al mismo tiempo que se produce un acoplamiento con una constante 4J (meta) entre el protón de la posición 4 con el de la posición 6 y finalmente, un acoplamiento con una constante 3J (orto) entre el protón de la posición 4 con el de la posición 5. Este mismo patrón es seguido por el protón de la posición 6, y en el espectro, únicamente se observó una señal doble (d), ancha, pero con una integral

para 2 protones, debido a que prácticamente es el mismo desplazamiento para estos protones (14 y 18).

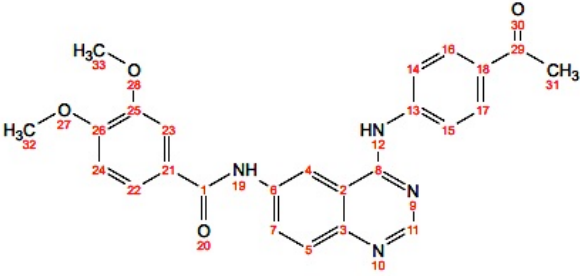
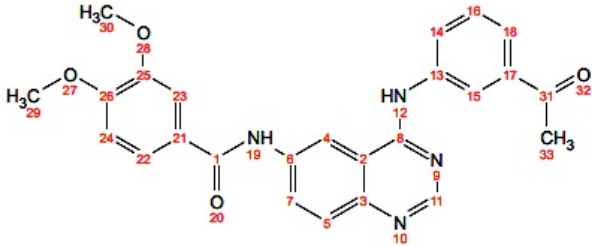
- La tercera señal, es un doble de dobles (dd) que se produce por un acoplamiento con una constante 3J (orto) entre el protón de la posición 5 con el de la posición 4, y un acoplamiento con una constante 3J (orto) entre el protón de la posición 5 con el de la posición 6. En el espectro, por ser tener valores muy similares, se observa como un pseudotriplete.

Figura 7.34 Fragmento del espectro de RMN 1H de E11



Las señales de los protones numerados como 4, 5 y 7 en el espectro fueron asignadas de acuerdo a sus constantes de acoplamiento y a los efectos electrónicos, es decir, dichas señales están ubicadas en campo bajo, respecto a las del 3,4-dimetoxibencilo. El protón de la posición 11, era la señal que tenía el mayor desplazamiento, según lo observado desde la caracterización de los intermediarios, al tiempo que forma parte de un sistema aromático en el que esa posición es la más desprotegida, debido a los efectos de resonancia.

Figura 7.35 Características espectroscópicas de los productos E11 y E31

 <p style="text-align: center;">E11 <i>N</i>-[4-(4-acetilaniilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida P.M.: 442.47 Aspecto: Polvo crema Rendimiento: 8.4% Punto de fusión: 261.3-262.5 Rf: 0.48 en Sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-NH) 3423,3434, (-CH) 3024, (C=O) 1680, 1600, (-OCH₃) 1267, 1169</p> <p>EM (DART)⁺ : 443 (M+1⁺), 477 (M*HCl⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.31 [(H₁₁)(s,1H)], 10.15 [(H₁₉)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O,)], 8.73 [(H₁₂)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O,)], 8.04 [(H_{16,17})(d, J = 8.9_{16,17-14,15} Hz, 2H)], 7.97 [(H_{14,15})(d, J = 8.9_{14,15-16,17} Hz, 2H)], 8.0 [(H₇)(d, J = 8.9₇₋₅, 1H)], 8.0 [(H₄)(s, 1H)], 7.87 [(H₅)(d, J = 8.9₅₋₇, Hz, 1H)], 7.71 [(H₂₂)(d, J = 8.5₂₂₋₂₄, 2.0₂₂₋₂₃ Hz, 1H)], 7.62 [(H₂₃)(d, J = 2.0₂₃₋₂₂ Hz, 1H)], 7.13 [(H₂₄)(d, J = 8.5₂₄₋₂₂ Hz, 1H)], 3.86 [(H₃₃)(s, 3H)], 3.84 [(H₃₂)(s, 3H)], 2.6 [(H₃₁)(s, 3H)].</p>
 <p style="text-align: center;">E31 <i>N</i>-[4-(3-acetilaniilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida P.M.: 442.47 Aspecto: Polvo naranja claro Rendimiento: 2.9% Punto de fusión: 265.0-270.2 Rf: 0.48 en Sistema II</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.46 [(H₁₁)(s,1H)], 10.04 [(H₁₉)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O,)], 8.89 [(H₁₂)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O,)], 8.59 [(H₄)(s, 1H)], 8.40 [(H₁₅)(s, 1H)], 8.22 [(H₂₂)(d, J = 8.4₂₂₋₂₄, Hz, 1H)], 8.04 [(H₇)(d, J = 7.8₇₋₅, Hz, 1H)], 7.83 [(H₅)(d, J = 7.8₅₋₇, Hz, 1H)], 7.73 [(H_{18,14})(d, J = 7.8_{18-16, 14-16}, 2H)], 7.65 [(H₂₃)(s, 1H)], 7.56 [(H₁₆)(t, J = 7.8₁₆₋₁₄₋₁₈ Hz, 1H)], 7.14 [(H₂₄)(d, J = 8.4₂₄₋₂₂, 1H)], 3.87 [(H₃₀)(s, 3H)], 3.86 [(H₂₉)(s, 3H)], 2.6 [(H₃₃)(s, 3H)].</p>

7.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el sistema XO-NBT

7.2.1 Actividad de atrapamiento de superóxido, mediante el sistema XO-NBT.

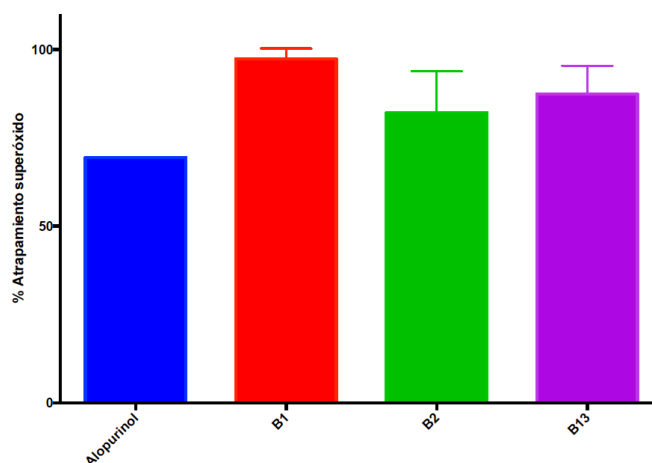
Dado que anteriormente se había propuesto estimar la actividad atrapadora de especies ROS para establecer la potencial actividad antioxidante que podría producirse *in vivo*, ya sea mediante el efecto directo de evitar la propagación por el atrapamiento de dichas especies, o indirectamente, al producir intermediarios que activarían la transcripción de genes directamente relacionados con las enzimas de defensa ante estrés oxidante, se propuso evaluar la actividad de atrapamiento de superóxido producido por la enzima xantina oxidasa bovina.

Dicha actividad, es estimada al medir la producción de formazán, un sustrato que es reducido por el superóxido. Es decir, entre mayor atrapamiento de superóxido existe, una menor señal de formazán se produce.

Como puede observarse, el alopurinol, a pesar de inhibir a la enzima casi en su totalidad, no atrapa al poco superóxido que se produce. Según al análisis estadístico (ANOVA, *post hoc* Dunnet, $\alpha = 0.05$, GraphPad Prism), existen diferencias significativas entre la actividad observada del compuesto **B1** y el alopurinol. Debe señalarse que se exploró la posibilidad de que el alopurinol reaccionará directamente con el nitroazul de tetrazolio (NBT), pero esto no sucedió, es decir, incubando en las mismas condiciones, sin añadir la enzima, no se produjo formazán. Esto también se realizó con todos los compuestos evaluados, pero la reducción del NBT a formazán no se llevó a cabo. Se plantean otros experimentos a futuro para explorar mejor el potencial reductor de los compuestos.

De acuerdo con este experimento, **B1** atrapa eficientemente al radical superóxido, aunque no se puede decir si dicho atrapamiento es directo, o indirecto al inhibir la enzima. De ahí radica entonces la razón para evaluar la actividad inhibidora de la enzima xantina oxidasa bovina, esta vez, con todos los compuestos sintetizados en este proyecto.

Figura 7.36 Promedio de porcentaje de atrapamiento de superóxido de las muestras (C=59.1 μ M)



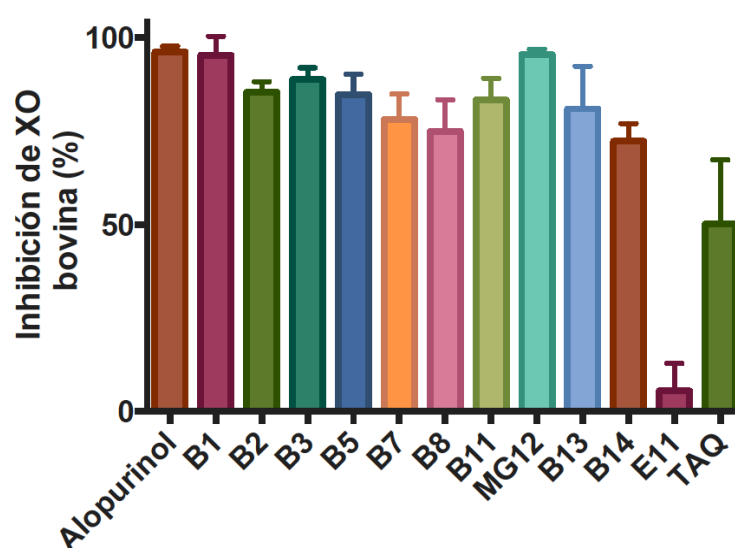
7.2.2 Actividad de inhibición de xantina oxidasa

De los resultados obtenidos en la evaluación de la inhibición de la xantina oxidasa bovina, se puede concluir que, a grandes rasgos, el núcleo de la quinazolin-2,4,6-triamina presenta características que producen la inhibición de la enzima, pero adicionalmente, cuando en la posición 6 se tiene una carboxamida bencílica, dicha actividad se incrementa sustancialmente.

Por otra parte, los aminos en la posición 2 y 4 son fundamentales para que se produzca dicha inhibición, pues si bien es cierto que la enzima cataliza la oxidación de carbonos sp^2 de sistemas aromáticos, en el caso de **E11**, el impedimento estérico de la anilina es un factor que puede ser determinante para la interacción entre la enzima y el compuesto. Esto se exploró a mayor profundidad con los estudios de docking.

Finalmente, si bien fueron 6 los compuestos que potencialmente habían presentado una actividad de inhibición similar al alopurinol, entre estos, MG12 posee como característica estructural un núcleo capaz de formar puentes de hidrógeno en las posiciones 2 y 4, como los derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina, y por ello, se puede presuntivamente atribuir a esta interacción la actividad observada.

Figura 7.37 Promedio de porcentaje de inhibición de XO de las muestras



En lo referente a la actividad atrapadora de superóxido evaluada anteriormente, si bien, no se puede descartar del todo que los compuestos evaluados pueden atrapar al superóxido, al menos con este método (XO-NBT) no se puede decir que efectivamente la actividad observada se debió a este efecto, ya que es un hecho que todos los compuestos evaluados inhiben a la XO, y consecuentemente la producción de superóxido no pudo llevarse a cabo en la misma proporción en todos los experimentos descritos.

7.2.3 Determinación de la concentración inhibitoria media de B1, B3 y MG12

Los resultados de concentración inhibitoria media de la enzima xantina oxidasa bovina se presentan a continuación. Se observó que existe un intervalo de confianza muy grande para **B3**, debido a la dispersión en los valores de inhibición obtenidos. Sin embargo, respecto a **B1** y **MG12**, se observa que sus CI_{50} son menores que el alopurinol, por lo tanto, potencialmente podrían ser también inhibidores de la XO humana.

Figura 7.38 Concentraciones inhibitorias medias de los compuestos evaluados.

	Alopurinol	B1	B3	MG12
CI_{50} (μ M)	6.788	1.461	3.052	3.085
Intervalo de confianza (95%) CI_{50}	5.305 to 8.686	1.018 to 2.096	0.9121 to 10.21	1.601 to 5.943

Se debe explorar a detalle el mecanismo de acción mediante el cuál podría estarse observando este efecto, ya que como se mencionó en los antecedentes, el alopurinol inhibe a la enzima, pero de acuerdo a la concentración que se utilice, puede convertirse en su sustrato, y con ello, la producción de superóxido continúa, lo cual puede generar estrés oxidante. Esta es una desventaja actual en la utilización del alopurinol como parte del tratamiento de hiperuricemia, característica principal de padecimientos como la gota, o bien como efecto adverso de medicamentos usados en la terapia del cáncer. (Galbusera, Spector, Orth, Fedida, & Ezrin, 2005)

Por esta razón, algunos planes que se tienen para explorar la actividad observada de los derivados sintetizados incluyen la realización de experimentos en los que se pueda hacer una aproximación del posible mecanismo de inhibición, por ejemplo, para saber si es reversible o irreversible; o si es reversible, pero de tipo competitivo, por ejemplo, y con ello tener más información que pueda fortalecer su posterior aplicación terapéutica.

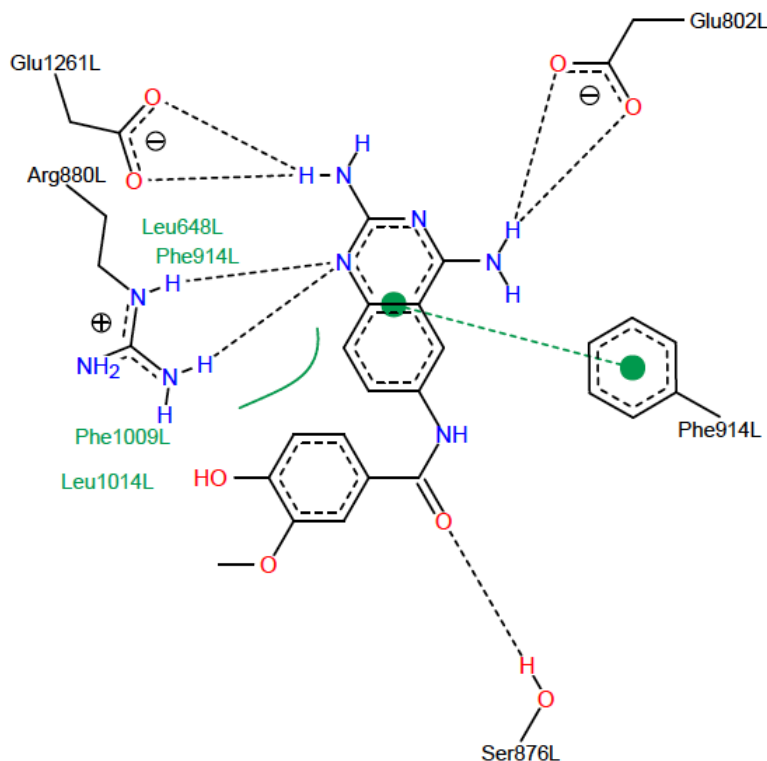
Adicionalmente, como se mencionó en los antecedentes, el metotrexato es un fármaco que produce la inhibición de otras enzimas directamente relacionadas entre sí, por ser NADPH deshidrogenasas, por lo que resultan relevantes los resultados obtenidos, en vista de que la enzima utilizada pertenece a este tipo de proteínas.

7.3 Estudios de acoplamiento molecular de la Xantina Oxidasa de *Bos taurus* con las moléculas sintetizadas.

Algunos resultados interesantes que se pueden analizar con respecto a los estudios de acoplamiento, es que se pudo confirmar que el scaffold o andamio estructural utilizado en el diseño de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina interactúa con al menos 5 residuos de la enzima, lo cuál podría ser la causa de la inhibición observada. En la figura 7.32 puede observarse un ejemplo del resultado del acoplamiento de **B1** en la xantina oxidasa bovina.

De estos estudios, se obtuvieron valores estimados de energías de unión, pero para poder explorar otros posibles sitios de unión que puedan aproximarse más a los resultados experimentales observados, se realiza un estudio de docking ciego, debido a que es importante tratar de establecer si el mecanismo de inhibición es similar o no al del alopurinol, lo cuál, como se ha mencionado, es una limitante en su utilización actualmente dado que bajo ciertas condiciones, se vuelve sustrato de la enzima, siendo una fuente de producción de superóxido.

Figura 7.39 Interacciones de los residuos de aminoácidos de la xantina oxidasa bovina con B1 (Elaborado con PoseView, software de la Universidad de Hamburgo)



7.4 Estudios de actividad citotóxica

Este estudio se llevó a cabo con dos de los compuestos que mostraron mayor actividad inhibidora sobre la XO. La línea celular utilizada fue la HCT-15 proveniente de un adenocarcinoma colorectal.

Los resultados obtenidos después de exponer las células mencionadas a los compuestos **B1**, **B3** y metotrexato durante 48 h, fueron 28, 32 y 89 %, respectivamente.

Aunque los compuestos sintetizados presentaron una actividad menor que el metotrexato, marcan la pauta como inhibidores de la XO que también afectaron el crecimiento celular. Estos dato colocan a los compuestos **B1** y **B3** como estructuras prototipos para posteriores estudios de optimización.

Figura 7.40 Actividad citotóxica frente a la línea HCT-15*

Compuesto	% inhibición a las 48 h, a 100 mM
B1	28
B3	32
Metotrexato	89
Control negativo	0

*Adenocarcinoma colorectal

8. Conclusiones

Para la síntesis de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas se realizó una ruta sintética alterna a la inicialmente estudiada por nuestro grupo de investigación y con la que se obtuvieron rendimientos moderados. El enfoque de dicha ruta no es divergente, sin embargo, la posibilidad de obtener las carboxamidas sin otros productos secundarios es una característica que puede ser de utilidad.

En nuestros estudios quedó demostrado que los grupos aminos en las posiciones 2 y 4 del núcleo de la quinazolina son necesarios para comportarse como inhibidores de la xantina oxidasa, por lo que estudios posteriores deben de estar encaminados a seguir explorando esta posición manteniendo constante a los grupos amino de las posiciones 2 y 4.

Los resultados alcanzados en este trabajo son una fuente de información importante para iniciar estudios posteriores que nos lleven a la obtención de compuestos con mayor potencia en su actividad biológica. Hasta esta parte, no se lograron obtener compuestos de mayor potencia citotóxica que el fármaco de referencia (metotrexato), aunque aún sigue en proceso la evaluación de toda la serie de compuestos.

Los resultados de la actividad antioxidante evaluada con el método de la Xantina Oxidasa para el atrapamiento de radical superóxido deben ser confirmados por otro método, en el que no existan otros fenómenos que enmascaren la señal que se analice.

Finalmente, respecto a los estudios de los sitios en los que las moléculas podrían metabolizarse con mayor facilidad, se pudo determinar que si estos compuestos se administran a seres humanos, los riesgos de efectos adversos por la toxicidad de los metabolitos podrían ser menores. Incluso, si se aplican como parte de la terapia contra cáncer, se podría esperar un efecto prooxidante promotor de la citotoxicidad, con las implicaciones benéficas deseadas. En este sentido, aún falta explorar otras cuestiones, pero el grupo de investigación seguirá trabajando para aportar solidez a la información.

9. Referencias

1. Adams, S. (2010). *Molecular Similarity and Xenobiotic Metabolism*. Trinity College, Cambridge University. Cambridge: Tesis para obtener el grado de PhD.
2. Ajani, O. (2014). Present status of quinoxaline motifs: Excellent pathfinders in therapeutic medicine. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 688-715.
3. Böhm, H., Flohr, A., & Stahl, M. (2004). Scaffold hopping. *Drug Discovery Today: Technologies* , 217-224.
4. Bailey, L. (2010). *Folate in Health and Disease*. Florida: CRC Press.
5. Berman, J., King, M., & Edwards, N. (1989). Antileishmanial activities of 2,4-diaminoquinazoline putative dihydrofolate reductase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1860-1863.
6. Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry* , 1-15.
7. Boyer, S., & Zamora, I. (2002). New methods in predictive metabolism. *Molecular Diversity* , 403-413.
8. Boyer, S., Arnby, C., Carlsson, L., Smith, J., Stein, V., & Glen, R. (2007). Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations. *Journal of Chemical Information and Modeling* , 583-590.
9. Bravo, M., Castañeda, P., & Quijano, A. (2012). Determinación del mecanismo de acción de la actividad antioxidante de compuestos de origen natural. In M. Bravo, J. Cornejo, F. Hernández, P. J., A. Pérez, S. F., et al., *Manual de guiones experimentales para la enseñanza y aprendizaje del laboratorio de Toxicología (clave 1614)*. México, D.F.: Facultad de Química.
10. Cairns, R., Harris, I., & Mak, T. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* , 85-95.
11. Carlsson, L., Spjuth, O., Adams, S., Glen, R., & Boyer, S. (2010). Use of historic metabolic biotransformation data as a means of anticipating metabolic sites using MetaPrint2D and Bioclipse. *BMC bioinformatics* , 362-369.
12. Caron, S. (2011). *Practical Synthetic Organic Chemistry: Reactions, Principles, and Techniques*. Nueva Jersey: Wiley.
13. Connolly, D. J., Cusack, D., O'Sullivan, T., & Guiry, P. (2005). Synthesis of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron* , 61, 10153-10202.
14. Davoll, J., & Johnson, A. (1970). Quinazoline analogues of folic acid. *Journal of Chemical Society C* , 997-1002.

15. Davoll, J., Johnson, A., H., D., O., B., J., C., & E., E. (1972). Folate Antagonists. 2. 2,4-Diamino-6-([aralkyl and (heterocyclic)methyl] amino)quinazolines, a novel class of antimetabolites of Interest in drug-resistant malaria and Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry* , 812-826.
16. Delgado, A., Minguillón, C., & Joglar, J. (2015). *Introducción a la química terapéutica* (2ª edición ed.). Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
17. Elslager, E., Bird, O., Clarke, J., S., P., Worth, D., & Davoll, J. (1972). Folate Antagonists. 9. 2,4-Diamino-6- [(aralkyl)alkylaminol quinazolines, a potent class of antimetabolites with prodigious antimalarial effects. *Journal of Medicinal Chemistry* , 1138-1146.
18. Edwards, P., Albert, J., Sylvester, M., Aharony, D., Andisik, D., Callaghan, O., et al. (2007). Application of fragment-based lead generation to the discovery of novel, cyclic amidine \square -secretase inhibitors with nanomolar potency, cellular activity, and high ligand efficiency. *Journal of Medicinal Chemistry* , 5912-5925.
19. Ekins, S. (2014). Progress in computational toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* , 115-140.
20. Fang, J., Seki, T., & Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 290-302.
21. Galal, S., Hegab, K., Kassab, A., Rodriguez, M., Kerwin, S., M. A., et al. (2009). New transition metal ion complexes with benzimidazole-5-carboxylic acid hydrazides with antitumor activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 1500-1508.
22. Galbusera, C., Spector, T., Orth, P., Fedida, D., & Ezrin, A. (2005). Superoxide Radical Production by Allopurinol and Xanthine Oxidase. *Journal of Cardiac Failure* , S160.
23. Gangjee, A., & ál., e. (1998). Structure-based design and synthesis of lipophilic 2,4-diamino-6- substituted quinazolines and their evaluation as inhibitors of dihydrofolate reductases and potential antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry* , 3426-3434.
24. Gangjee, A., Adair, O., Pagley, M., & Queener, S. (2008). N9-substituted 2,4-diaminoquinazolines: Synthesis and biological evaluation of lipophilic inhibitors of *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* , 6195-6200.
25. Gangjee, A., Namjoshi, O., Raghavan, S., Queener, S., Kisliuk, R., & Cody, V. (2013). Design, synthesis, and molecular modeling of novel pyrido[2,3-d]pyrimidine analogues as antifolates; Application of buchwald-hartwig aminations of heterocycles. *Journal of Medicinal Chemistry* , 4422-4441.
26. García, G. (2010). *Preparación de conjugados de bencimidazoles antiparasitarios con aminoácidos*. UNAM. México: Tesis para obtener el grado de QFB.

27. Gilbert, I. (2002). Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* , 249-257.
28. Gonen, N., & Assaraf, Y. (2012). Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates* , 183-210.
29. Hess, J., & Khasawneh, M. (2015). Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. *BBA Clinical* , 152-161.
30. Hess, J., & Khasawneh, M. (2015). Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. *BBA Clinical* , 152-161.
31. Holmström, K., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling . *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* , 411-421.
32. Instituto Nacional del Cáncer. (9 de Febrero de 2015). *Sitio web del Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud de EU*. Retrieved 29 de Abril de 2015 from ¿Qué es el cáncer?: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
33. Jackman, A. (1999). *Antifolate drugs in cancer therapy*. Nueva York: Springer.
34. Joule, J., & Mills, K. (2010). *Heterocyclic Chemistry*. Sussex: Wiley.
35. Kubinyi, H. (2001). Hydrogen bonding: The last mystery in drug design? *Combinatorial Chemistry* , 513-524.
36. Lewis, A., Murphy, L., McCalla, C., Fleary, M., & Purcell, S. (1984). Inhibition of mammalian Xanthine Oxidase by folate compounds and amethopterin. *Journal of Biological Chemistry* , 12-15.
37. Li, H., Li, D., Lu, X., Xu, Y., & Zhu, H. (2012). Design and synthesis of 4,6-substituted-(diaphenylamino)quinazolines as potent EGFR inhibitors with antitumor activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* , 317-323.
38. Li, X., Gao, N., & Zhang, H. (2009). Natural inspirations for antioxidant drug discovery. *Drug Discovery Today* , 910-912.
39. Limón, J., & Gonsebatt, M. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 137-147.
40. Matus, S. (2013). *Síntesis de derivados de la 2,4,5-triaminquinazolina como posibles agentes antiparasitarios*. UNAM. México: Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias.
41. Mendoza, C. (2009). *Síntesis, evaluación biológica y estudios in silico de moléculas diseñadas como híbridos contra Trypanosoma cruzi*. UNAM. México: Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

42. Mendoza, C., Correa, J., Nieto, R., Márquez, A., Aguilar, R., Montero, M., et al. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 296-307.
43. Mendoza, C., Galindo, N., Correa, J., Ugalde, V., Rodríguez, R., Hernández, J., et al. (2015). Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 314-331.
44. Montalbetti, C., Falque, V., Park, M., & Ox, A. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* , 10827-10852.
45. Motulsky, H., & Christopoulos, A. (2004). *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting*. NY: Oxford University Press.
46. Niles, J., Wishnok, J., & Tannenbaum, S. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* , 109-121.
47. Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* , 503-515.
48. Okamoto, K., Kusano, T., & Nishino, T. (2013). Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase. *Current pharmaceutical design* , 2606-2614.
49. Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., & Vyvyan, J. (2009). *Introduction to Spectroscopy*. Belmont: Cengage Learning.
50. Phillips, M. (1928). The formation of 2-substituted benzimidazoles. *Journal of the Chemical Society* , 2393-2399.
51. Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. (2009). *Structure Determination of Organic Compounds*. Zürich: Springer.
52. R., H. (2002). Structure and function of Xanthine Oxidoreductase : Where are we now? *Free radical biology and medicine* , 774-797.
53. R., R., & R., R. (2005). Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 3175-3176.
54. Rodrigues, R., Barros, I., & Lima, E. (2005). Mild one-pot conversion of carboxylic acids to amides or esters with Ph₃P/trichloroisocyanuric acid. *Tetrahedron Letters* , 5945-5947.
55. Rosales, V. (2015). *Síntesis de derivados de quinazolina con potencial actividad citotóxica*. UNAM. México: Tesis para obtener el grado de Q.F.B.

56. Schmitt, C. (2003). Senescence, apoptosis and therapy - cutting the lifelines of cancer. *Nature reviews. Cancer* , 286-295.
57. Silverman, R. B. (2004). In R. B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action* (Segunda edición ed.). Elsevier.
58. Sirota, R., Gibson, D., & Kohen, R. (2015). The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biology* , 48-59.
59. Sporn, M., & Liby, K. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer* , 564-571.
60. Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., & Ito, H. (2010). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* , 170-177.
61. Thurmond, J., Butchbach, M., Palomo, M., Pease, B., Rao, M., Bedell, L., et al. (2008). Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2 , 4-Diaminoquinazoline Derivatives as SMN2 Promoter Activators for the Potential Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Medicinal Chemistry* , 449-469.
62. Tomašić, T., Zidar, N., Rupnik, V., Kovač, A., Blanot, D., Gobec, S., et al. (2009). Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid-based inhibitors of MurD ligase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* , 153-157.
63. WHO Media Centre. (- de Febrero de 2015). *Nota descriptiva del Cáncer No. 297*. Retrieved 29 de Abril de 2015 from Centro de prensa de la Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
64. Zhang, H., Yang, D., & Tang, G. (2006). Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discovery Today* , 749-754.

Información General de la Síntesis y Caracterización de los Compuestos

La síntesis de los compuestos se realizó con disolventes, reactivos de las compañías Sigma-Aldrich™, Merck™ y J.T.Baker™ sin purificar.

Para pesar la cantidad requerida de reactivos, se usaron las balanzas analíticas Sartorius™ AZ10P y Adventurer Ohaus™, así como las balanzas granataria E4000 y Scout Pro Ohaus™.

Las reacciones se llevaron a cabo en las parrillas de agitación y calentamiento controlado IKA; y las reacciones de hidrogenación catalítica se llevaron a cabo en el hidrogenador Paar™ 3916EG.

El seguimiento de las reacciones se hizo mediante cromatografía en capa fina, mediante placas de vidrio recubiertas con gel de sílice y fluoresceína GF 254 de Merck™, usando los sistemas de elución de la tabla 1 y fueron reveladas con una lámpara de luz ultravioleta Spectroline® ENF-240C de onda corta (254nm) y larga (257nm) y vapor de yodo.

Tabla 1. Sistemas de elución empleados

Sistema	Disolventes	Proporción
I	CHCl ₃ :MeOH	99:1
II	CHCl ₃ :MeOH	95:05
III	CHCl ₃ :MeOH	9:1
IV	CHCl ₃ :MeOH	8:2
V	2-ButOH: Ácido acético:H ₂ O	80:20:5

Para la cromatografía en columna abierta se usó gel de sílice 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 370, de Merck™.

La destilación a presión reducida de los disolventes se llevó a cabo en los rotaevaporadores con condensador de dedo frío:

- Rotaevaporador IKA™ RV-10 digital con condensador de dedo frío Coated S IKA™, adaptado a una bomba de vacío Vacuubrand PC160 con regulador CVC-2^{II} y refrigerante de espiral Brinkmann.
- Rotaevaporador Büchi RC-144 con una bomba de vacío Vacuubrand PC160, con regulador CVC-2^{II} y baño de calentamiento Büchi B-480, adaptado a un enfriador VWRW scientific 117.
- Rotaevaporador R-205 con una bomba de vacío Büchi modelo V-800, controlador V-500 y un baño de calentamiento R-490.

La determinación de los puntos de fusión con capilares, sin corregir, se hizo en un aparato Electrothermal, marca Equipar.

Los espectros de infrarrojo fueron elaborados en la USAI de la Facultad de Química de la UNAM por la Q. Maricela Gutierrez Franco en un espectrofotómetro de FTIR / FIR 400 de Perkin-Elmer. (Reflectancia atenuada ATR).

Los espectros de masas mediante IE o FAB de baja resolución fueron realizados a su vez en el espectrómetro de masas Thermo de la USAI por la Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci, y los de los compuestos A12, B1, B13, B14 y E11 de baja resolución, y alta resolución de todos los compuestos sintetizados se realizaron en el laboratorio de espectrometría de masas del Instituto de Química, mediante la técnica de DART (*Direct Analysis in Real Time*) por el Dr. Francisco Javier Pérez Flores y el I.Q. Luis Velasco Ibarra.

Se utilizó DMSO-d₆ Sigma Aldrich™ y CIL™ para las muestras de RMN. La DMF-d₇ fue proporcionada por el laboratorio de RMN de la USAI.

Los espectros de los intermediarios (AMB y A1-A14, E11 y E31) fueron adquiridos en el espectrómetro de RMN de 7.2 Varian-Unity Inova de la USAI, FQ, UNAM, previa capacitación de uso por la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales.

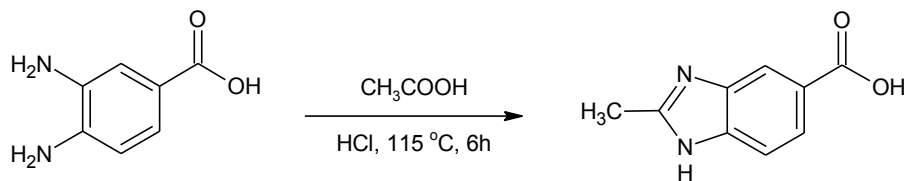
Los espectros de RMN de los compuestos finales (B1-B14 y MG12) se realizaron por la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, y la Dra. Minerva Monroy en el espectrómetro de RMN de 9.4 T Varian-VNMRS y en el espectrómetro de RMN de 9.4 T Varian-MR de la USAI, FQ, UNAM.

Los desplazamientos químicos (δ) se encuentran especificados en ppm con relación al TMS.

La multiplicidad de las señales está descrita con la siguiente notación:

- s : Singulete
- d : Doblete
- dd : Doble doblete
- ddd : Doble doblete de dobletes
- t : Triplete
- m : Señal múltiple compleja (principalmente por solapamiento de señales)

Síntesis de ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico (AMB)



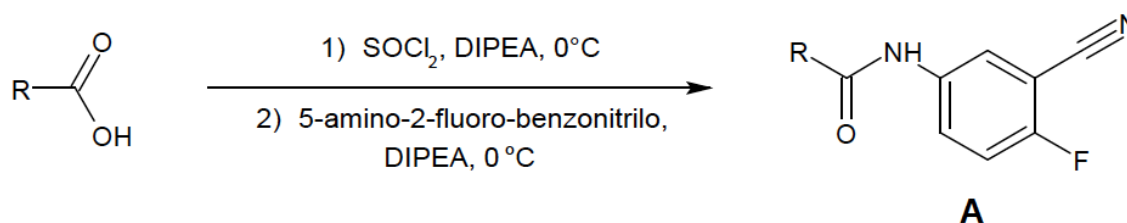
En un matraz bola de 100mL se pesaron 5.04g de ácido 3,4.diaminobenzoico (33.12mmol) y se agregó 50mL de ácido acético glacial, así como 0.3mL de ácido clorhídrico concentrado y se colocó en agitación, a reflujo, a una temperatura de 115°C, durante 6 horas.

Una vez que se enfrió la mezcla, se adiciono solución de KOH 4M hasta un pH de 4, y se filtró el sólido café. Posteriormente, se disolvió dicho sólido en 30mL de una solución 2M de KOH, añadiéndose carbón activado en una proporción del 15%, y se agitó a reflujo por 5 horas.

La solución se filtró en caliente por un embudo de vidrio poroso, y se llevó a un pH de 4 con HCl concentrado. El sólido blanco que precipitó, se filtró y se dejó secar por 2 días. Después de triturarlo y secarlo en la estufa por 1 día, se pesó, obteniéndose 5.44g de un sólido blanco (30.93mmol), con un rendimiento del 93% y Rf de 0.36 (Sistema IV).

Clave	Molécula	Información espectroscópica
AMB	<p>Ácido 2-metil-1H-bencimidazol-5-carboxílico</p> <p>P.M.: 176.17 Aspecto: Polvo blanco Rendimiento: 93.4% Punto de fusión: 300.4-301.1 Rf: 0.36 (Sistema IV)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 12.84-12.17 [(H₈)(s, 1H)], 8.05 [(H₃)(s, 1H)], 7.75 [(H₂)(dd, J = 8.4(2-4), 1.6(2-3) Hz, 1H), 7.50 [(H₄)(d, J=8.4 Hz, 1H)], 2.51 [(H₁₃)(s, 3H)]</p>

Procedimiento general para la síntesis de las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas (A1-A14)



En un matraz bola seco de 100mL de boca 20X40, se pesaron las cantidades de ácido indicadas en la tabla 2, y se disolvió o suspendió dicho compuesto en tolueno, mediante agitación, en un baño de hielo. A continuación, se adiciono la cantidad de DIPEA marcada en la tabla, y continuó la agitación por al menos 10 minutos más.

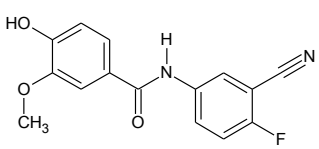
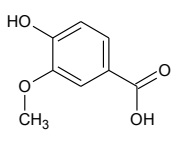
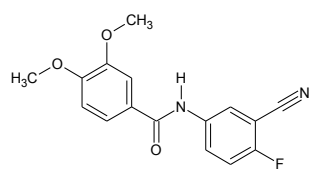
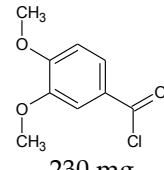
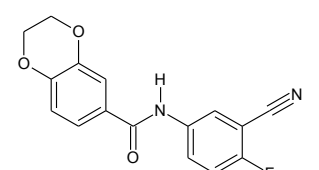
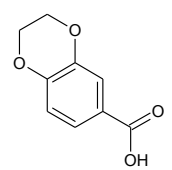
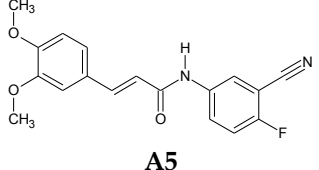
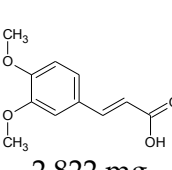
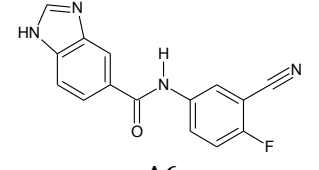
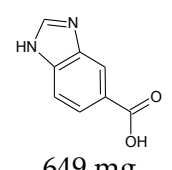
Seguidamente, se adiciono gota a gota el SOCl_2 , y se monitoreo el avance de la reacción, mediante la formación del éster metílico de muestras tomadas cada hora. Una vez que se terminó la formación del cloruro, se evaporo a presión reducida la mezcla de tolueno y SOCl_2 , (4x20mL).

El cloruro de acilo formado, se disolvió o suspendió en cloroformo, con agitación en baño de hielo, y se adiciono gota a gota, mediante un embudo de adición, una solución de 5-amino-2-fluorobenzonitrilo con DIPEA en cloroformo.

Se monitoreo la reacción nuevamente y finalmente, el tratamiento general de la reacción fue filtrar la solución, y realizar una extracción en medio básico, con solución de Na_2CO_3 al 4% (pH=12), y en medio ácido, con solución de ácido cítrico al 1% (pH=2). Posteriormente, se lavó la fase orgánica con agua destilada. La fase orgánica, se secó con sulfato de sodio, evaporó, y se recristalizo en algunos casos.

En la tabla 3, se reportan las características principales de cada uno de los compuestos. así como la información espectroscopica de dichas moléculas.

Tabla 2: Cantidades empleadas de reactivos usados en las dos etapas de la reacción de síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas y características físicas de los productos

Clave de la <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamida sintetizada y características	1° Etapa de la reacción: Formación del cloruro de acilo			2° Etapa de la reacción: Formación de la carboxamida	
	Ácido empleado (Cantidad en mg)	SOCl ₂ (Volumen en mL)	DIPEA (Volumen en mL)	5-amino-2-fluoro benzonitrilo (Cantidad en mg)	DIPEA (Volumen en mL)
 A1 <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida	 1,500 mg (8.9 mmol)	3.6 mL (49.5 mmol)	2.4 mL (13.5 mmol)	925 mg (6.8 mmol)	1.4 mL (7.9 mmol)
 A2 <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida	 230 mg (1.15 mmol)			135 mg (0.99 mmol)	0.26 mL (1.5 mmol)
 A3 <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida	 1,994 mg (11.1 mmol)	4.0 mL (55.1 mmol)	4.0 mL (23 mmol)	1,230 mg (9 mmol)	2.0 mL (11.5 mmol)
 A5 (2E)- <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida	 2,822 mg (13.6 mmol)	5.2 mL (71.6 mmol)	4.7 mL (27 mmol)	1,706 mg (12.5 mmol)	2.8 mL (16.1 mmol)
 A6 <i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida	 649 mg (4 mmol)	1.6 mL (22 mmol)	1.1 mL (6.3 mmol)	273 mg (2.0 mmol)	0.45 mL (2.6 mmol)

Apéndice I: Procedimientos Experimentales de Síntesis y Caracterización de Compuestos

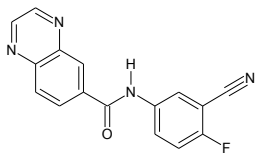
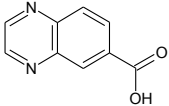
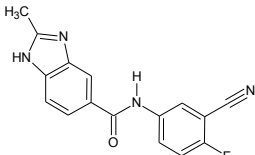
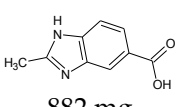
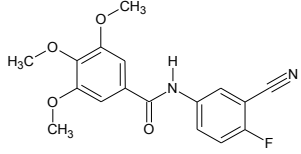
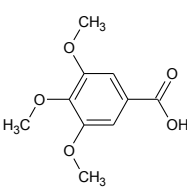
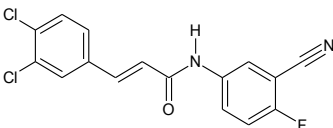
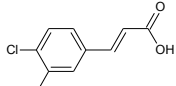
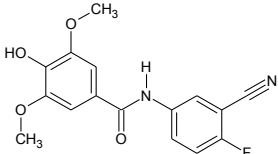
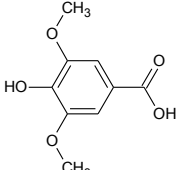
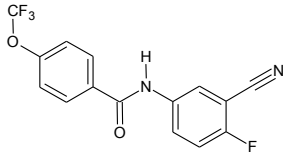
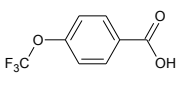
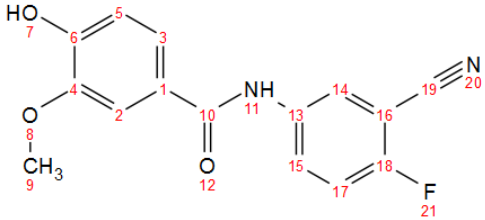
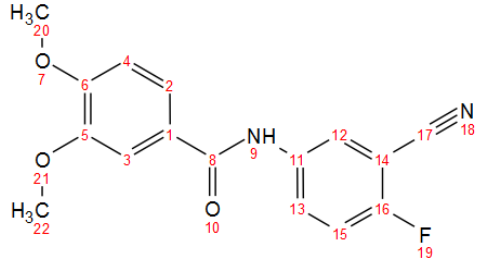
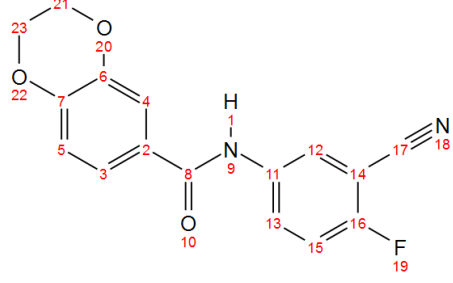
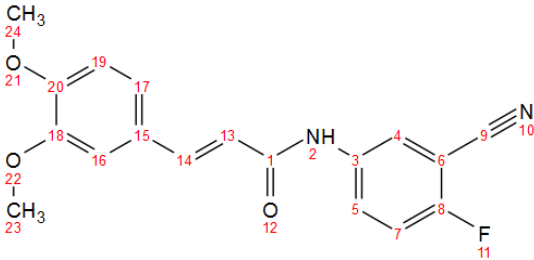
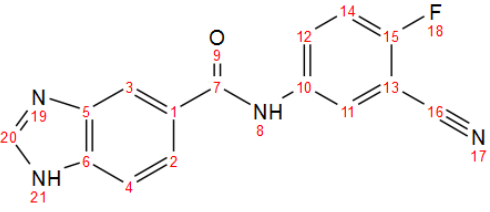
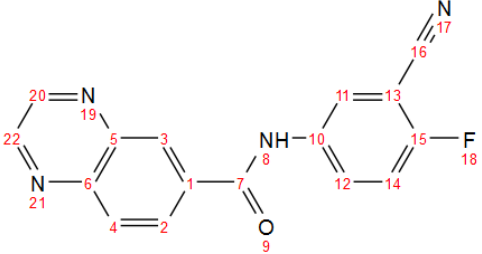
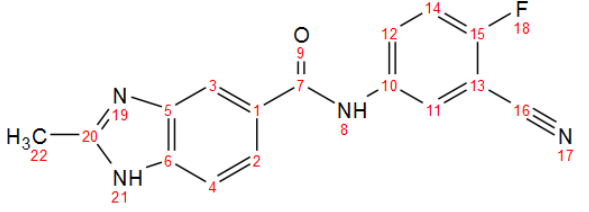
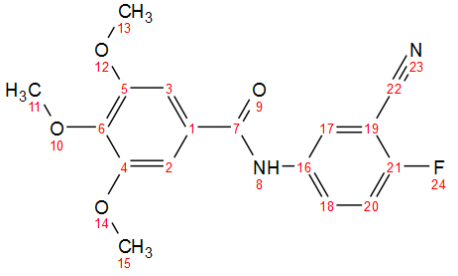
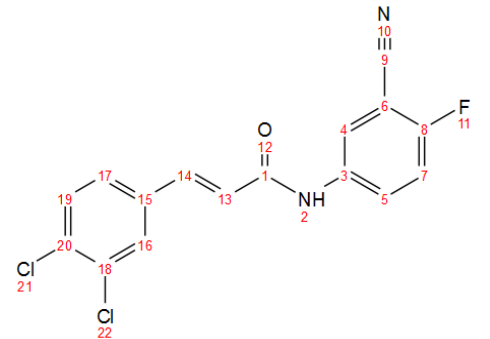
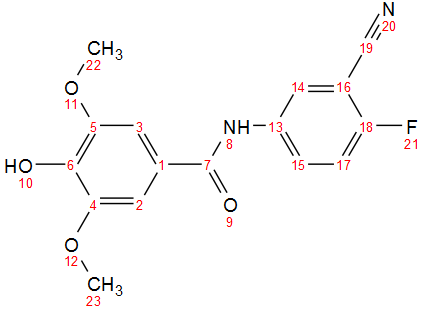
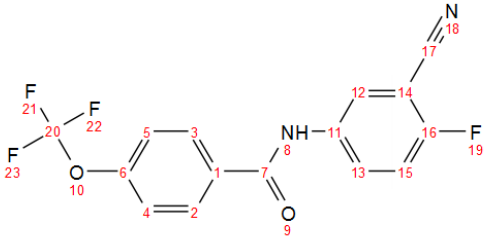
 <p>A7 N-(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida</p>	 <p>517 mg (3 mmol)</p>	1.2 mL (16.5 mmol)	1.05 mL (6 mmol)	353 mg (2.6 mmol)	0.5 mL (3 mmol)
 <p>A8 N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida</p>	 <p>882 mg (5 mmol)</p>	2.0 mL (28 mmol)	1.3 mL (7.5 mmol)	582 mg (4.3 mmol)	0.9 mL (5 mmol)
 <p>A11 N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida</p>		Compuesto sintetizado por alumna de Servicio Social			
 <p>A12 (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida</p>	 <p>1140 mg (5.3 mmol)</p>	2.0 mL (28 mmol)	1.2 mL (6.9 mmol)	678 mg (5.0 mmol)	1.2 mL (6.9 mmol)
 <p>A13 N-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida</p>	 <p>842 mg (6.2 mmol)</p>	1.7 mL (23.4 mmol)	1.5 mL (8.6 mmol)	519 mg (3.8 mmol)	0.8 mL (4.4 mmol)
 <p>A14 N-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida</p>	 <p>461 mg (2.4 mmol)</p>	1.0 mL (13.8 mmol)	0.8 mL (4.8 mmol)	281 mg (2.1 mmol)	0.5 mL (3 mmol)

Tabla 3. Información espectroscópica de los derivados sintetizados

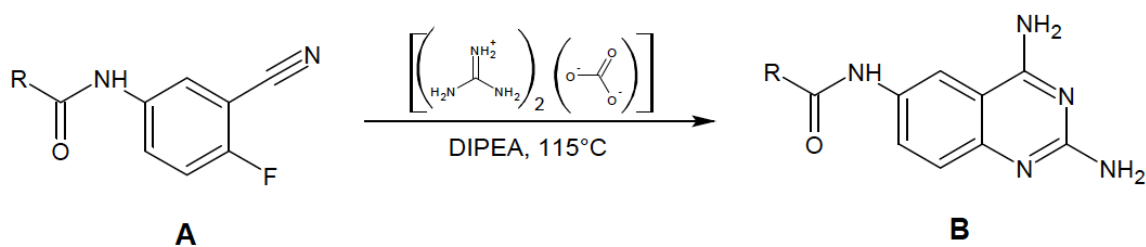
Derivado	Información espectroscópica
 <p style="text-align: center;">A1</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 286.26 Aspecto: Polvo color crema Rendimiento: 44% Punto de fusión: 206.4-209.3 Rf: 0.51 (Sistema II)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.32 [(H₁₁)(s, 1H)], 8.25 [(H₁₄)(dd, J = 6.1_{(14-21(F))}, 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 8.05 [(H₁₅)(ddd, J = 7.81₍₁₅₋₁₇₎, 5.02_{(15-21(F))}, 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.55 [(H₁₇)(t, J = 9.2_{(17-15-21(F))} Hz, 1H)], 7.51 [(H₂)(s, 1H)] 7.49 [(H₃)(d, J = 7.8₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 6.89 [(H₅)(d, J = 7.8 Hz, 1H)], 3.85 [(H₉)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.19 [(F₂₁)]</p>
 <p style="text-align: center;">A2</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 300.28 Aspecto: Polvo blanco mate Rendimiento: 93 Punto de fusión: 254.4-255.1 Rf: 0.64 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3409, (-NH₂) 3402, 3409, (-CN) 2236, (C=O) 1670, (-OCH₃) 2844, 1269, 1158</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 300</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.39 [(H₉)(s, 1H)], 8.25 [(H₁₂)(dd, J = 5.2_{(12-19(F))}, 3.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.06 [(H₁₃)(ddd, J = 8.3₍₁₃₋₁₅₎, 4.26_{(13-19(F))}, 3.7₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.62 [(H₂)(d_a, J = 8.4₍₂₋₄₎ Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₅)(dd, J = 9.9_{(15-19(F))}, 8.3₍₁₅₋₁₃₎ Hz, 1H)] 7.52 [(H₃)(s_a, 1H)], 7.10 [(H₄)(d, J = 8.4₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 3.84 [(H₂₀, H₂₂)(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.05 [(F₁₉)]</p>
 <p style="text-align: center;">A3</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 298.269 Aspecto: Polvo café claro, mate. Rendimiento: 56.9 % Punto de fusión: 220.7-220.8 Rf: 0.68 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3293, (-CN) 2239, (C=O) 1651, (-OCH₂) 2949, 2884, 1286, 1061</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 339</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.38 [(H₁)(s, 1H)], 8.26 [(H₁₂)(dd, J = 5.8_{(12-19(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.06 [(H₁₃)(ddd, J = 7.8₍₁₃₋₁₅₎, 4.9_{(13-16(F))}, 2.7₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.53 [(H₁₅)(*t, J = 9.2_{(15-13-19(F))}, Hz, 1H)], 7.525 [(H₄)(d, J = 2.2₍₄₋₃₎ Hz, 1H)], 7.50 [(H₃)(dd, J = 8.4₍₃₋₅₎, 2.2₍₃₋₄₎ Hz, 1H)], 7.01 [(H₅)(d, J = 8.4₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 4.31-4.32 [(H₂₁₋₂₃)(Dos tripletes, J = 6.4 Hz, 4H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.02 [(F₁₈)]</p> <p>*Pseudotriplete</p>

 <p style="text-align: center;">A5</p> <p style="text-align: center;">(2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.:326.32</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo claro</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 76%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 257.1-258.4</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.66 (Sistema II)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3344, (H-C=C-H) 3071, (-CN) 2239, (C=O) 1685, (-OCH₃) 2964, 2839, 1256, 1138</p> <p style="text-align: center;">EM (IE)⁺ : (M⁺) 326</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.56 [(H₂)(s, 1H)], 8.23 [(H₄)(dd, J = 5.8_{(4-11(F))}, 2.7₍₄₋₅₎ Hz, 1H)], 7.92 [(H₅)(ddd, J = 9.1₍₅₋₇₎, 4.9_{(5-11(F))}, 2.7₍₅₋₄₎ Hz, 1H)], 7.57 [(H₁₃)(d, J = 15.8₍₁₃₋₁₄₎, Hz, 1H)], 7.50 [(H₇)(dd, J = 9.1₍₇₋₅₎, 8.9₍₇₋₅₎ Hz, 1H)], 7.23 [(H₁₆)(d, J = 1.82₍₁₆₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.19 [(H₁₇)(dd, J = 8.3₍₁₇₋₁₉₎, 1.82₍₁₇₋₁₆₎ Hz 1H)], 7.02 [(H₁₉)(d, J = 8.3₍₁₉₋₁₇₎ Hz, 1H)], 6.66 [(H₁₄)(d, J = 15.8₍₁₄₋₁₃₎, Hz, 1H)], 3.82 [(H₂₃)(s, 3H)], 3.80 [(H₂₄)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.07 [(F₁₁)]</p>
 <p style="text-align: center;">A6</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 280.26</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo café claro</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 89%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 245.2-245.8</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.26 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 8.37 [(H₂₀)(s, 1H)], 8.33 [(H₁₁)(d, J = 5.8_{(11-18(F))}, 2.6₍₁₁₋₁₂₎ Hz, 1H)], 8.31 [(H₃)(d, J = 1.3₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 8.12 [(H₁₂)(ddd, J = 9.2₍₁₂₋₁₄₎, 4.9_{(12-18(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.83 [(H₂)(dd, J = 8.5₍₂₋₄₎, 1.6₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₄)(d, J = 8.5₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 7.55 [(H₁₄)(t, J = 9.2_{(14-12-18(F))}, 1H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -115.43 [(F₁₈)]</p>
 <p style="text-align: center;">A7</p> <p style="text-align: center;">N-(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 292.27</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo café claro</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 69%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 230.8-231.1</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.58 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.97 [(H₈)(s, 1H)], 9.08 [(H_{20, 22})(d, J = 4.1₍₂₀₋₂₂₎, Hz, 2H)], 8.78 [(H₃)(d, J = 1.9₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 8.36 [(H₁₁)(dd, J = 5.7_{(11-18(F))}, 2.1₍₁₁₋₁₂₎ Hz, 1H)], 8.34 [(H₂)(dd, J = 8.8₍₂₋₄₎, 1.9₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 8.25 [(H₄)(d, J = 8.8₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 8.14 [(H₁₂)(ddd, J = 9.1₍₁₂₋₁₄₎, 4.9_{(12-18(F))}, 2.8₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₄)(t, J = 9.1_{(14-12-18(F))} Hz, 1H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -114.16 [(F₁₈)]</p>

 <p>A8 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1<i>H</i>-benzimidazol-5-carboxamida P.M.: 294.28 Aspecto: Polvo blanco, crema Rendimiento: 72% Punto de fusión: 300.4-301.1 Rf: 0.34 (Sistema III)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 10.12 [(H₁₁)(s, 1H)], 8.20 [(H₁₄)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₂)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.67 [(H₃)(dd, <i>J</i> = 2.0₍₃₋₂₎, 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 7.66 [(H₁₅)(d, <i>J</i> = 2.2₍₁₄₋₁₅₎, 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)] 7.24 [(H₁₇)(d, <i>J</i> = 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.20 [(H₂₄)(s, 2H)], 7.13 [(H₅)(d, <i>J</i> = 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 5.94 [(H₂₃)(s, 2H)], 3.89 [(H₉)(s, 6H)], 3.88 [(H₂₅)(s, 6H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -115.15 [(F₁₈)]</p>
 <p>A11 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida P.M.: 330.31 Aspecto: Polvo blanco Rendimiento: 90 Punto de fusión: 211.0-212.7 Rf: 0.52 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 10.50 [(H₈)(s, 1H)], 8.27 [(H₁₇)(dd, <i>J</i> = 5.7_{(17-24(F))}, 2.4₍₁₇₋₁₈₎ Hz, 1H)], 8.14 [(H₁₈)(ddd, <i>J</i> = 8.9₍₁₈₋₂₀₎, 4.8_{(18-24(F))}, 2.76₍₁₈₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.58 [(H₂₀)(t, <i>J</i> = 9.1_{(20-18-21(F))}, Hz, 1H)], 7.32 [(H_{3,2})(s, 1H)], 3.90 [(H_{13,15})(s, 6H)], 3.77 [(H₁₁)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -114.68 [(F₂₄)]</p>
 <p>A12 (2<i>E</i>)-<i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida P.M.: 335.16 Aspecto: Polvo blanco Rendimiento: 52.2% Punto de fusión: 250.0-251.2 Rf: 0.58 (Sistema I)</p>	<p>EM DART: (M+2⁺): 337 (66%) (M⁺): 335 (100%)</p> <p>EM (ESI)⁺ : 335.01466</p> <p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 300MHz): δ 8.21 [(H₄)(dd, <i>J</i> = 5.8_{(4-11(F))}, 2.7₍₄₋₅₎ Hz, 1H)], 7.90 [(H₁₆)(d, <i>J</i> = 1.7₍₁₆₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.90 [(H₅)(ddd, <i>J</i> = 9.1₍₅₋₇₎, 4.96_{(5-11(F))}, 2.76₍₅₋₄₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₁₉)(d, <i>J</i> = 8.4₍₁₉₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.62 [(H₁₇)(dd, <i>J</i> = 8.4₍₁₇₋₁₉₎, 2.0₍₁₇₋₁₆₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₄)(d, <i>J</i> = 15.8₍₁₄₋₁₃₎ Hz, 1H)], 7.51 [(H₇)(t, <i>J</i> = 9.1_{(7-5-11(F))}, 1H)], 6.84 [(H₁₃)(d, <i>J</i> = 15.8₍₁₄₋₁₃₎ Hz, 1H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-<i>d</i>₆, 282MHz): δ -114.68 [(F₂₄)]</p>

 <p>A13 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 316.28 Aspecto: Polvo café claro Rendimiento: 76% Punto de fusión: >350°C Rf: 0.13 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.15 [(H₈)(s, 1H)], 8.26 [(H₁₄)(dd, <i>J</i> = 5.4_{(14-21(F))}, 2.5₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 8.08 [(H₁₅)(ddd, <i>J</i> = 8.9₍₁₅₋₁₇₎, 4.8_{(15-21(F))}, 2.5₍₁₅₋₁₄₎ Hz, 1H)], 7.47 [(H₂₀)(t, <i>J</i> = 9.55_{(17-15-21(F))} Hz, 1H)], 7.23 [(H_{3,2})(s, 2H)], 3.71 [(H_{22,23})(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -116.70 [(F₂₁)]</p>
 <p>A14 <i>N</i>-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida P.M.: 324.23 Aspecto: Polvo rojo obscuro Rendimiento: 62% Punto de fusión: 139.5-144.5 Rf: 0.67 (Sistema I)</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 300MHz): δ 10.69 [(H₈)(s, 1H)], 8.27 [(H₁₂)(dd, <i>J</i> = 5.8_{(12-19(F))}, 2.7₍₁₂₋₁₃₎ Hz, 1H)], 8.08 [(H_{3,2})(d, <i>J</i> = 8.82_{(2,3)-(5,4)} Hz, 2H)], [(H₁₃)(ddd, <i>J</i> = 7.63₍₁₃₋₁₅₎, 4.9_{(13-19(F))}, 2.76₍₁₃₋₁₂₎ Hz, 1H)], 7.56 [(H₁₅)(t, <i>J</i> = 9.1_{(15-13-19(F))} Hz, 1H)], 7.56 [(H_{4,5})(dq, , <i>J</i> = 8.8_{(4,5)-(2,3)} Hz, 0.9_{[4,5]-[21(F), 22(F), 23(F)]}, 2H)].</p> <p>RMN ¹⁹F (DMSO-d₆, 282MHz): δ -56.66 [(F_{21,22,23})], -114.37 [(F₂₄)]</p>

Procedimiento general para la síntesis de las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas (B1-B14)

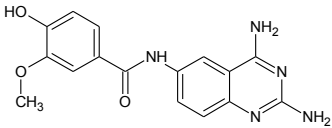
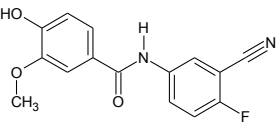
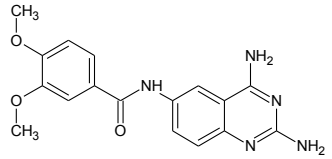
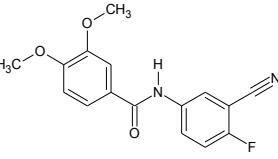
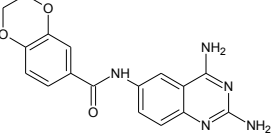
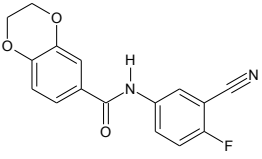
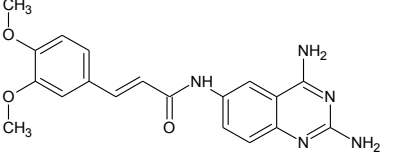
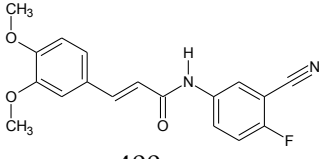
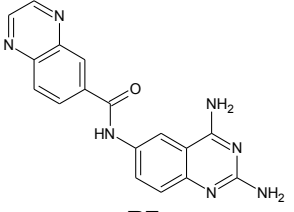
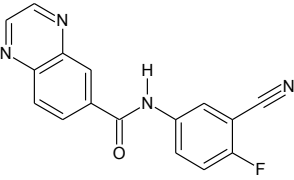


En un matraz bola de 100 mL, con boca de 14x20, se pesaron las cantidades indicadas en la tabla 4 de las *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamidas, así como el carbonato de guanidina. Se disolvió en DMA o DMSO y se agregó la DIPEA. Posteriormente se adaptó un refrigerante con una trampa, y se colocó en un baño de aceite, a 115°, durante 6-8 horas.

Finalmente, se purificaron los compuestos mediante columna de cromatografía de sílica gel 60, con polaridad creciente de cloroformo a metanol, y se recrystalizaron en metanol.

La información espectroscópica y características de los derivados se encuentra en la tabla 5.

Tabla 4: Cantidades empleadas de reactivos usados en la reacción de síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas y características físicas de los productos

Clave de la <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamida sintetizada y características	<i>N</i> -(3-ciano-4-fluorofenil)-carboxamida empleada (Cantidad en mg)	Carbonato de guanidina (Cantidad en mg)	DIPEA (Volumen empleado en mL)
 <p>B1 <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida</p>	 <p>572 mg (2.0 mmol)</p>	798 mg (4.4 mmol)	1.4 mL (8.0 mmol)
 <p>B2 <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida</p>	 <p>1,772 mg (5.9 mmol)</p>	966 mg (5.4 mmol)	3.8 mL (21.8 mmol)
 <p>B3 <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida</p>	 <p>1,307 mg (4.4 mmol)</p>	785 mg (4.4 mmol)	3.0 mL (17.2 mmol)
 <p>B5 (2E)- <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida</p>	 <p>400 mg (1.23mmol)</p>	260 mg (1.4mmol)	0.9 mL (5.2 mmol)
 <p>B7 <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida</p>	 <p>406mg (1.4 mmol)</p>	267mg (1.5 mmol)	0.5 mL (2.9 mmol)

Apéndice I: Procedimientos Experimentales de Síntesis y Caracterización de Compuestos

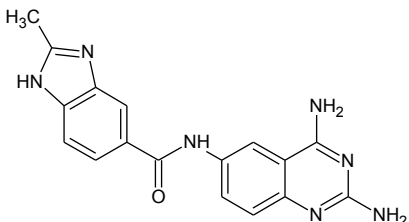
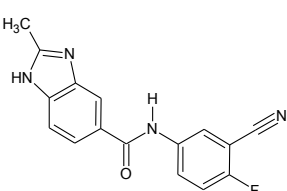
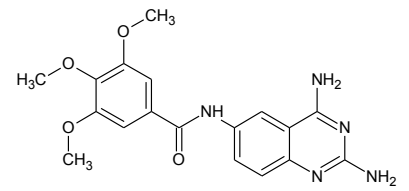
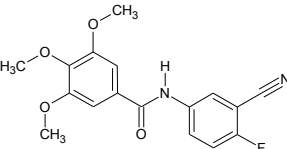
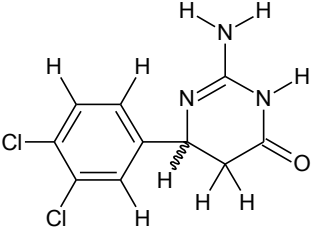
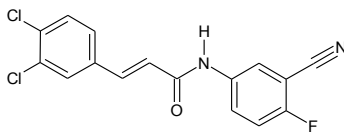
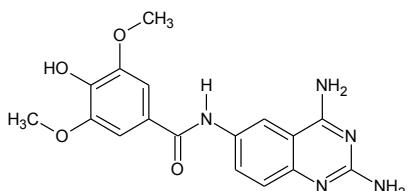
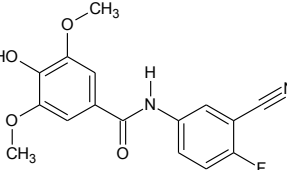
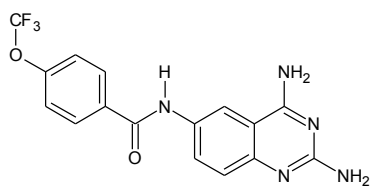
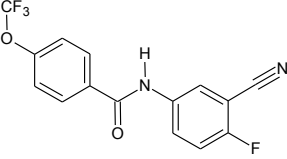
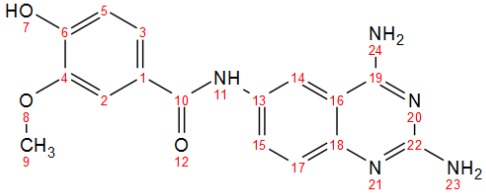
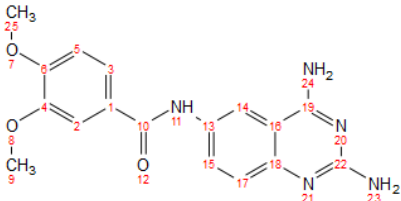
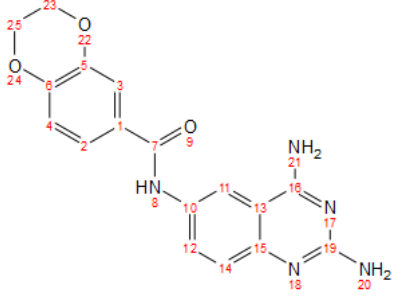
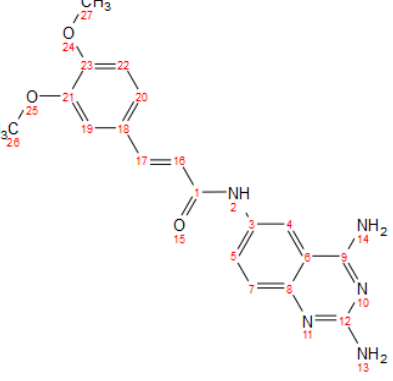
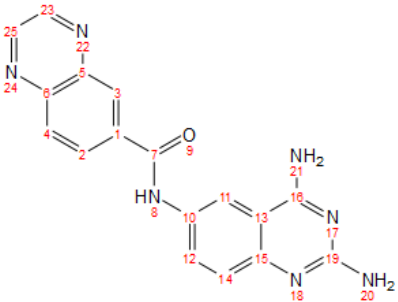
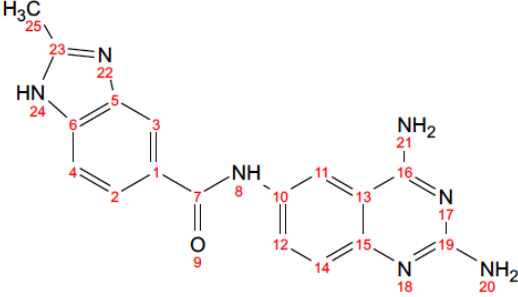
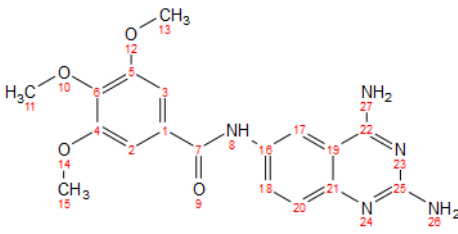
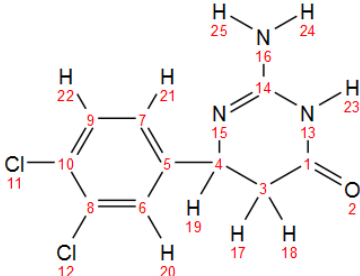
 <p>B8 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida</p>	 <p>586mg (1.99 mmol)</p>	<p>369mg (2.05 mmol)</p>	<p>0.7mL (4.02 mmol)</p>
 <p>B11 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida</p>		<p>Compuesto sintetizado por alumna de servicio social</p>	
 <p>MG12 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidropirimidin-4(3H)-ona</p>	 <p>336mg (1.01 mmol)</p>	<p>185mg (1.02 mmol)</p>	<p>0.4mL (2.3 mmol)</p>
 <p>B13 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida</p>	 <p>322mg (1.02 mmol)</p>	<p>189mg (1.05 mmol)</p>	<p>0.35mL (2.01 mmol)</p>
 <p>B14 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida</p>	 <p>310mg (1.0 mmol)</p>	<p>189mg (1.05 mmol)</p>	<p>0.7mL (4.0 mmol)</p>

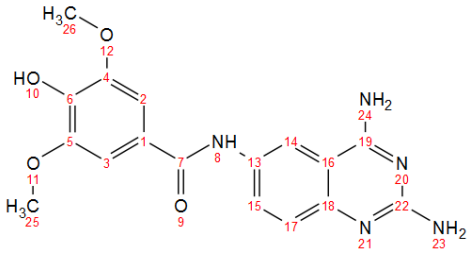
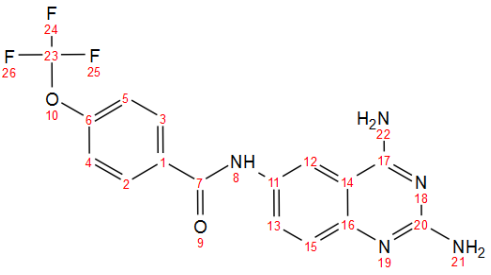
Tabla 5. Información espectroscópica de los derivados sintetizados

Derivado	Información espectroscópica
 <p style="text-align: center;">B1</p> <p style="text-align: center;">N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 325.32</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo claro</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 29%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: Mayor a 350°C</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.45 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3116, (-NH₂) 3338, (C=O) 1648, (-OCH₃) 2840, 1150±1070</p> <p>EM DART: (M+1⁺) 326, 100%, (M⁺) 325, 16%</p> <p>EM (ESI)⁺: (M+1⁺) 326.12453 (¹²C₁₆¹H₁₅¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.13 [(H₁₁)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 8.32 [(H₁₄)(s, 1H)], 7.95 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 7.94 [(H₇)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 7.75 [(H₁₅)(d, J = 8.2₍₁₅₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₂)(s, 1H)], 7.54 [(H₃)(dd, J = 8.3₍₃₋₅₎, 1.6₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 7.32 [(H₁₇)(d, J = 8.2₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 6.97 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 6.89 [(H₅)(d, J = 8.3₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 3.86 [(H₉)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.84 (C₁₀), 162.59 (C₁₉), 157.60 (C₂₂), 150.05 (C₆), 147.25 (C₄), 143.13 (C₁₈), 133.01 (C₁₆), 129.47 (C₁₅), 125.18 (C₁), 121.36 (C₃), 120.80 (C₁₇), 116.56 (C₁₄), 114.97 (C₅), 111.61 (C₂), 109.51 (C₁₃), 55.76 (C₉)</p>
 <p style="text-align: center;">B2</p> <p style="text-align: center;">N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 339.35</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo brillante.</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 53%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 258.2-258.6</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.17 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3420, (-NH₂) 3592, (C=O) 1660, (-OCH₃) 2841, 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺: (M⁺) 339 (42%), 165 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺: (M+1⁺) 340.1414 (¹²C₁₇¹H₁₇¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.12 [(H₁₁)(s, 1H, Protón intercambiado en experimento de D₂O)], 8.20 [(H₁₄)(d, J = 2.2₍₁₄₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.69 [(H₂)(d, J = 2.2₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.67 [(H₃)(dd, J = 2.0₍₃₋₂₎, 8.5₍₃₋₅₎ Hz, 1H)], 7.66 [(H₁₅)(dd, J = 2.2₍₁₅₋₁₄₎, 8.9₍₁₅₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.24 [(H₁₇)(d, J = 8.9₍₁₇₋₁₅₎ Hz, 1H)], 7.20 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 7.13 [(H₅)(d, J = 8.5₍₅₋₃₎ Hz, 1H)], 5.94 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento de D₂O)], 3.89 [(H₂₅)(s, 3H)], 3.88 [(H₉)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 165.01 (C₁₀), 162.75 (C₂₂), 160.83 (C₁₉), 151.95 (C₆), 150.23 (C₁₈), 148.72 (C₄), 131.46 (C₁₆), 129.27 (C₁₅), 127.18 (C₁), 124.74 (C₁₇), 121.37 (C₃), 116.86 (C₁₄), 111.39 (C₁₃), 111.29 (C₂), 110.31 (C₁₃), 56.08 (C₉), 56.06 (C₂₅)</p>

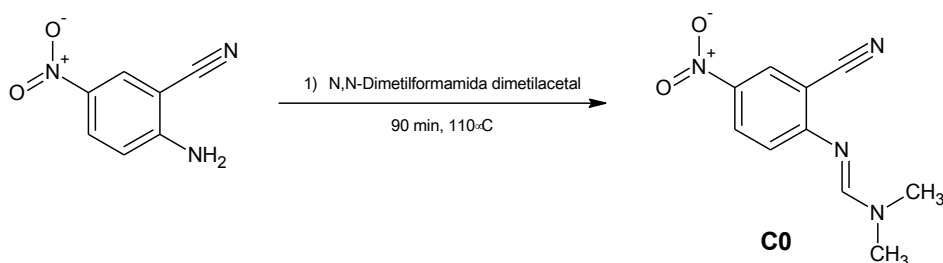
 <p style="text-align: center;">B3</p> <p><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida</p> <p>P.M.: 337.33</p> <p>Aspecto: Polvo amarillo opaco.</p> <p>Rendimiento: 46%</p> <p>Punto de fusión: 275.0-275.3</p> <p>Rf: 0.43 (Sistema V)</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3431, (-NH₂) 3481, (C=O) 1656, (-OCH₂) 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺: (M⁺) 337 (45%), 163 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺: (M+1⁺) 338.1246 (¹²C₁₇¹H₁₅¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.26 [(H₈)(s, Protón intercambiado en experimento con D₂O, 1H)], 8.41 [(H₁₁)(d, J = 2.2₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 8.12 [(H₂₁)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 7.78 [(H₁₂)(dd, J = 8.9₍₁₂₋₁₄₎, 2.2₍₁₂₋₁₁₎ Hz, 1H)], 7.57 [(H₃)(d, J = 2.3₍₂₋₃₎ Hz, 1H)], 7.56 [(H₂)(dd, J = 8.1₍₄₋₂₎, 2.3₍₃₋₂₎ Hz, 1H)], 7.35 [(H₁₄)(d, J = 8.9₍₁₂₋₁₄₎ Hz, 1H)], 6.99 [(H₄)(d, J = 8.1₍₄₋₂₎ Hz, 1H)], 6.98[(H₂₀)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 4.38 - 4.31 [(H₂₅ y H₂₃)(q, J = 4.9 Hz, 4H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.42 (C₇), 162.66 (C₁₉), 156.99 (C₁₆), 146.53 (C₆), 143.04 (C₅), 141.78 (C₁₀), 133.34 (C₁), 129.50 (C₁₂), 127.24 (C₁₅), 121.25 (C₂), 120.25 (C₁₄), 117.00 (C₄), 116.71 (C₃), 116.47 (C₁₁), 109.49 (C₁₃), 64.46 (C₂₅), 64.08 (C₂₃)</p>
 <p style="text-align: center;">B5</p> <p>(2E)- <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida</p> <p>P.M.: 365.39</p> <p>Aspecto: Polvo amarillo.</p> <p>Rendimiento: 48%</p> <p>Punto de fusión: 287.8-289.4</p> <p>Rf: 0.31 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3352, (-NH₂) 3252, (-HC=CH-) 3003, 2968, (C=O) 1504, (-OCH₃) 1150±1070</p> <p>EM (IE)⁺: (M⁺) 365 (34%), 191 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺: (M+1⁺) 366.1573 (¹²C₁₉¹H₁₉¹⁴N₅¹⁶O₃)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.54 [(H₂)(s, Protón intercambiado en experimento con D₂O, 1H)], 8.56 [(H₁₄)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 8.47 [(H₄)(d, J = 2.0_[4-5] Hz, 1H)], 7.81 [(H₅)(dd, J = 8.9_[5-7], 2.0_[5-4] Hz, 1H)], 7.53 [(H₁₆)(d, J = 15.7_[16-17] Hz, 1H)], 7.46 [(H₁₃)(s, Protones intercambiados en experimento con D₂O, 2H)], 7.40 [(H₇)(d, J = 8.9_[7-5] Hz, 1H)], 7.20 [(H₁₉)(d, J = 2.0_[19-20] Hz, 1H)], 7.17 [(H₂₀)(dd, J = 8.3_[20-22], 2.0_[20-19] Hz, 1H)], 6.99 [(H₂₂)(d, J = 8.3_[22-20] Hz, 1H)], 6.81 [(H₁₇)(d, J = 15.7_[17-16] Hz, 1H)], 3.80 [(H₂₆)(s, 3H)], 3.78 [(H₂₇)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.40 (C₁), 163.17 (C₁₂), 155.63 (C₉), 150.91 (C₂₃), 149.37 (C₂₁), 140.85 (C₁₆), 138.05 (C₈), 135.18 (C₆), 128.75 (C₃), 127.88 (C₁₈), 122.19 (C₂₀), 120.05 (C₁₇), 118.92 (C₇), 115.09 (C₄), 112.22 (C₂₂), 110.65(C₁₉), 109.85 (C₃), 56.03 (C₂₇), 55.91 (C₂₆)</p>

 <p style="text-align: center;">B7</p> <p><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)quinoxalin-6-carboxamida</p> <p>P.M.: 331.3</p> <p>Aspecto: Polvo naranja amarillento</p> <p>Rendimiento: 43%</p> <p>Punto de fusión: 288.3-289.1</p> <p>Rf: 0.23 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3163, (-NH₂) 3346, (C=O) 1655</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 332 (7%), 55 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 332.1261 (¹²C₁₇¹H₁₃¹⁴N₇¹⁶O₁)</p> <p>RMN ¹H (DMF-d₇, 400MHz): δ 10.68 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 9.10 [(H₂₅)(s, 2H)], 8.87 [(H₁₁)(s,1H)], 8.56 [(H₃)(s,1H)], 8.50 [(H₁₂)(d, J = 8.4 Hz, 1H)], 8.27 [(H₁₄)(d, J = 8.4 Hz, 1H)], 7.92 [(H₂)(d, J = 8.7 Hz, 1H)], 7.43 [(H₂₁) (s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.34 [(H₄)(d, J = 8.7 Hz, 1H)], 6.03 [(H₂₀)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O,)]</p> <p>RMN ¹³C (DMF-d₇, 100MHz): δ 164.43 (C₇), 163.05 (C₁₉), 161.11 (C₁₆), 150.44 (C₁₅), 147.18 (C₂₅), 146.84 (C₂₃), 144.02 (C₆), 142.21 (C₅), 136.44 (C₁), 131.79 (C₁₃), 129.65 (C₄), 129.00 (C₃), 128.85 (C₂), 127.79 (C₁₂), 125.06 (C₁₄), 115.18 (C₁₁), 110.30 (C₁₀)</p>
 <p style="text-align: center;">B8</p> <p><i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxamida</p> <p>P.M.: 333.35</p> <p>Aspecto: Polvo color crema</p> <p>Rendimiento: 46%</p> <p>Punto de fusión: Mayor a 350°C</p> <p>Rf: = 0.15 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3584, (-NH₂) 3145, (-CH₃) 3071, (C=O) 1654</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 334 (6%), 55 (Pico base)</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M+1⁺) 334.1416 (¹²C₁₇¹H₁₅¹⁴N₇¹⁶O₁)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.24 [(H₈)(s,1H)], 8.16 [(H₂₄)(s, 1H)], 7.84 [(H₁₁)(d, J = 2.2 Hz,1H)], 7.81 [(H₃)(s,1H)], 7.66 [(H₁₂)(dd, J = 8.55, 2.2 Hz, 1H)], 7.60 [(H₂)(d, J = 9.1 Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₄)(d, J = 8.55 Hz, 1H)], 7.20 [(H₄)(d, J = 9.1 Hz, 1H)], 7.16 [(H₂₁)(s, 2H)], 5.89 [(H₂₀)(s, 2H)], 2.53 [(H₂₅)(s, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 166.35 (C₇), 159.48 (C₁₉), 156.97 (C₁₆), 153.99 (C₂₃), 136.70 (C₁₅), 136.68 (C₁₀), 127.63 (C₅), 127.55 (C₆), 127.03 (C₁₄), 124.11 (C₂), 121.39 (C₁), 117.00 (C₄), 116.80 (C₁₂), 114.12 (C₁₃), 99.84 (C₁₁), 99.68 (C₃), 14.81 (C₂₅)</p>

 <p>B11 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-3,4,5-trimethoxybenzamide P.M.: 369.37 Aspecto: Polvo color hueso Rendimiento: No determinado Punto de fusión: 178.4-179.2 Rf: 0.43 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3346, (-NH₂) 3162, (C=O) 1538, (-OCH₃) 1123±1335</p> <p>EM (IE)⁺ : (M⁺) 369 (47%), 195 (Pico base)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.20 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.17 [(H₁₇)(d, J = 2.2 Hz, 1H)], 7.65 [(H₁₈)(dd, J = 8.9₁₈₋₂₀, 2.2₁₈₋₁₇ Hz, 1H)], 7.35 [(H₂₇)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.34 [(H_{2,3})(s, 1H)], 7.23 [(H₂₀)(d, J = 8.9₂₀₋₁₈ Hz, 1H)], 6.08 [(H₂₆)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{13,15})(s, 6H)], 3.72 [(H₁₁)(s, 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.96 (C₇), 162.79 (C₂₅), 160.37 (C₂₂), 153.07 (C_{4,5}), 149.16 (C₂₁), 140.65 (C₆), 131.55 (C₁₉), 130.08 (C₁), 129.51 (C₁₈), 124.16 (C₂₀), 117.07 (C₁₇), 110.24 (C₁₆), 105.57 (C_{2,3}), 60.54 (C₁₁), 56.50 (C_{13,15})</p>
 <p>MG12 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) P.M.: 258.1 Aspecto: Polvo amarillo brillante Rendimiento: 62% Punto de fusión: 243.7-244.4 Rf: 0.36 en Sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH, -NH₂) 3319, (-CH₂) 2985, (C=O) 1640</p> <p>EM (FAB)⁺ : (M⁺, cuasimolecular) 258(12%), 260 (8%, M+2⁺, patrón isotópico de dos cloros), 55 (Pico base)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 7.61 [(H₂₂)(d, J = 8.4₂₂₋₂₁ Hz, 1H)], 7.54 [(H₂₀)(d, J = 2.0₂₀₋₂₁ Hz, 1H)], 7.29 [(H₂₁)(dd, J = 8.4₂₁₋₂₂, 2.0₂₁₋₂₀ Hz, 1H)], 6.60 [(H_{23,24,25})(s,3H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 4.67 [(H₁₉)(dd, J = 7.6₁₉₋₁₈, 6.3₁₉₋₁₇ Hz, 1H)], 2.53 [(H₁₇)(dd, J = 15.5₁₇₋₁₈, 6.3₁₇₋₁₉ Hz, 1H)], 2.28 [(H₁₈)(dd, J = 15.5₁₈₋₁₇, 7.6₁₈₋₁₉ Hz, 1H)],</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 175.40 (C₁), 143.97 (C₅), 131.53 (C₈), 131.17 (C₉), 130.35 (C₁₀), 128.71 (C₆), 127.01 (C₇), 110.49 (C₁₄), 51.63 (C₄), 38.41 (C₃)</p>

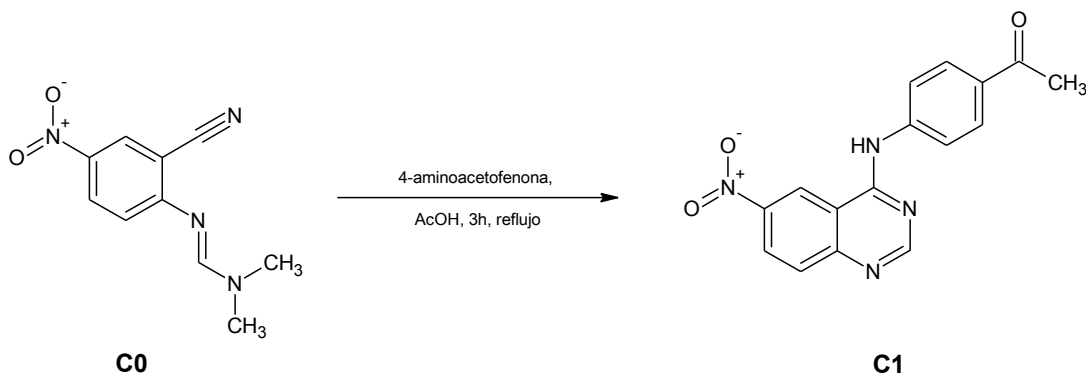
 <p>B13 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 71% Punto de fusión: Mayor a 350°C Rf: 0.44 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3321, (-NH₂) 3183, (C=O) 1643, (-OCH₃) 1113±1331</p> <p>EM (DART)⁺ : 356 (M+1⁺) EM (ESI)⁺ : (M+1⁺) 356.13676 (¹²C₁₇¹H₁₇¹⁴N₅¹⁶O₄)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.42 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 9.09 [(H₁₀)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.75 [(H₂₄)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 8.50 [(H₁₄)(d, J = 2.0₁₄₋₁₅ Hz, 1H)], 7.94 [(H₁₅)(dd, J = 8.9₁₅₋₁₇, 2.0₁₅₋₁₄ Hz, 1H)], 7.68 [(H₂₃)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.43 [(H₁₇)(d, J = 8.9₁₇₋₁₅ Hz, 1H)], 7.40 [(H_{2,3})(s,2H), 3.84 [(H_{25,26})(s, 6H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 165.32 (C₇), 163.27 (C₂₂), 155.12 (C₁₉), 147.95 (C_{4,5}), 139.72 (C₆), 136.69 (C₁₈), 135.39 (C₁₆), 130.91 (C₁₅), 123.95 (C₁), 117.69 (C₁₇), 117.58 (C₁₄), 109.64 (C₁₃), 106.11 (C_{2,3}), 56.67 (C_{25,26})</p>
 <p>B14 N-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-4-trifluorometoxibenzamida P.M.: 363.3 Aspecto: Polvo color crema Rendimiento: 16% Punto de fusión: Mayor a 350°C Rf: 0.69 en sistema V</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3331, (-NH₂) 3184, (C=O) 1657, (-OCF₃) 1160±1258</p> <p>EM (DART)⁺ : 364 (M+1⁺) EM (ESI)⁺ : (M+1⁺) 364.10167 (¹²C₁₆¹H₁₂¹⁹F₃¹⁴N₅¹⁶O₂)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.58 [(H₈)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.44 [(H₁₂)(d, J = 2.0₁₄₋₁₅ Hz, 1H)], 8.30 [(H₂₂)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 8.11 [(H_{2,3})(d, J = 9.0_{2,3-4,5} Hz, 1H)], 7.81 [(H₁₃)(dd, J = 8.9₁₃₋₁₅, 2.0₁₃₋₁₂ Hz, 1H)], 7.52 [(H_{4,5})(d, J = 9.0_{4,5-2,3} Hz, 1H)], 7.38[(H₁₅)(d, J = 8.9₁₃₋₁₅, 1H)], 7.20 [(H₂₁)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.48 (C₇), 162.78 (C₁₇), 156.19 (C₁₆), 150.82 (C₁), 133.61 (C₂₀), 133.57 (C₁₄), 130.21 (C_{2,3}), 129.60 (C₁₃), 121.44 (C₂₃), 120.98 (C_{4,5}), 119.65 (C₁₅), 118.88 (C₆), 116.49 (C₁₂), 109.47 (C₁₁)</p>

Síntesis de *N'*-(2-ciano-4-nitrofenil)-*N,N*-dimetilformamidina (C0)



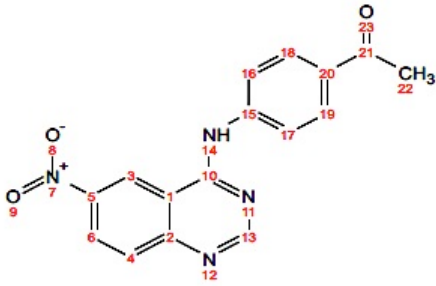
En un matraz bola de 100mL de boca 20X40 se pesaron 5.0g de 5-nitroantranilonitrilo (30.7mmol), y se adicionó 10.2mL de DMF-DMA. Se adaptó un refrigerante con una trampa de gel de sílice con indicador de humedad, y posteriormente se colocó en agitación y calentamiento en un baño de aceite, a 110°C. Una vez que se monitoreo mediante ccf el fin de la reacción, se procedió a filtrar en caliente, y al sólido obtenido, se le sometió a lavados con éter dietílico (3X20mL). Finalmente se dejo secar dicho sólido, obteniéndose un producto de color amarillo brillante con un 91% de rendimiento, y Rf de 0.13 en sistema III

Síntesis de *N*-(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C1)

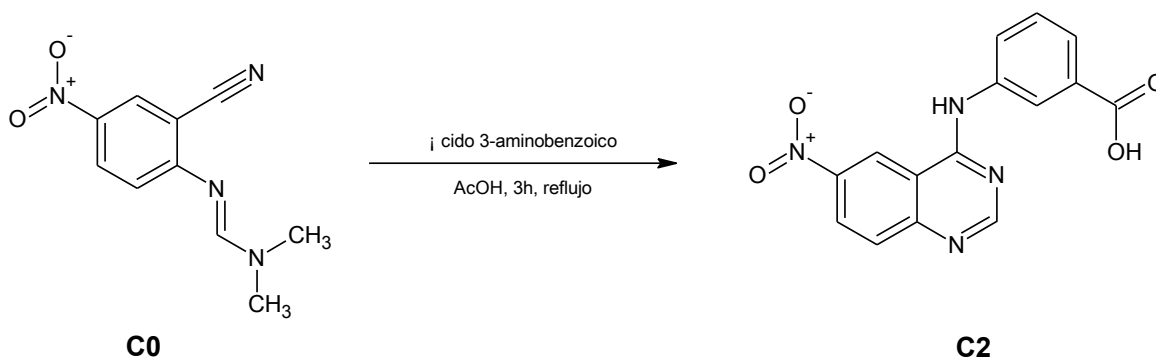


En un matraz de 100mL, de boca 20X40, se pesaron 3.0g (13.7 mmol) de C0, y 2.04g de 4-aminoacetofenona (15.1 mmol). Se adaptó un refrigerante y una trampa de vidrio con un globo; se adicionaron 10 mL de ácido acético, y se colocó en agitación y calentamiento en baño de aceite. Posteriormente, al confirmarse mediante ccf el avance de la reacción, se procedió a filtrar en caliente, y a lavarse con 5 mL de ácido acético, así como con éter dietílico (3X20mL).

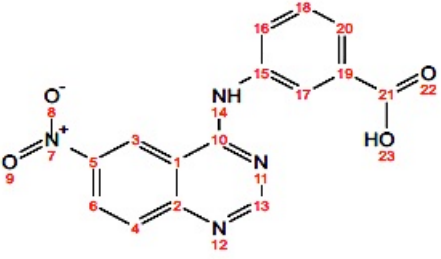
Se dejo secar al vacío, obteniéndose un sólido de color amarillo, con un rendimiento del 71%, p.f. de 257.8-265.5 y Rf de 0.33 en el Sistema II

 <p>C1 <i>N</i>-(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina P.M.: 308.29 Aspecto: Polvo amarillo brillante Rendimiento: 71% Punto de fusión: 257.8-265.5 Rf: 0.33 en Sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-NH) 3300, (-CH) 3069, (C=O) 1659, (-OCH₃) 1331, 1178</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.58 [(H₁₃)(s, 1H)], 9.68 [(H₃)(s, 1H)], 8.82 [(H₁₄)(s, 1H)], 8.57 [(H₆)(dd, <i>J</i> = 9.2₍₆₋₄₎, 1.2₍₆₋₃₎ Hz, 1H)], 8.09 [(H_{18,19})(m, 2H)], 8.04 [(H_{16,17})(m, 2H)], 7.97 [(H₄)(d, <i>J</i> = 9.2₍₄₋₆₎ Hz, 1H)], 2.62 [(H₂₂)(s, 3H)].</p>
---	---

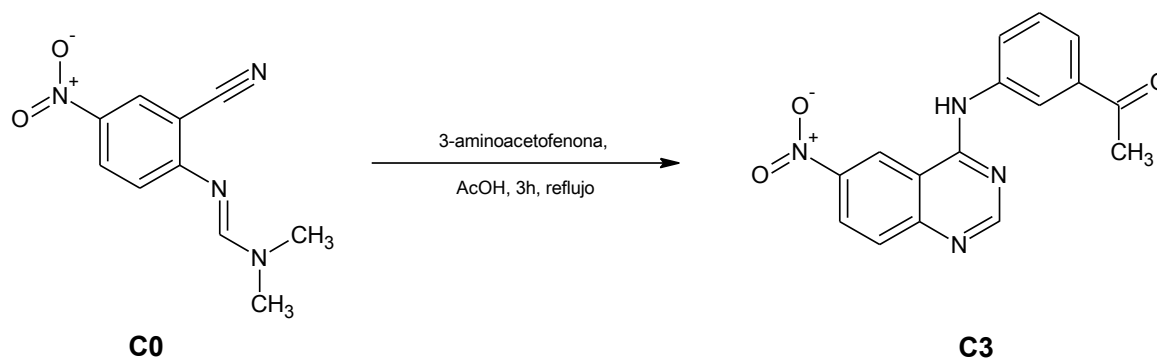
Síntesis de ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico (C2)



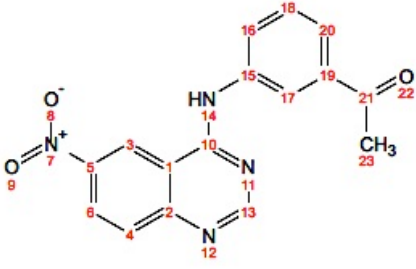
En un matraz de 100mL, de boca 20X40, se pesaron 3.0g (13.7 mmol) de **C0**, y 2.08g de ácido 3-aminobenzoico (15.1 mmol). Se adaptó un refrigerante y una trampa de vidrio con un globo; se adicionaron 10 mL de ácido acético, y se colocó en agitación y calentamiento en baño de aceite. Posteriormente, al confirmarse mediante ccf el avance de la reacción, se procedió a filtrar en caliente, y a lavarse con 2 mL de ácido acético, así como con éter dietílico (3X20mL). Se dejó secar al vacío, obteniéndose un sólido de color amarillo, con un rendimiento del 97%, p.f. de 343.1-344.2 y Rf de 0.04 en sistema II.

 <p style="text-align: center;">C2</p> <p style="text-align: center;">Ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico</p> <p style="text-align: center;">P.M.: 310.26</p> <p style="text-align: center;">Aspecto: Polvo amarillo brillante</p> <p style="text-align: center;">Rendimiento: 97%</p> <p style="text-align: center;">Punto de fusión: 343.1-344.2</p> <p style="text-align: center;">Rf: 0.04 en Sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-OH) 2425, (-NH) 3391, (-CH) 3091, (-COOH) 1687, (-C=O) 1621 (-OCH₃) 1273, 1171</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 13.05 [(H₂₃)(s, 1H)], 10.61 [(H₁₃)(s, 1H)], 9.74 [(H₃)(d, J = 2.4₍₃₋₆₎ Hz, 1H)], 8.80 [(H₁₄)(s, 1H)], 8.61 [(H₆)(dd, J = 9.2₍₆₋₄₎, 2.4₍₆₋₃₎ Hz, 1H)], 8.47 [(H₁₇)(t, J = 1.8₍₁₇₋₁₆₋₂₀₎, 1H)], 8.27 [(H₂₀)(ddd, J = 9.2₍₂₀₋₁₈₎, 1.2₍₂₀₋₁₆₎, 0.8₍₂₀₋₁₇₎ Hz, 1H)], 7.99 [(H₄)(d, J = 9.2₍₄₋₆₎ Hz, 1H)], 7.79 [(H₁₆)(ddd, J = 7.5₍₁₆₋₁₈₎, 1.6₍₁₆₋₁₇₎, 1.2₍₁₆₋₂₀₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₈)(t, J = 1.8₍₁₈₋₁₆₋₂₀₎, 1H)].</p>
---	--

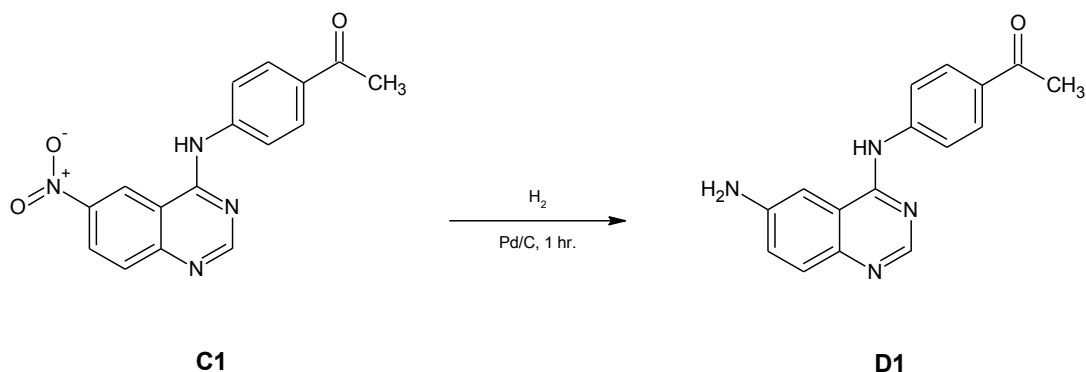
Síntesis de N-(3-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C3)



En un matraz de 100mL, de boca 20X40, se pesaron 3.0g (13.7 mmol) de **C0**, y 2.0g de 3-aminoacetofenona (15.1 mmol). Se adaptó un refrigerante y una trampa de vidrio con un globo; se adicionaron 10 mL de ácido acético, y se colocó en agitación y calentamiento en baño de aceite. Posteriormente, al confirmarse mediante ccf el avance de la reacción, se procedió a filtrar en caliente, y a lavarse con 5 mL de ácido acético, así como con éter dietílico (3X20mL). Se dejó secar al vacío, obteniéndose un sólido de color amarillo, con un rendimiento del 78%, p.f. de 252.2-252.5 y Rf de 0.33 en sistema II.

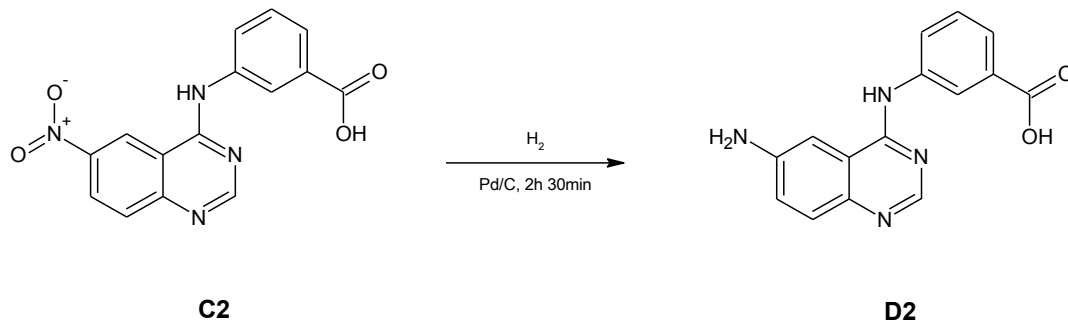
 <p>C3 <i>N</i>-(3-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina P.M.: 308.29 Aspecto: Polvo amarillo brillante Rendimiento: 78% Punto de fusión: 252.1-252.5 Rf: 0.33 en Sistema II</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.60 [(H₁₃)(s, 1H)], 9.69 [(H₃)(s, 1H)], 8.75 [(H₁₄)(s, 1H)], 8.57 [(H₆)(dd, <i>J</i> = 9.0₍₆₋₄₎, 2.2₍₆₋₃₎ Hz, 1H)], 8.36 [(H₁₇)(t, <i>J</i> = 1.7₍₁₇₋₁₆₋₂₀₎ Hz, 1H)], 8.23 [(H₂₀)(d, <i>J</i> = 8.2₍₂₀₋₁₈₎ Hz, 1H)], 7.95 [(H₄)(d, <i>J</i> = 8.9₍₂₀₋₁₈₎ Hz, 1H)], 7.80 [(H₁₆)(d, <i>J</i> = 7.4₍₁₆₋₁₈₎ Hz, 1H)], 7.59 [(H₁₈)(t, <i>J</i> = 7.9₍₁₈₋₁₆₋₂₀₎ Hz, 1H)], 2.62 [(H₂₂)(s, 3H)].</p>
---	---

Síntesis de 1-[4-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino]fenil]etanona (D1)



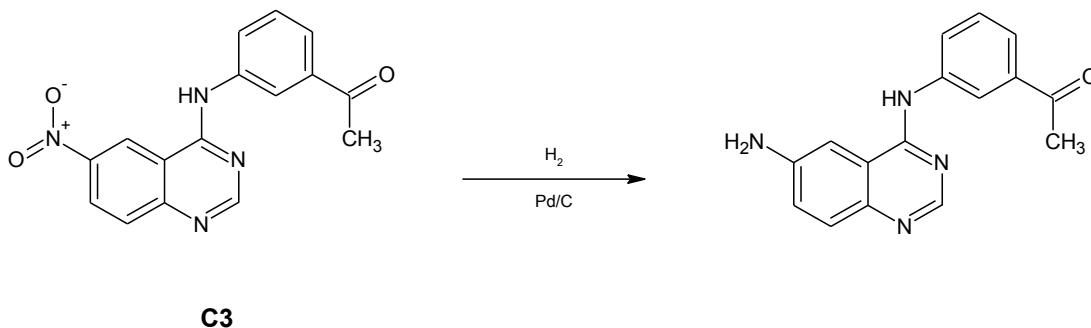
En un frasco Parr de 250mL, se colocó 1.03g de C1 (3.36mmol), 105.9mg de catalizador de Pd/C y se disolvió en 200 mL de metanol R.A.. Posteriormente, se adaptó dicho frasco al aparato de hidrogenación a una presión de 60 lb/in² de H₂, y se inició la agitación durante 30 minutos, hasta consumirse 10 lb/in². Se verificó mediante ccf el fin de la reacción y se filtró en un embudo de vidrio poroso la solución. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se obtuvo un sólido de color amarillo mostaza, con un rendimiento del 98%, p.f. de 325.3-328.0 y Rf de 0.25 en Sistema III.

Síntesis de ácido 3-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino] benzoico (D2)



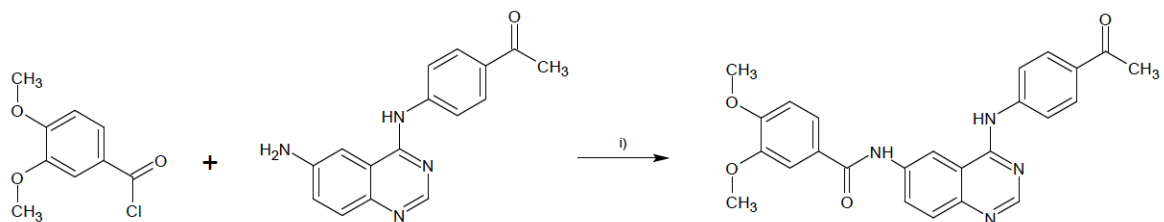
En un frasco Parr de 250mL, se colocó 1.0021g de C2 (3.23mmol), 103.5mg de catalizador de Pd/C y se disolvió en 200 mL de metanol R.A. y 25mL de DMF R.A.. Posteriormente, se adaptó dicho frasco al aparato de hidrogenación a una presión de 60 lb/in² de H₂, y se inició la agitación durante 1h 50min, hasta consumirse 13 lb/in². Se verificó mediante ccf el fin de la reacción y se filtró en un embudo de vidrio poroso la solución. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se obtuvo un sólido de color amarillo brillante, con un rendimiento del 94%, p.f. de 262.4-282.6 y Rf de 0.04 en Sistema III.

Síntesis de 1-[3-[(6-aminoquinazolin-4-il)amino]fenil]etanona (D3)



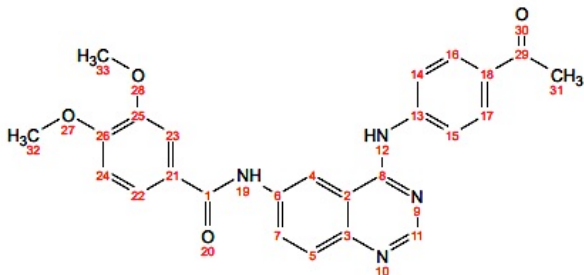
En un frasco Parr de 250mL, se colocó 1.0g de C3 (3.36mmol), 112mg de catalizador de Pd/C y se disolvió en 200 mL de metanol R.A.. Posteriormente, se adaptó dicho frasco al aparato de hidrogenación a una presión de 60 lb/in² de H₂, y se inició la agitación durante 45 minutos, hasta consumirse 18 lb/in². Se filtró en un embudo de vidrio poroso la solución y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo un sólido de color amarillo brillante, con un rendimiento del 96%, p.f. de 217.0-217.8 y Rf de 0.25 en Sistema III.

Síntesis de *N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)

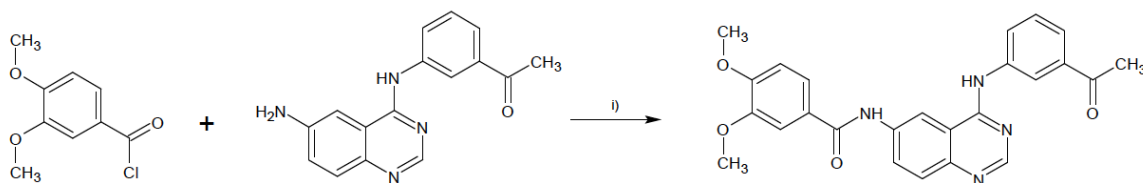


i) DIPEA (1.1 eq.)

Se pesaron 668 mg del cloruro de 3,4-dimetoxibencilo en un matr az bola de boca 14X20 con trampa anhidra, se disolvieron en 1.0mL de DMF y se agregaron 0.63 mL de DIPEA, y se colocó en agitación en baño de hielo. Posteriormente, se adicionaron 834 mg de C1 disueltos en 4.0mL de DMF, y se dejó agitando por 24 horas. Posteriormente, se filtró el precipitado y se purificó mediante columna de cromatografía de sílica gel 60, con polaridad creciente de cloroformo a metanol. Se obtuvo un sólido color crema, con un rendimiento del 8.4%, p.f. de 261.3-262.5 y Rf de 0.48 en sistema II.

 <p style="text-align: center;">E11 <i>N</i>-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida P.M.: 442.47 Aspecto: Polvo crema Rendimiento: 8.4% Punto de fusión: 261.3-262.5 Rf: 0.48 en Sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-NH) 3423,3434, (-CH) 3024, (C=O) 1680, 1600, (-OCH₃) 1267, 1169</p> <p>EM (DART)⁺: 443 (M+1⁺), 477 (M⁺HCl⁺) EM ESI (M⁺HCl⁺): 477.13165 (¹²C₂₅¹H₂₂³⁵Cl₁¹⁴N₄¹⁶O₄)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.31 [(H₁₁)(s,1H)], 10.15 [(H₁₉)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.73 [(H₁₂)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.04 [(H_{16,17})(d, J = 8.9_{16,17-14,15} Hz, 2H)], 7.97 [(H_{14,15})(d, J = 8.9_{14,15-16,17} Hz, 2H)], 8.0 [(H₇)(d, J = 8.9₇₋₅, 1H)], 8.0 [(H₄)(s, 1H)], 7.87 [(H₅)(d, J = 8.9₅₋₇, Hz, 1H)], 7.71 [(H₂₃)(d, J = 8.5₂₂₋₂₄, 2.0₂₂₋₂₃ Hz, 1H)], 7.62 [(H₂₃)(d, J = 2.0₂₃₋₂₂ Hz, 1H)], 7.13 [(H₂₄)(d, J = 8.5₂₄₋₂₂ Hz, 1H)], 3.86 [(H₃₃)(s, 3H)], 3.84 [(H₃₂)(s, 3H)], 2.6 [(H₃₁)(s, 3H)].</p>
---	--

Síntesis de *N*-[4-(3-acetil-anilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)



Se pesaron 109 mg del cloruro de 3,4-dimetoxibencilo en un matríz bola de boca 14X20 con trampa anhidra, se disolvieron en 5mL de CHCl_3 y se agregaron 0.1 mL de DIPEA, y se colocó en agitación en baño de hielo. Posteriormente, se adicionaron 50 mg de C3 disueltos en 10mL de CHCl_3 , y se dejó agitando por 24 horas. Posteriormente, se filtró y se realizó una extracción en medio básico, con solución de Na_2CO_3 al 4% y en medio acuoso de ácido cítrico al 1%. Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio, y se evaporó a presión reducida el disolvente. Se obtuvo un sólido color amarillo claro, con un rendimiento del 66.7%, p.f. de 265.0-270.2 y R_f de 0.48 en sistema II.

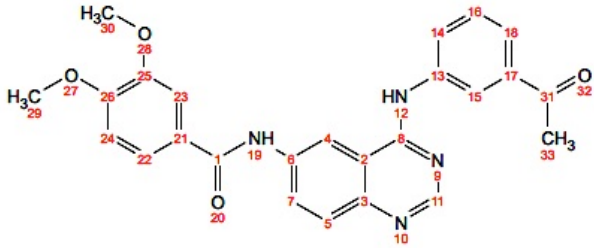
 <p style="text-align: center;">E31 <i>N</i>-[4-(3-acetil-anilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida P.M.: 442.47 Aspecto: Polvo naranja claro Rendimiento: 2.9% Punto de fusión: 265.0-270.2 R_f: 0.48 en Sistema II</p>	<p>RMN ^1H (DMSO-d_6, 400MHz): δ 10.46 [(H₁₁)(s,1H)], 10.04 [(H₁₉)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.89 [(H₁₂)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.59 [(H₄)(s, 1H)], 8.40 [(H₁₅)(s, 1H)], 8.22 [(H₂₂)(d, J = 8.4₂₂₋₂₄, Hz, 1H)], 8.04 [(H₇)(d, J = 7.8₇₋₅, Hz, 1H)], 7.83 [(H₅)(d, J = 7.8₅₋₇, Hz, 1H)], 7.73 [(H_{18,14})(d, J = 7.8_{18-16, 14-16}, 2H)], 7.65 [(H₂₃)(s, 1H)], 7.56 [(H₁₆)(t, J = 7.8₁₆₋₁₄₋₁₈ Hz, 1H)], 7.14 [(H₂₄)(d, J = 8.4₂₄₋₂₂, 1H)], 3.87 [(H₃₀)(s, 3H)], 3.86 [(H₂₉)(s, 3H)], 2.6 [(H₃₃)(s, 3H)].</p>
---	---

Figura 1. Espectro de RMN ^1H de ácido 2-metil-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (AMB)

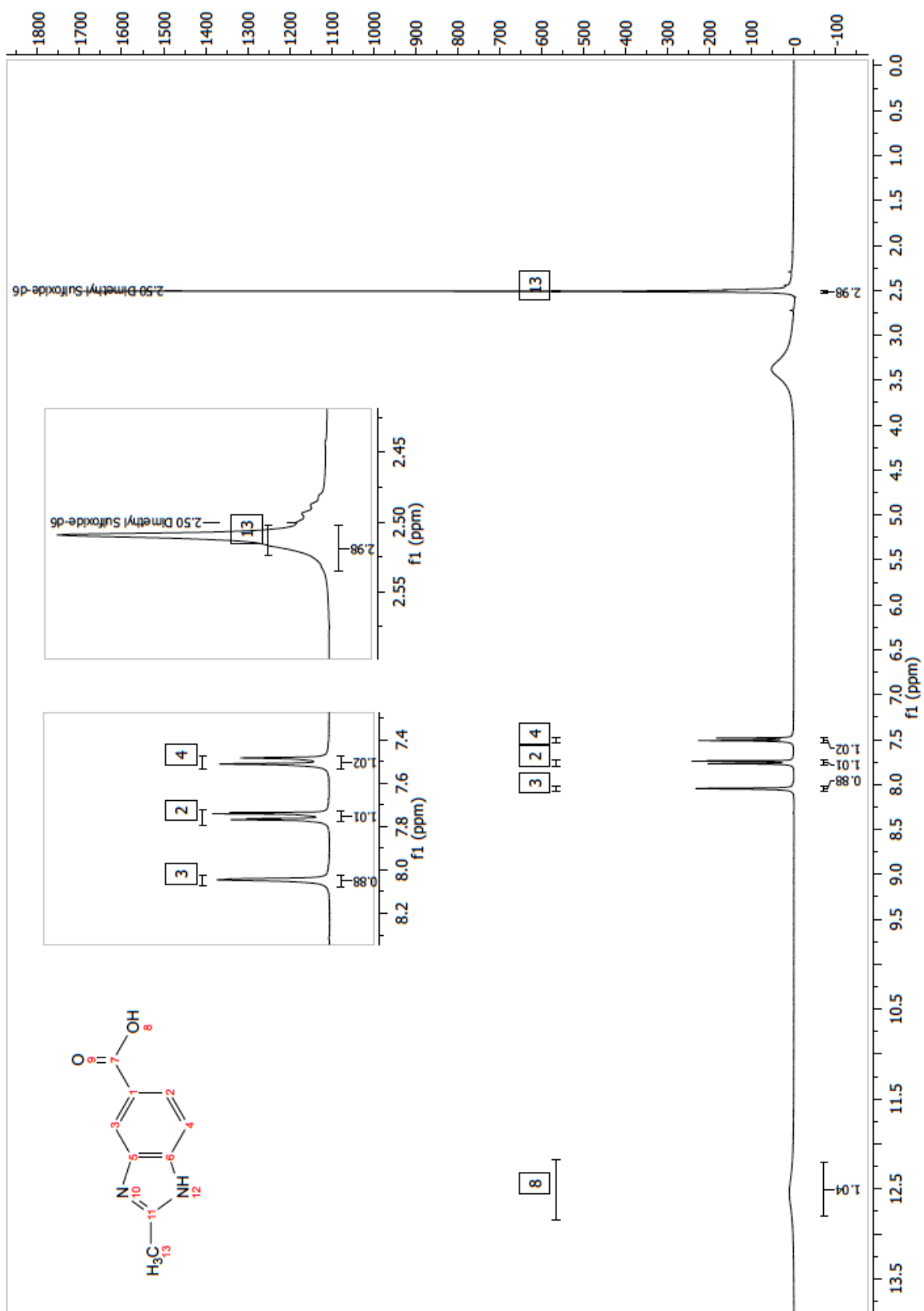


Figura 2. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (A1)

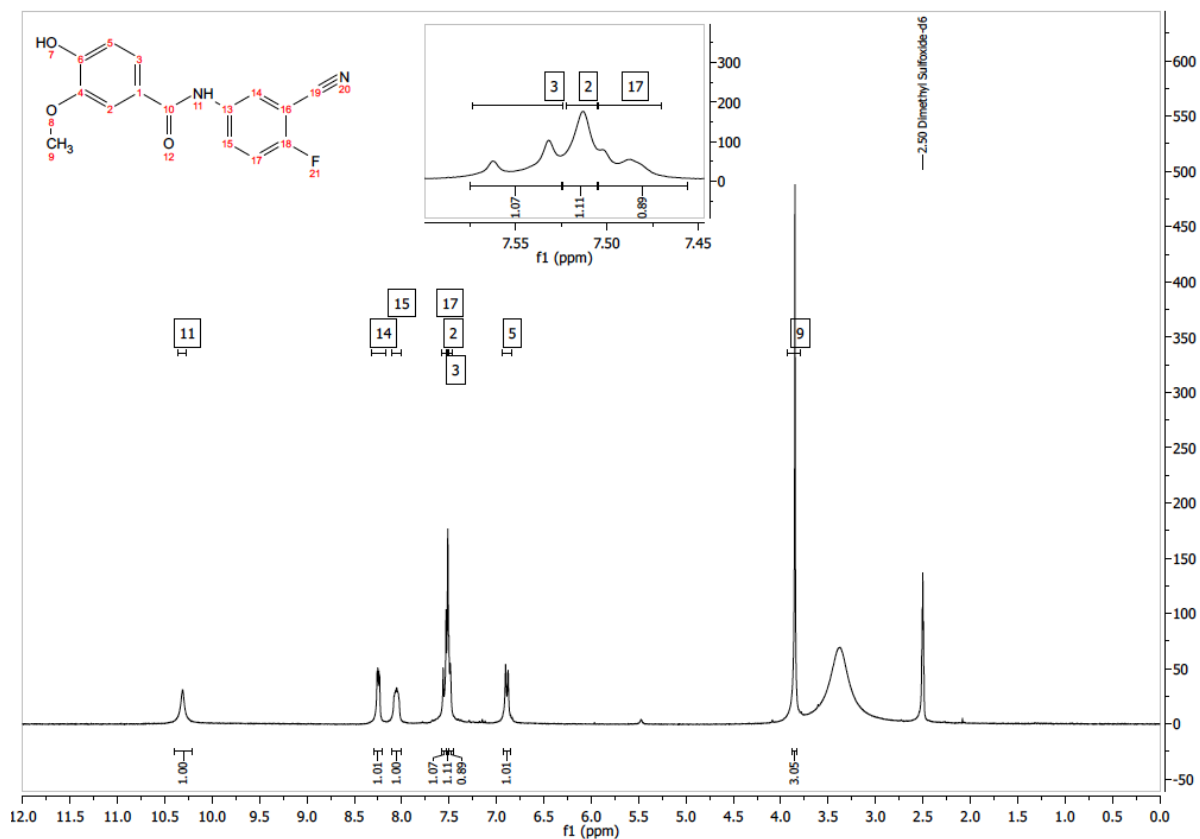


Figura 3. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (A1)

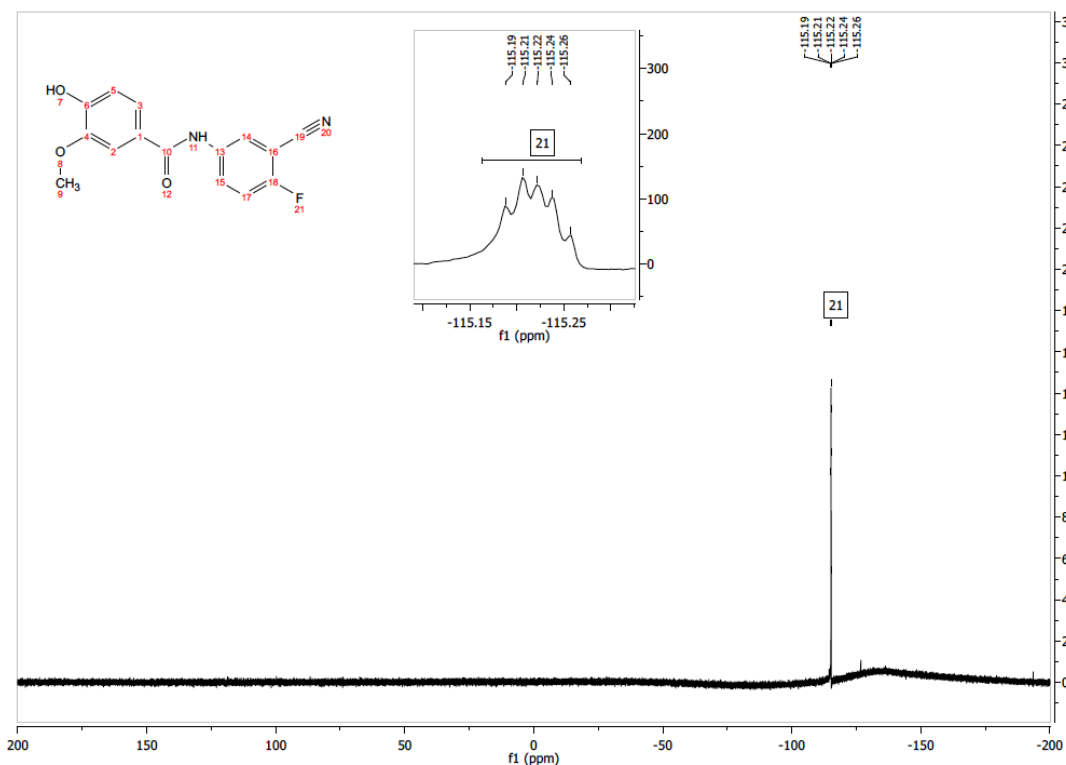


Figura 4. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida (A2)

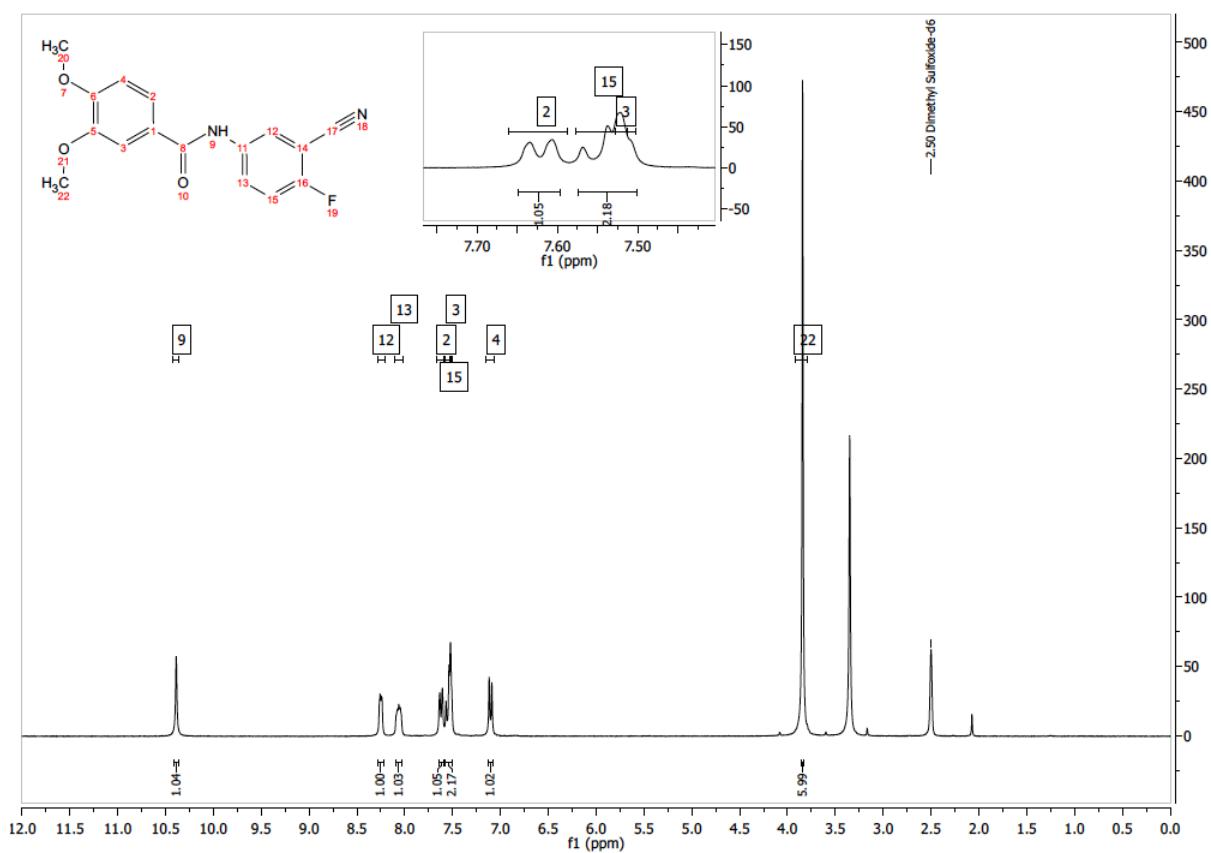


Figura 5. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida (A2)

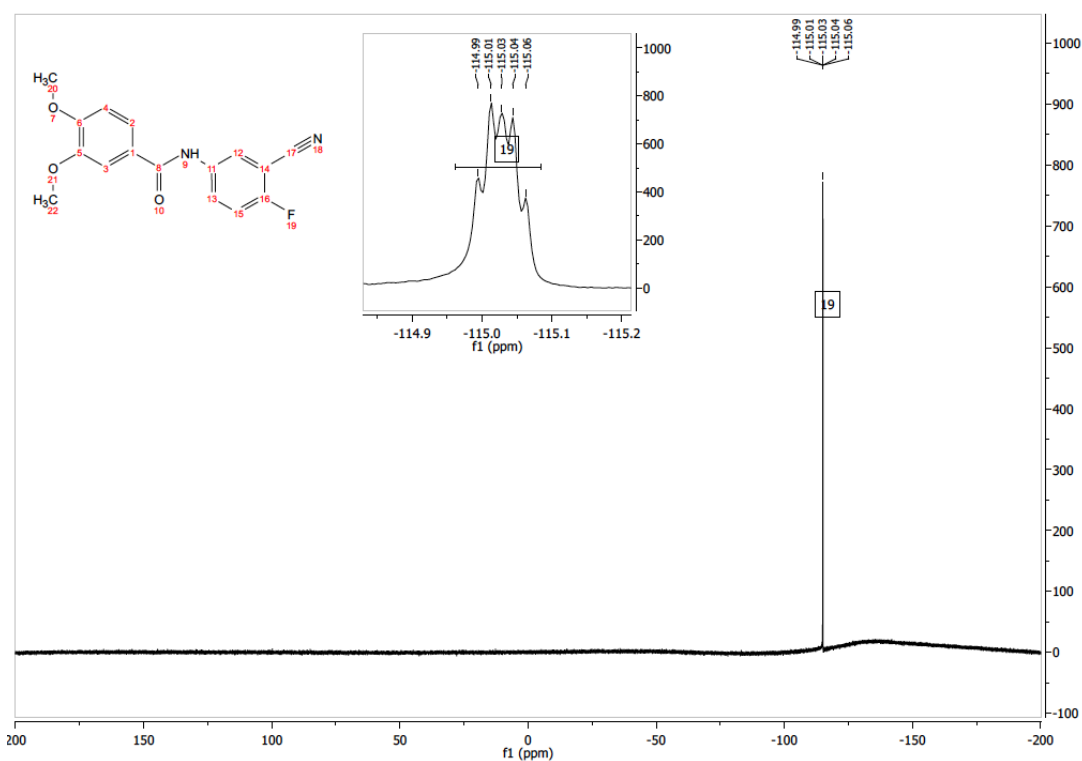


Figura 6. Espectro de FT-IR de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida (A2)

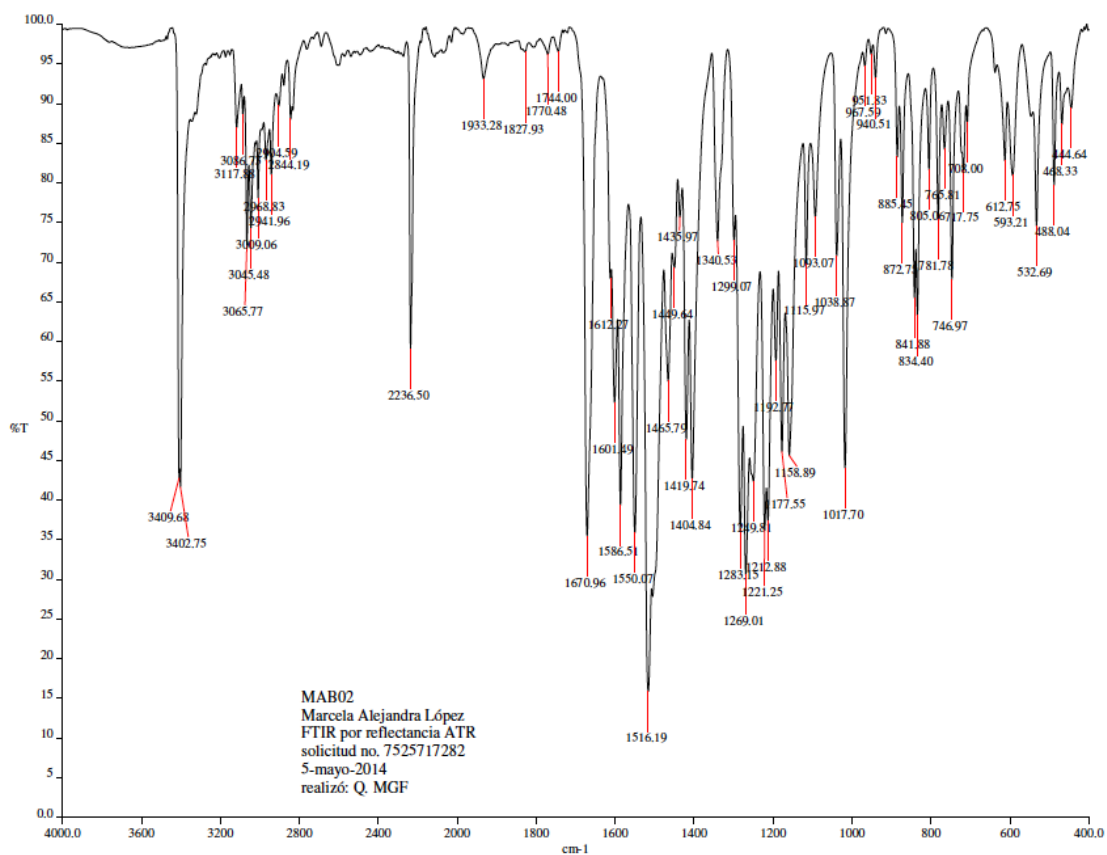


Figura 7. Espectro de EM-IE de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4-dimetoxibenzamida (A2)

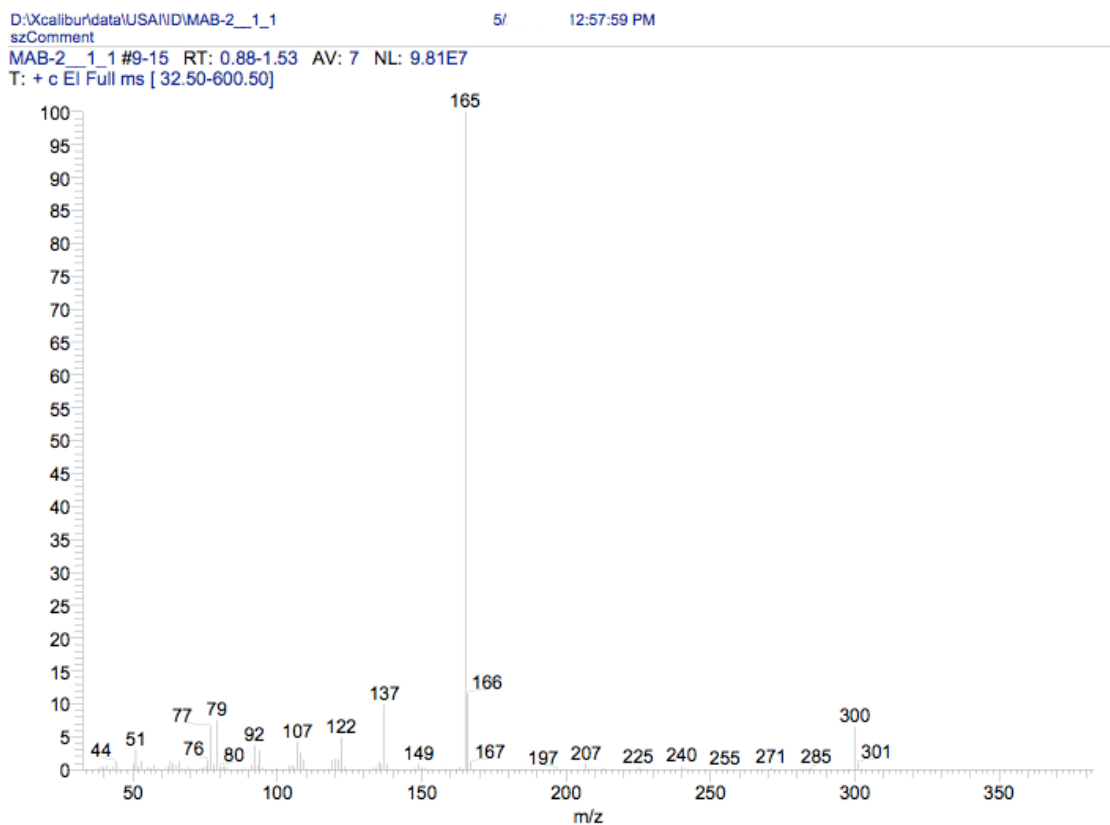


Figura 8. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (A3)

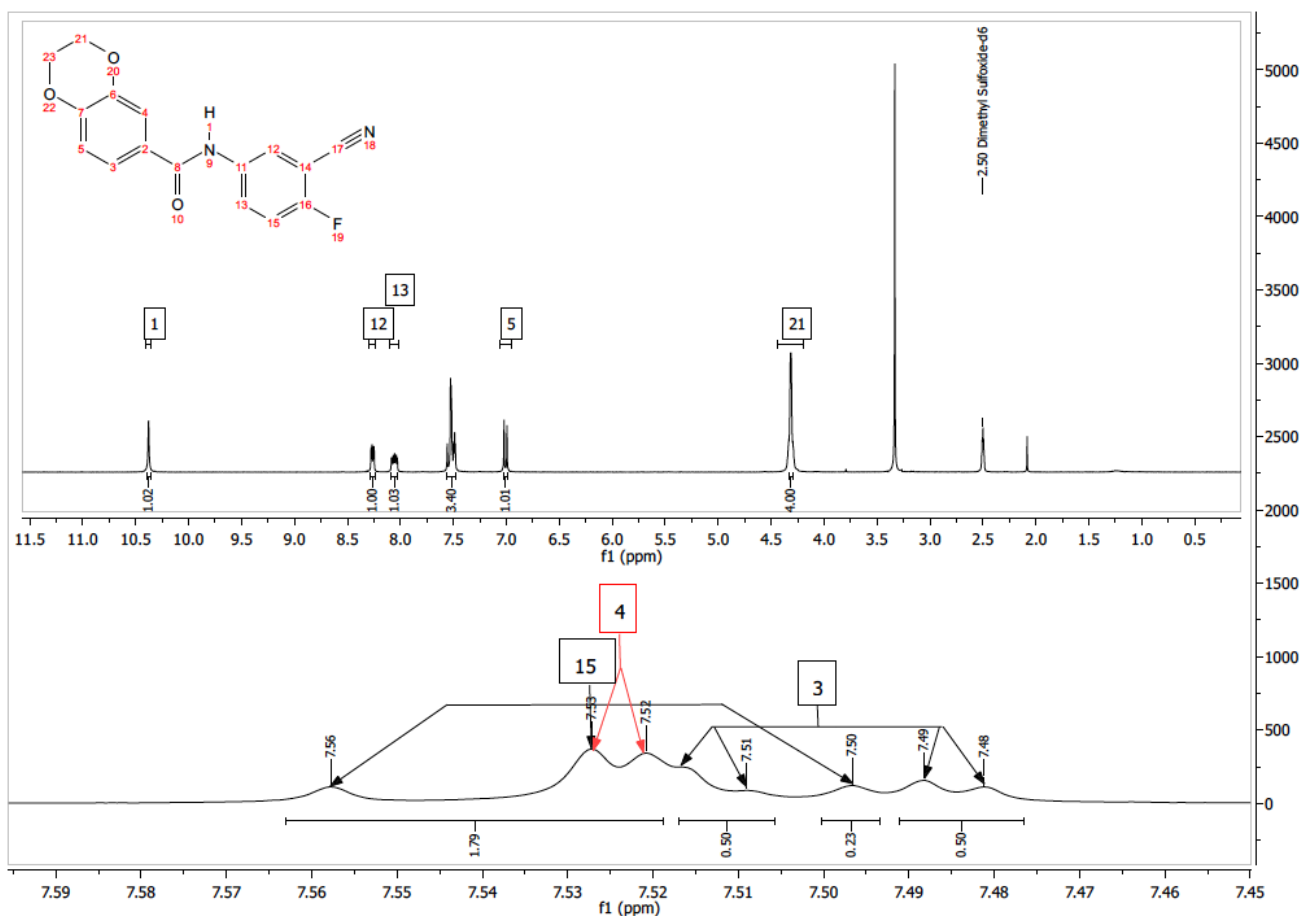


Figura 9. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (A3)

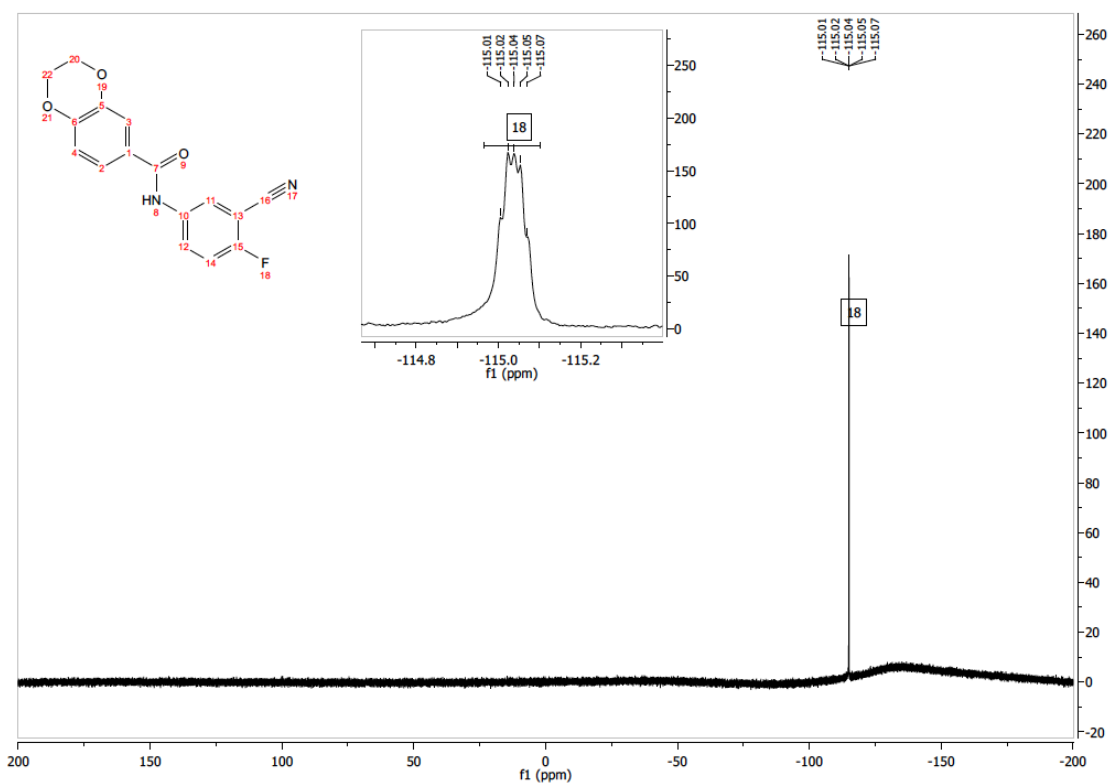


Figura 10. Espectro de FT-IR de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (A3)

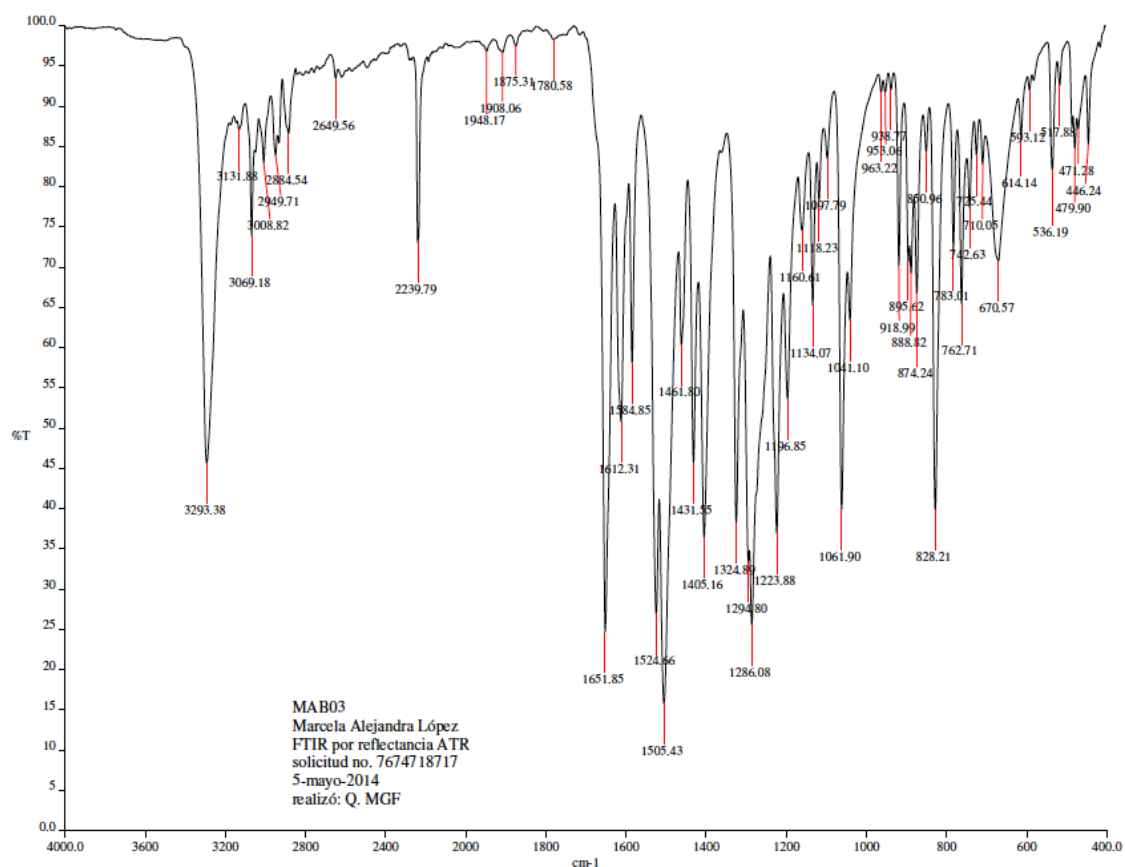


Figura 11. Espectro de EM-IE de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (A3)

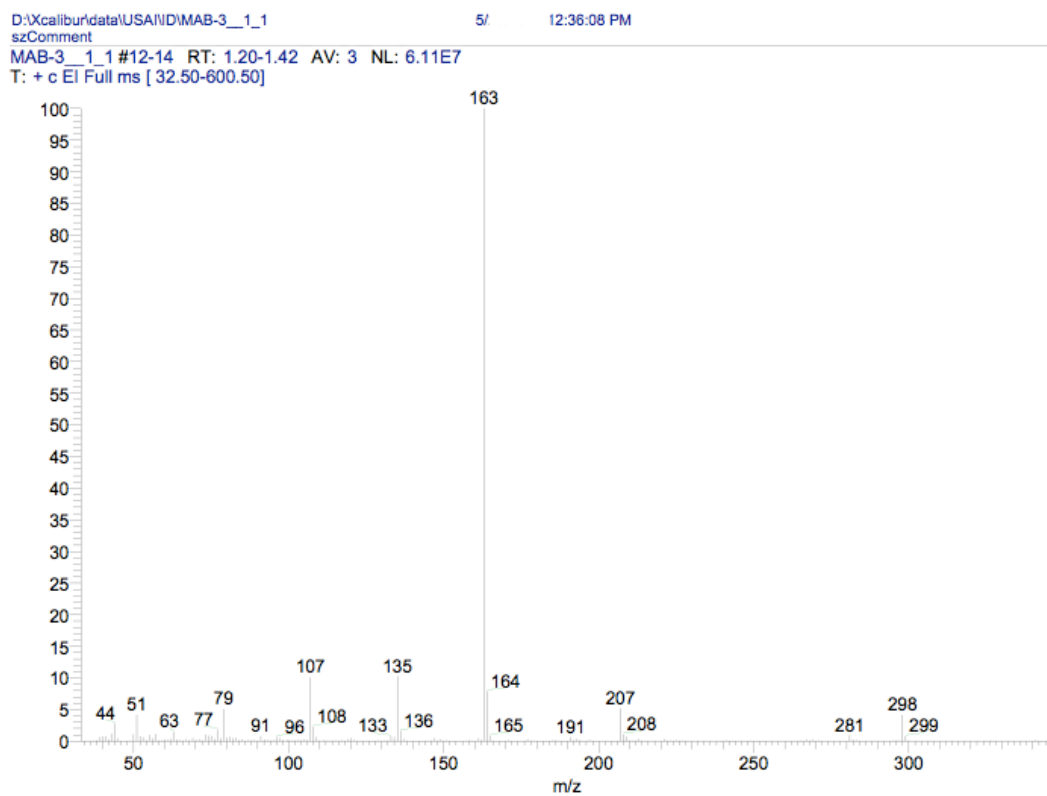


Figura 12. Espectro de RMN ^1H de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (A5)

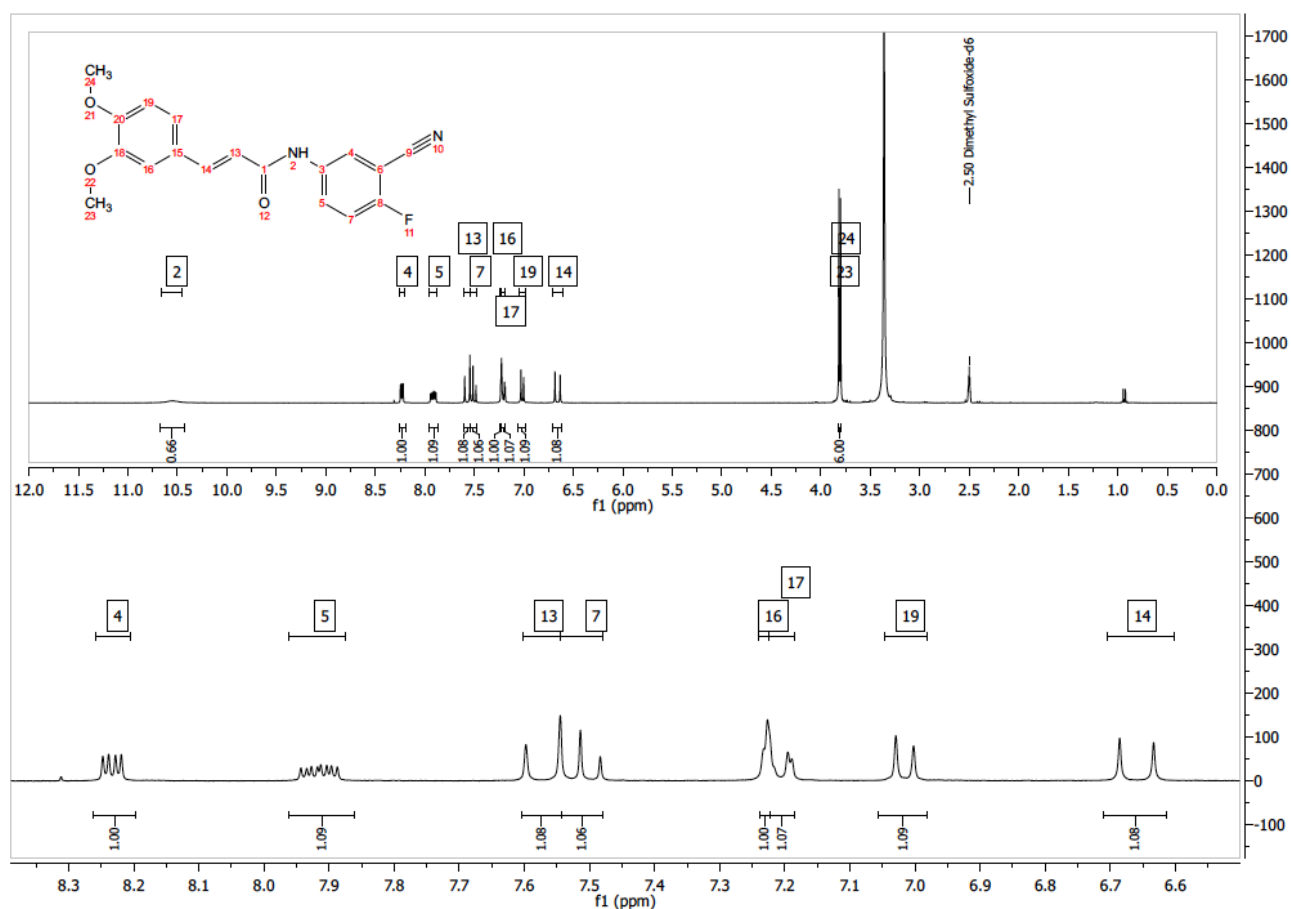


Figura 13. Espectro de RMN ^{19}F de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (A5)

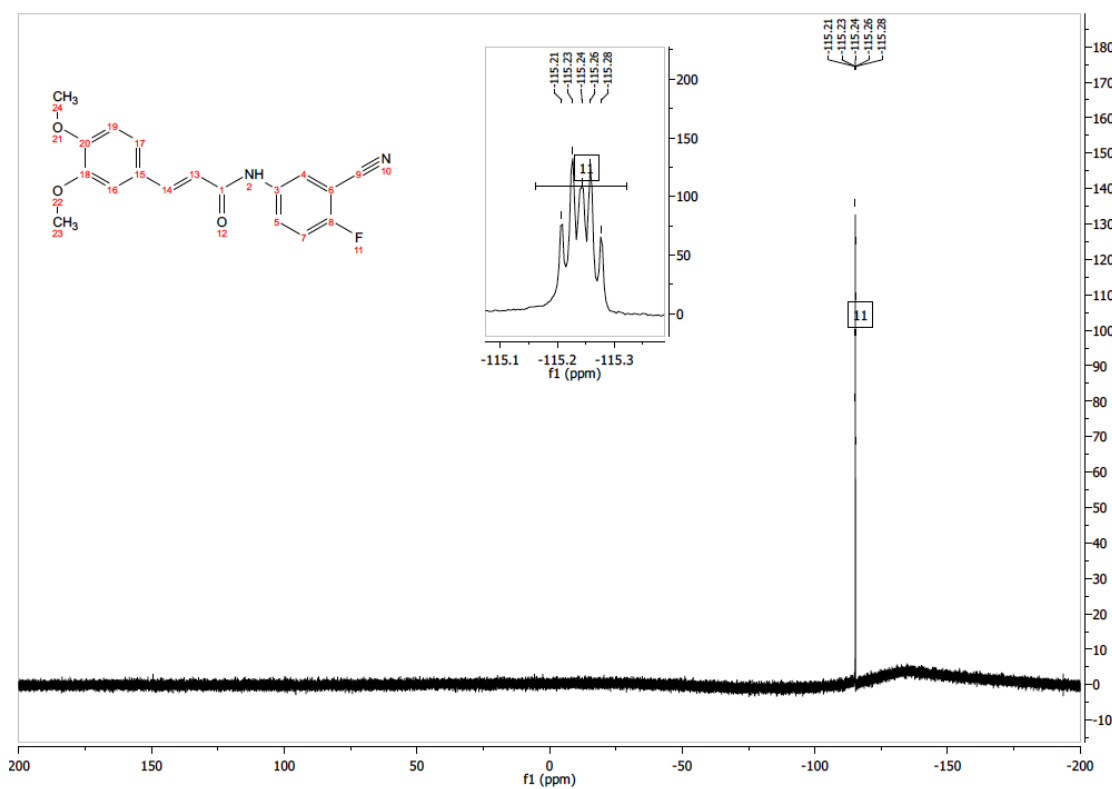


Figura 14. Espectro de FT-IR de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (A5)

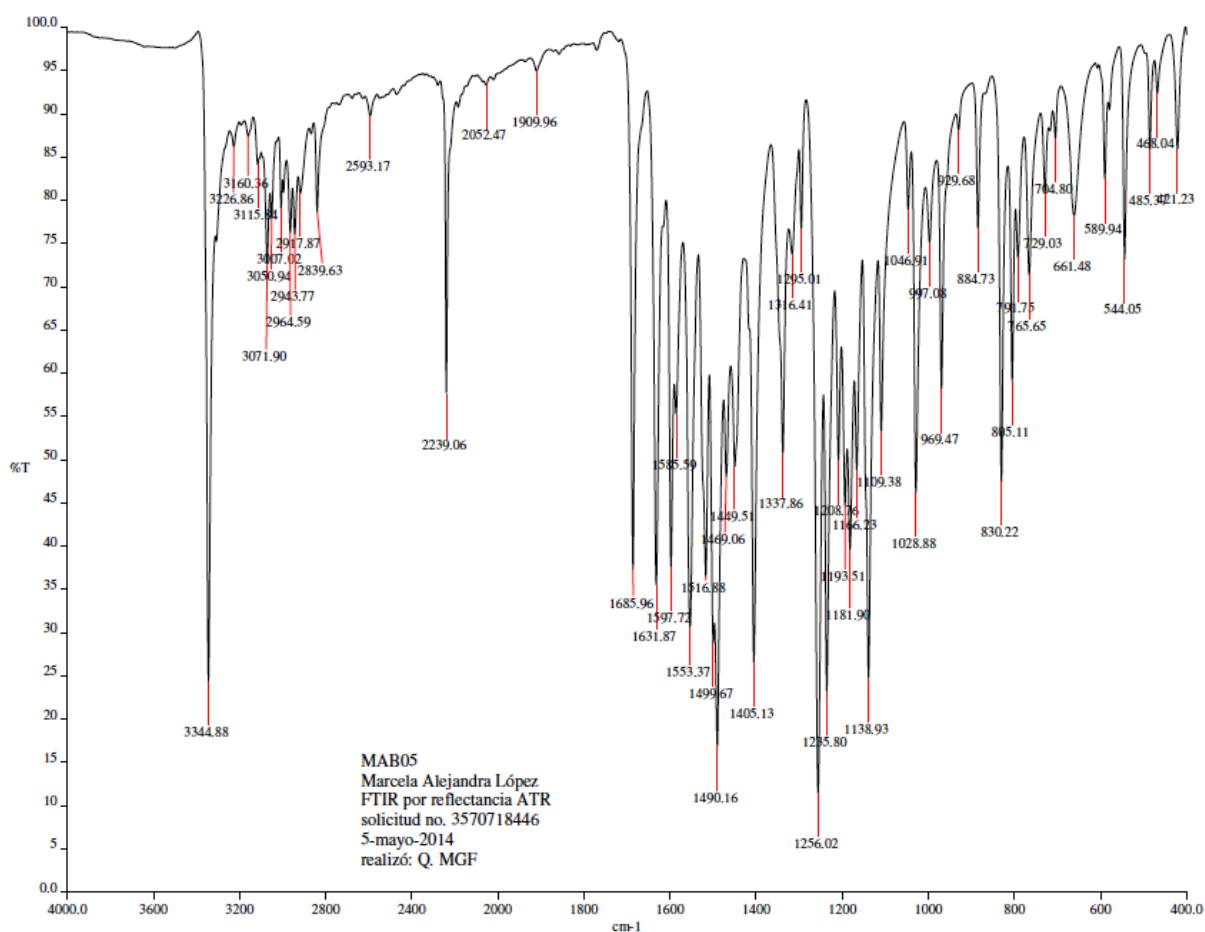


Figura 15. Espectro de EM-IE de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (A5)

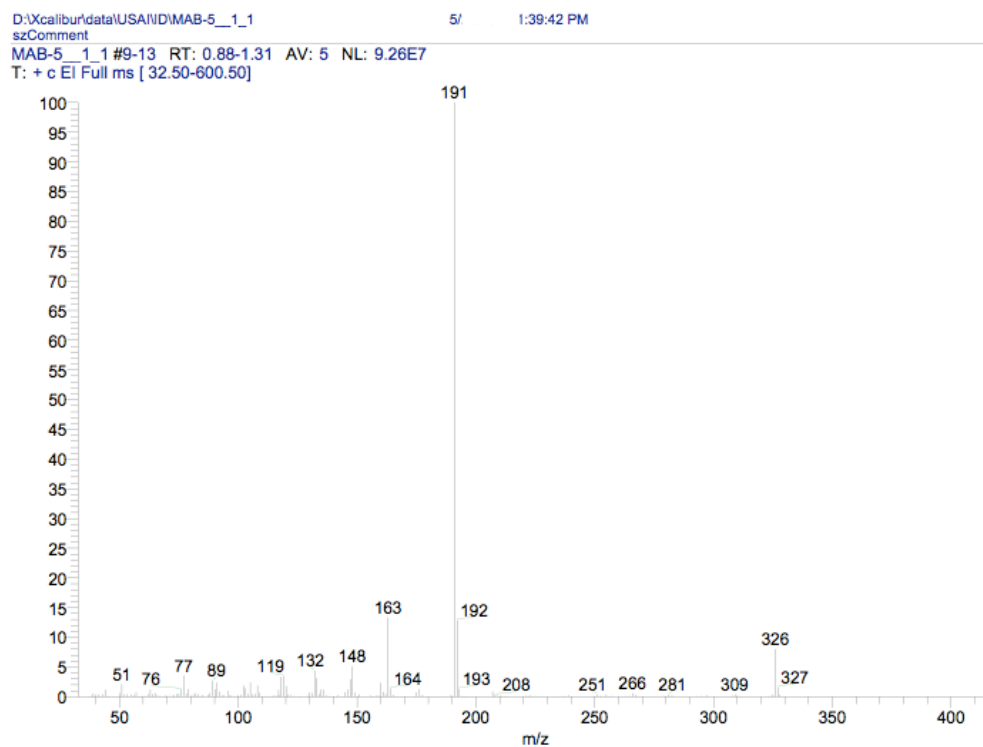


Figura 16. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (A6)

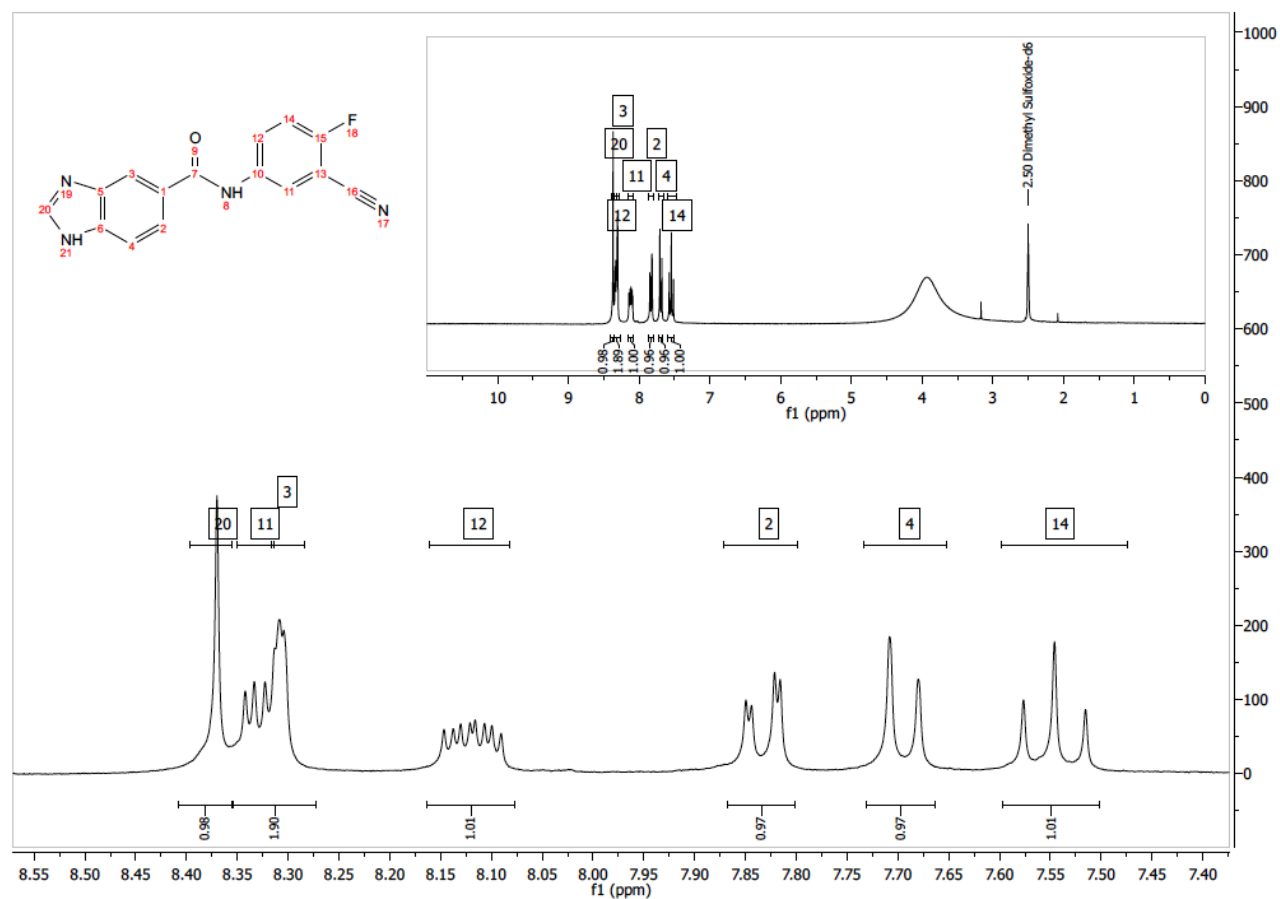


Figura 17. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (A6)

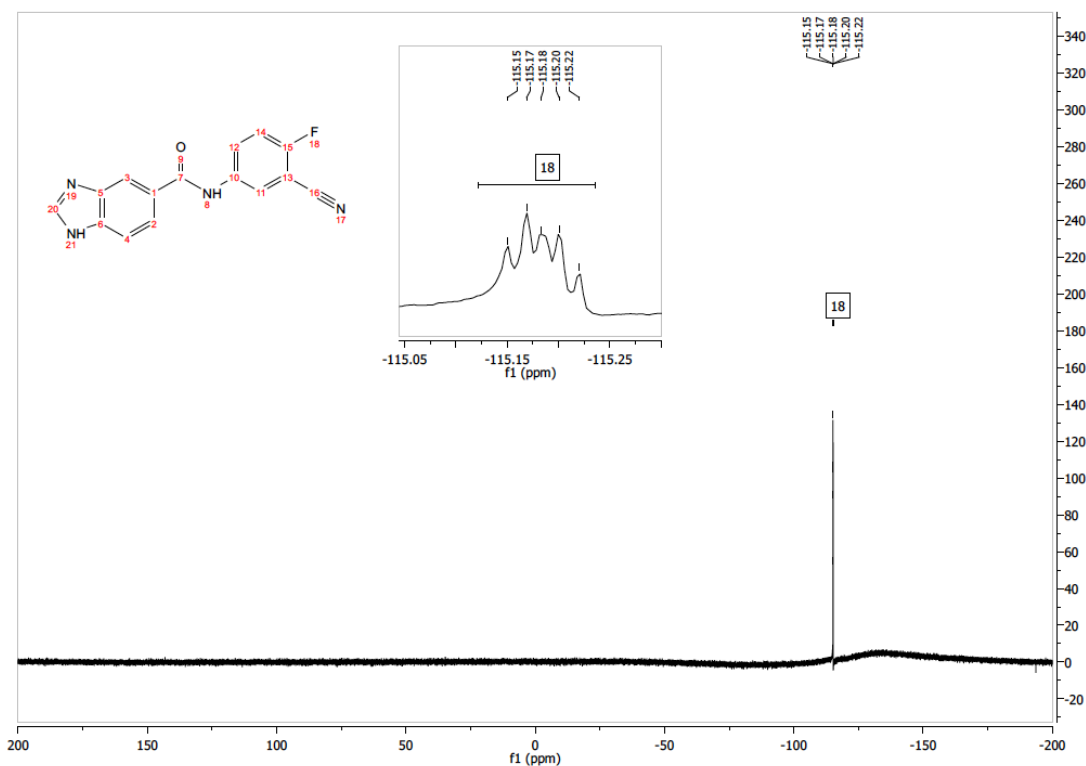


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida (A7)

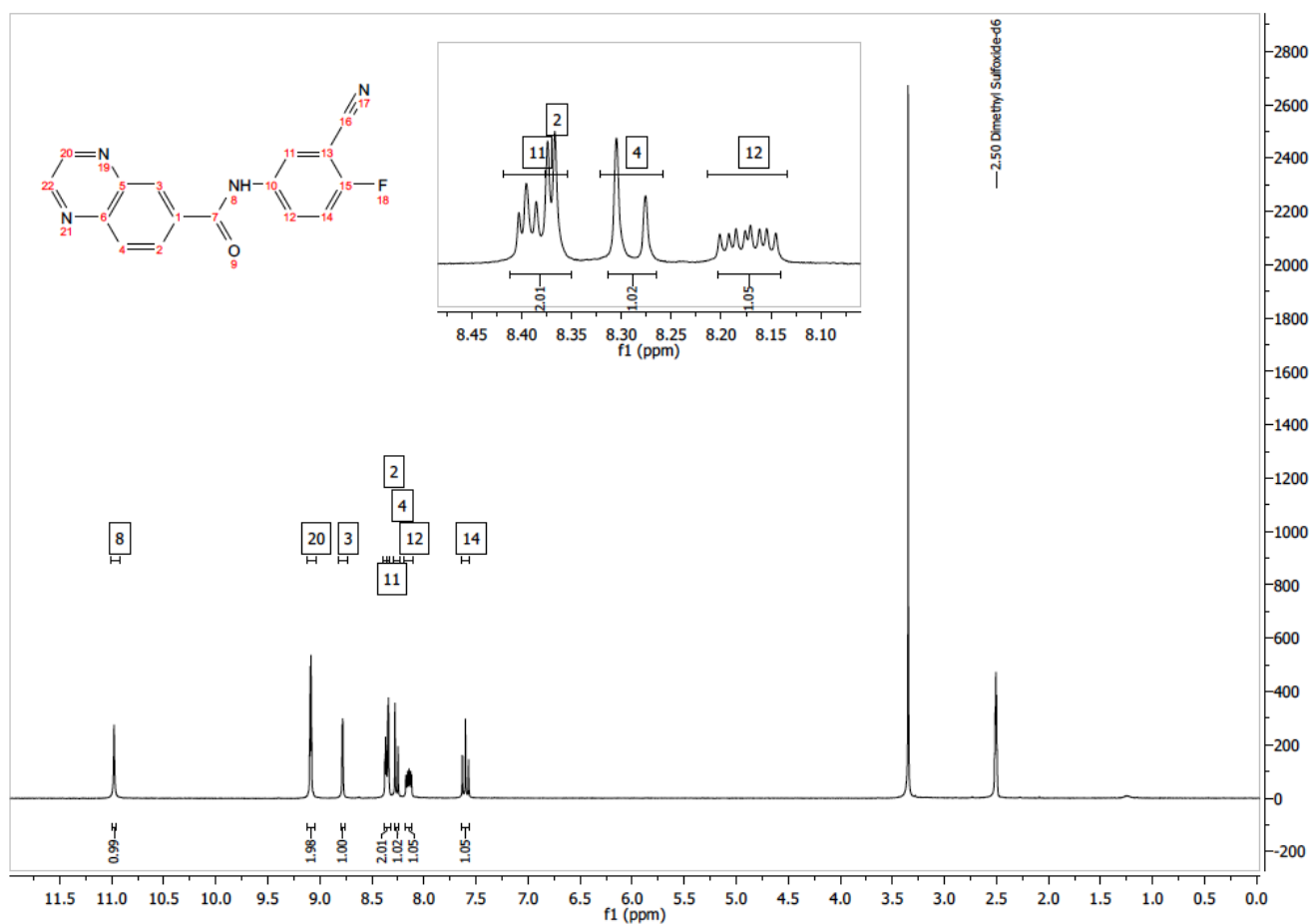


Figura 19. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)quinoxalin-6-carboxamida (A7)

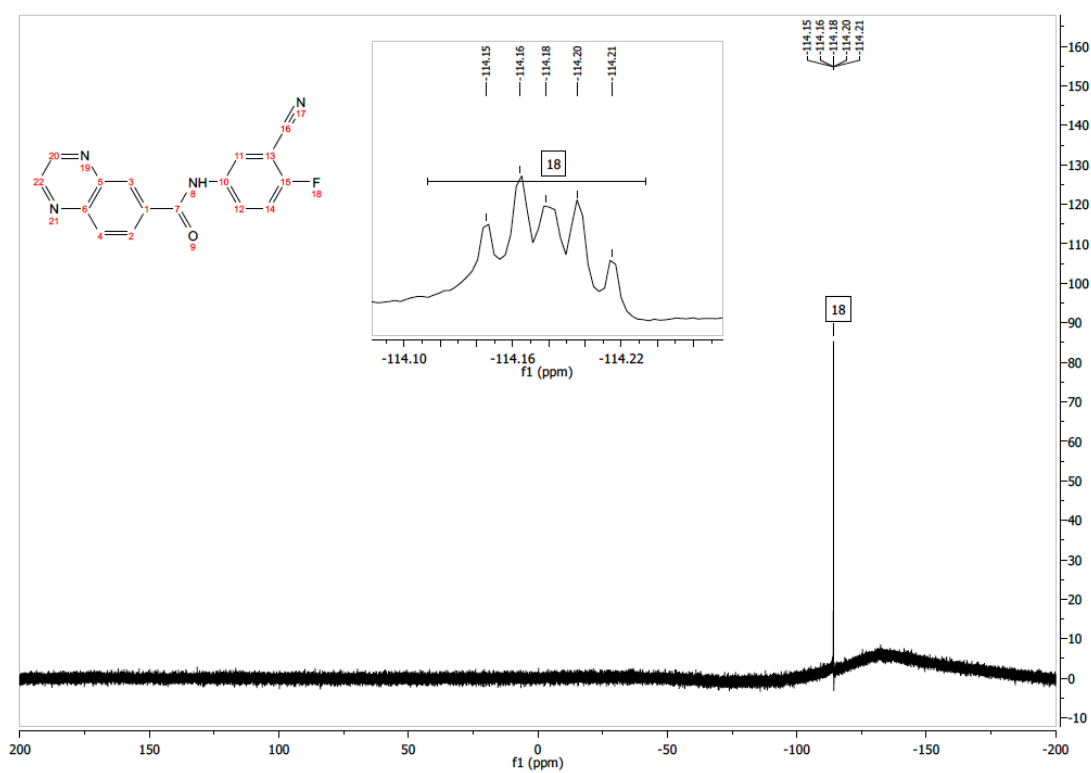


Figura 20. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (A8)

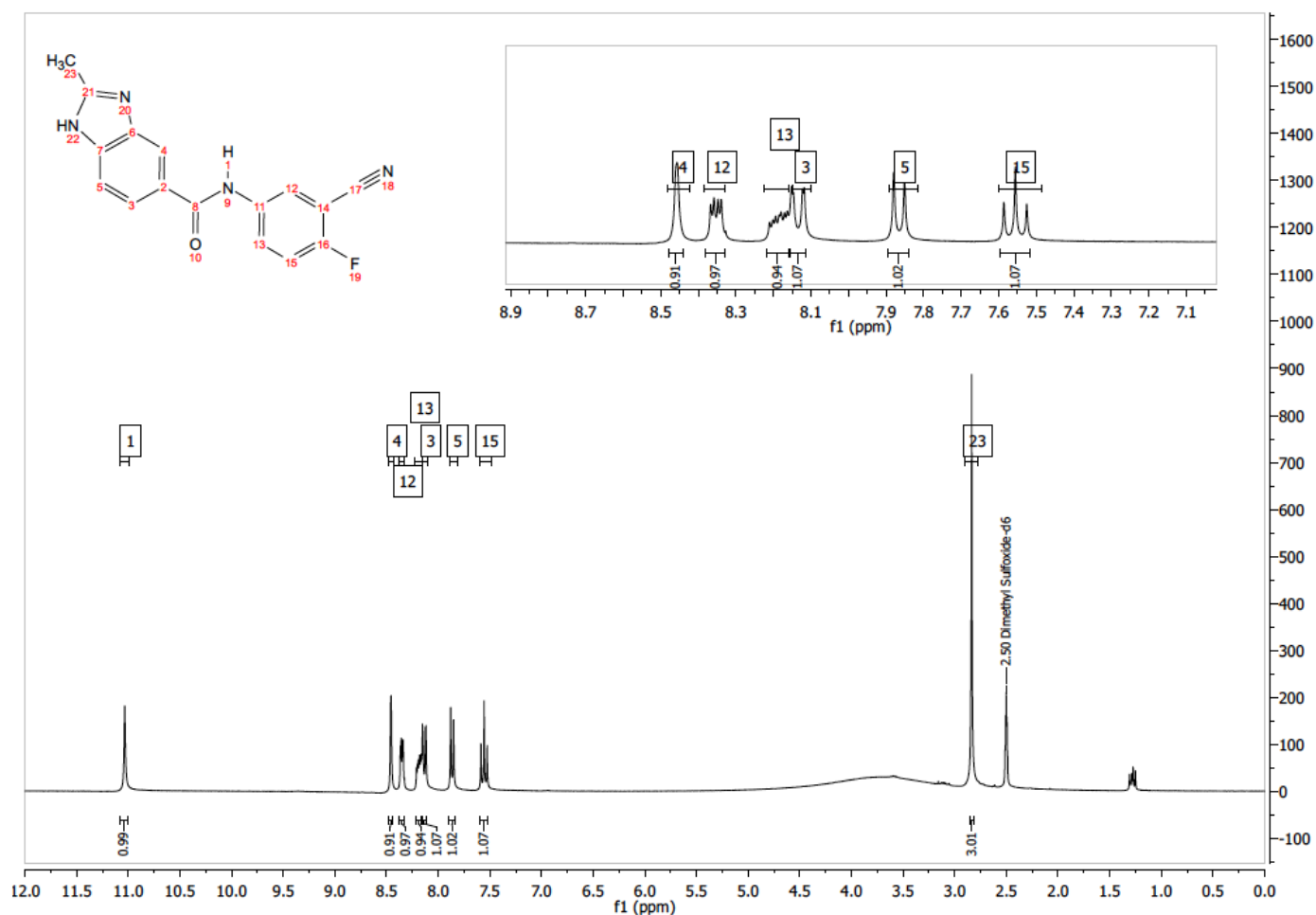


Figura 21. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (A8)

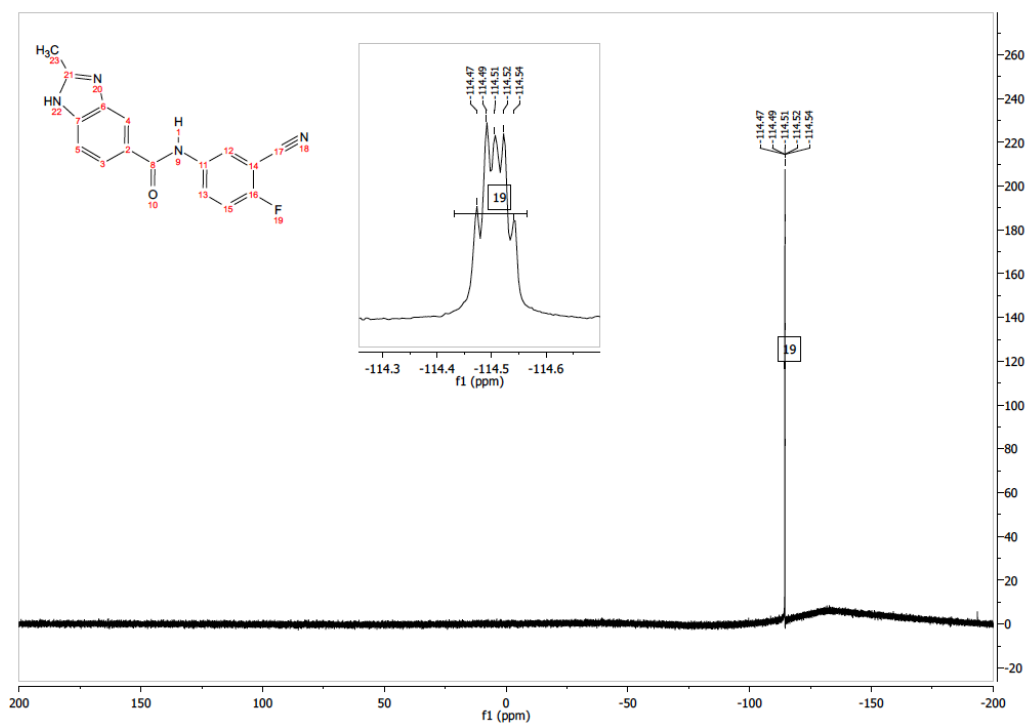


Figura 22. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (A11)

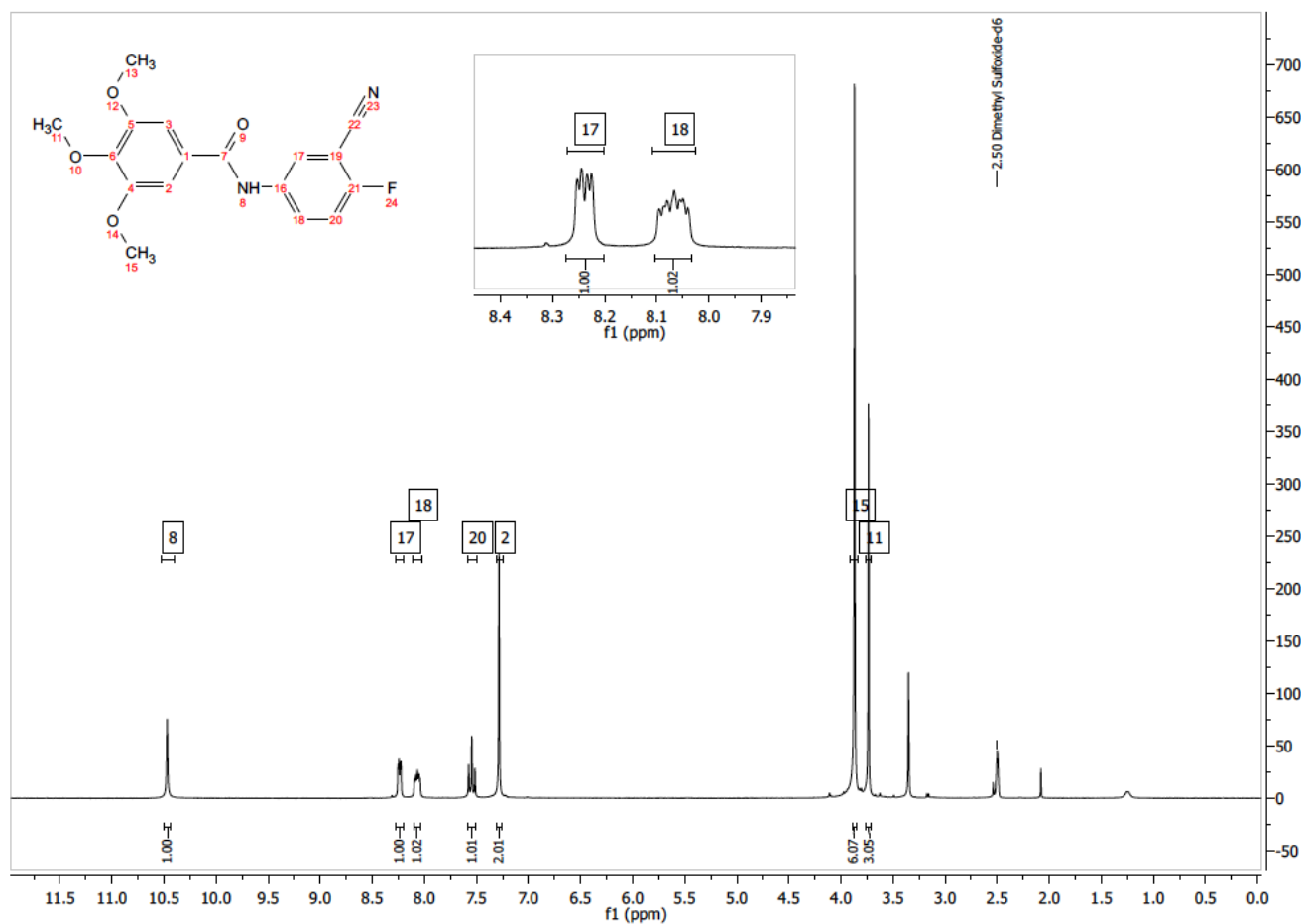


Figura 23. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (A11)

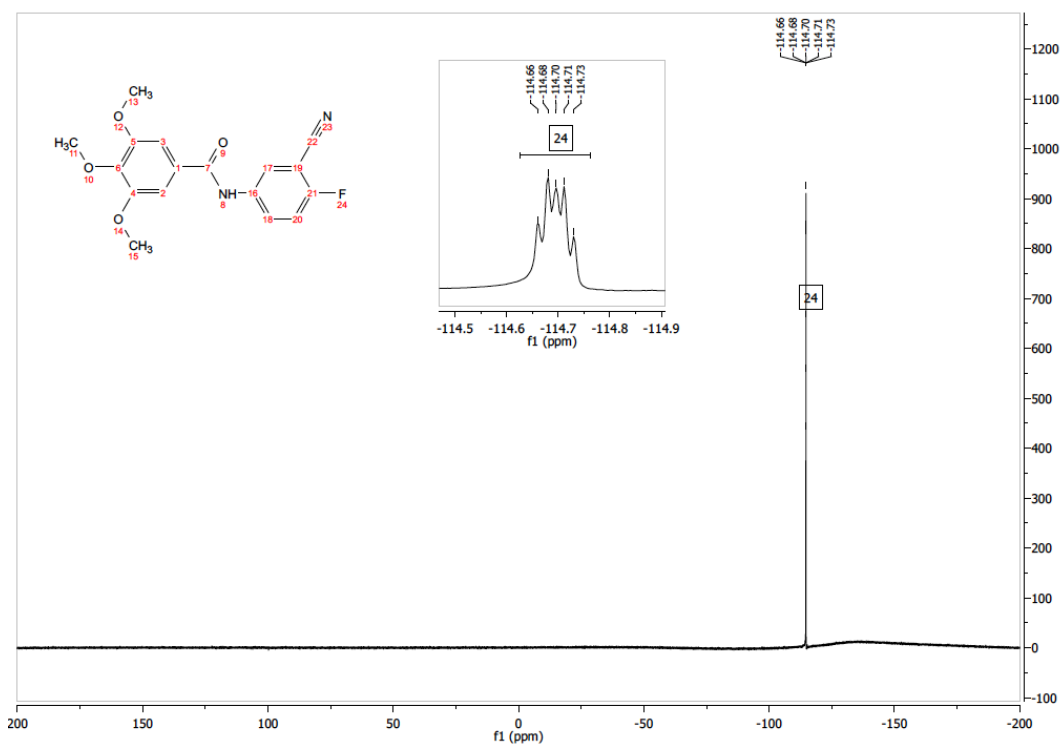


Figura 24. Espectro de RMN ^1H de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12)

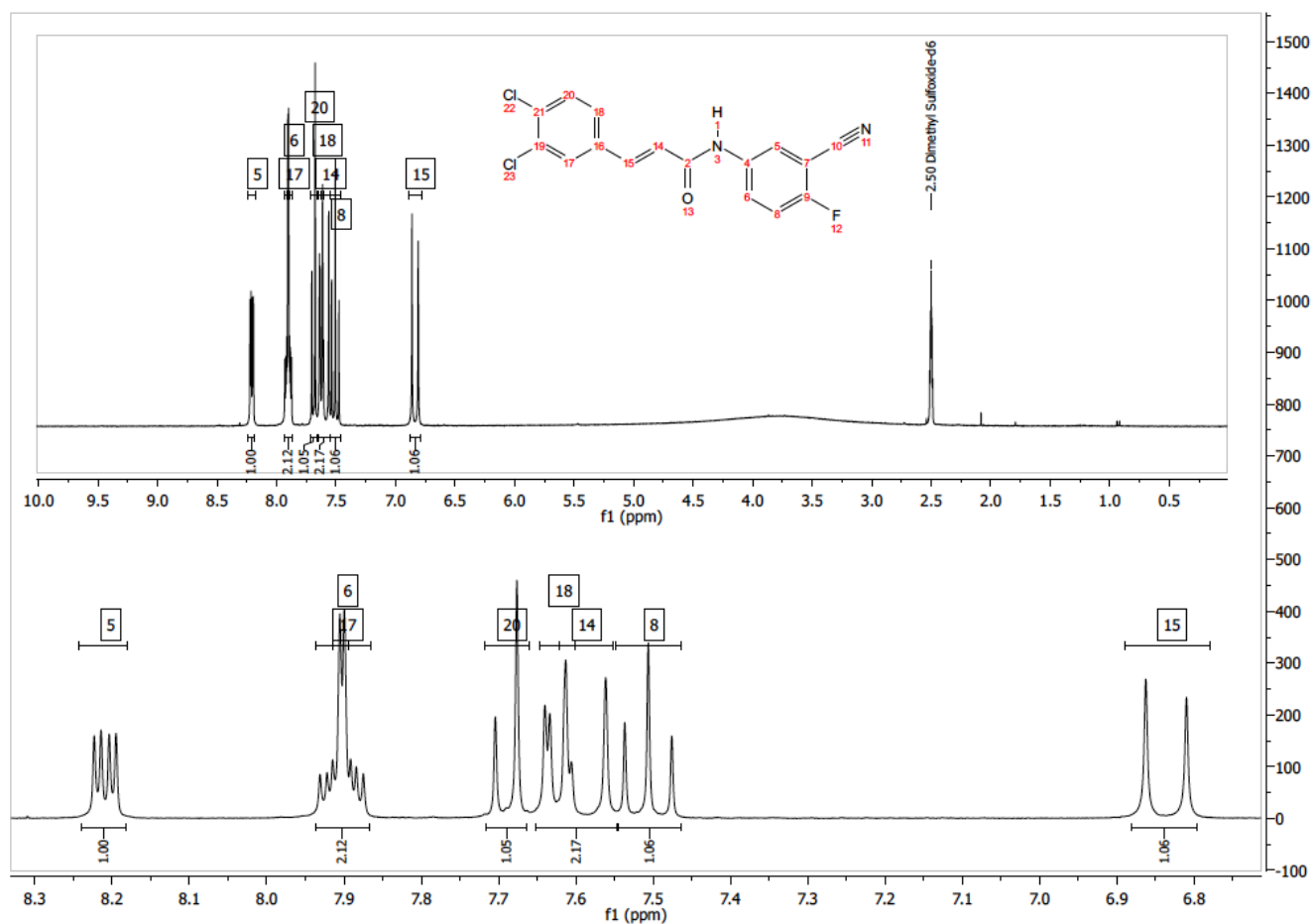


Figura 25. Espectro de RMN ^{19}F de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12)

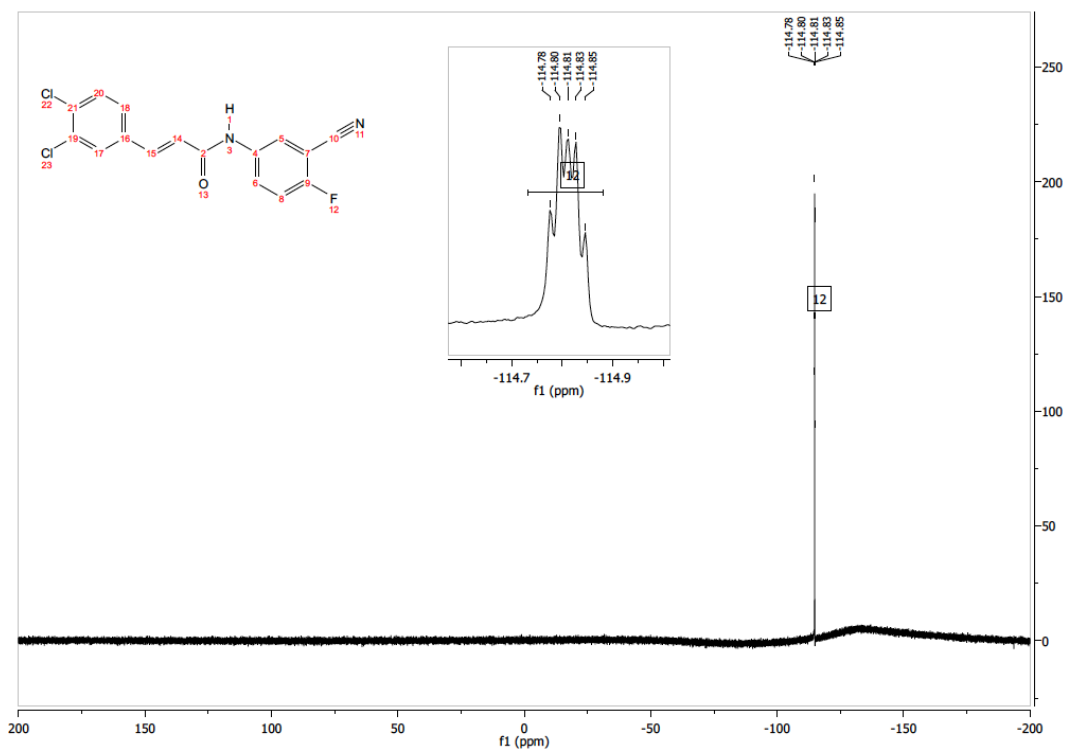


Figura 26. Espectro de FT-IR de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12)

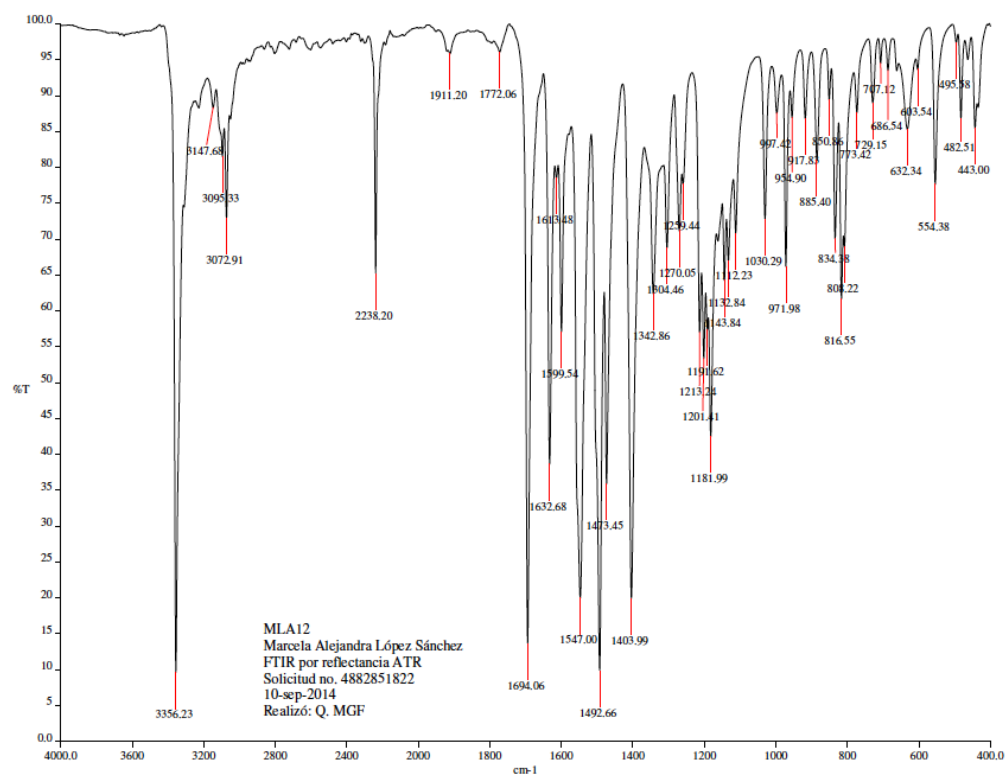


Figura 27. Espectro de masas por DART de (2E)-N-(3-ciano-4-fluorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-enamida (A12)

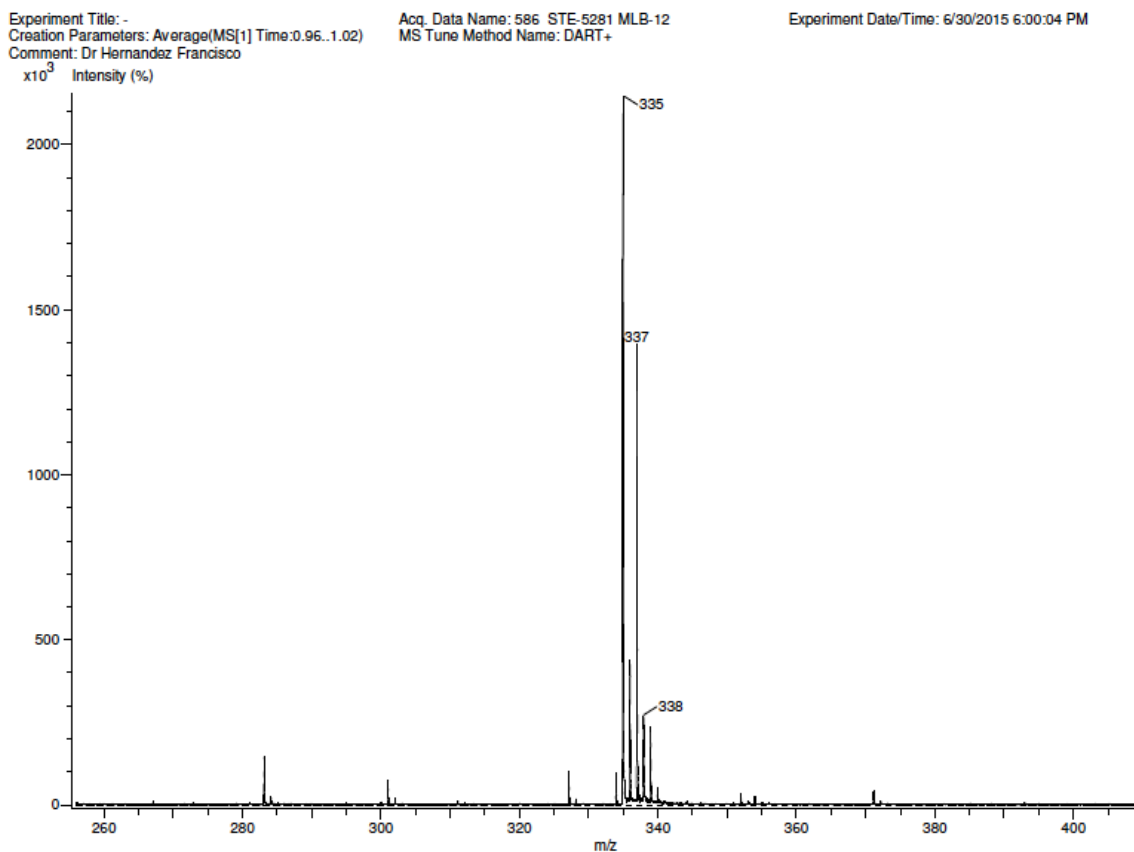


Figura 28. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (A13)

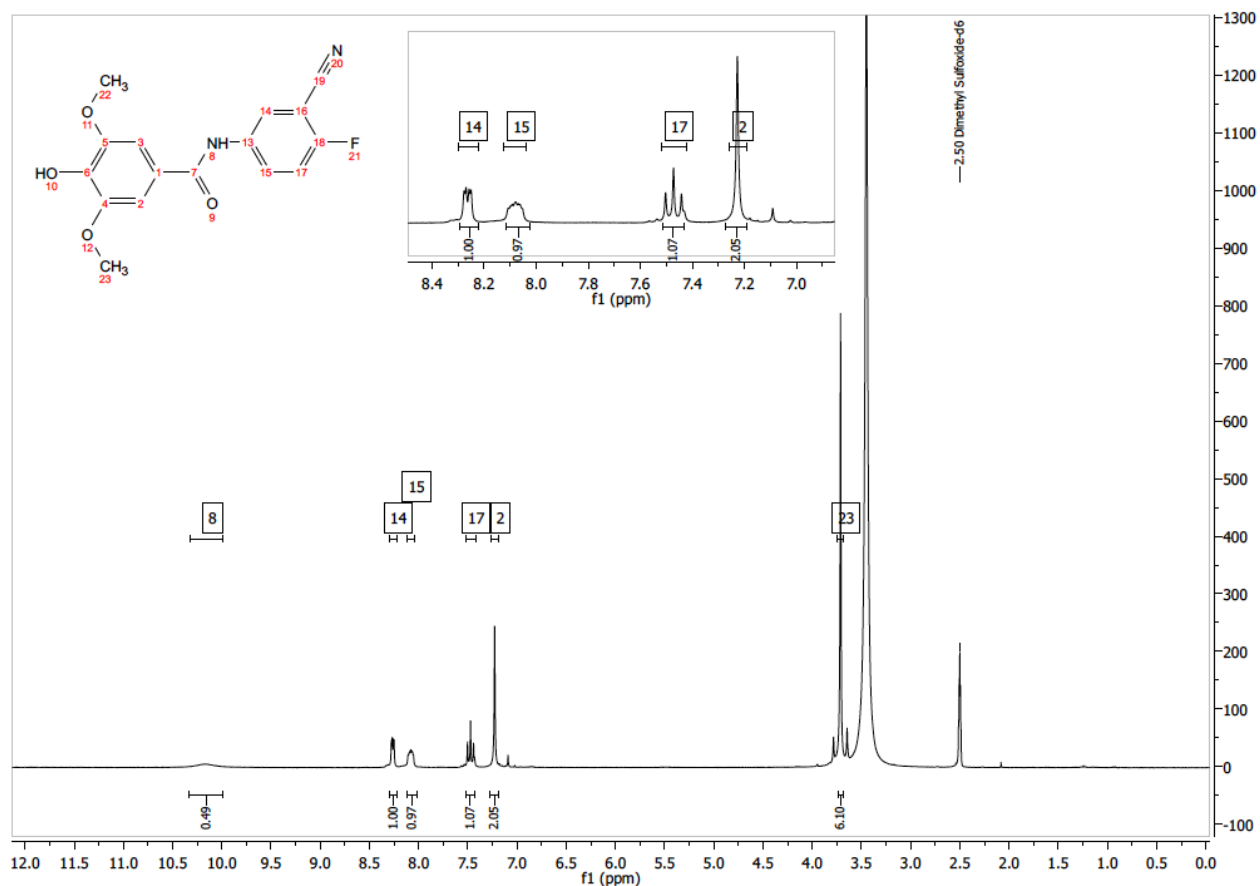


Figura 29. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (A13)

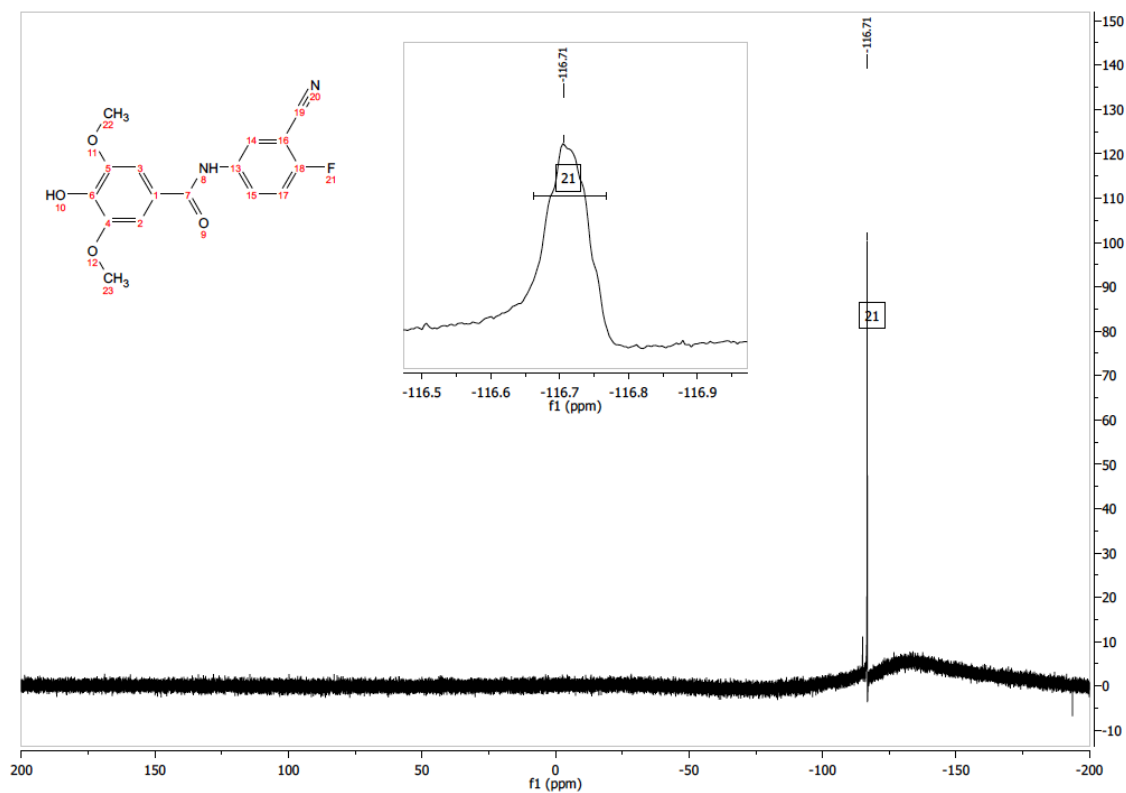


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida (A14)

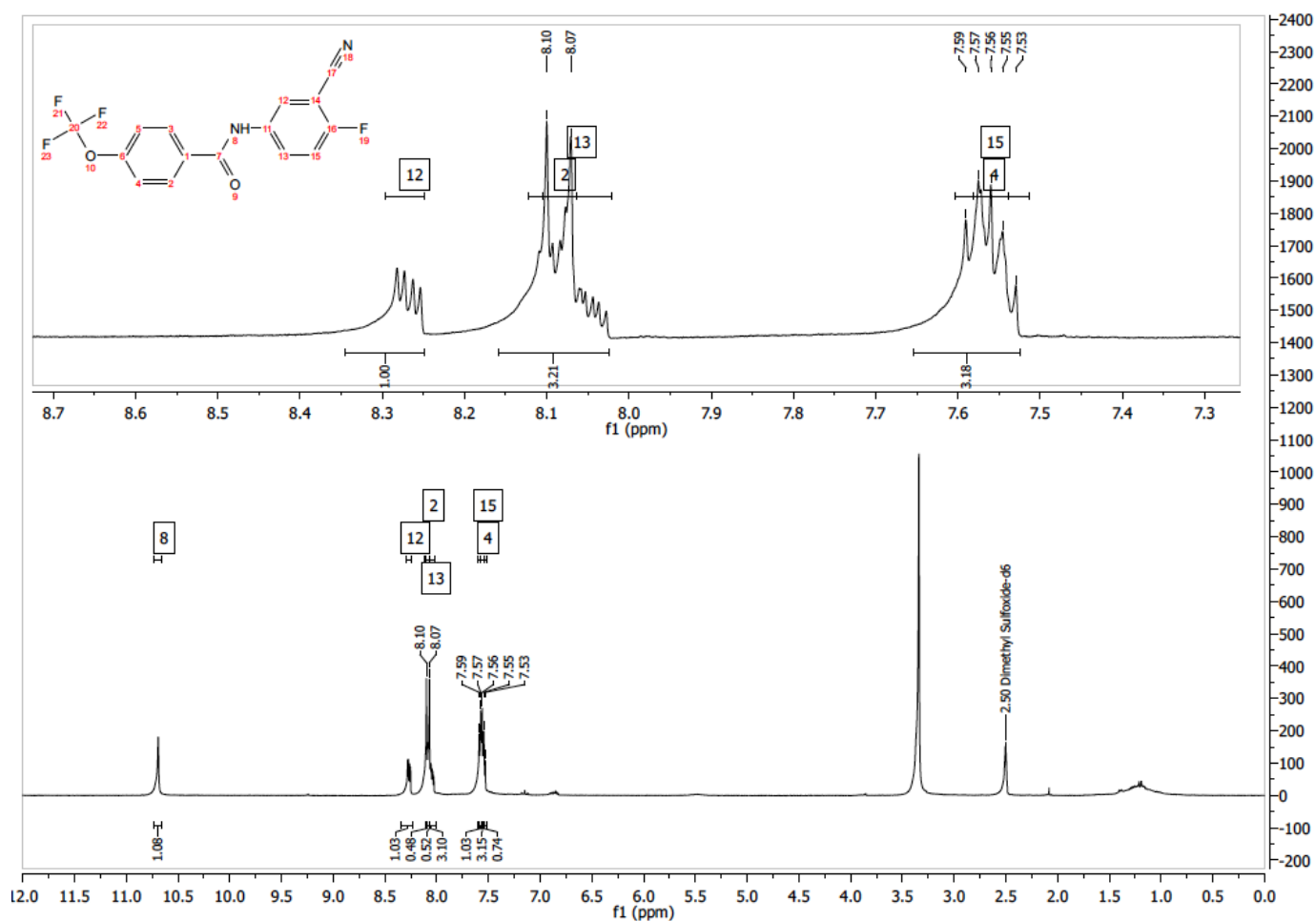


Figura 31. Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-trifluorometoxibenzamida (A14)

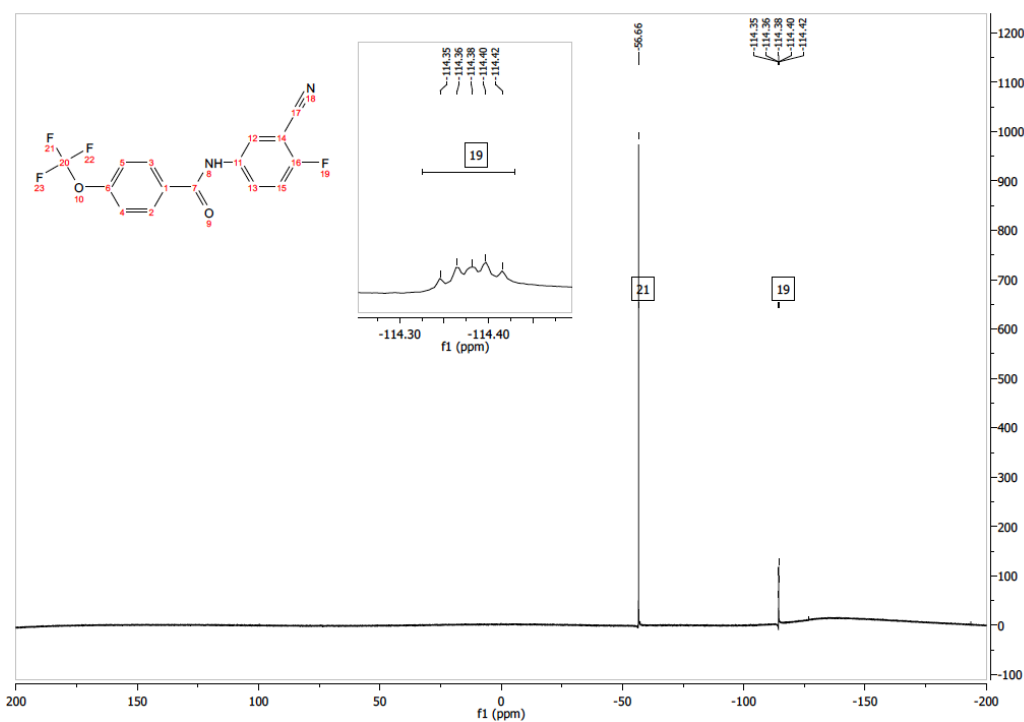


Figura 32. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

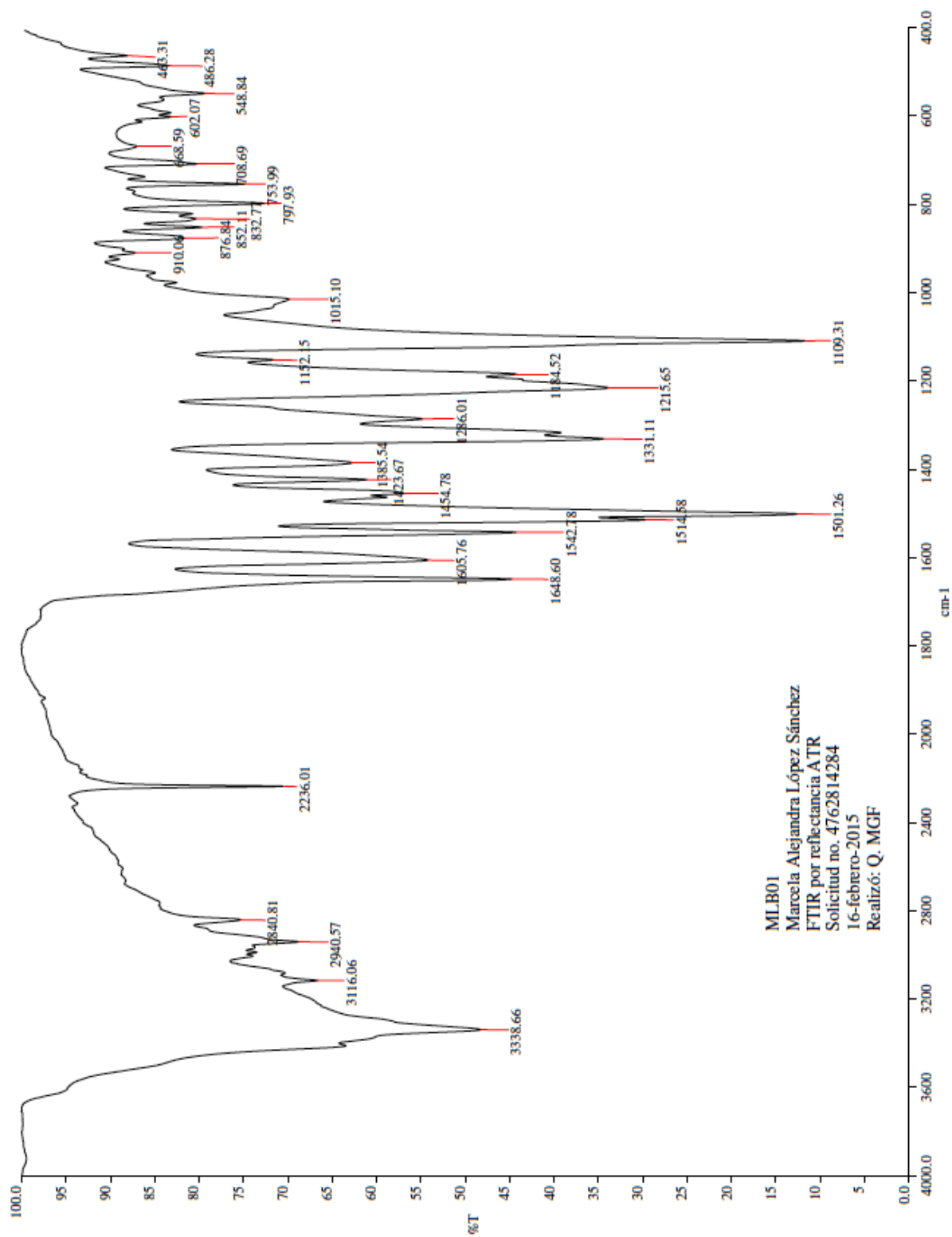


Figura 33. Espectro de masas por DART de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

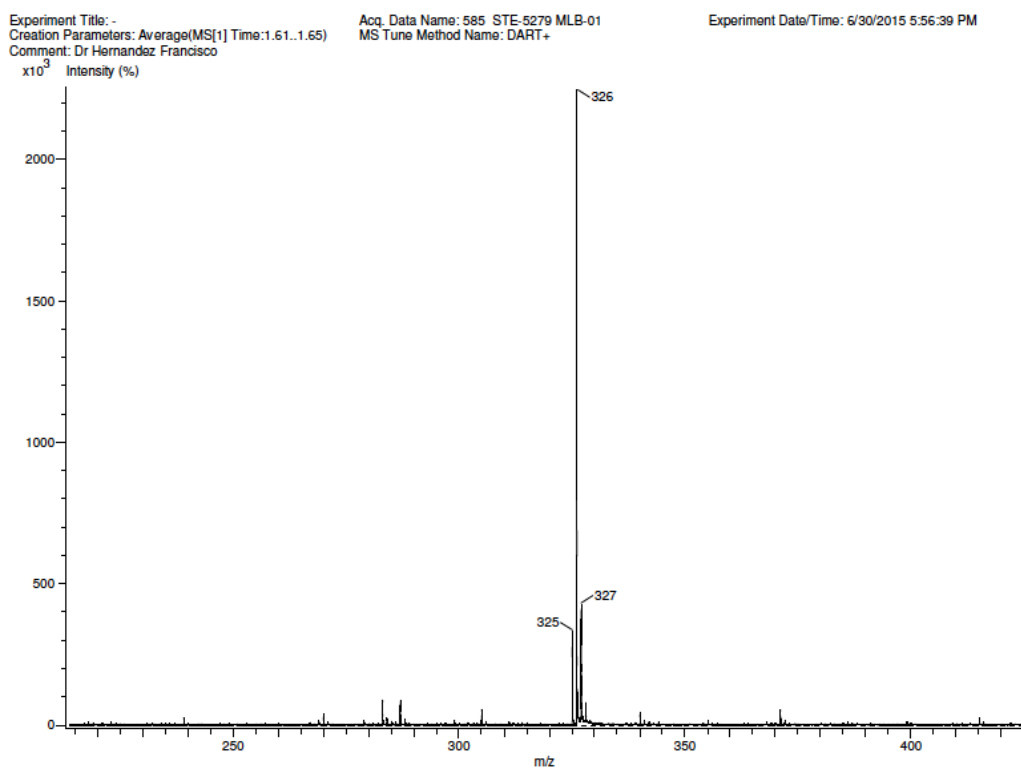


Figura 34. Espectro de masas de alta resolución por ESI de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

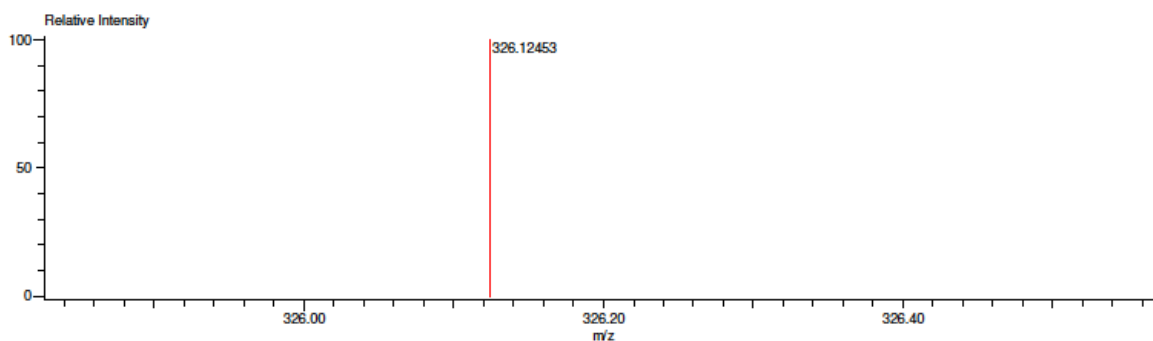
Data:585 STE-5279 MLB-01
 Sample Name:Dr Hernandez Francisco
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%];Correct Base[5.0%];Average[MS[1] 1.3...

Acquired:6/30/2015 5:56:39 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal_Peg_600
 Created:7/1/2015 8:35:59 AM
 Created by:AccuTOF

Charge number:1
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ¹⁴N:0 .. 6, ¹⁶O:0 .. 4

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 15.0 (Fraction:.5)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
326.12453	123083.13	326.12531	-0.78	¹² C ₁₆ ¹ H ₁₆ ¹⁴ N ₆ ¹⁶ O ₃	11.5

Figura 35. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

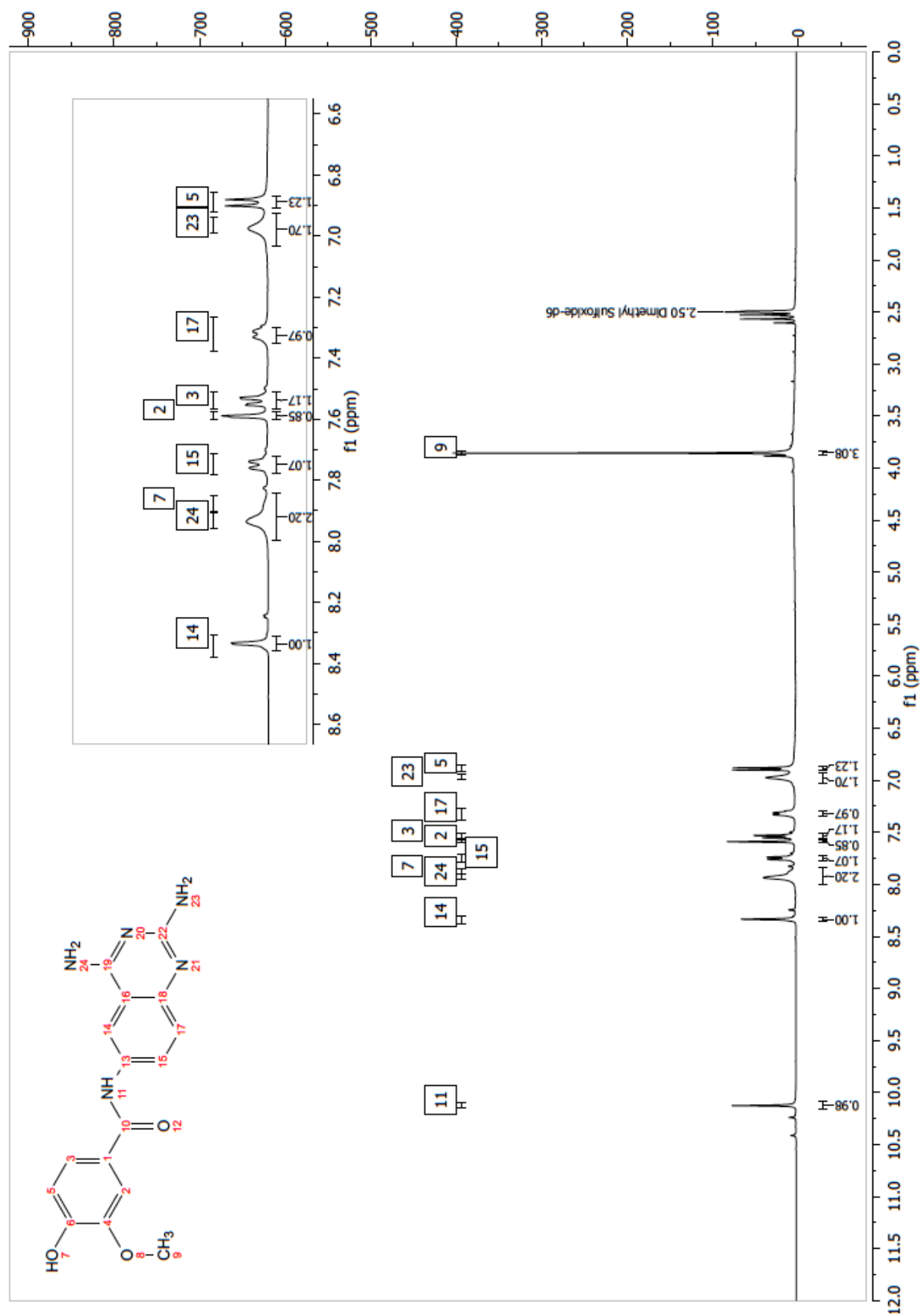


Figura 36. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

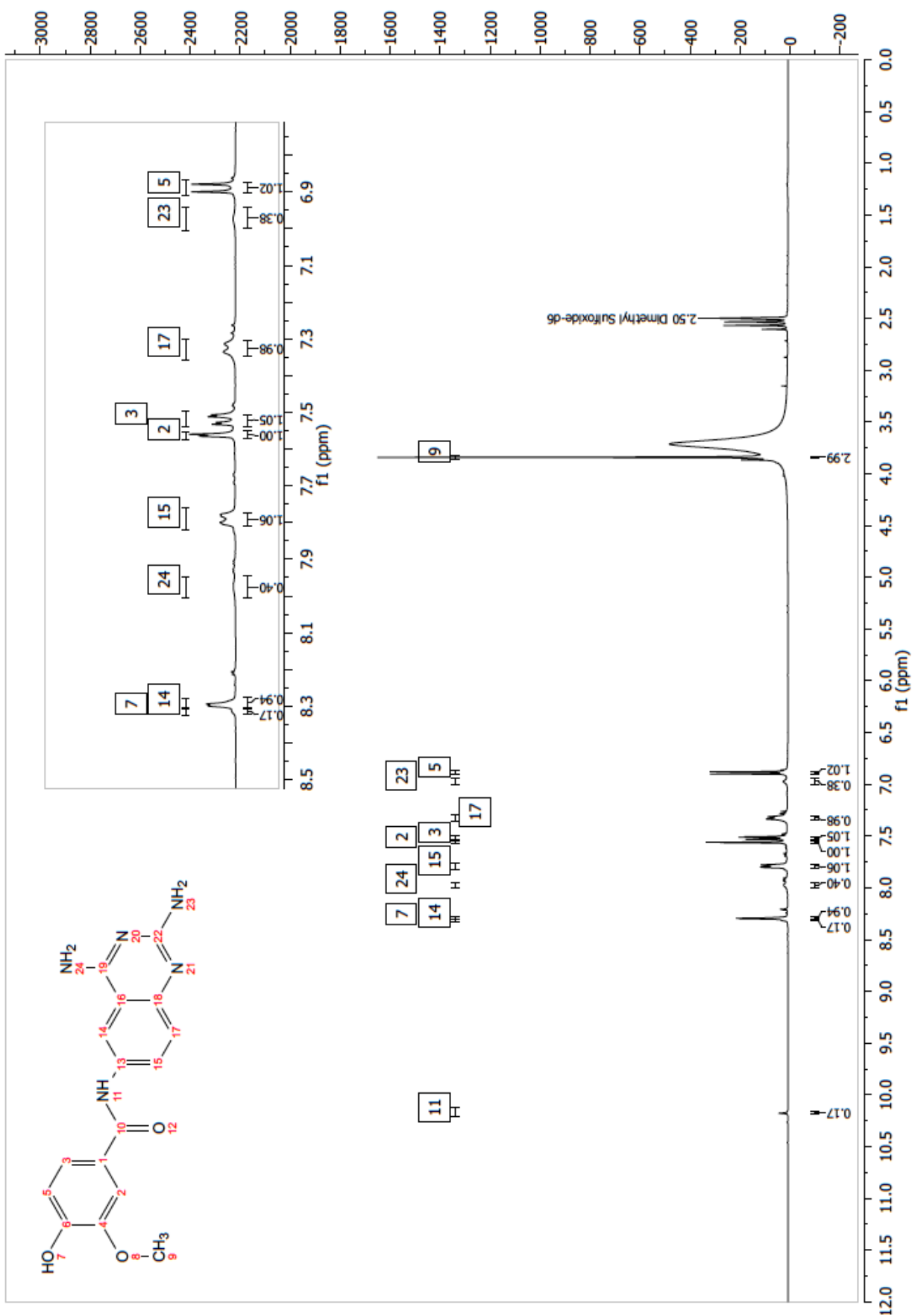


Figura 37. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

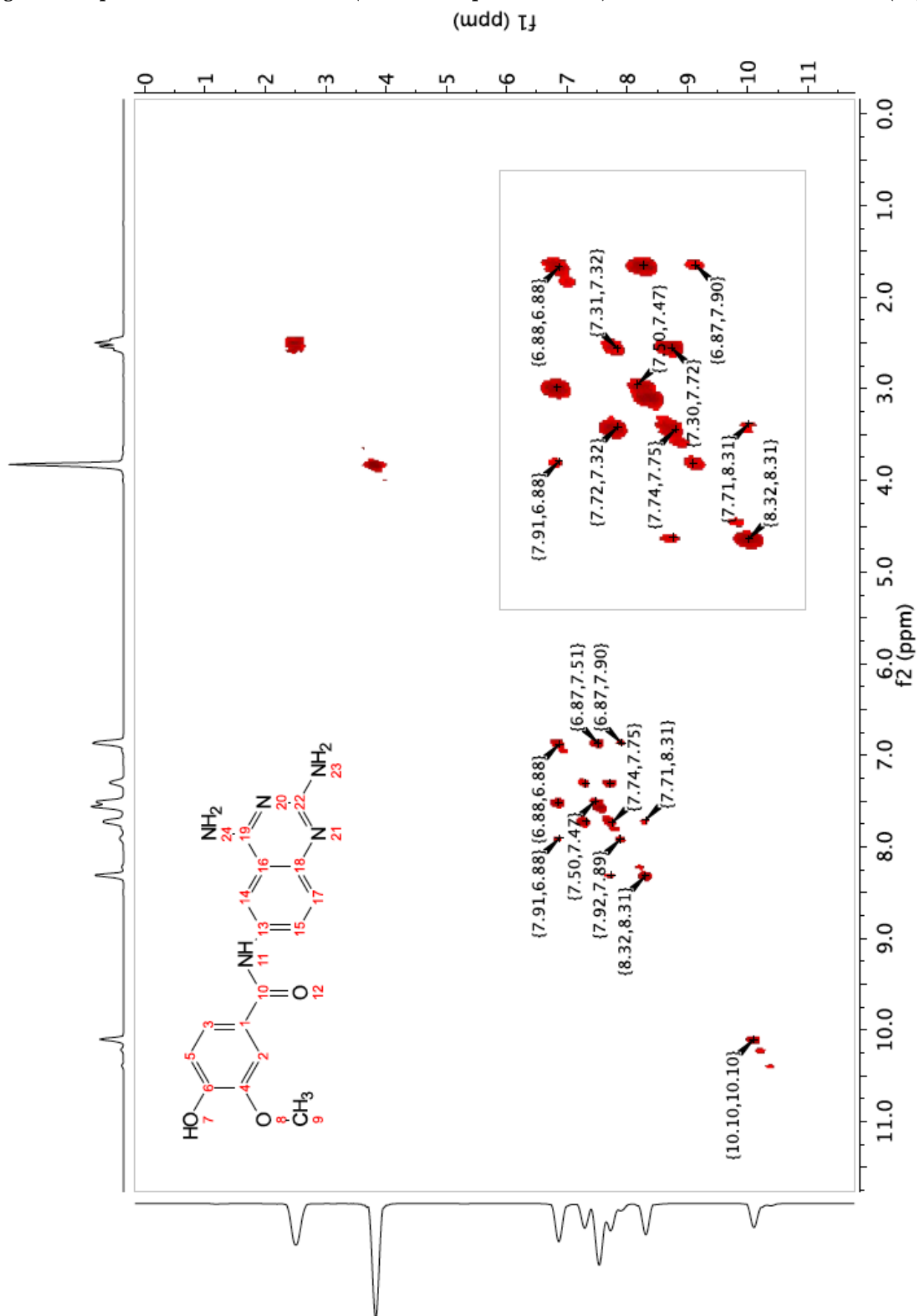


Figura 38. Espectro de RMN ¹³C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

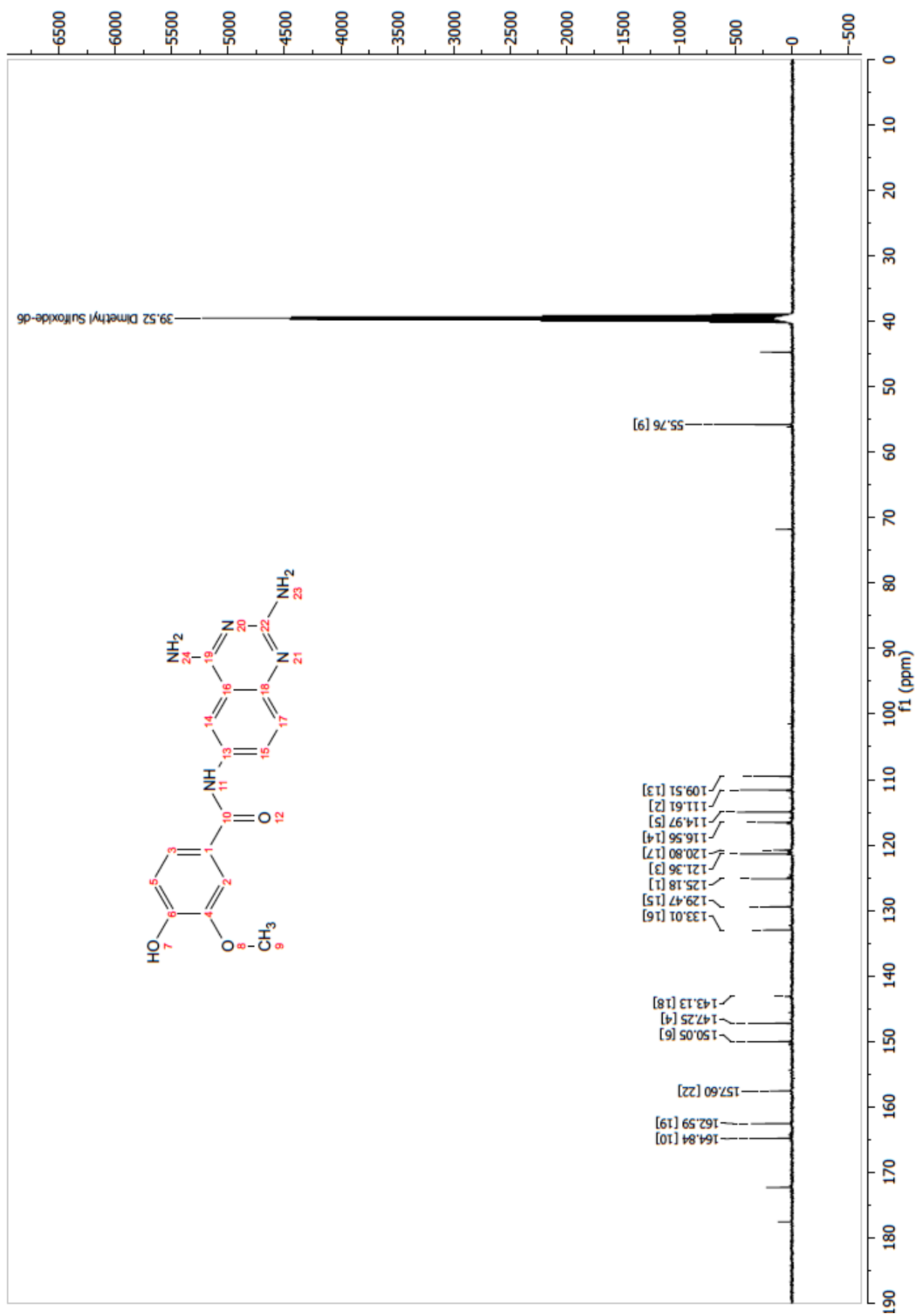


Figura 39. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

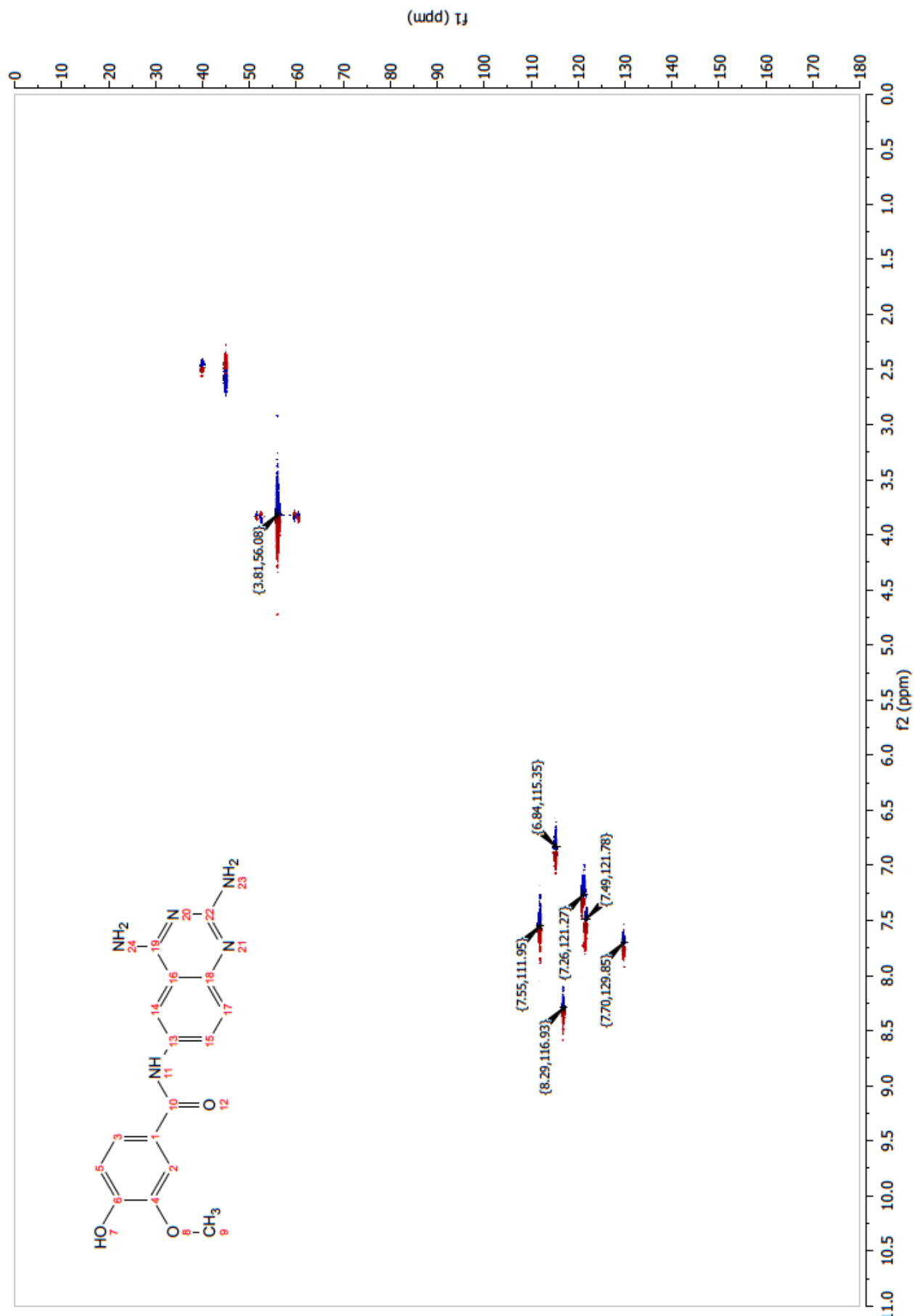


Figura 40. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

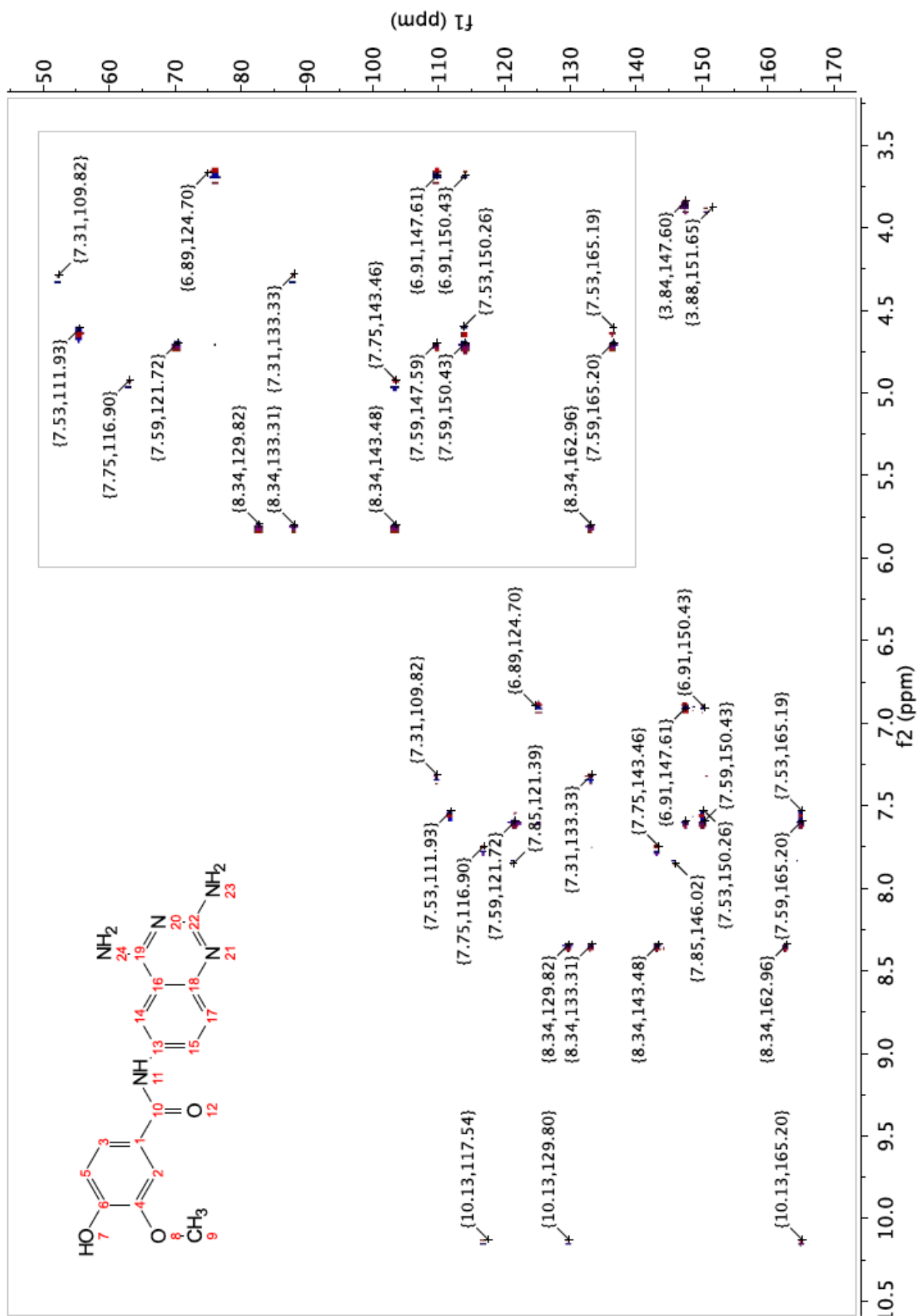


Figura 41. Espectro de RMN NOESY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (B1)

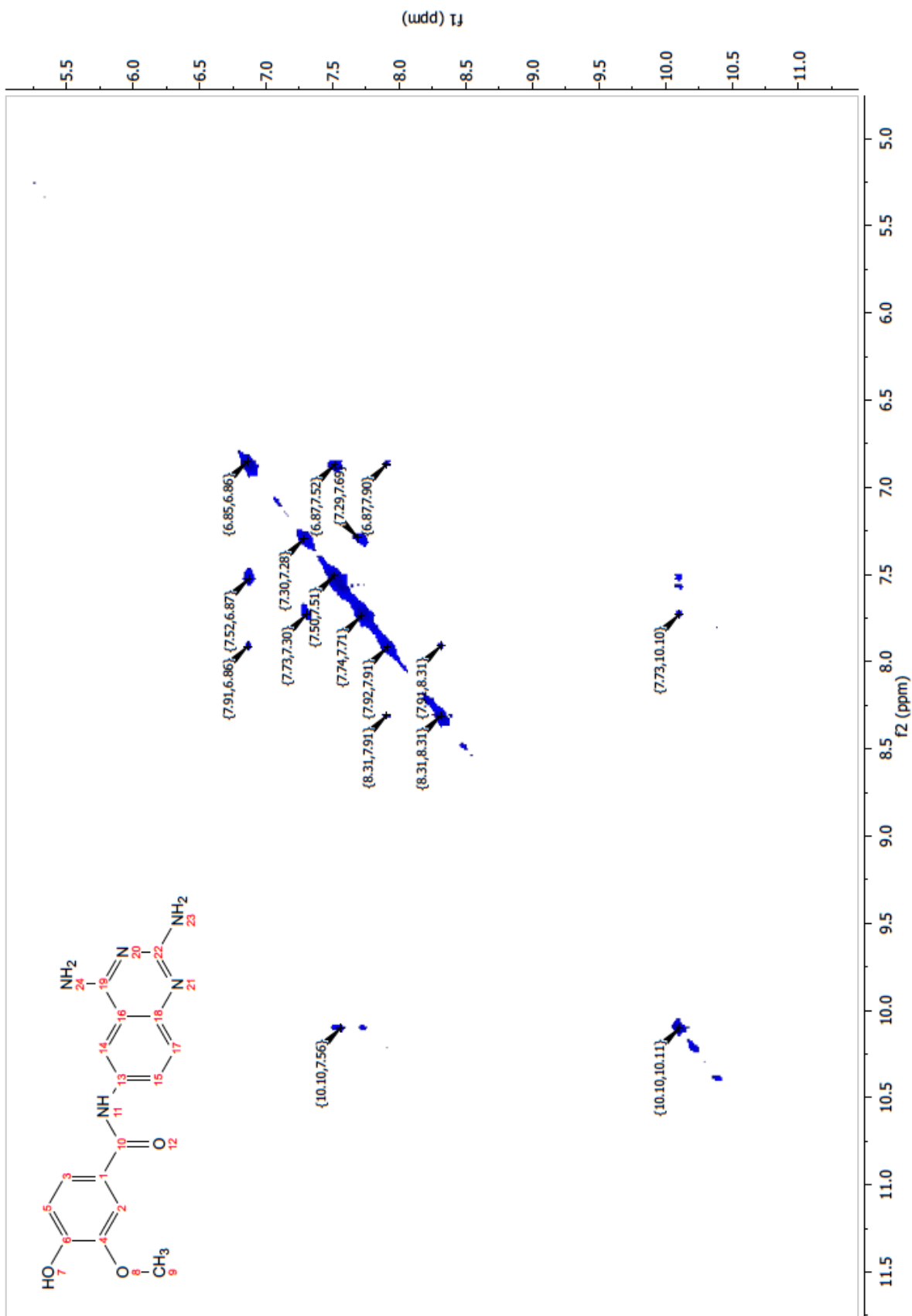


Figura 42. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

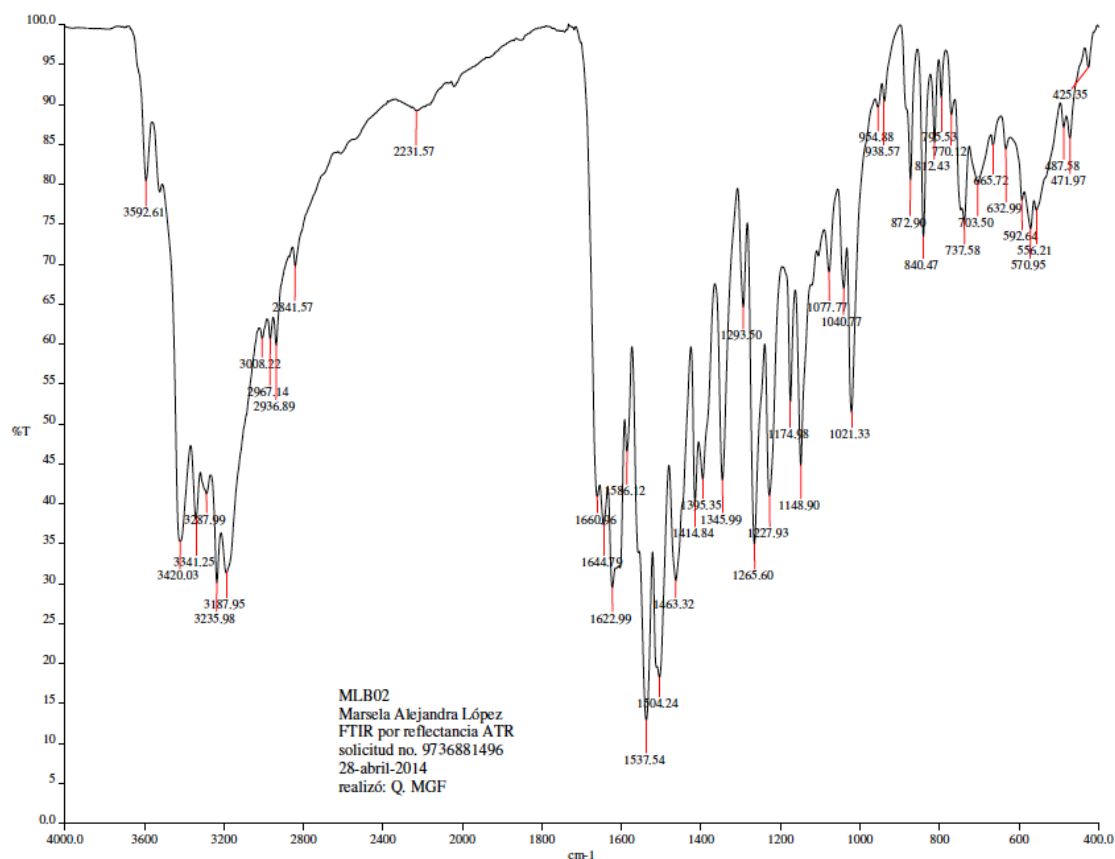


Figura 43. Espectro de UV de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

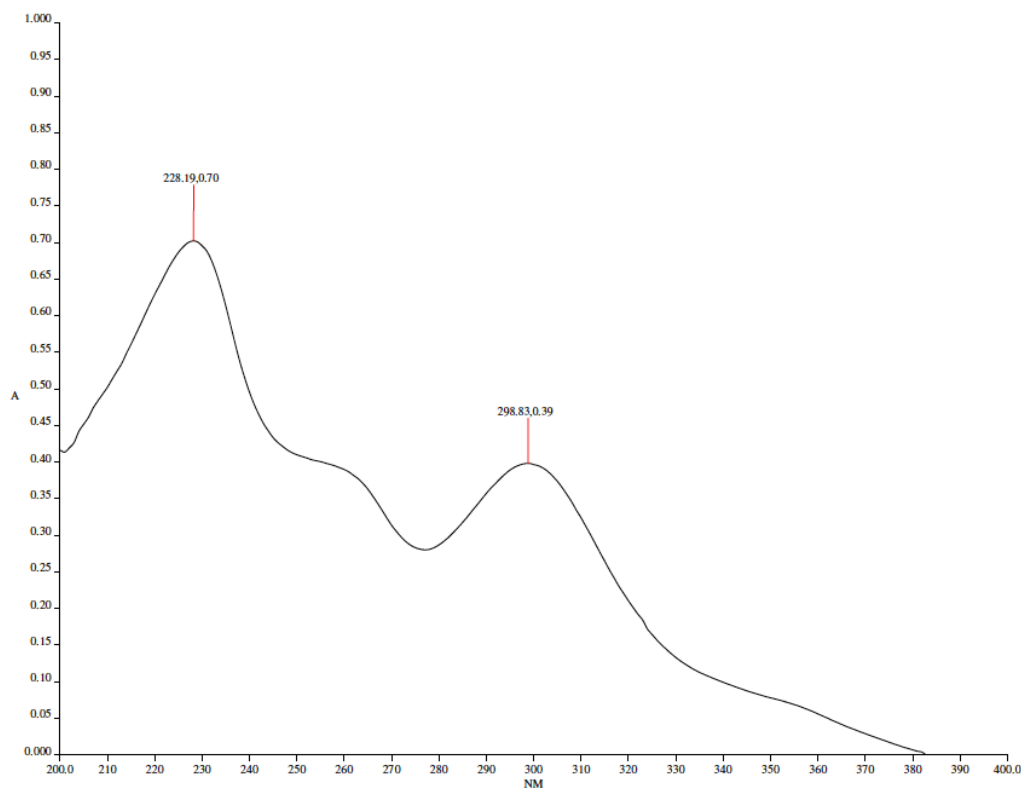


Figura 44. Espectro de EM-IE de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

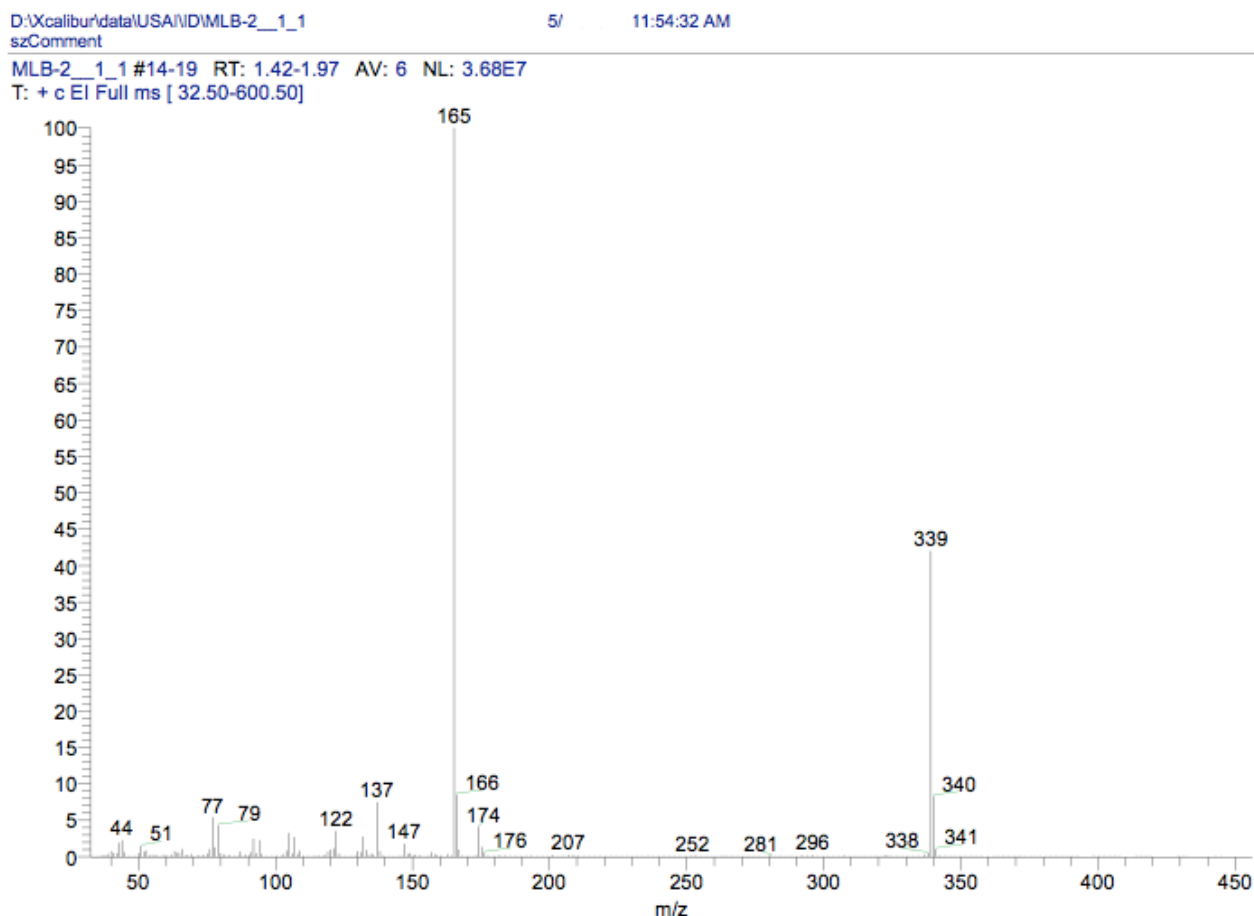


Figura 45. Espectro de alta resolución de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

[Elemental Composition]
 Data : Dr-Francisco-Hernandez-Luis0 Date : 06-Aug-2015 13:23
 Sample: 589-STE-5441--MLB-2
 Note : -luis-velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 2.13 min Scan#: (6,9)
 Elements : C 40/0, H 49/0, O 4/0, N 6/3
 Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 23.0

Page: 1

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	N
340.1414	100.0	340.1410	+1.2	11.5	17	18	3	5

Figura 46. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

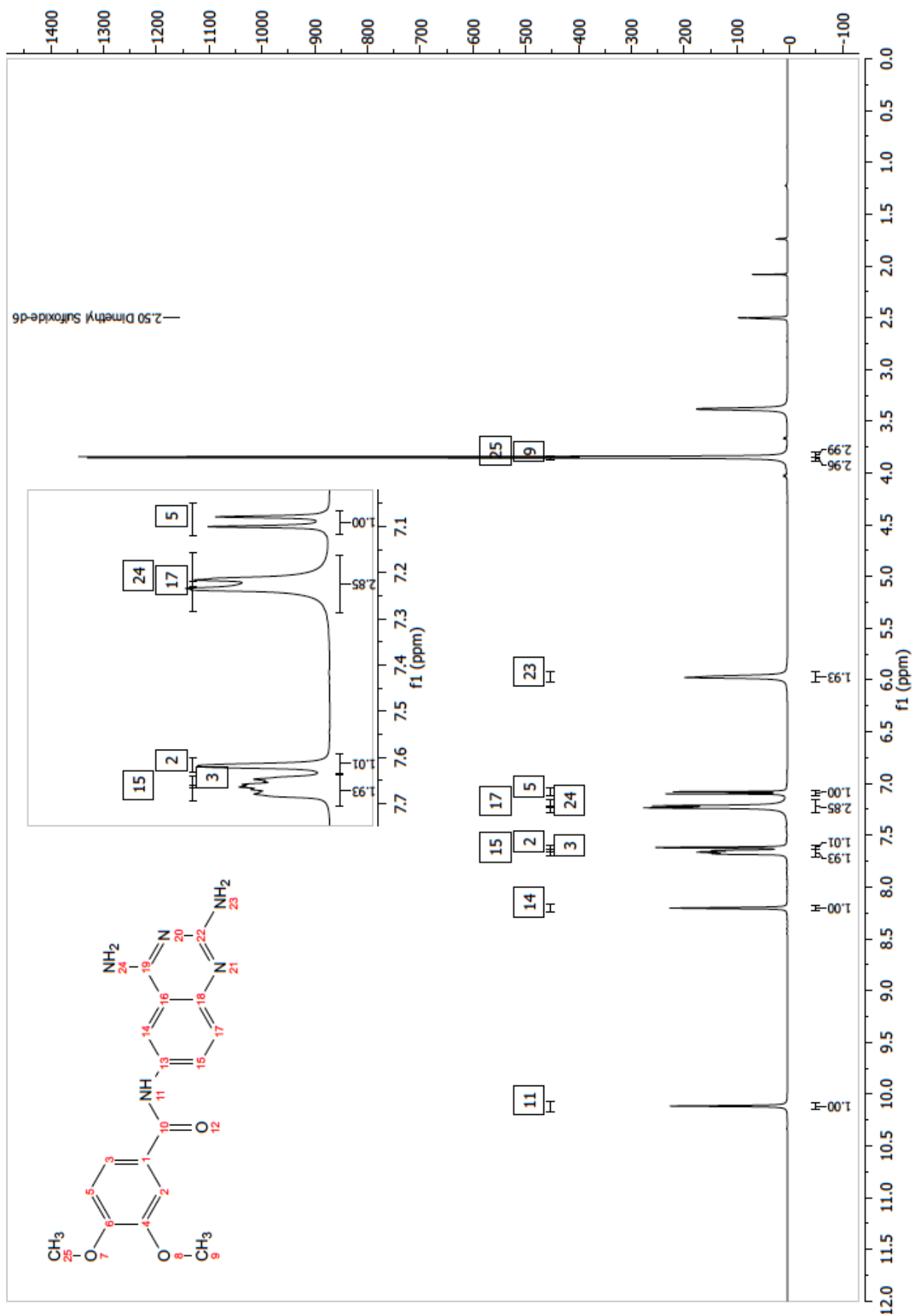


Figura 47. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

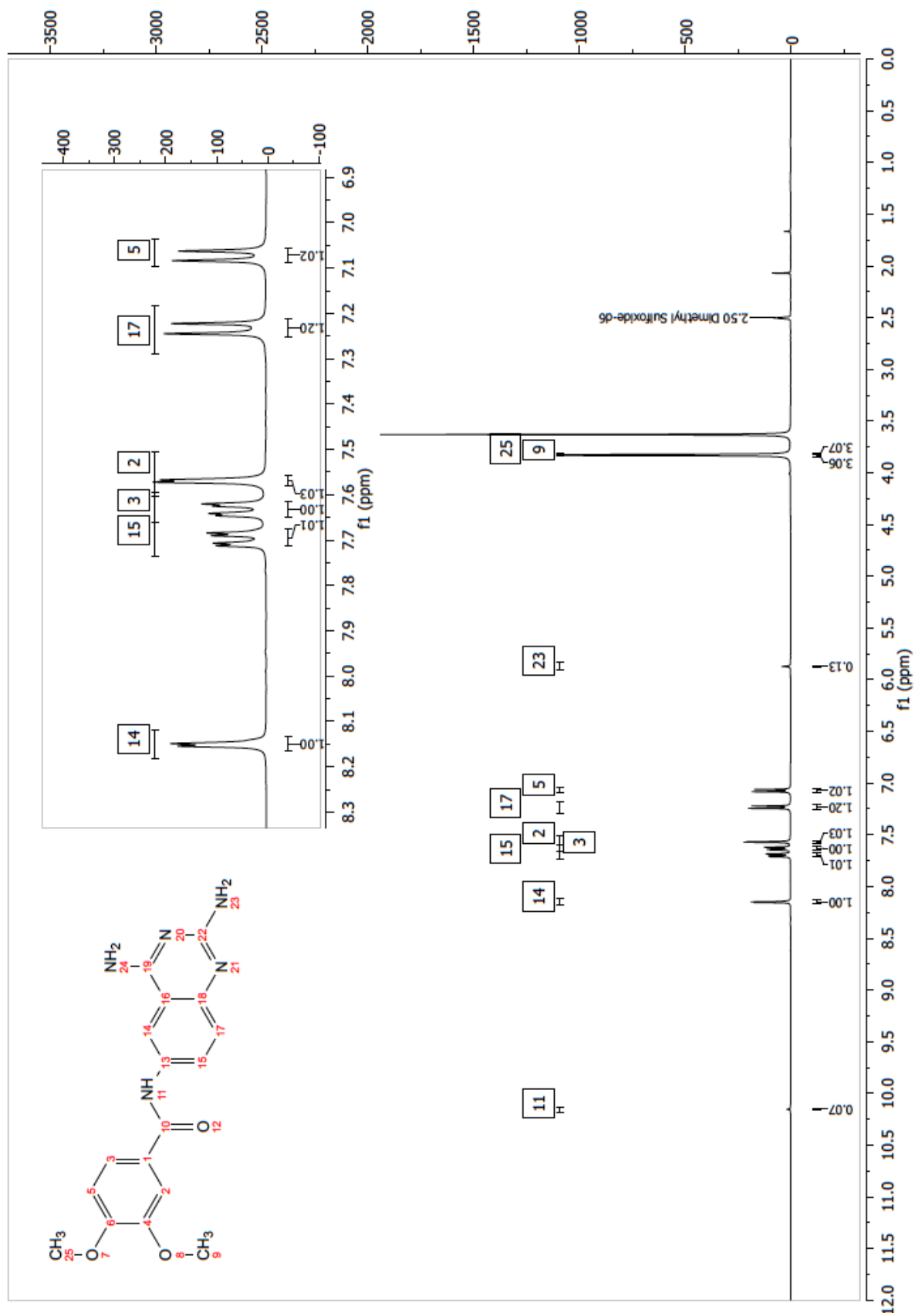


Figura 48. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

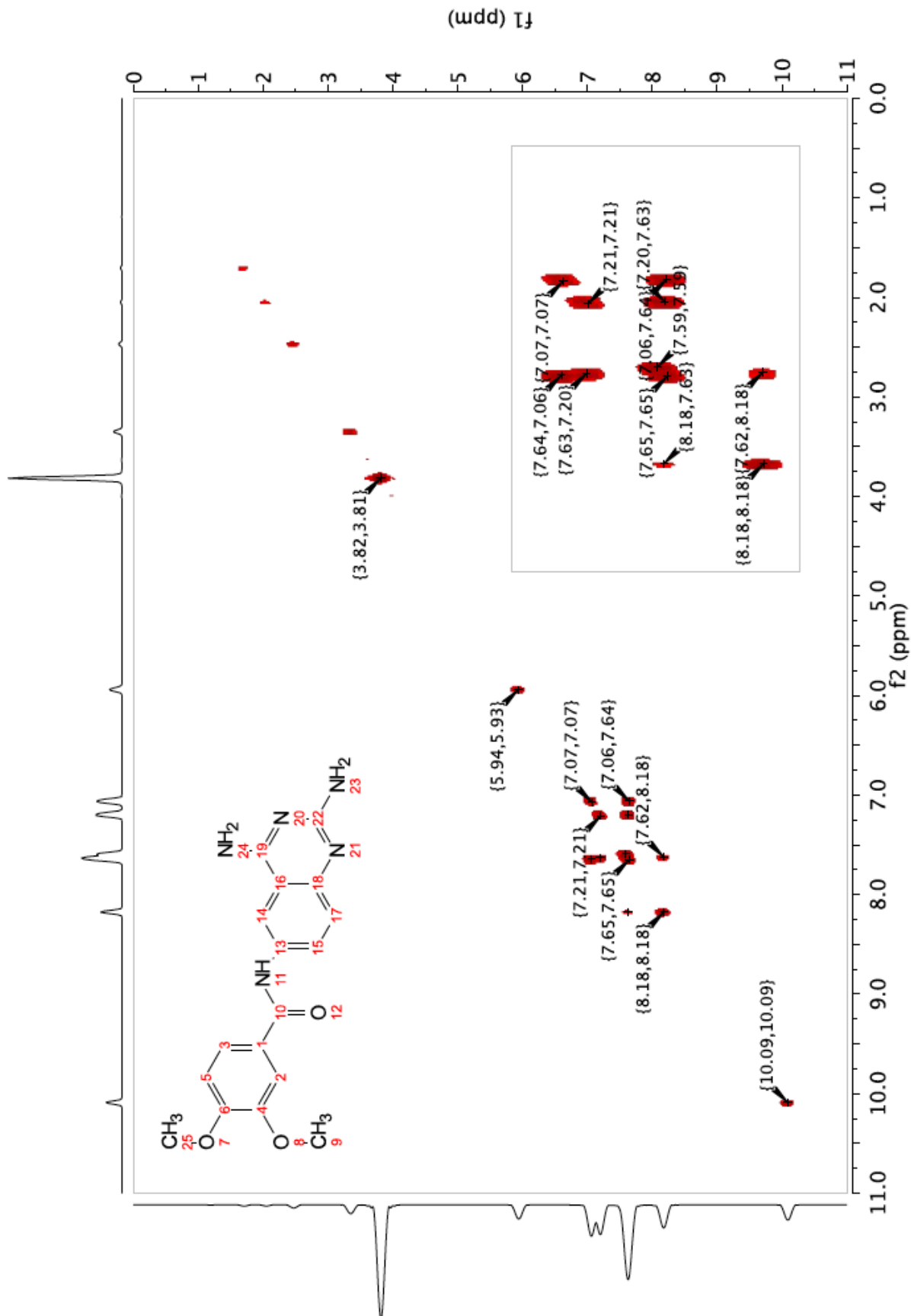


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

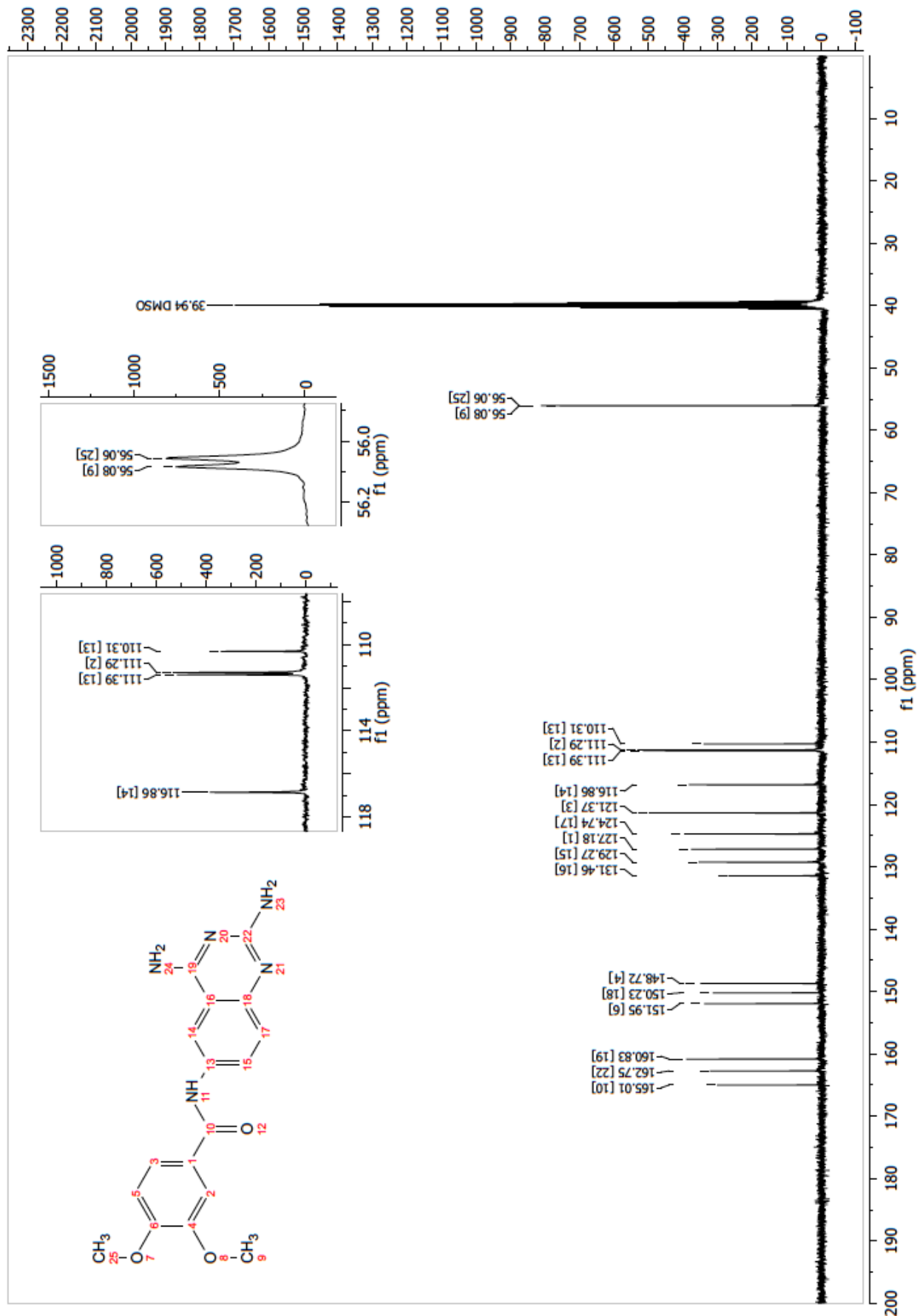


Figura 50. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

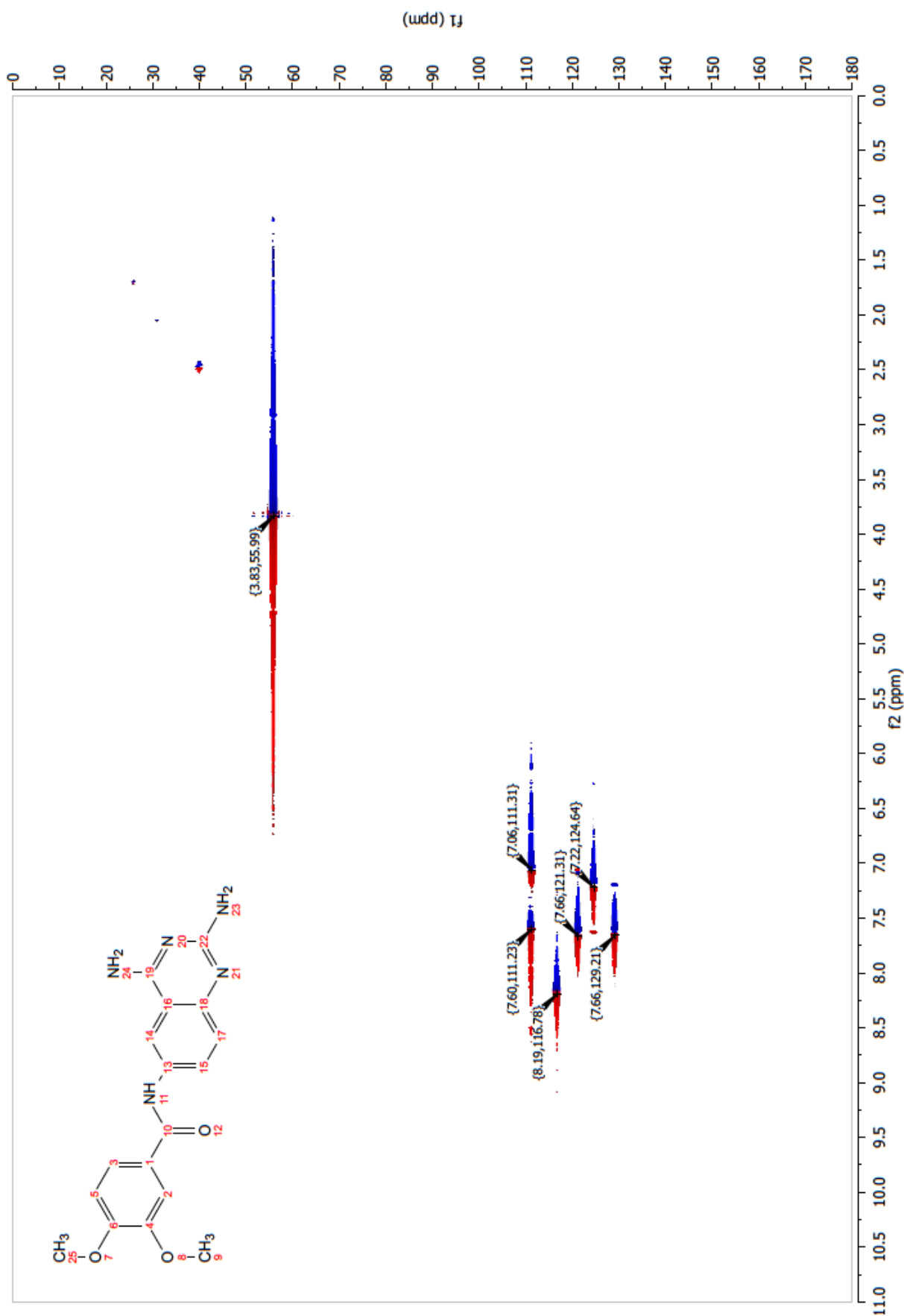


Figura 51. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4-dimetoxibenzamida (B2)

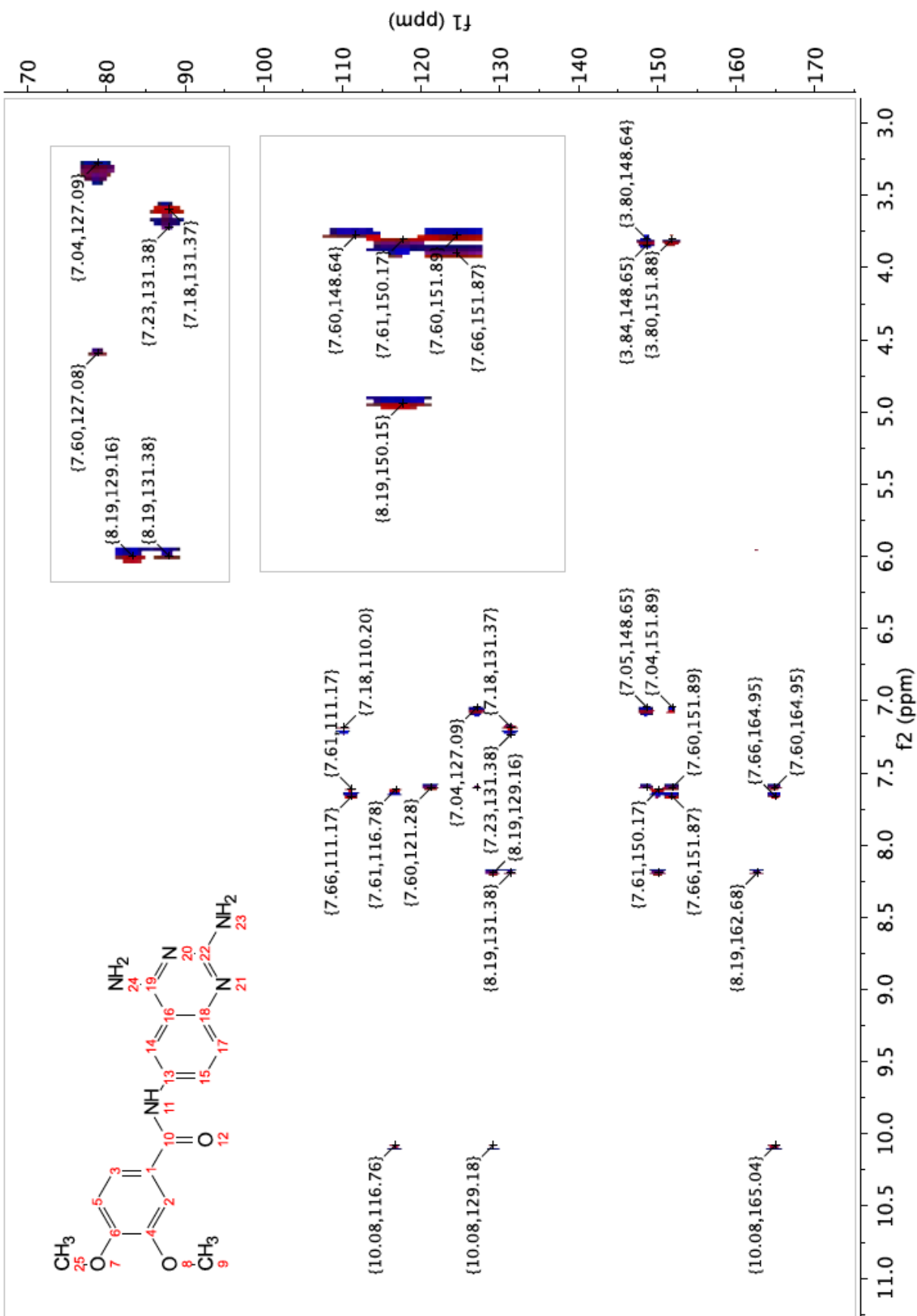


Figura 52. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

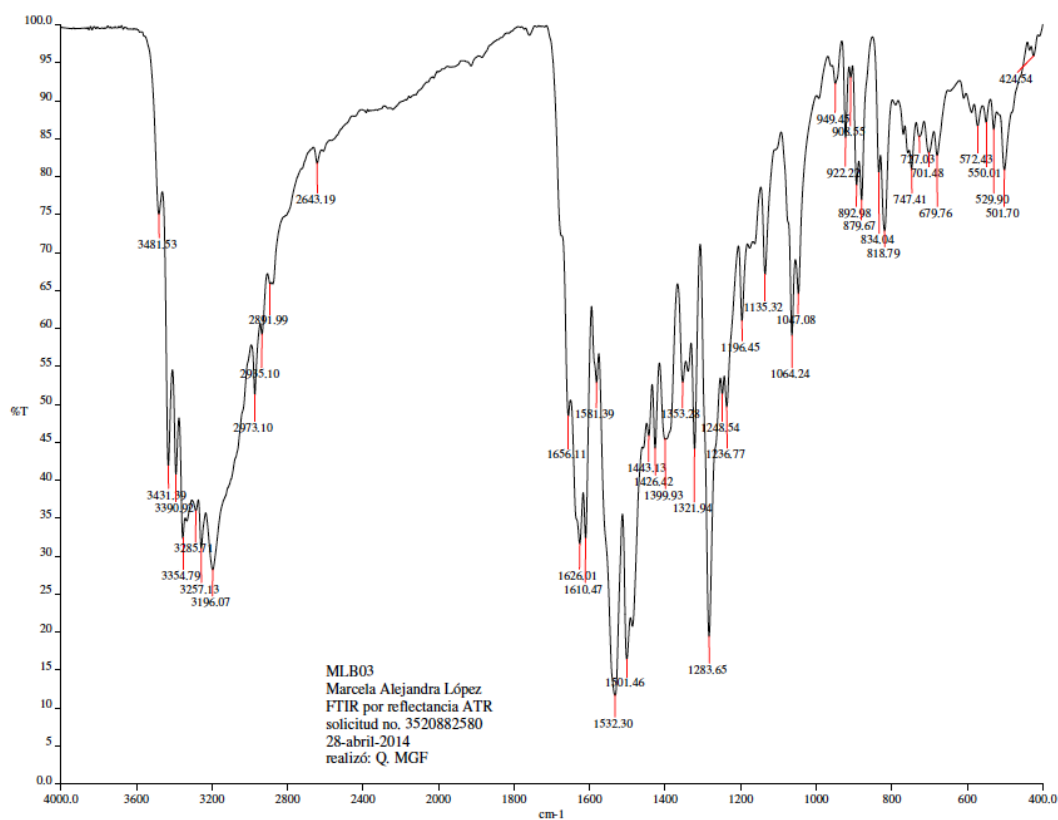


Figura 53. Espectro de UV de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

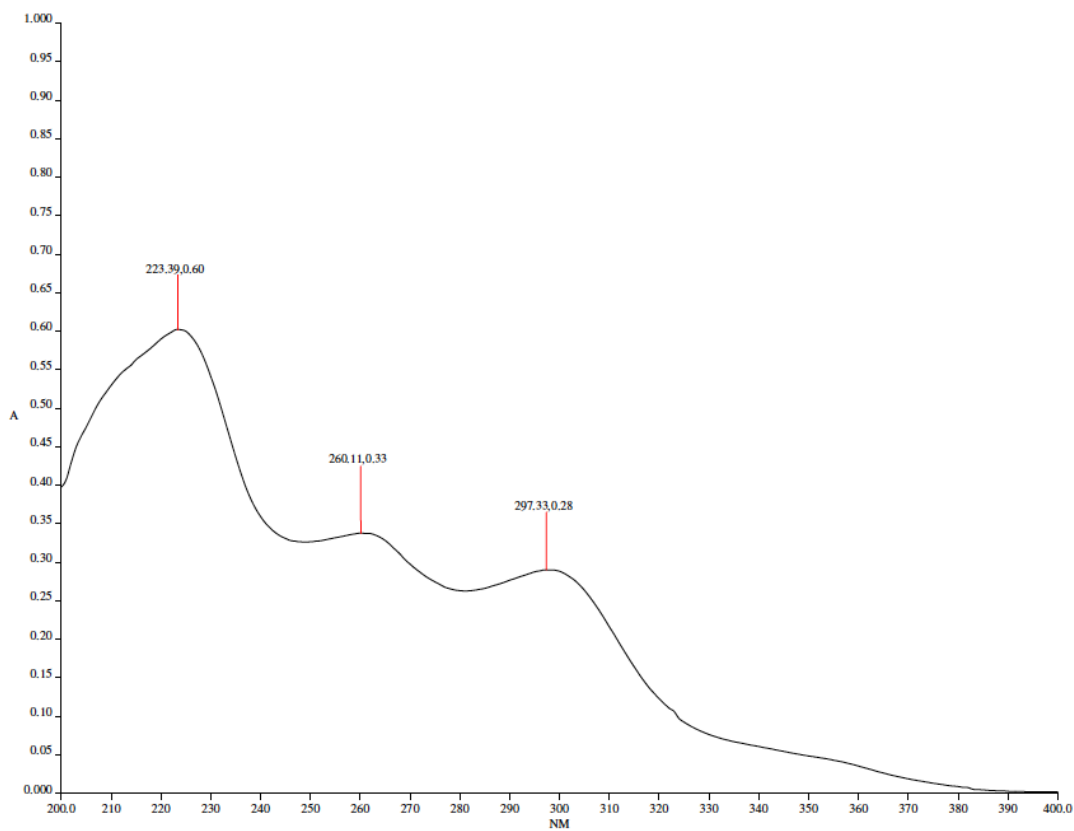


Figura 54. Espectro de EM-IE de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

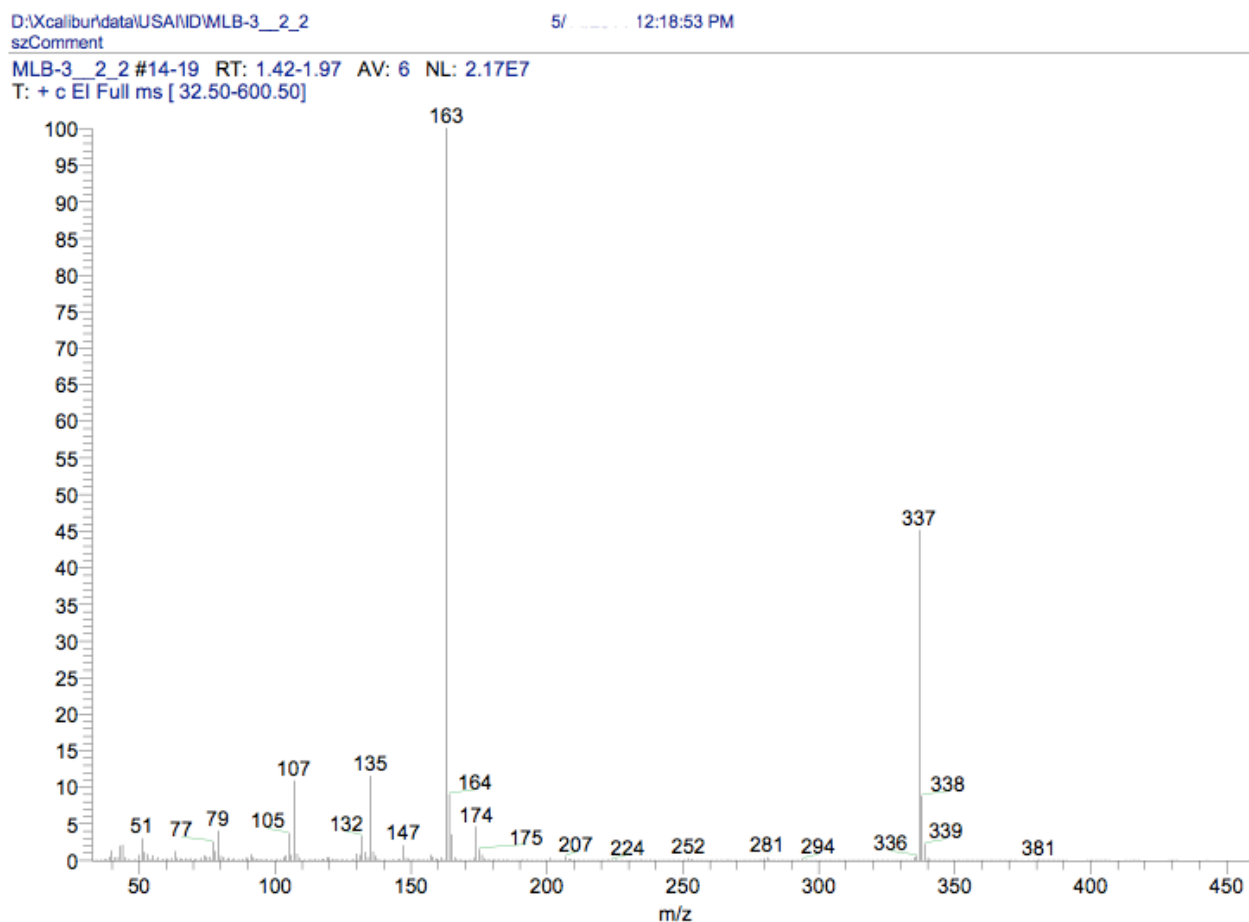


Figura 55. Espectro de alta resolución de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

[Elemental Composition]

Page: 1

Data : Dr-Francisco-Hernandez-Luis0 Date : 06-Aug-2015 16:45

Sample: 591-STE-5443 MLB-3

Note : -luis-velasco

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 1.15 min

Scan#: (4,5)

Elements : C 40/0, H 49/0, O 4/0, N 6/3

Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 23.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	N
338.1246	100.0	338.1253	-2.0	12.5	17	16	3	5

Figura 56. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

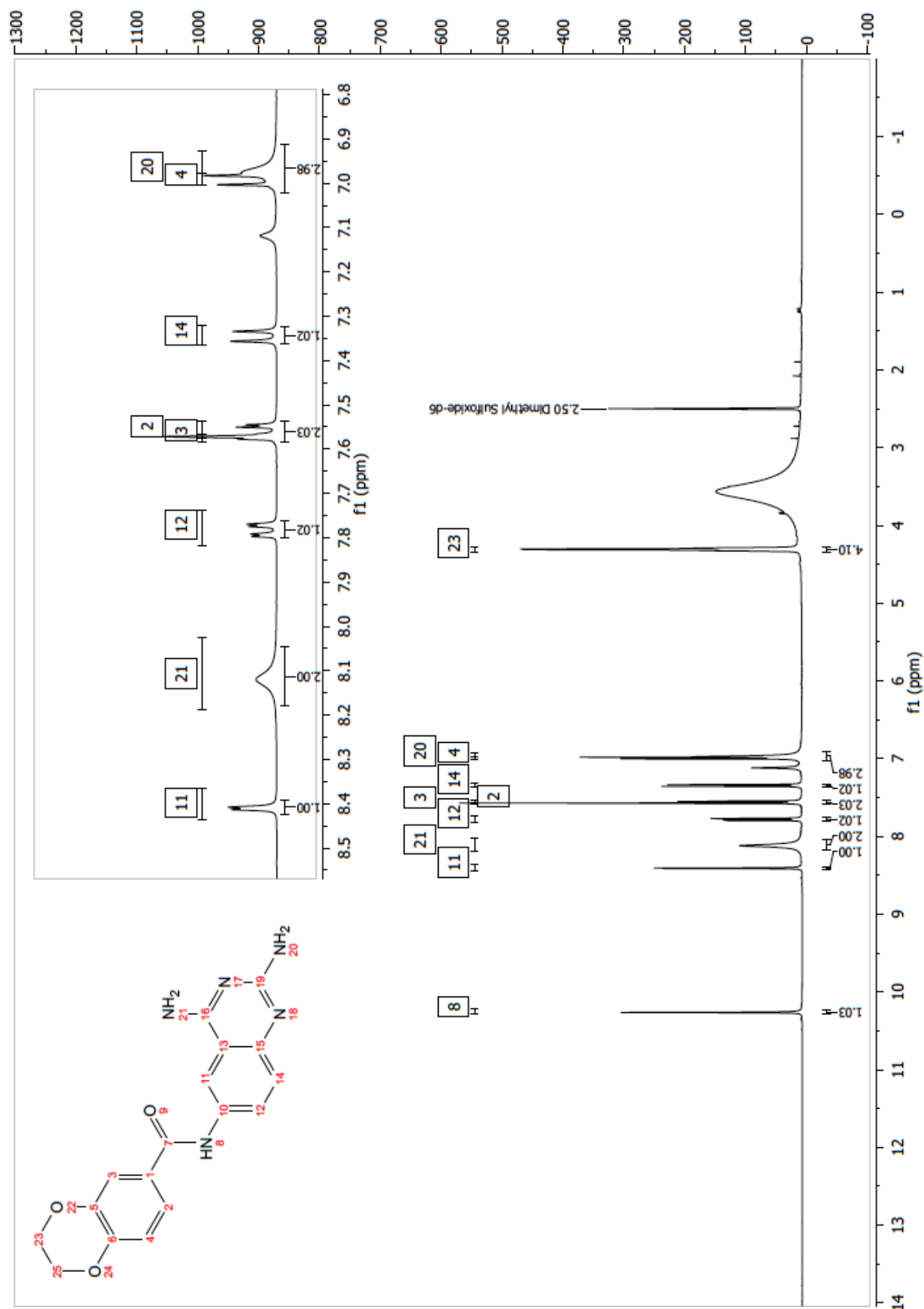


Figura 57. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

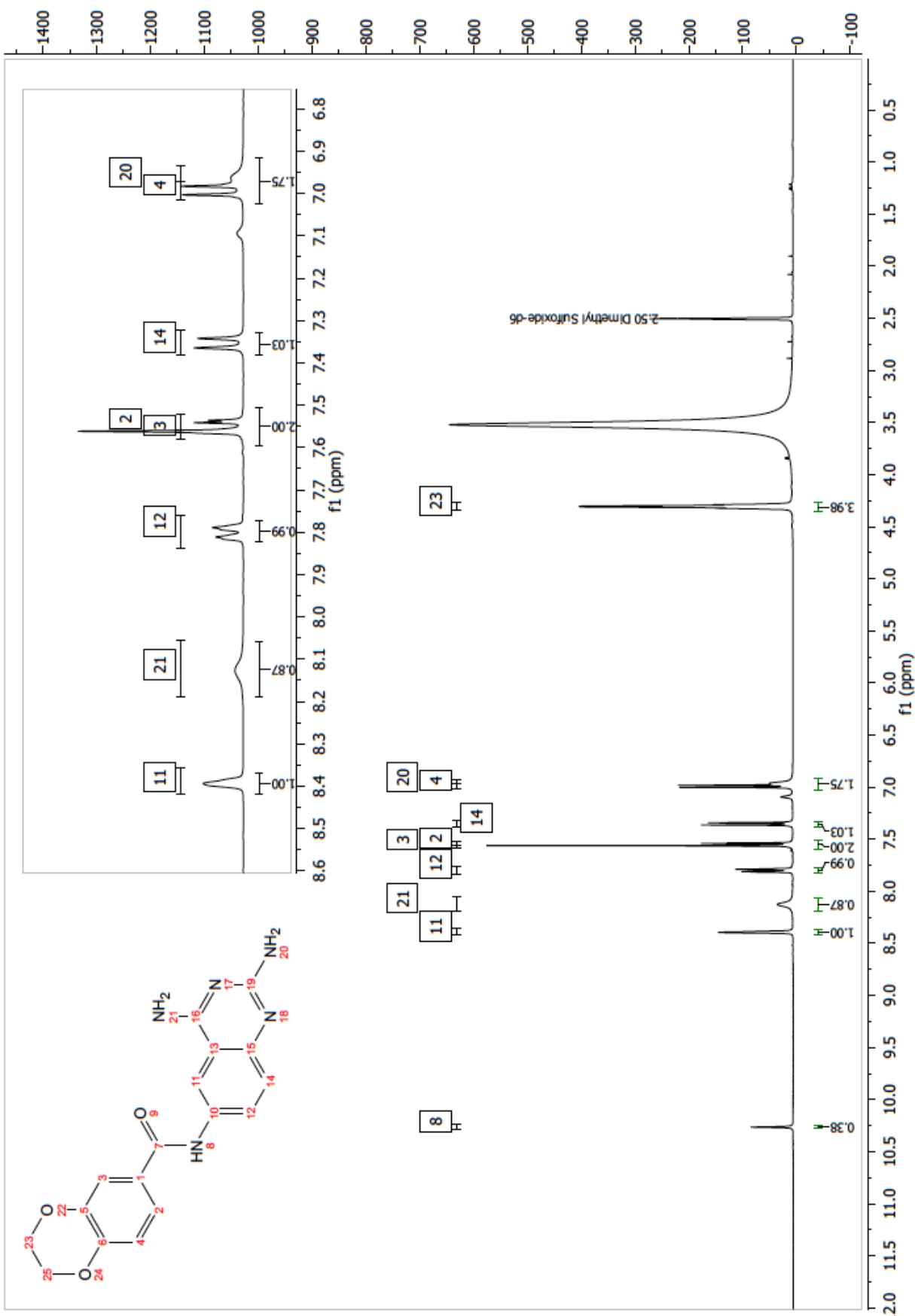


Figura 58. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

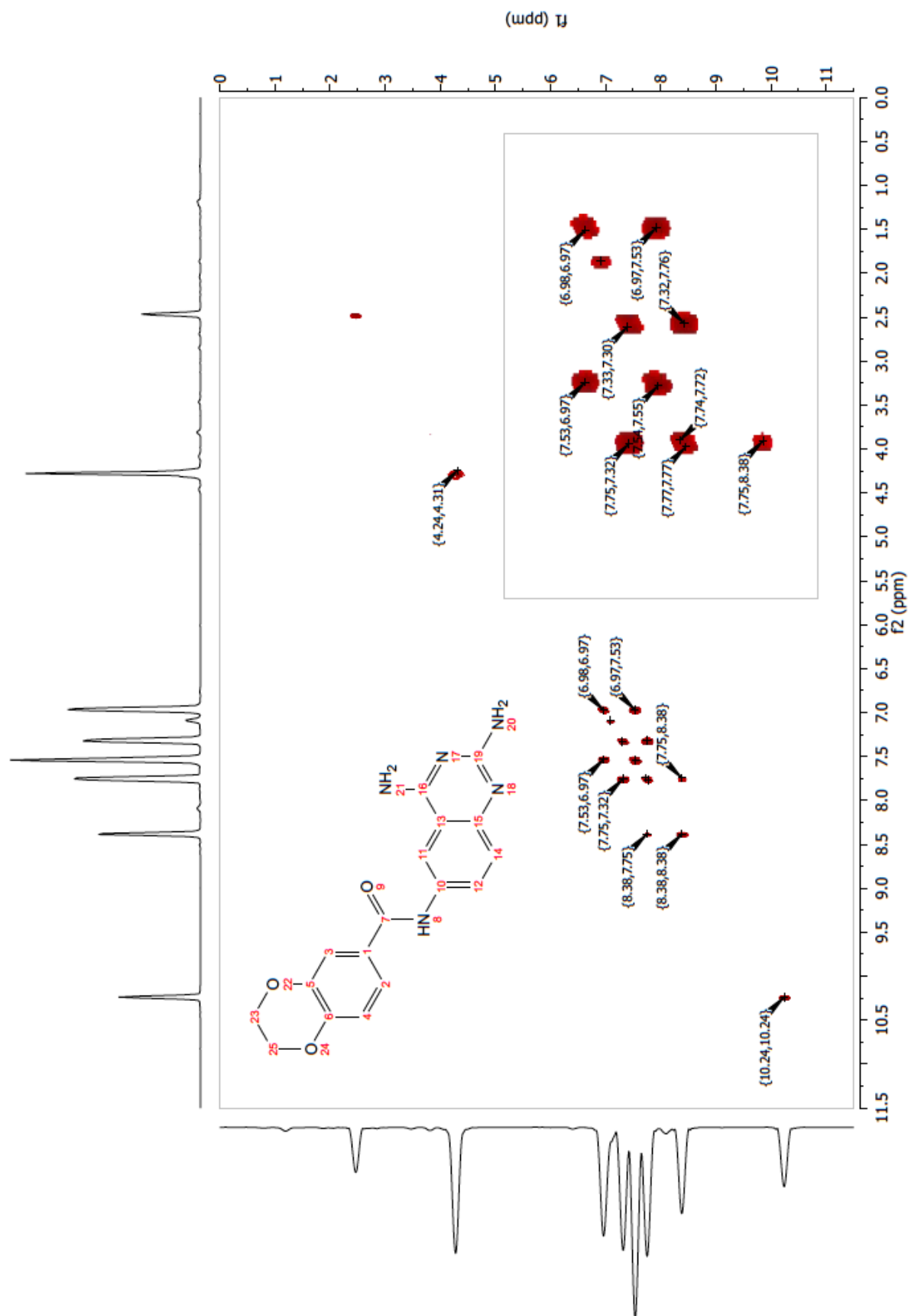


Figura 59. Espectro de RMN ¹³C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

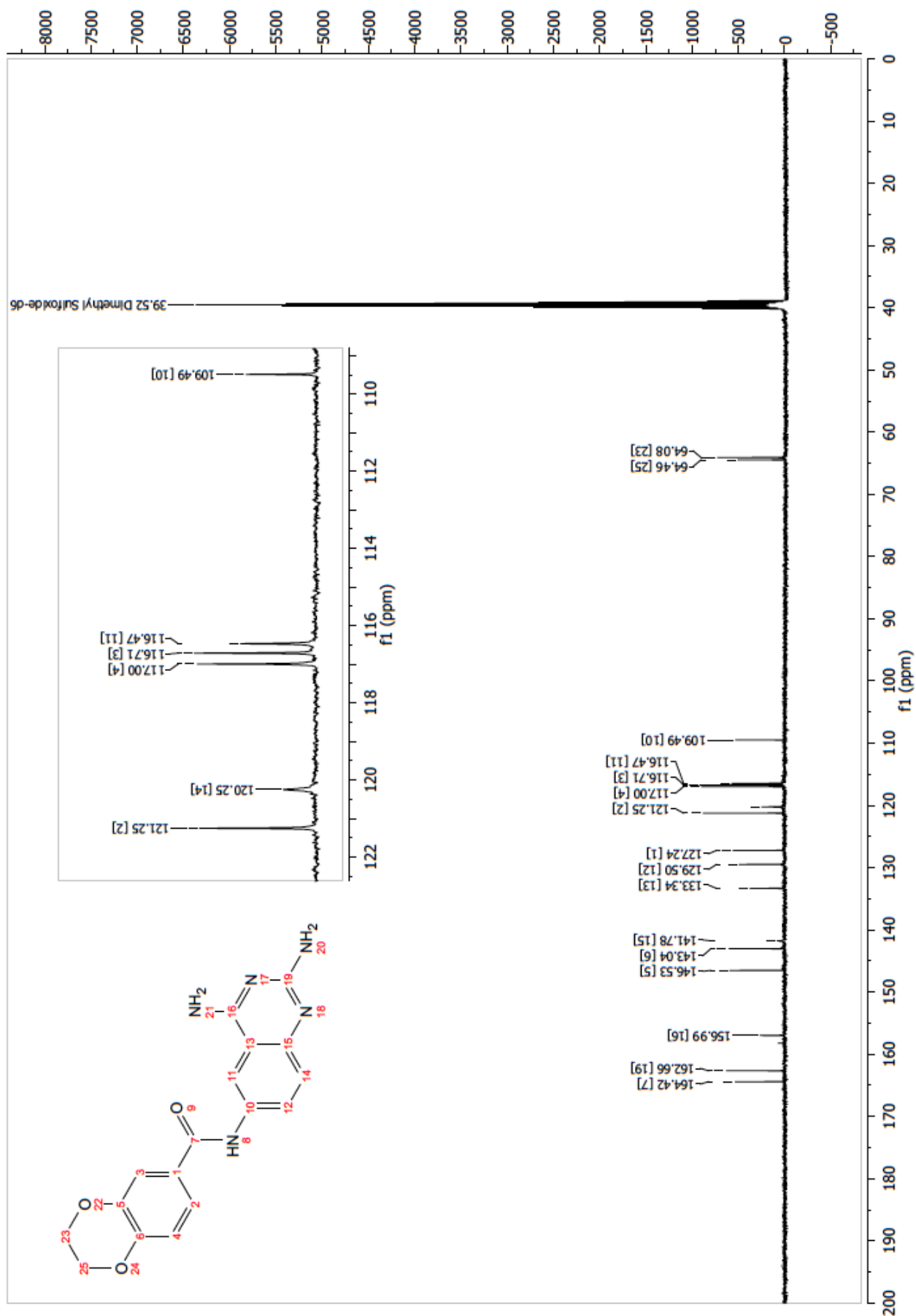


Figura 60. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

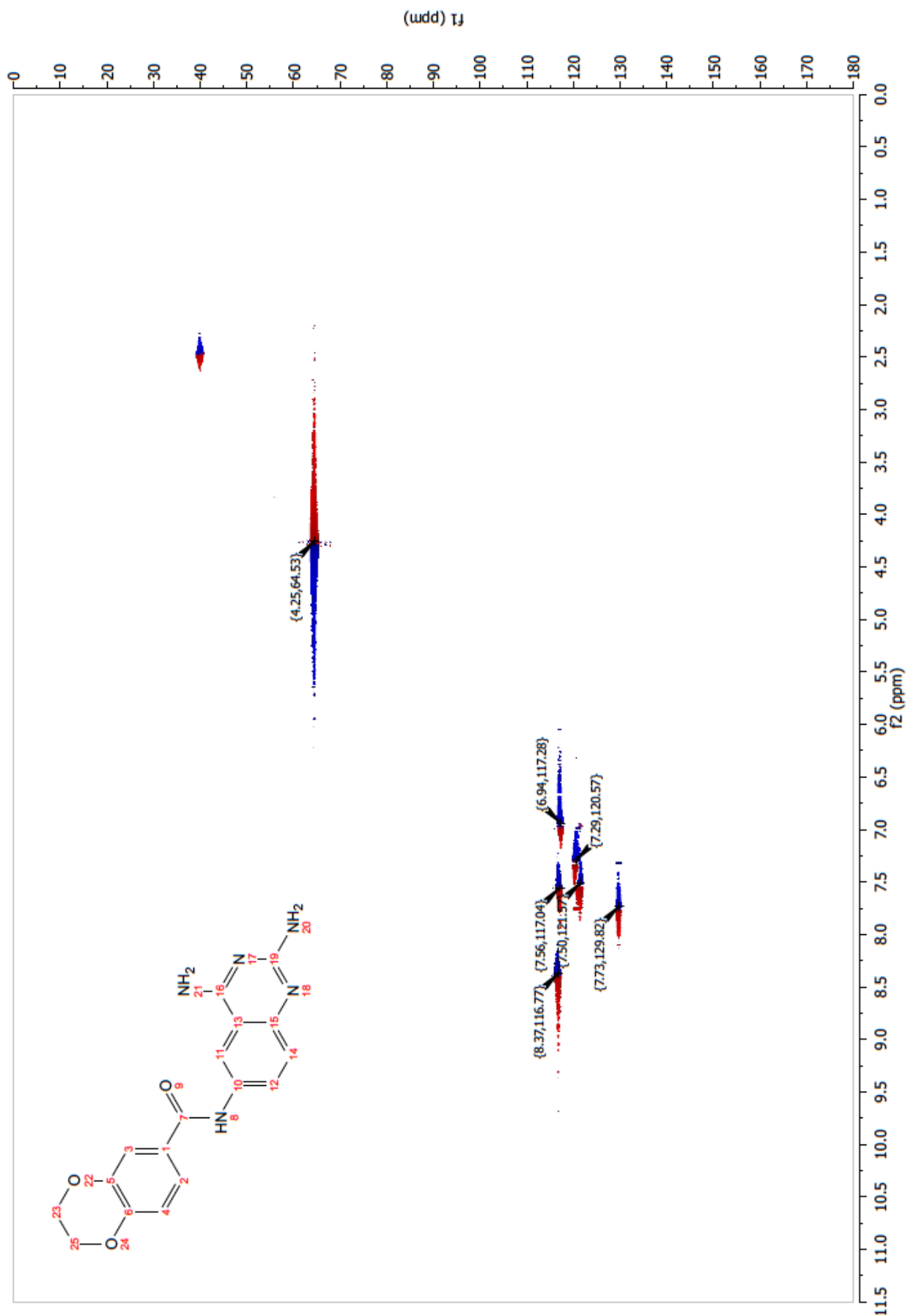


Figura 61. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-carboxamida (B3)

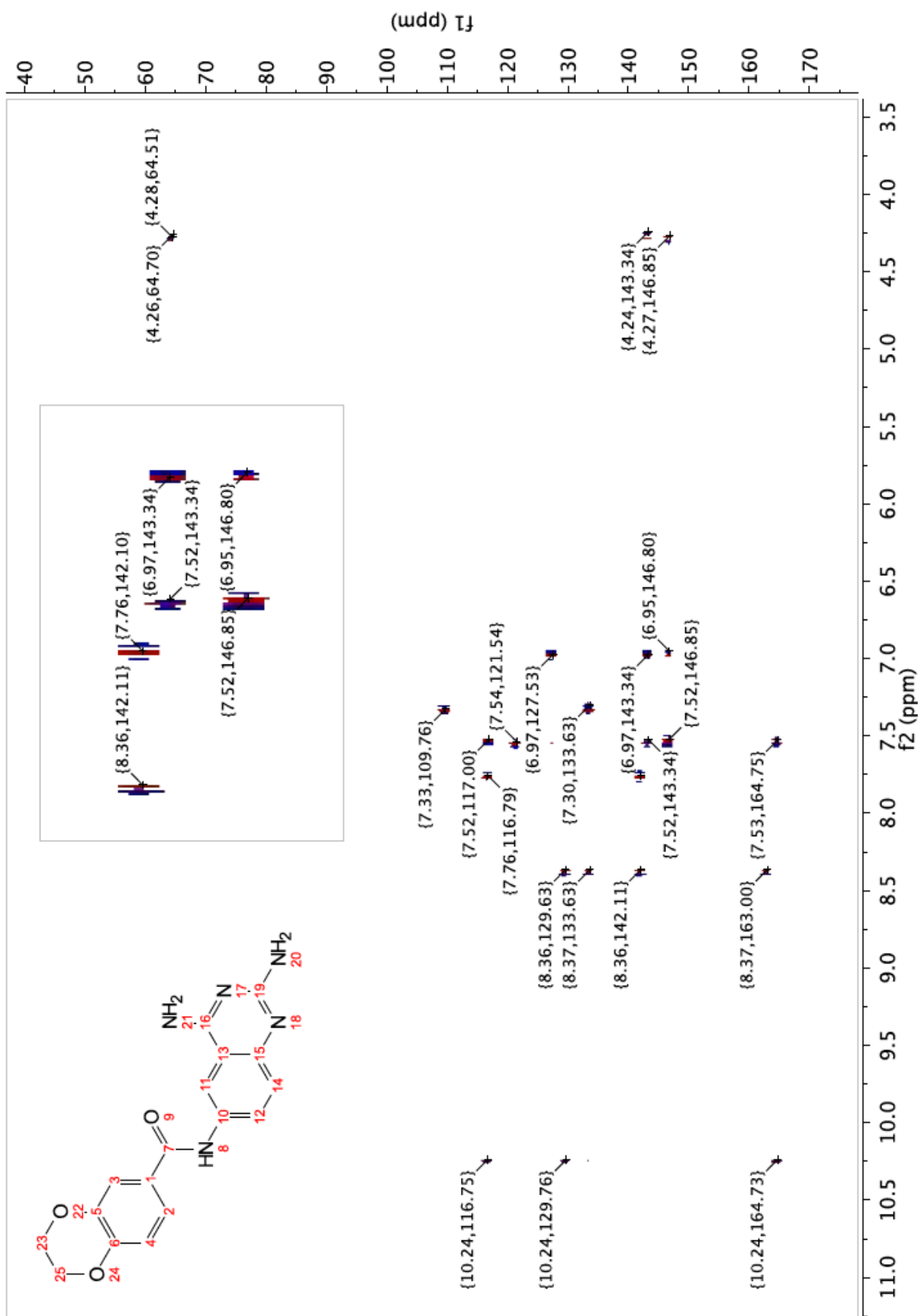


Figura 62. Espectro de FT-IR de (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

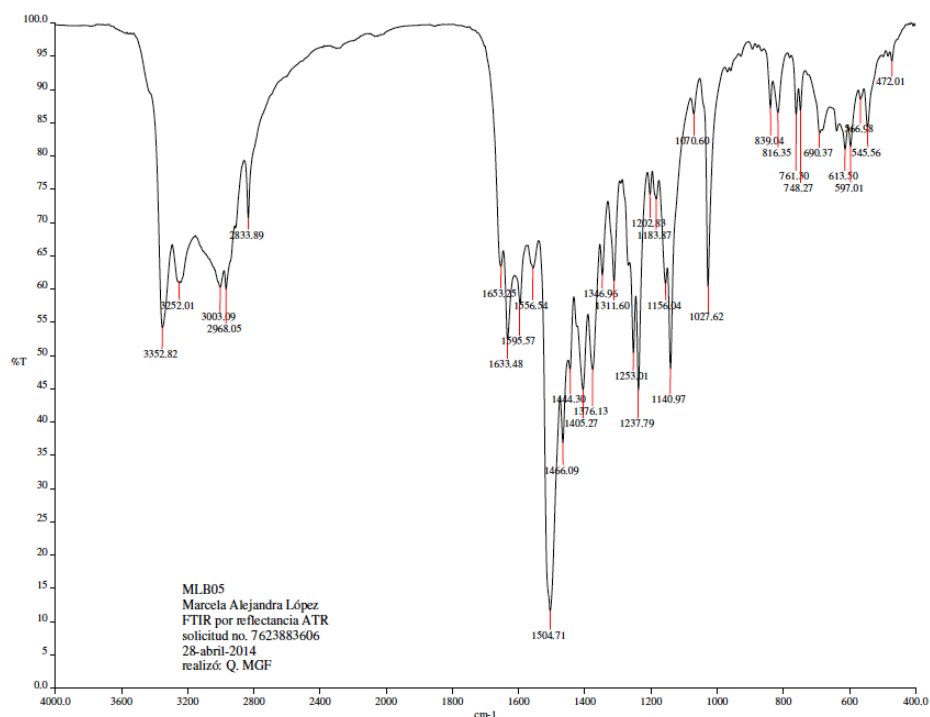


Figura 63. Espectro de EM-IE de (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

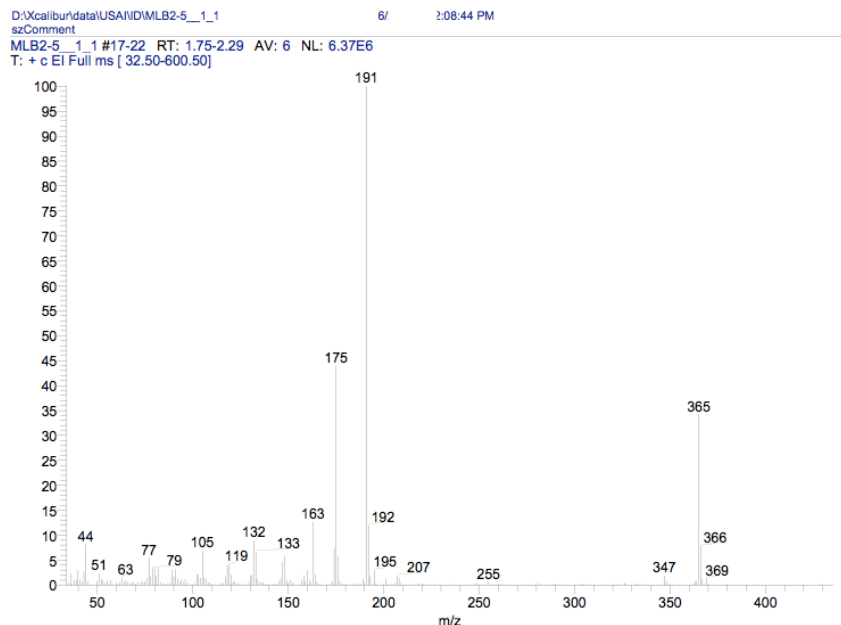


Figura 64. Espectro de alta resolución de EM-FAB de (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

[Elemental Composition] Page: 1
Data : Dr-Francisco-Hernandez-Luis0 Date : 06-Aug-2015 13:41
Sample: 590-STE-5442- MLB-5
Note : -luis-velasco
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
RT : 0.17 min Scan#: (1,2)
Elements : C 40/0, H 49/0, O 4/0, N 6/3
Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 23.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	N
366.1573	30.2							
366.1566	+1.8			12.5	19	20	3	5

Figura 65. Espectro de RMN ^1H de (2E)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

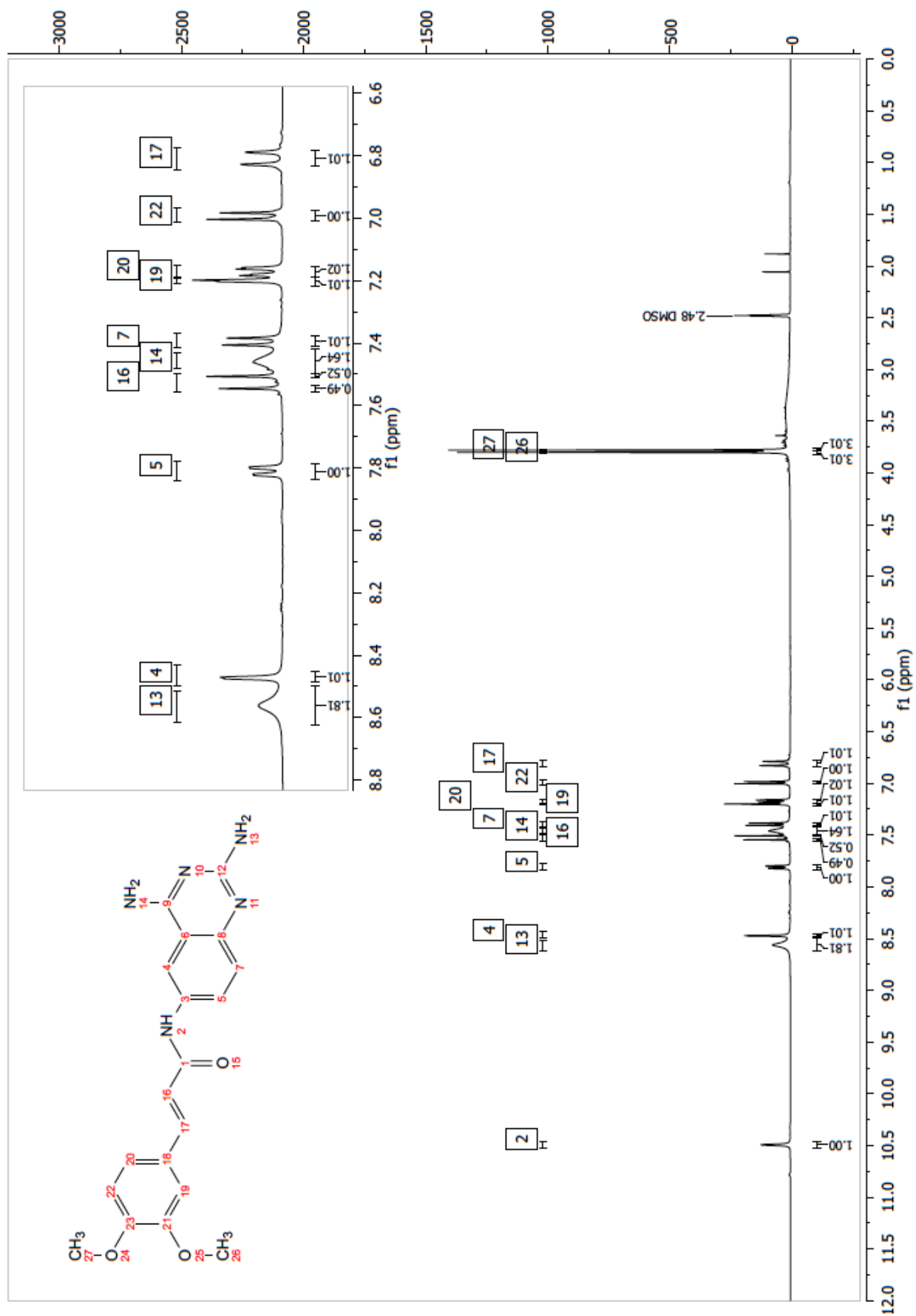


Figura 66. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

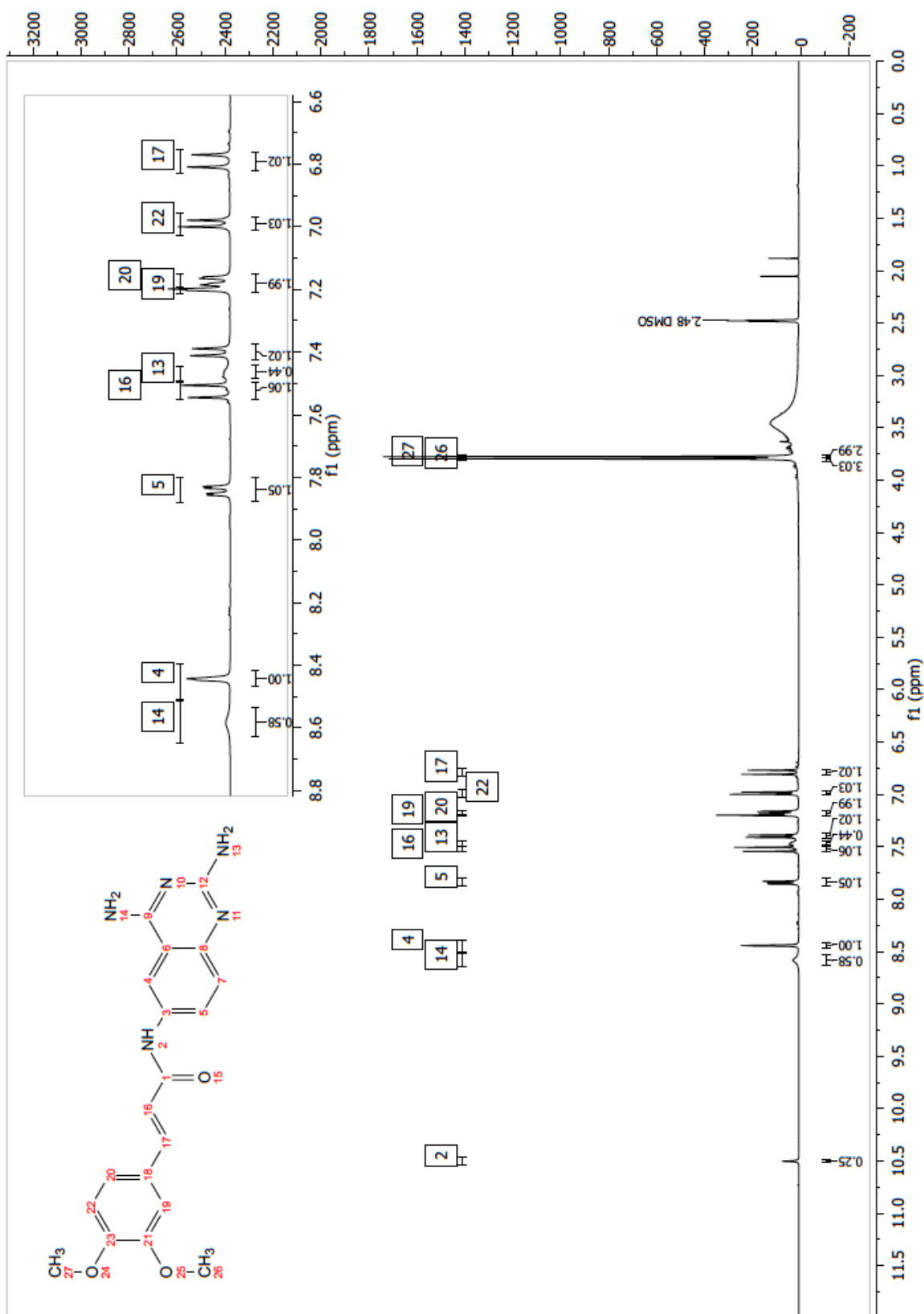


Figura 67. Espectro de RMN COSY de (2E)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

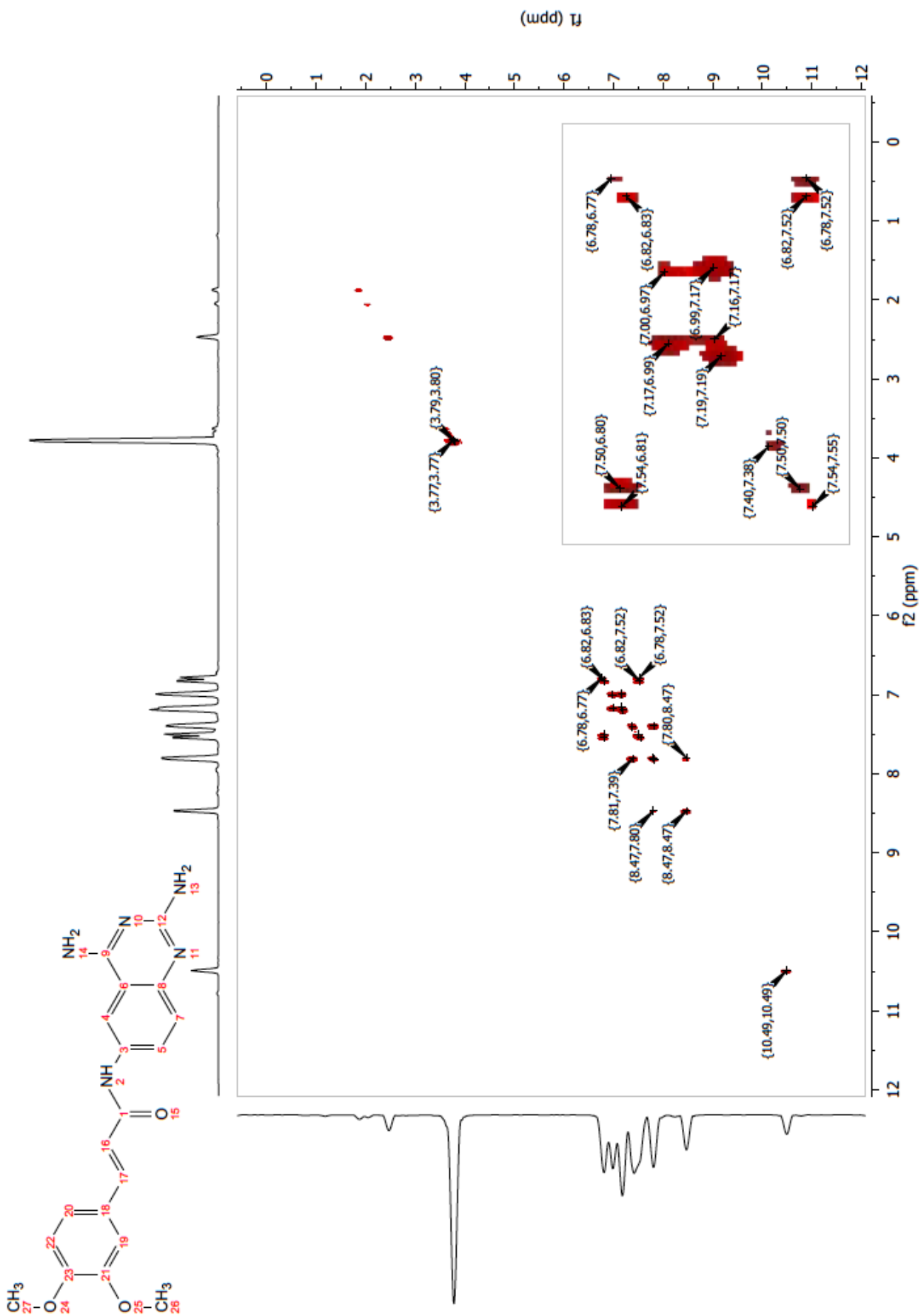


Figura 68. Espectro de RMN ¹³C de (2E)- N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

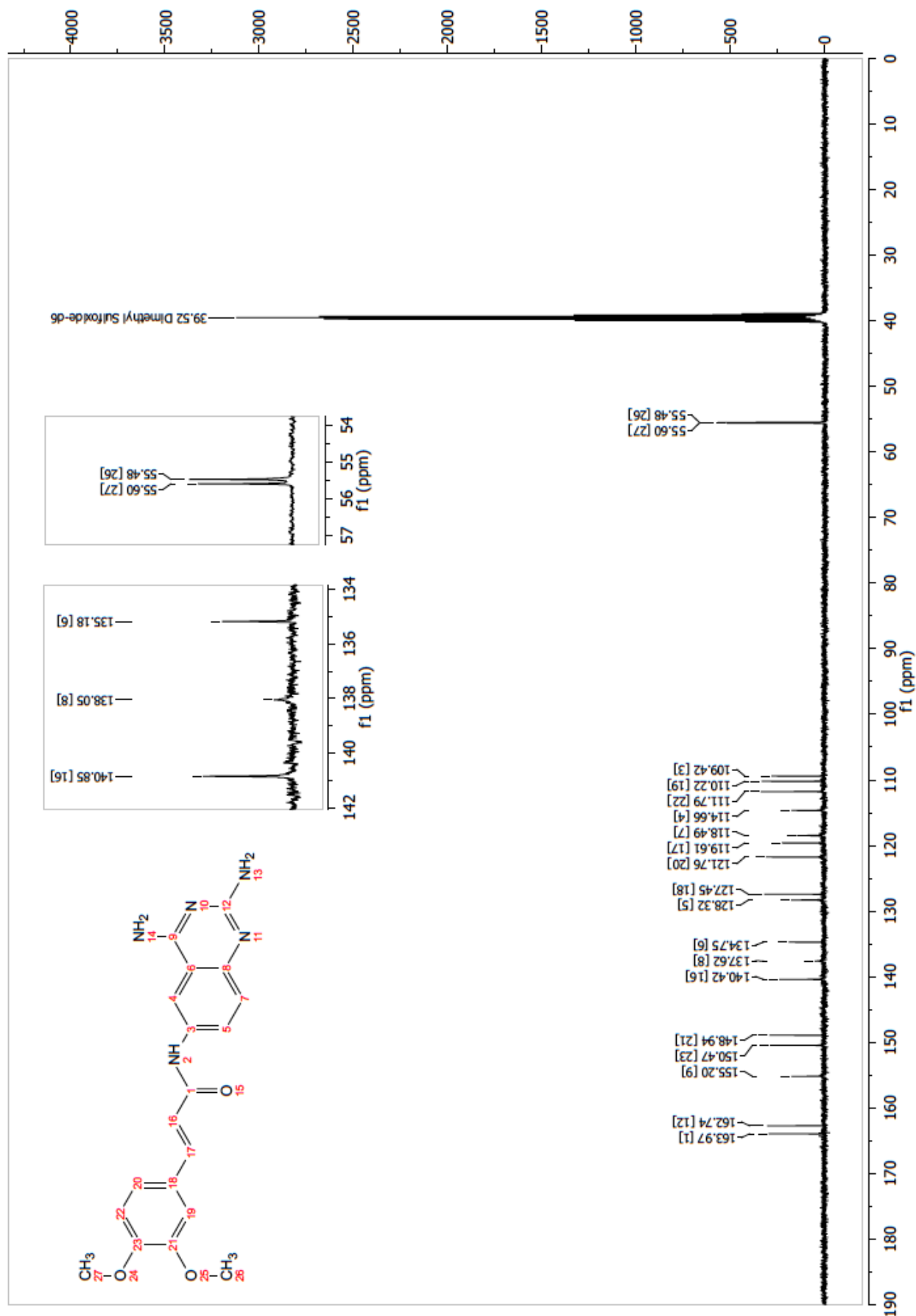


Figura 69. Espectro de RMN HSQC de (2E)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

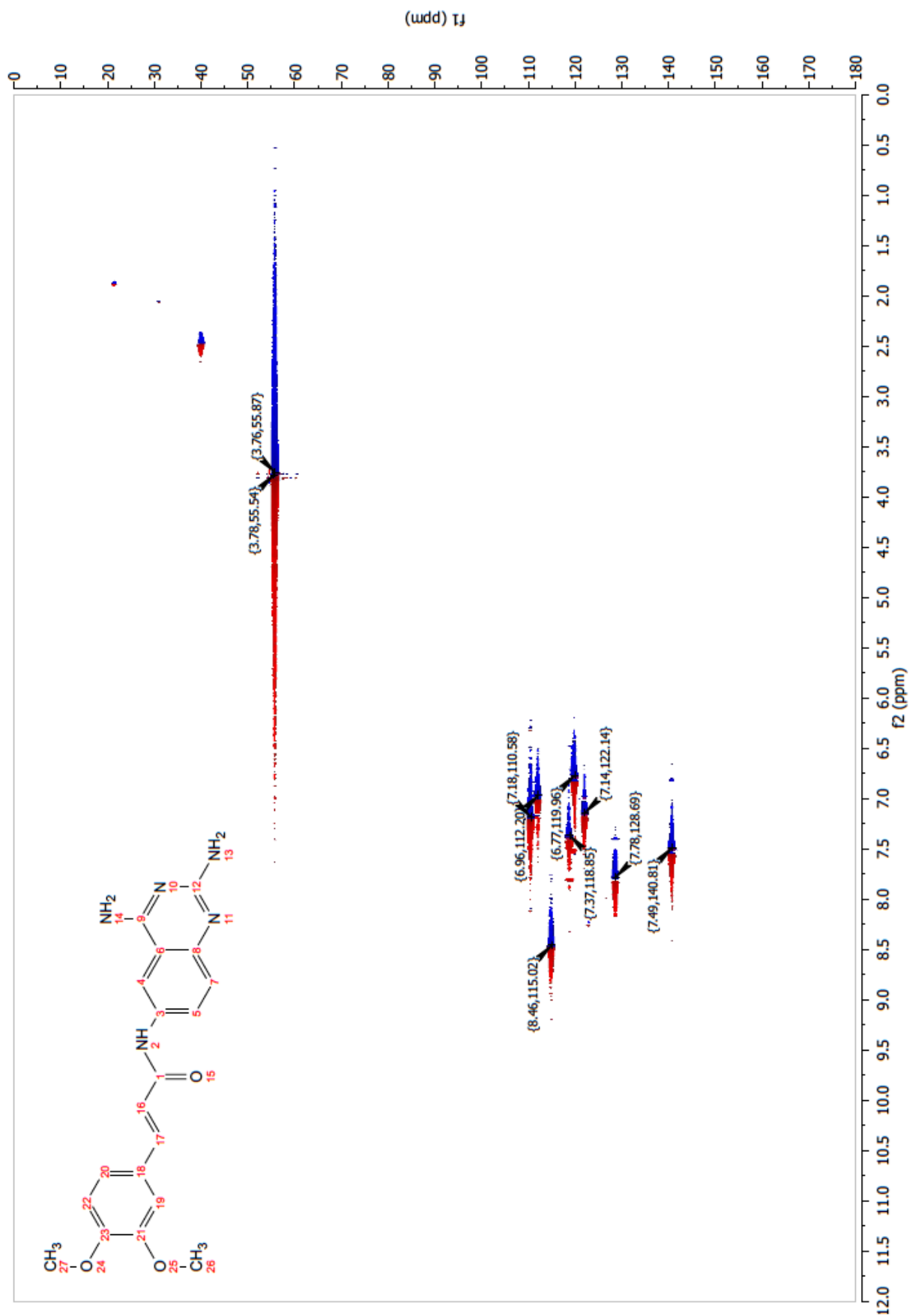


Figura 70. Espectro de RMN HMBC de (2E)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enamida (B5)

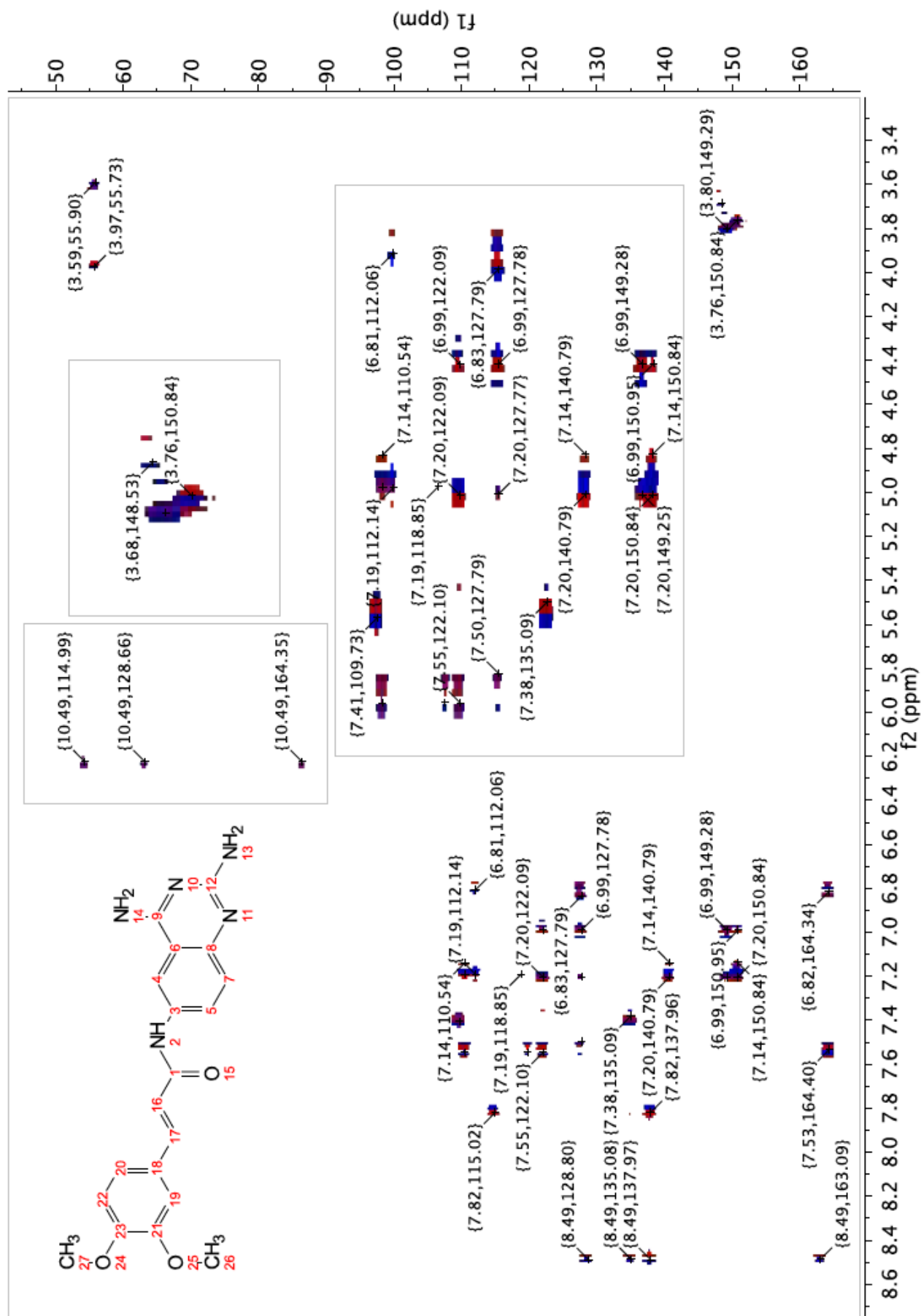


Figura 71. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

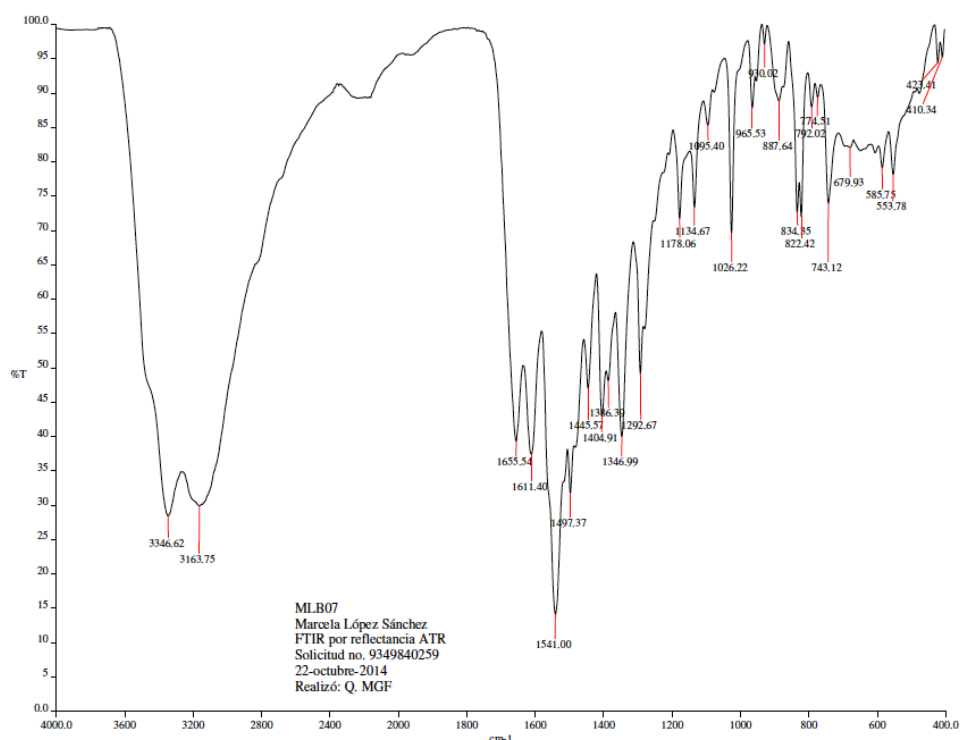


Figura 72. Espectro de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\MLB-07__1_1
szComment

12/3/2014 10:48:21 AM

MLB-07__1_1 #3-6 RT: 0.21-0.53 AV: 4 NL: 6.59E5

T: + c FAB Full ms [49.50-800.50]

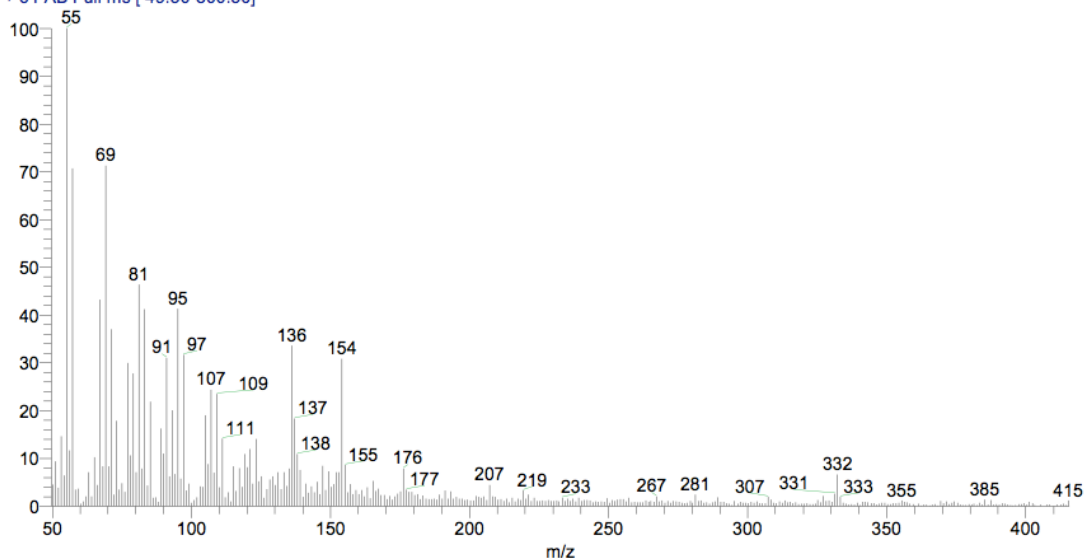


Figura 73. Espectro de alta resolución de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

[Elemental Composition]
Data : Dr-Francisco-Hernende-Luis01 Date : 06-Aug-2015 17:02
Sample: 592-STE-5444 MLB-7
Note : -luis-velasco
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
RT : 4.58 min Scan#: (8,22)
Elements : C 40/0, H 49/0, O 4/0, N 8/3
Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 23.0

Page: 1

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	N
332.1261	23.0	332.1260	+0.3	14.5	17	14	1	7

Figura 74. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

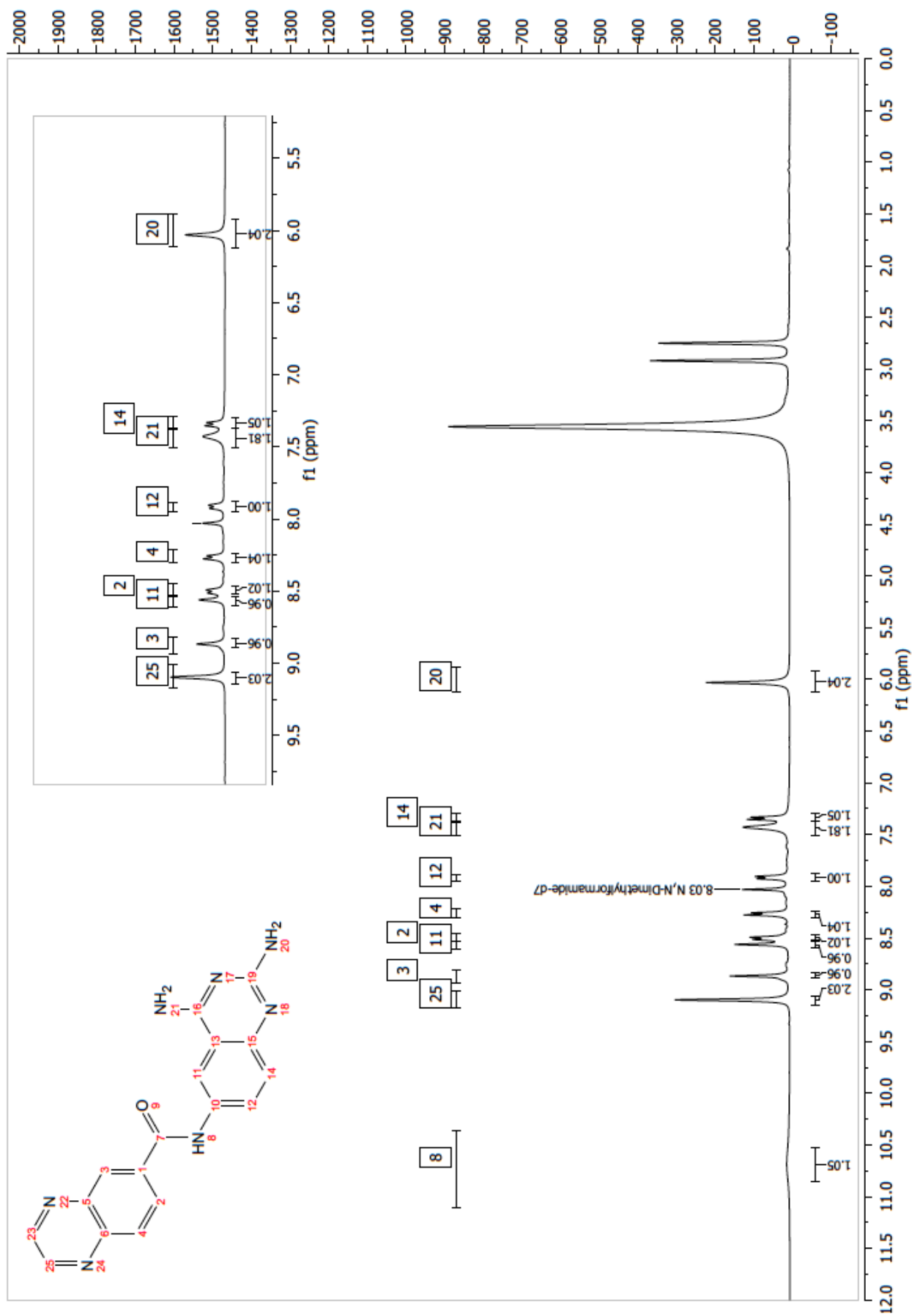


Figura 75. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

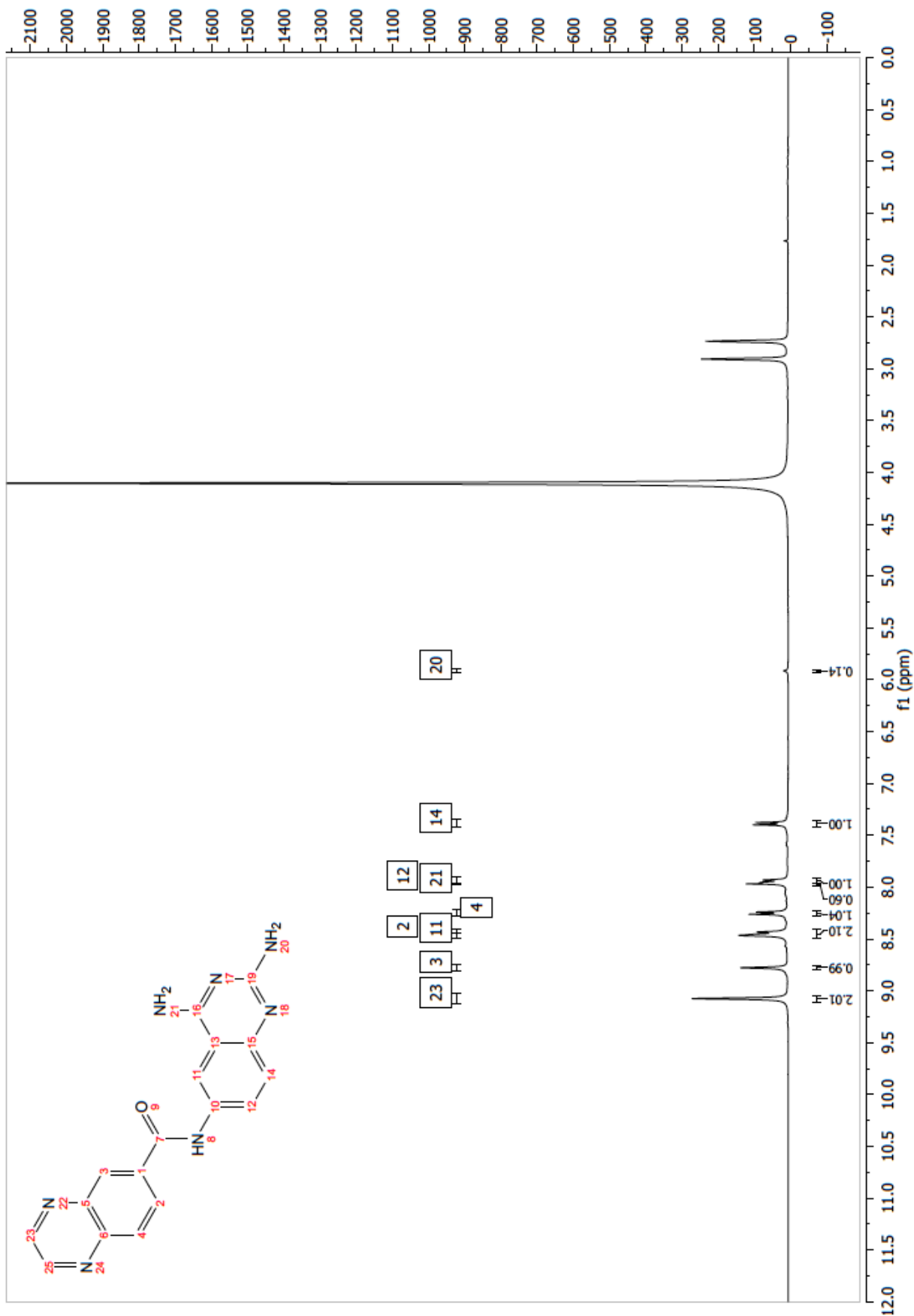


Figura 76. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

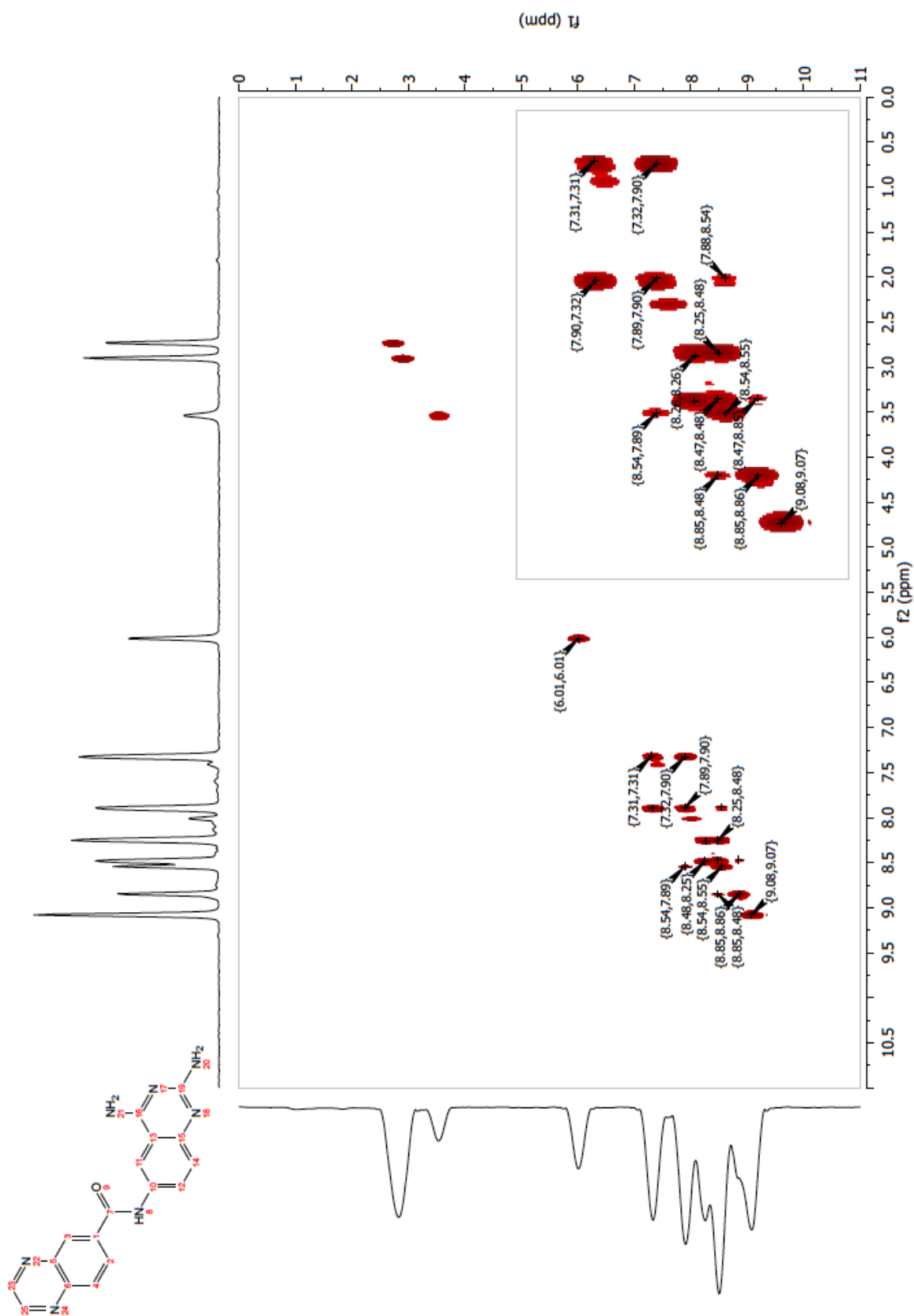


Figura 77. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

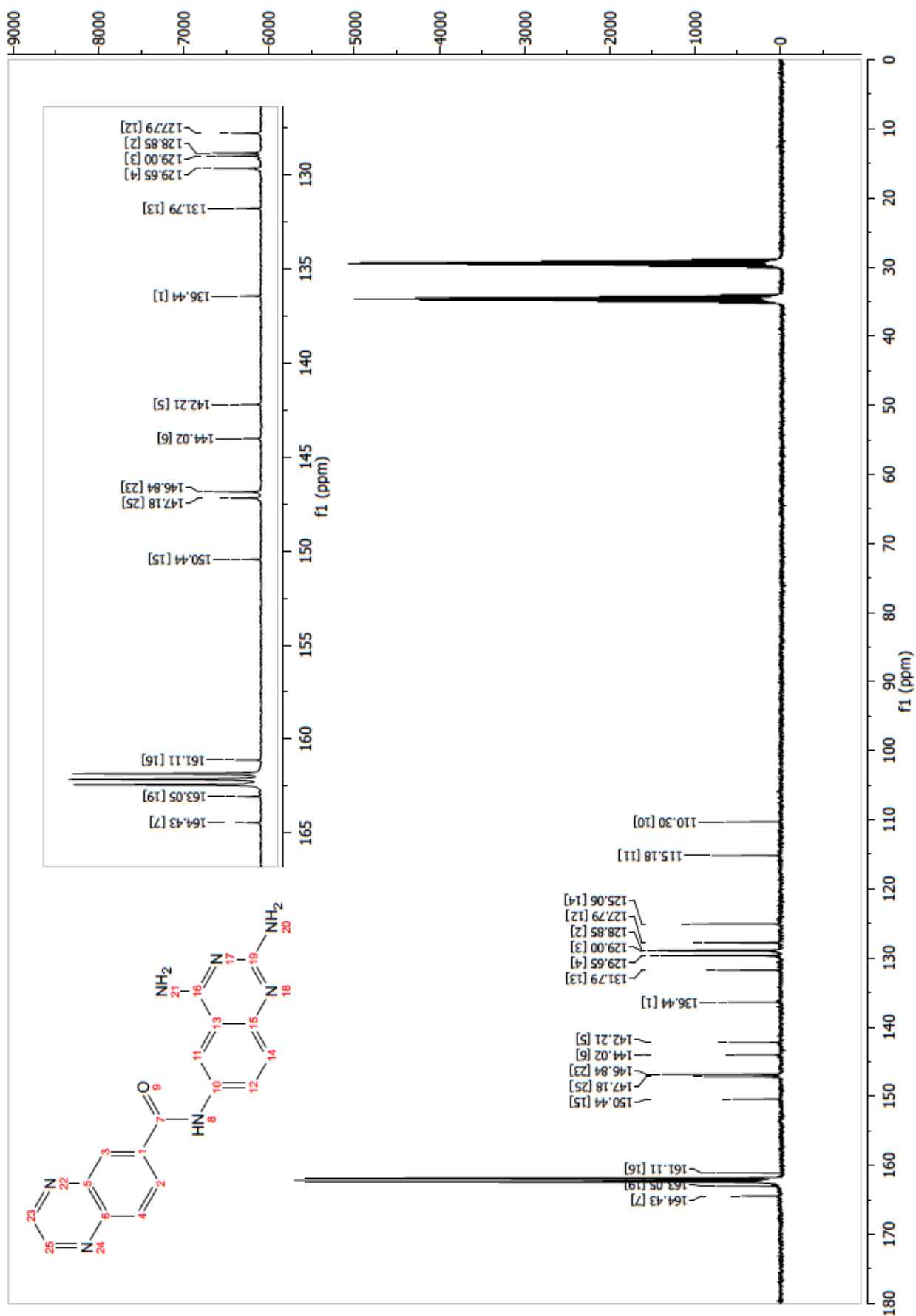


Figura 78. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

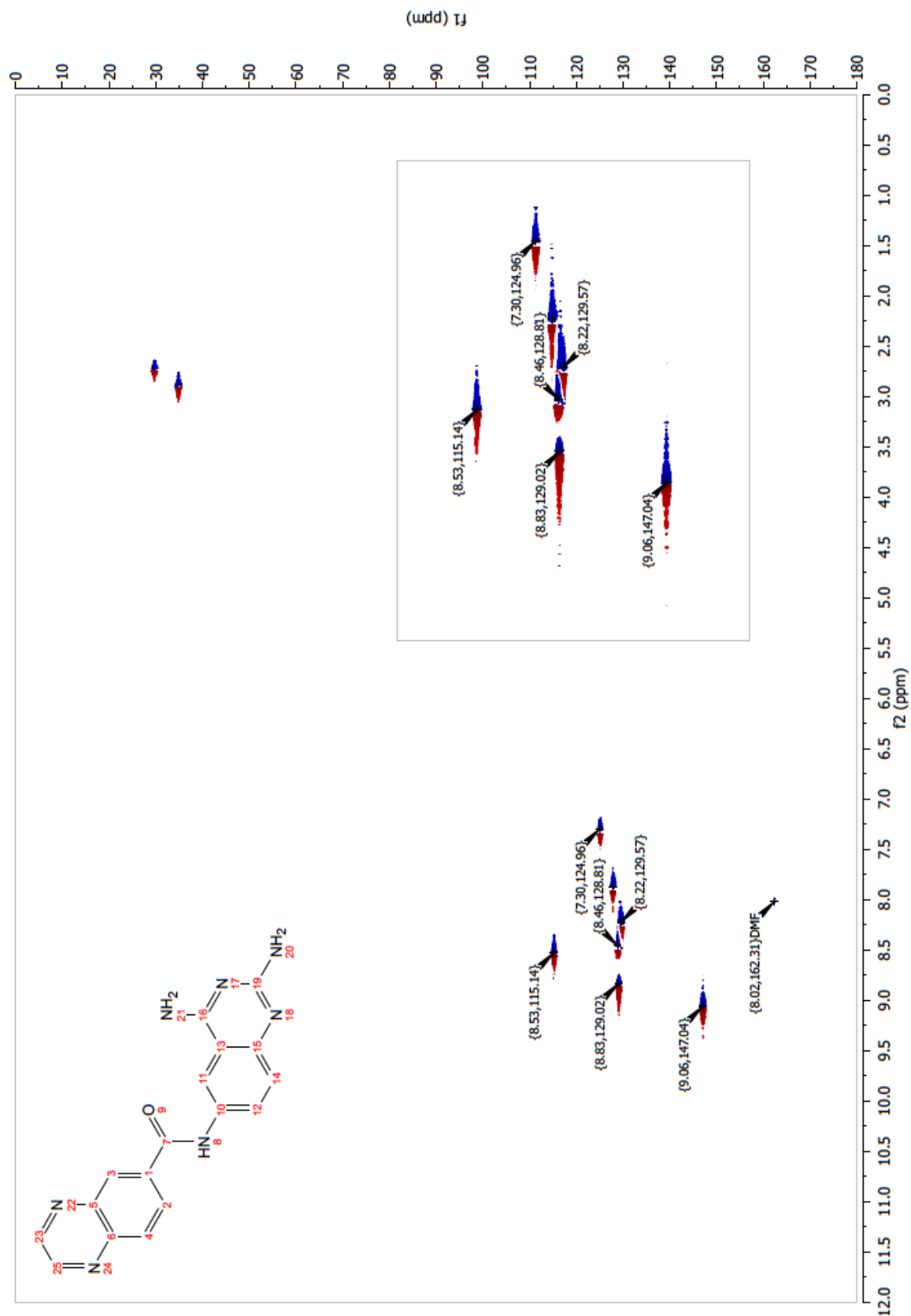


Figura 79. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)quinoxalin-6-carboxamida (B7)

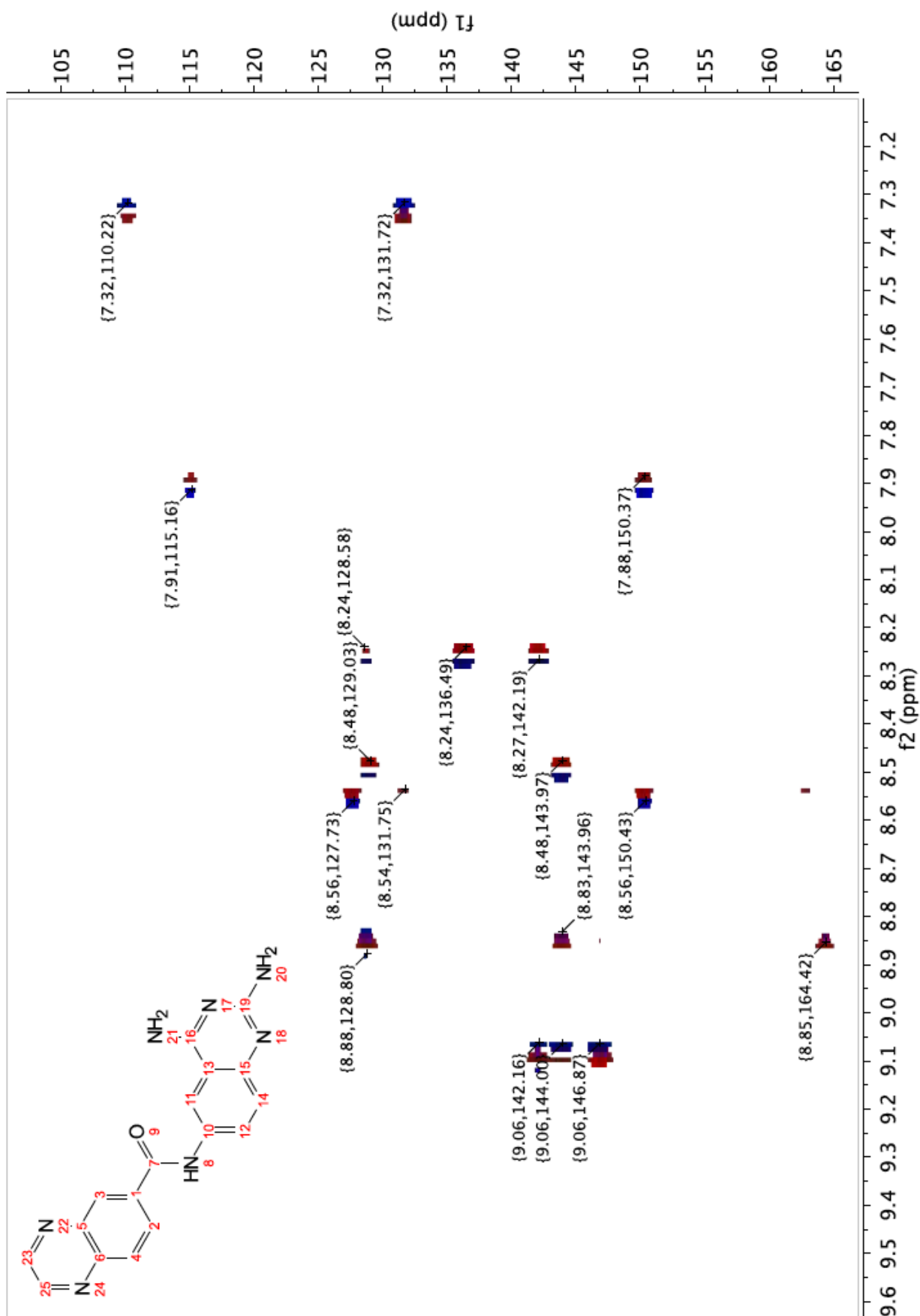


Figura 80. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

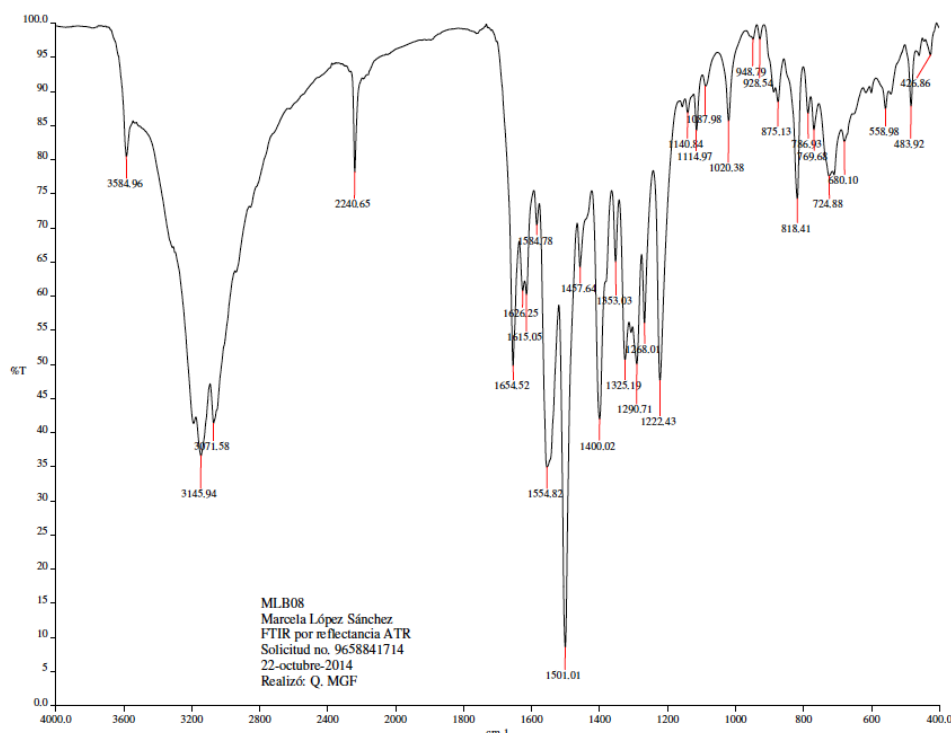


Figura 81. Espectro de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

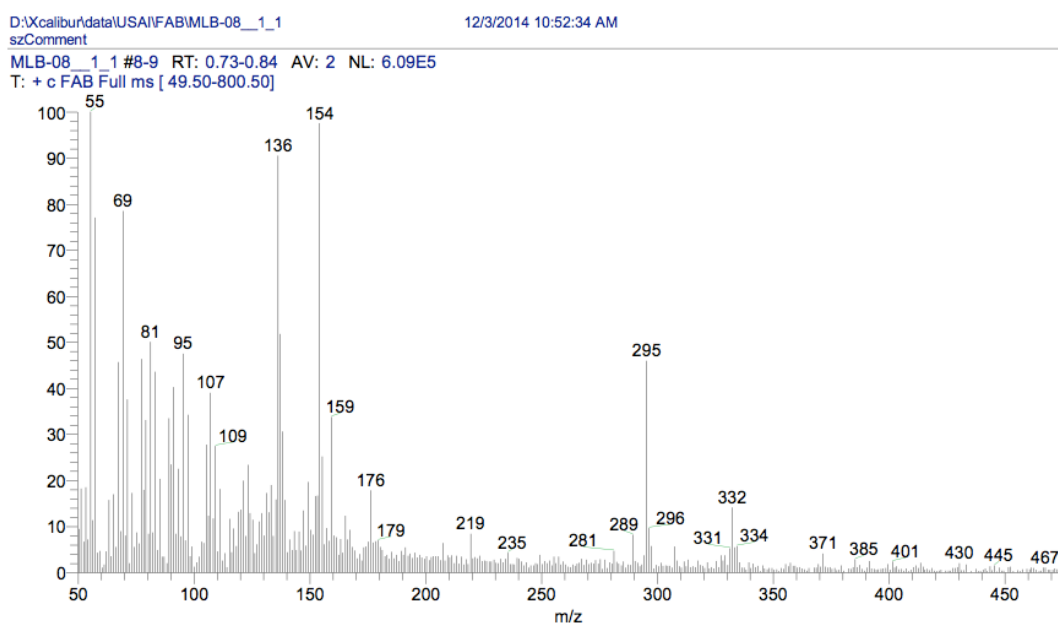


Figura 82. Espectro de alta resolución de EM-FAB de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

[Elemental Composition] Page: 1
 Data : Dr-Francisco-Hernende-Luis01 Date : 06-Aug-2015 17:17
 Sample: 593-STE-5445 MLB-8
 Note : -luis-velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 0.99 min Scan#: (3,5)
 Elements : C 40/0, H 49/0, O 4/0, N 8/3
 Mass Tolerance : 1000ppm, 1mmu if m/z > 1
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 23.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	N
334.1416	42.0	334.1416	-0.2	13.5	17	16	1	7

Figura 83. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

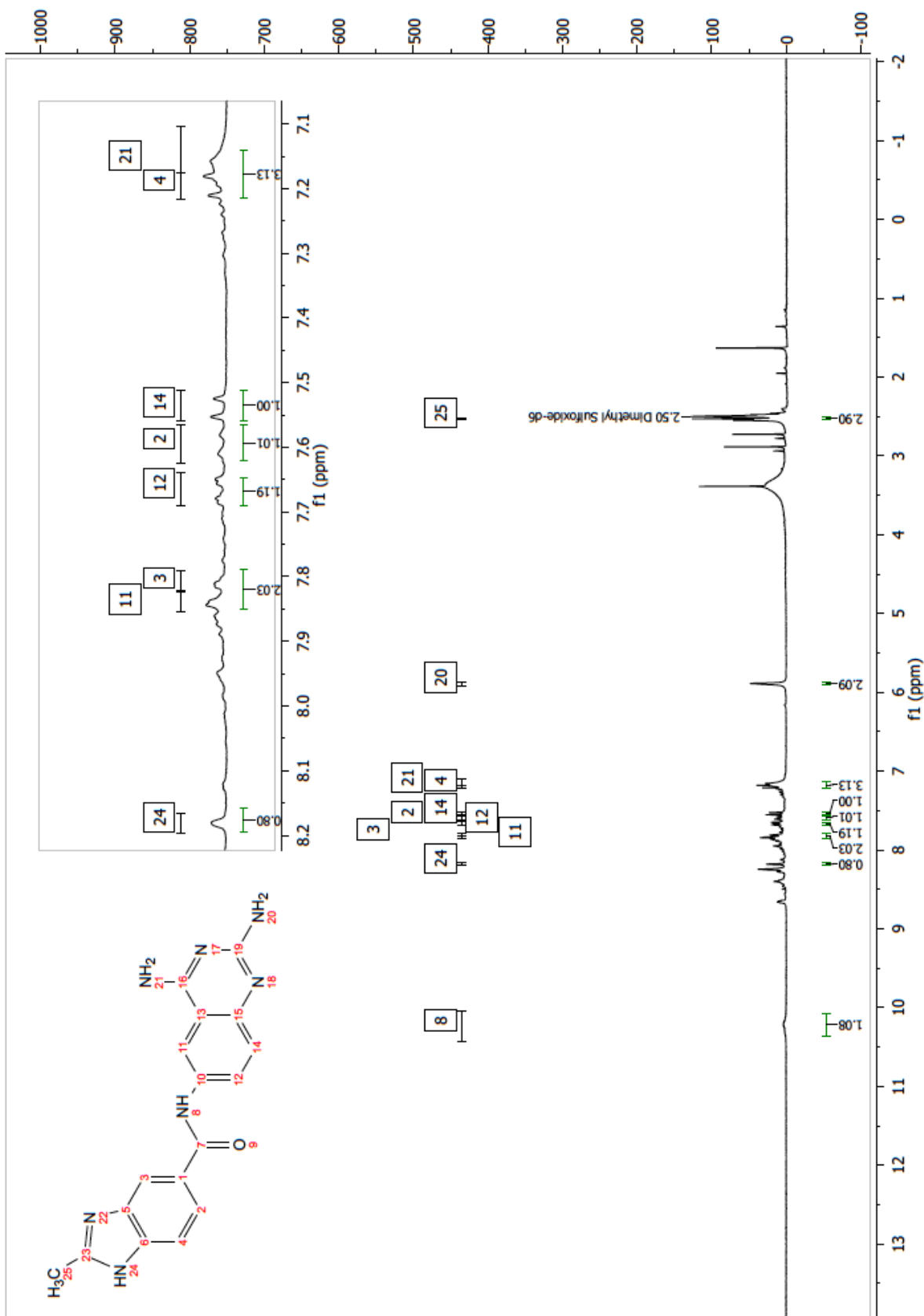


Figura 84. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

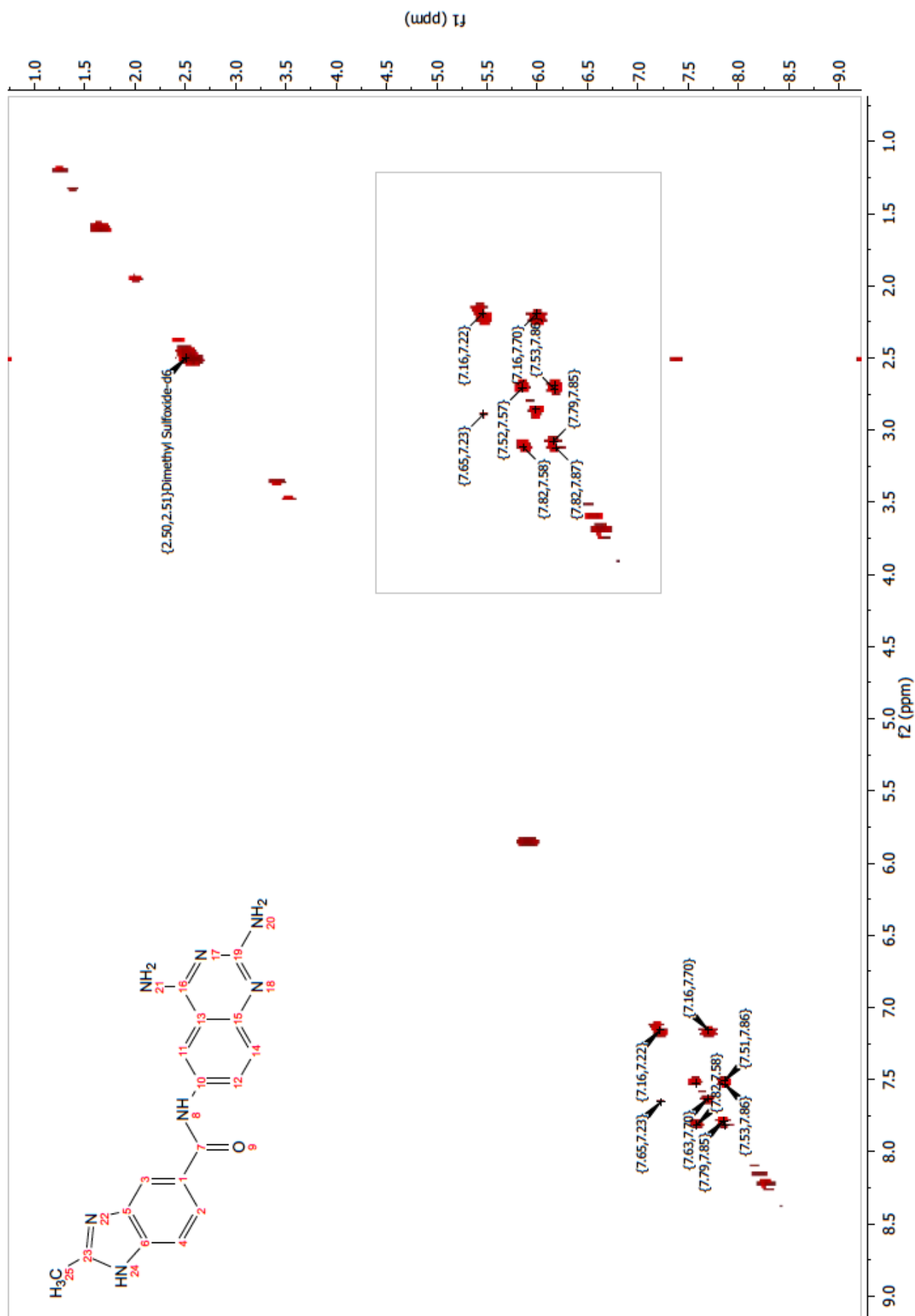


Figura 85. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

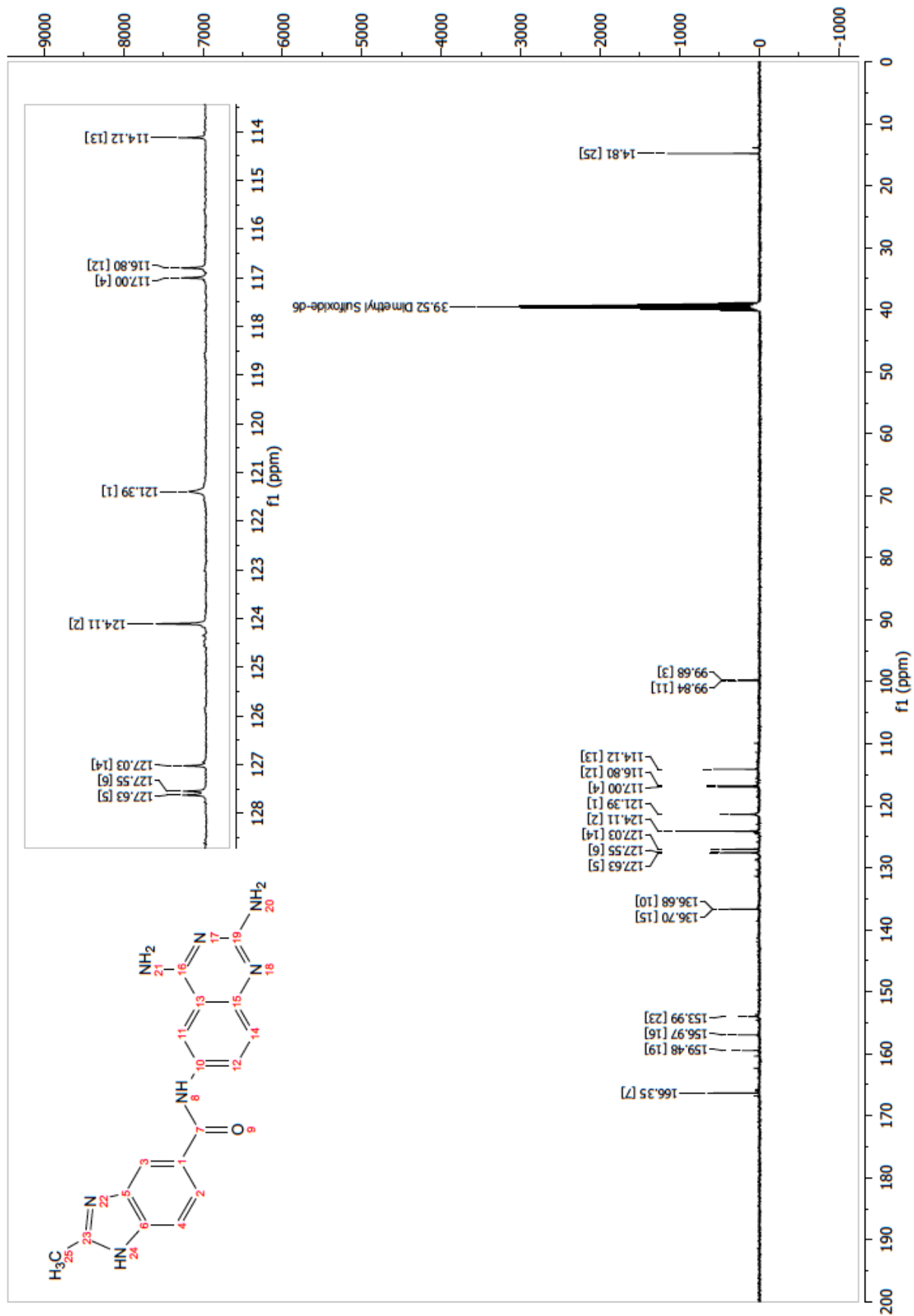


Figura 86. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-2-metil-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (B8)

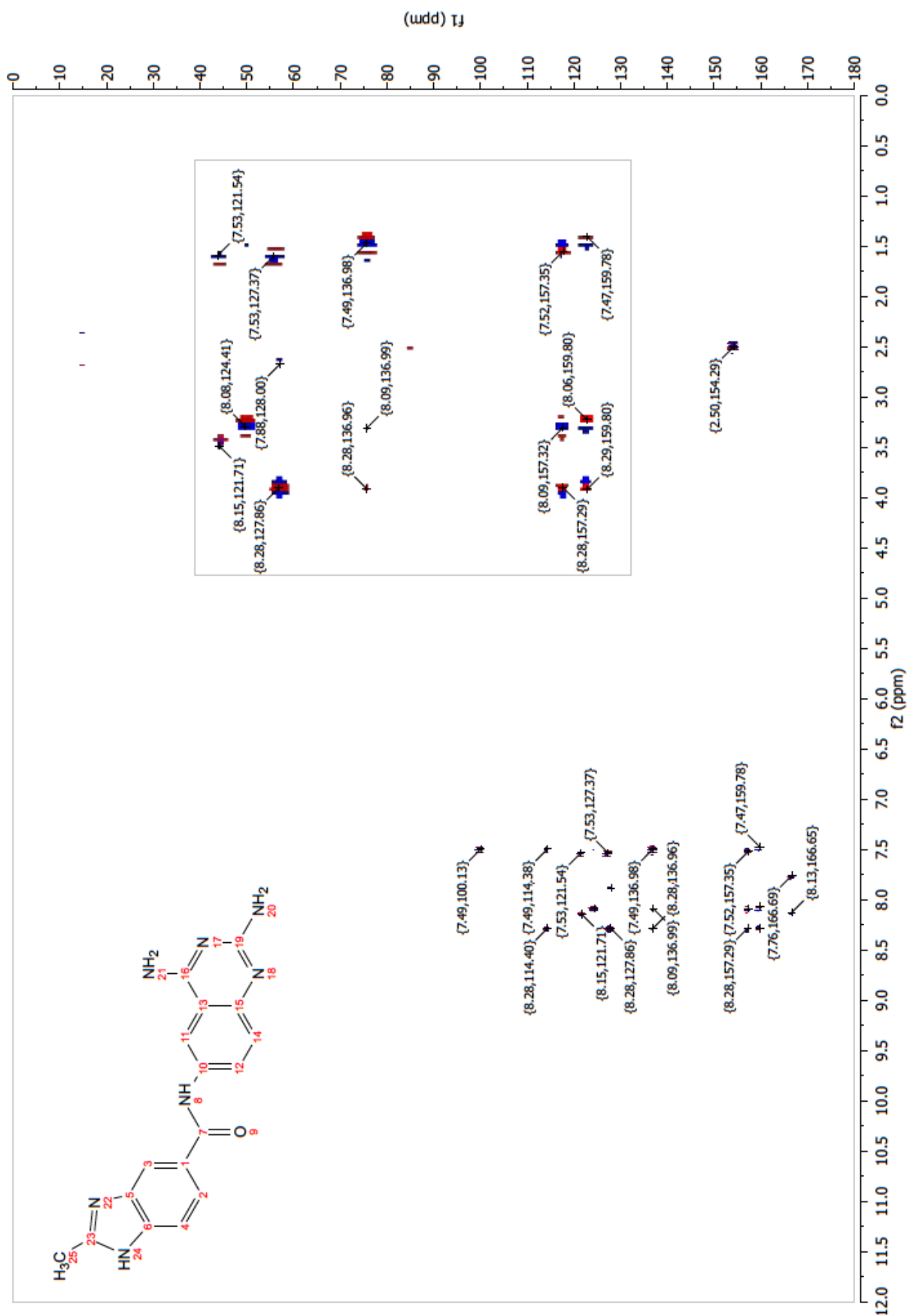


Figura 87. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

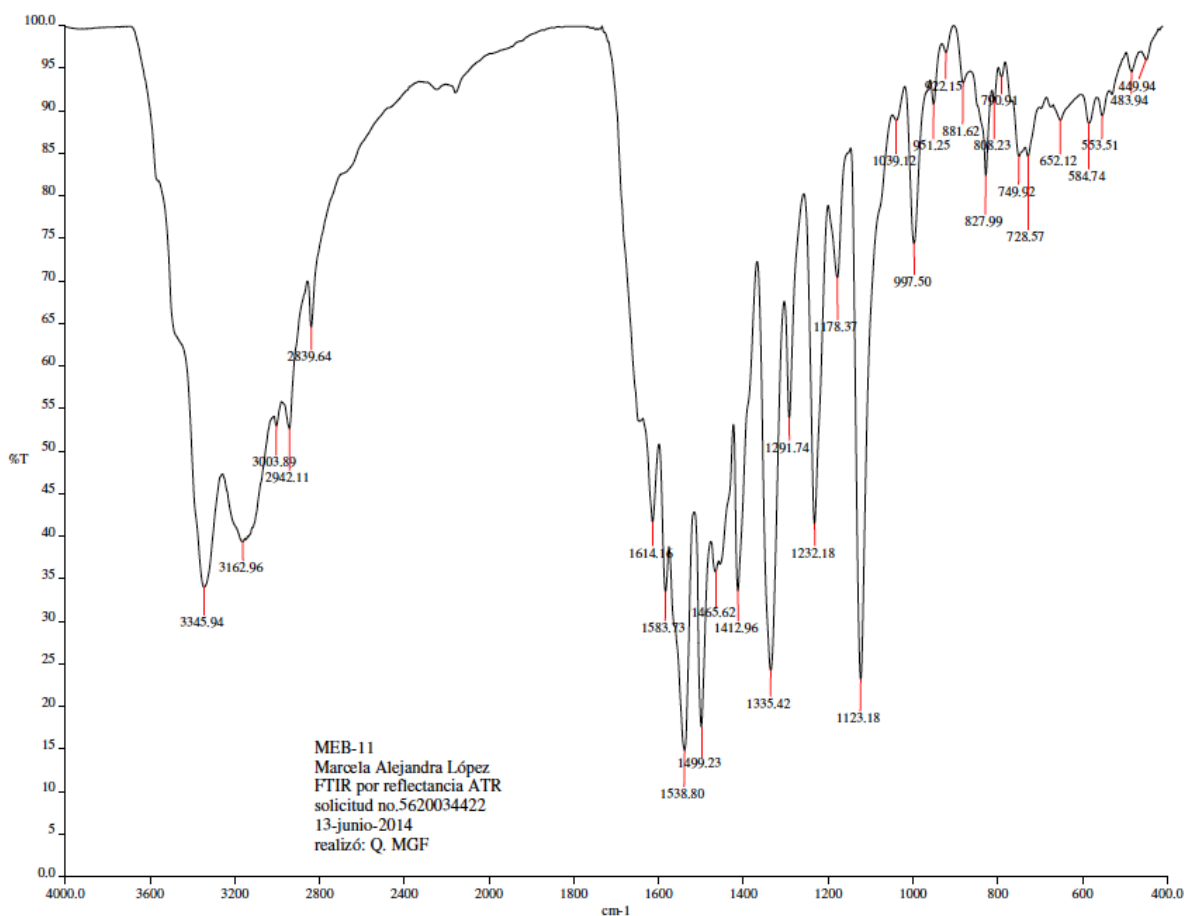


Figura 88. Espectro de EM-IE de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

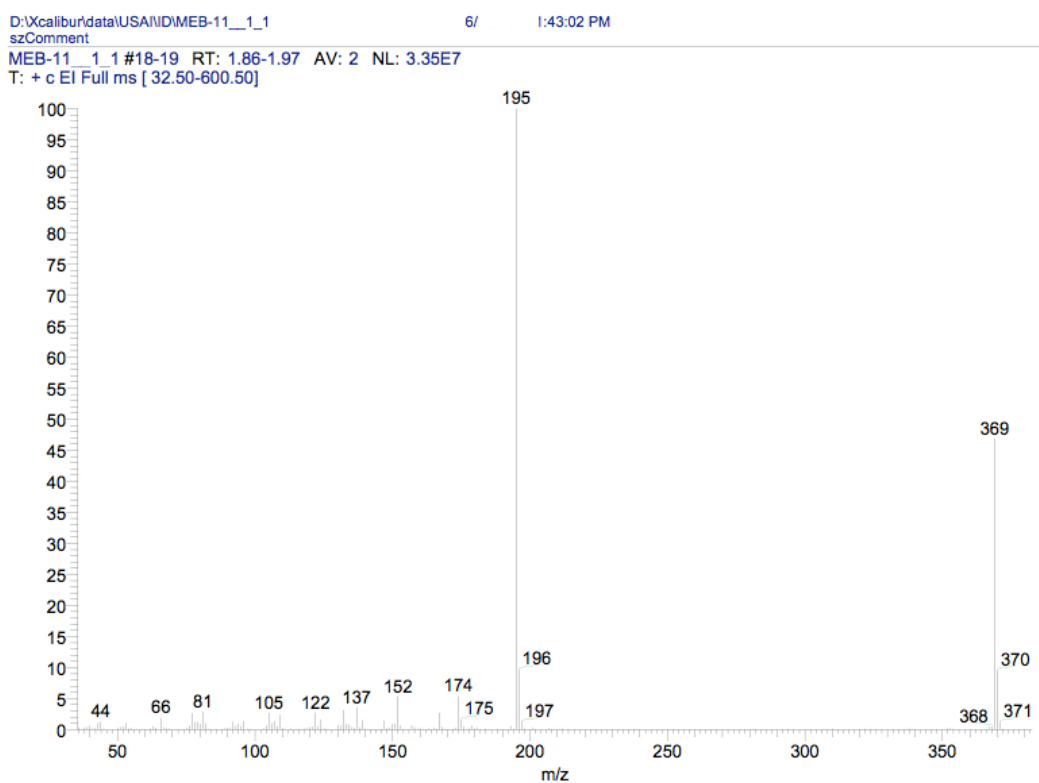


Figura 89. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

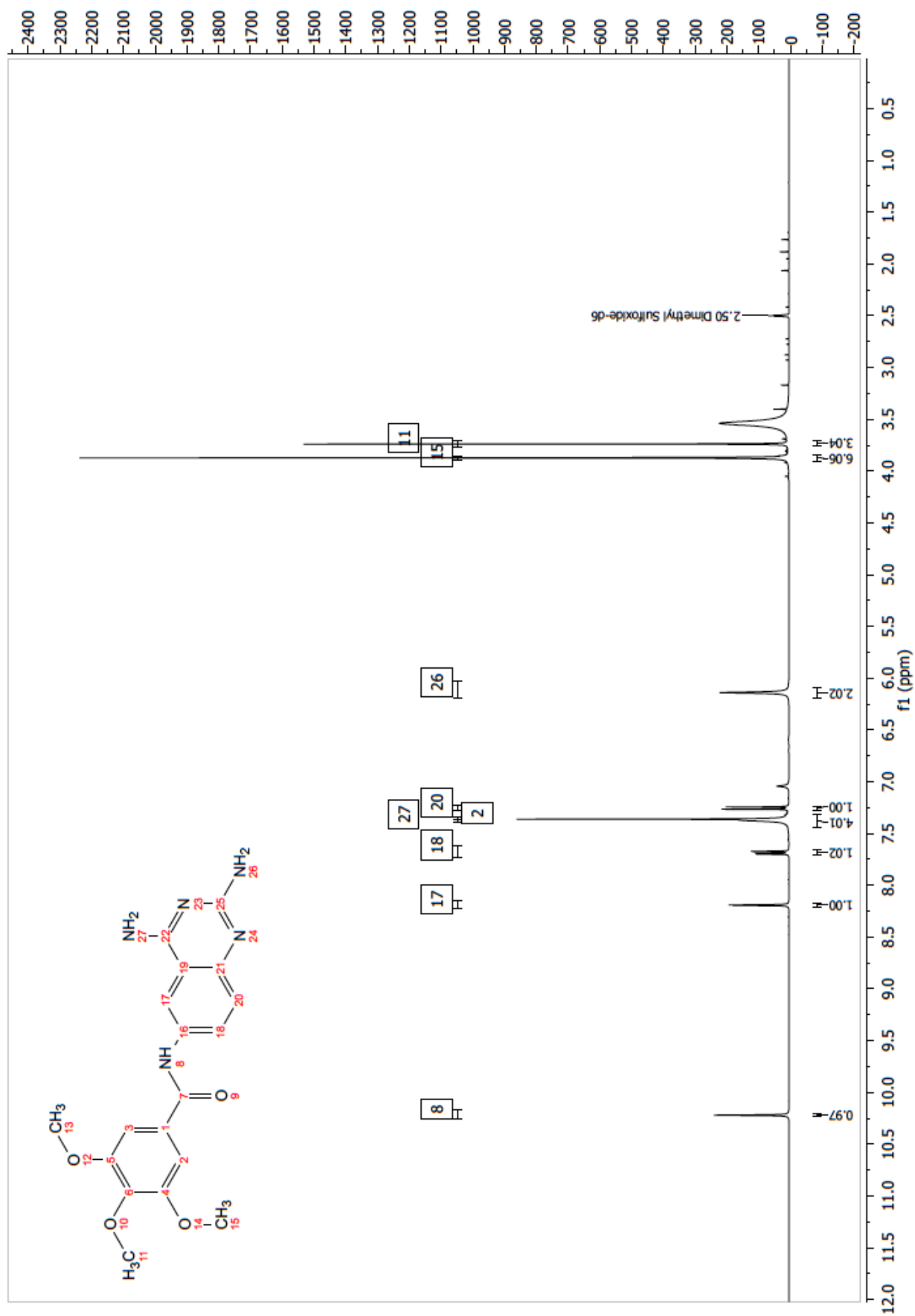


Figura 90. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

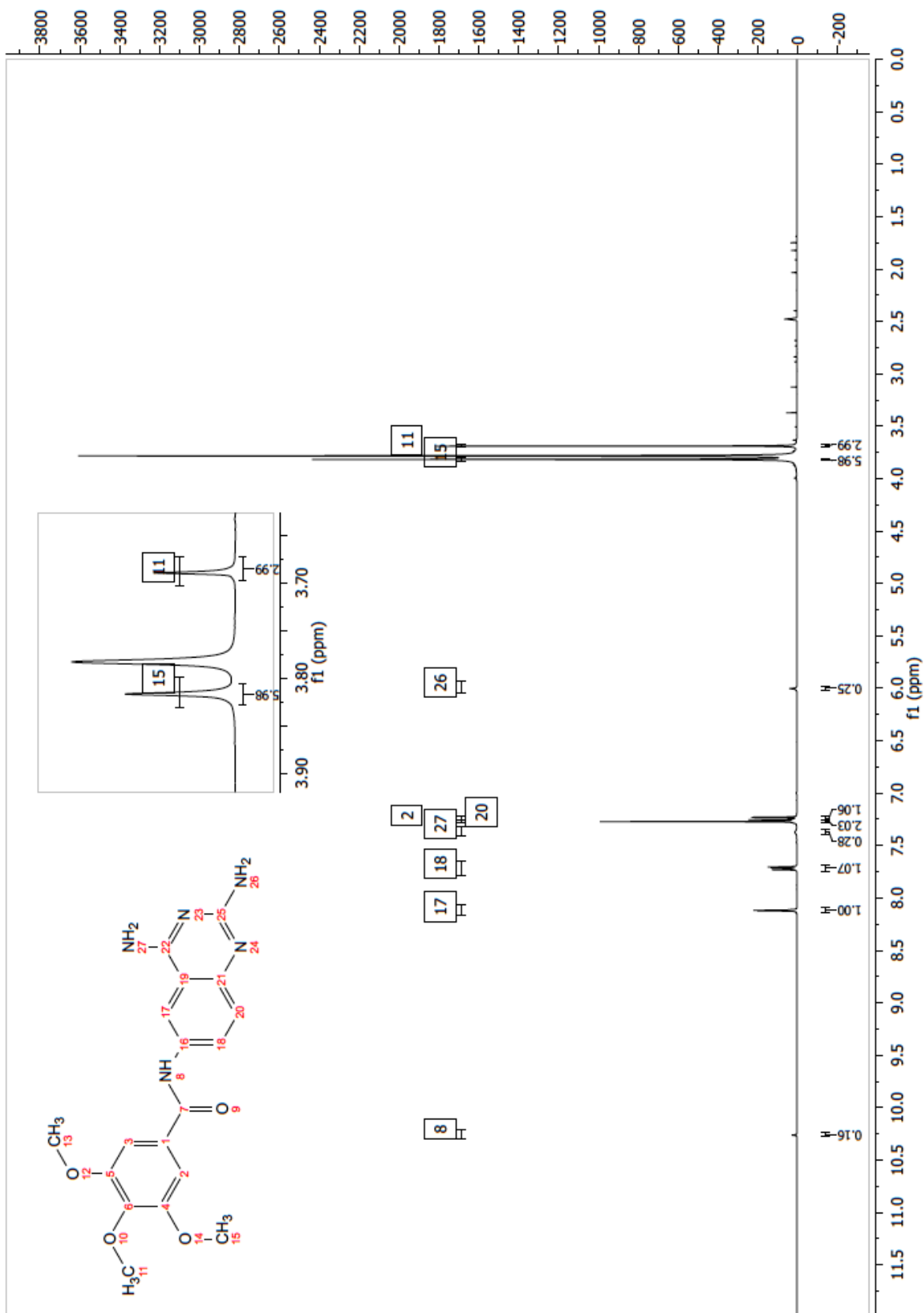


Figura 91. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

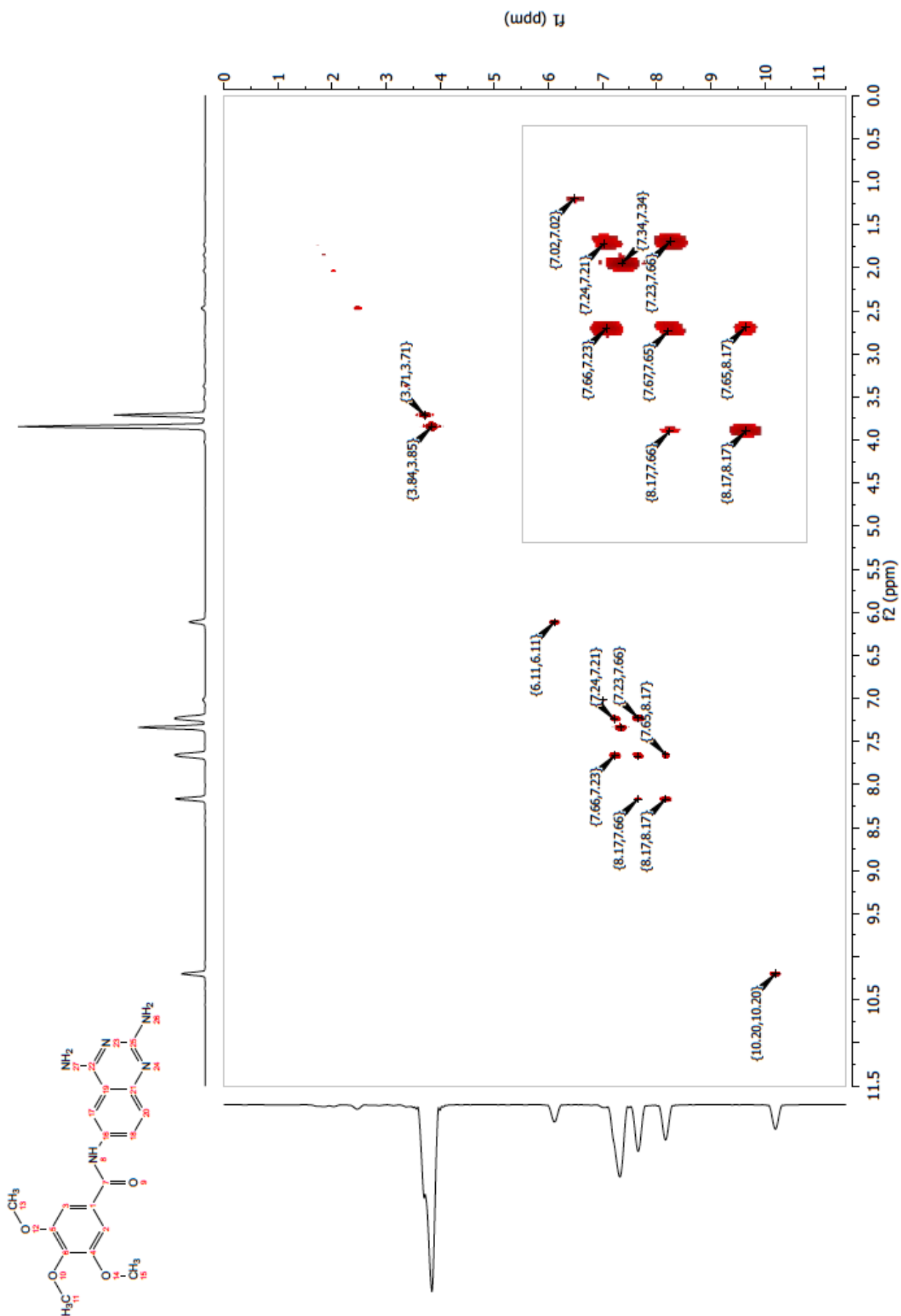


Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

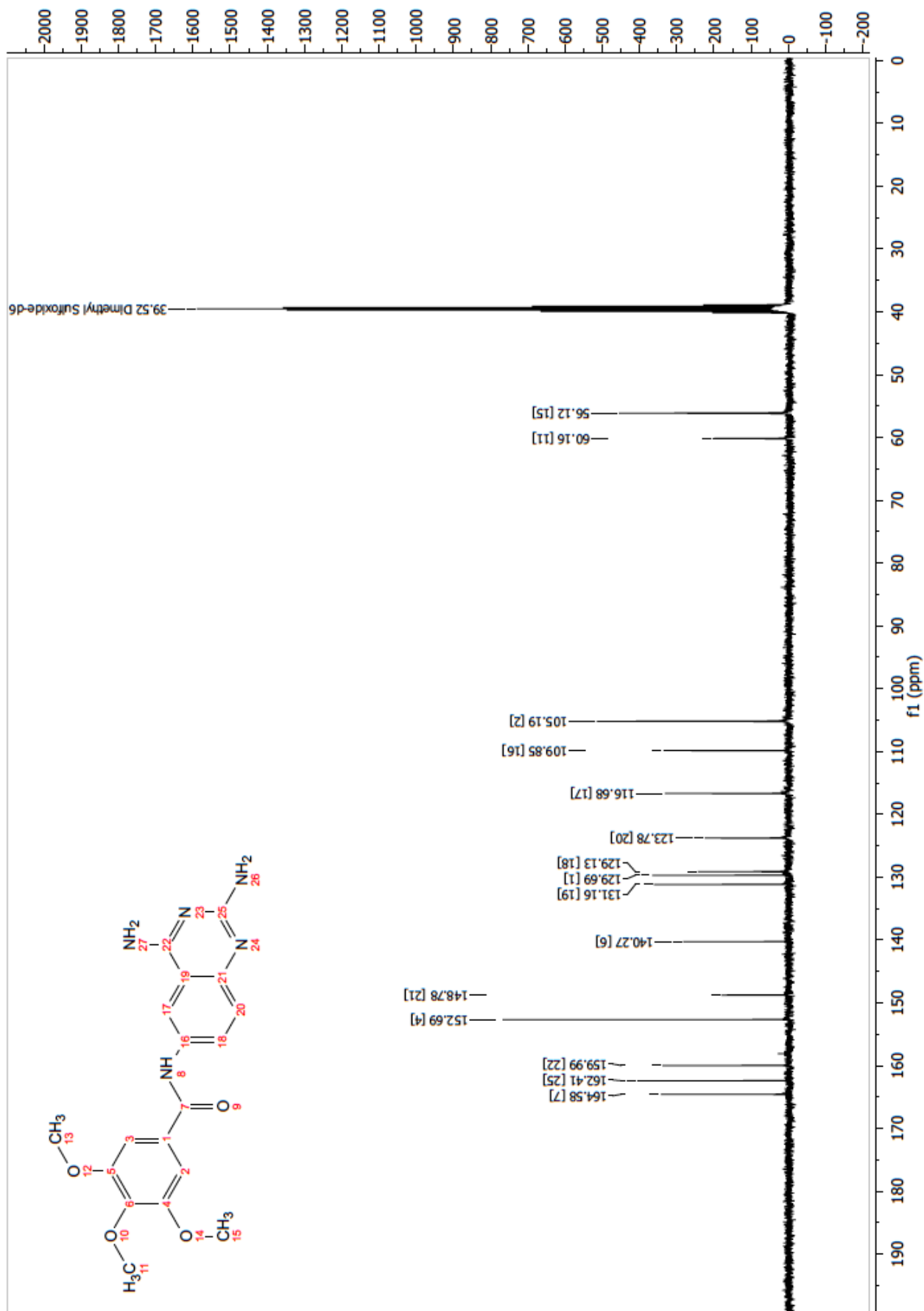


Figura 93. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

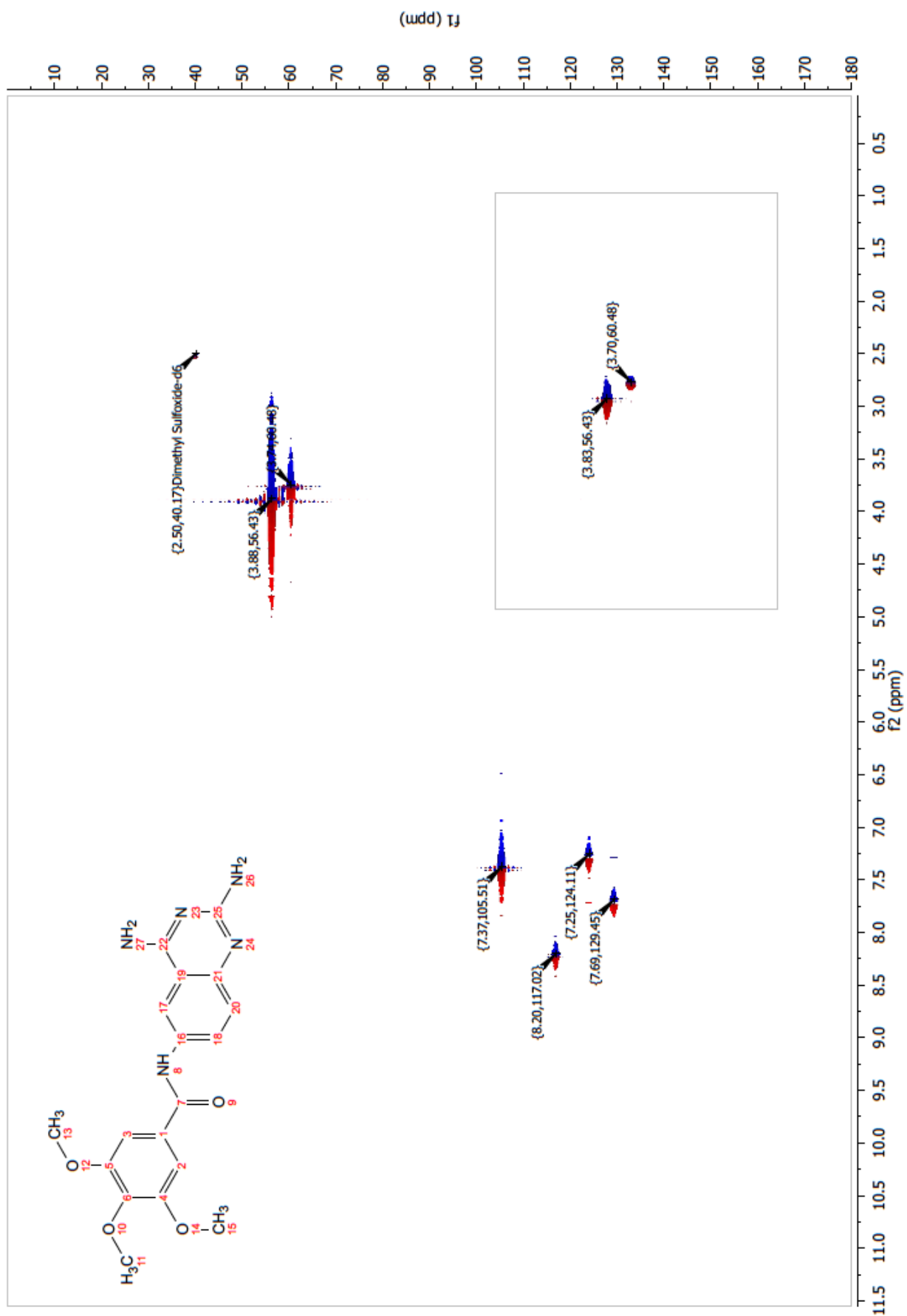


Figura 94. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (B11)

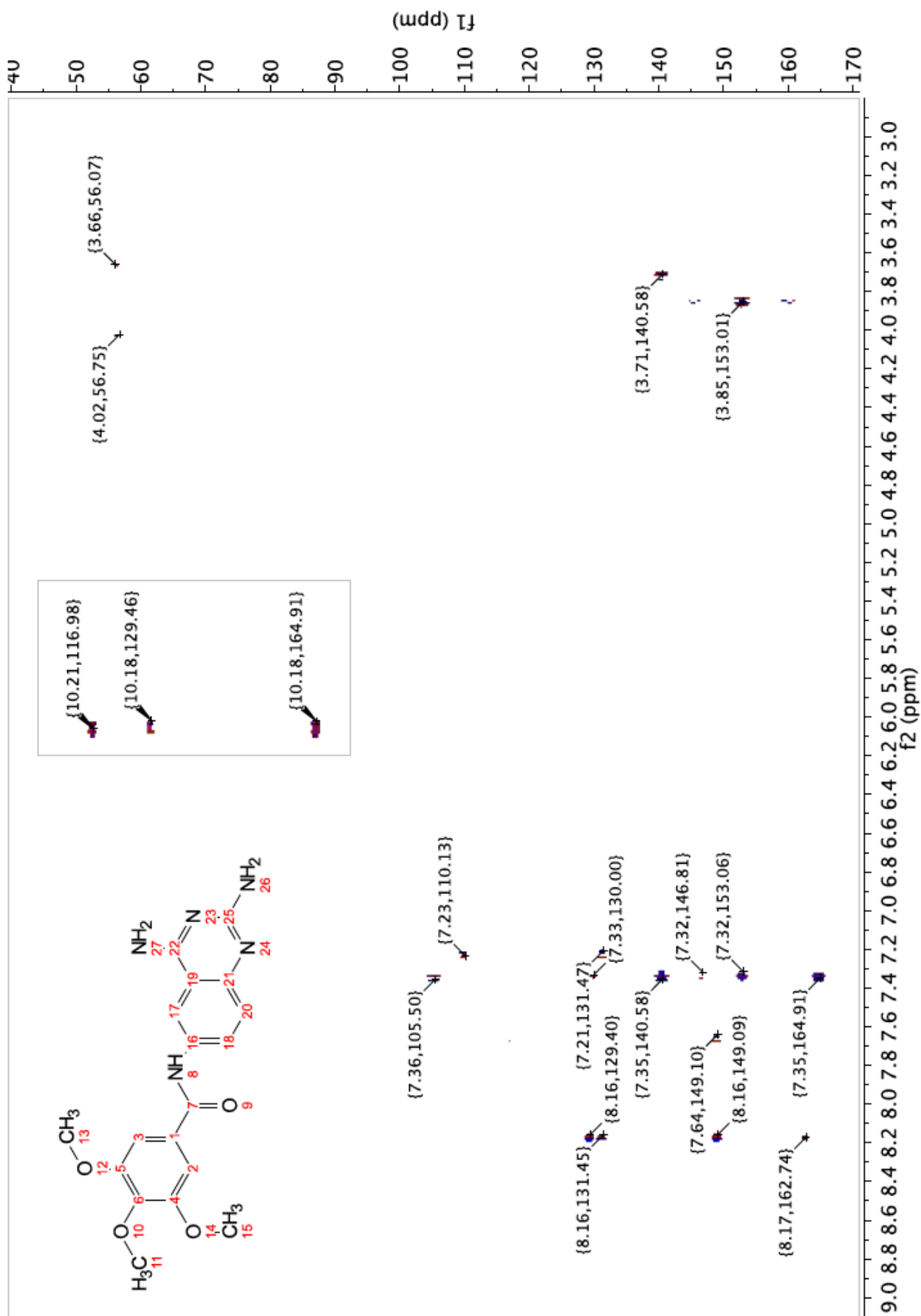


Figura 95. Espectro de FT-IR de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

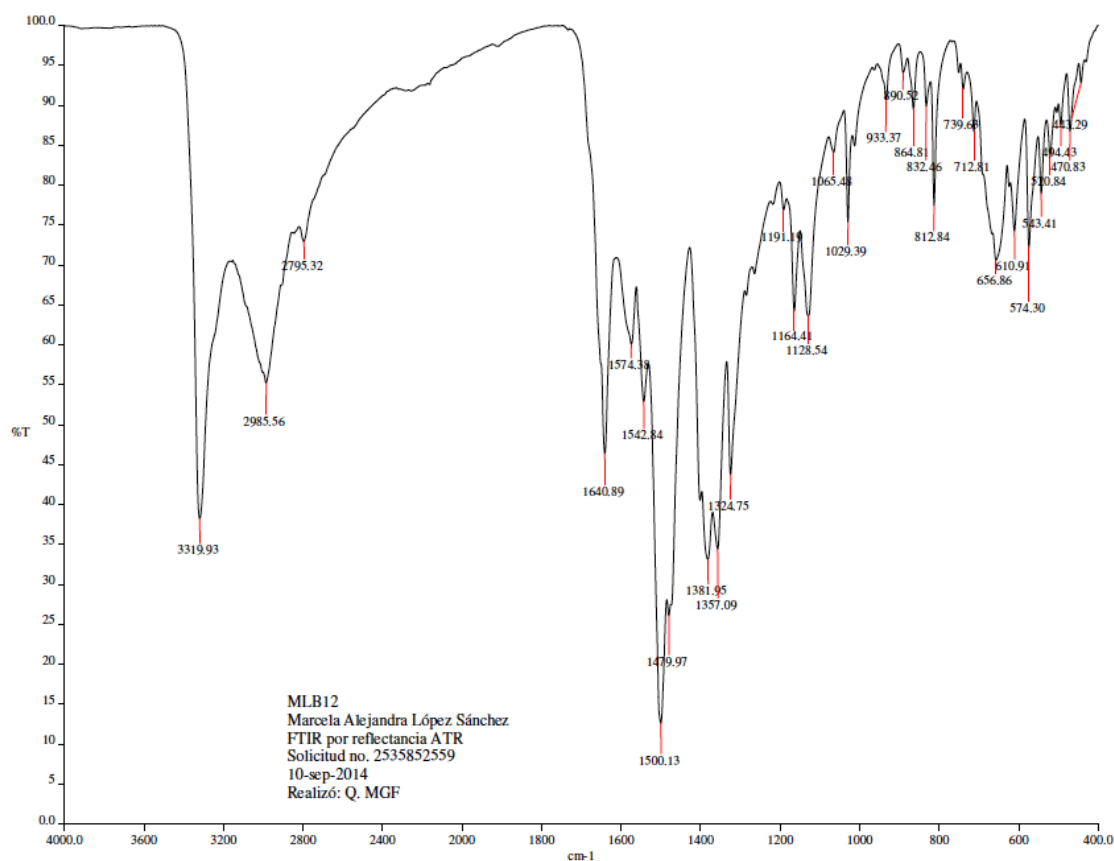


Figura 96. Espectro de EM-FAB de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\MLB-12_2_2

12/3/2014 10:59:10 AM

szComment

MLB-12_2_2 #2-4 RT: 0.11-0.32 AV: 3 NL: 8.96E5

T: + c FAB Full ms [49.50-800.50]

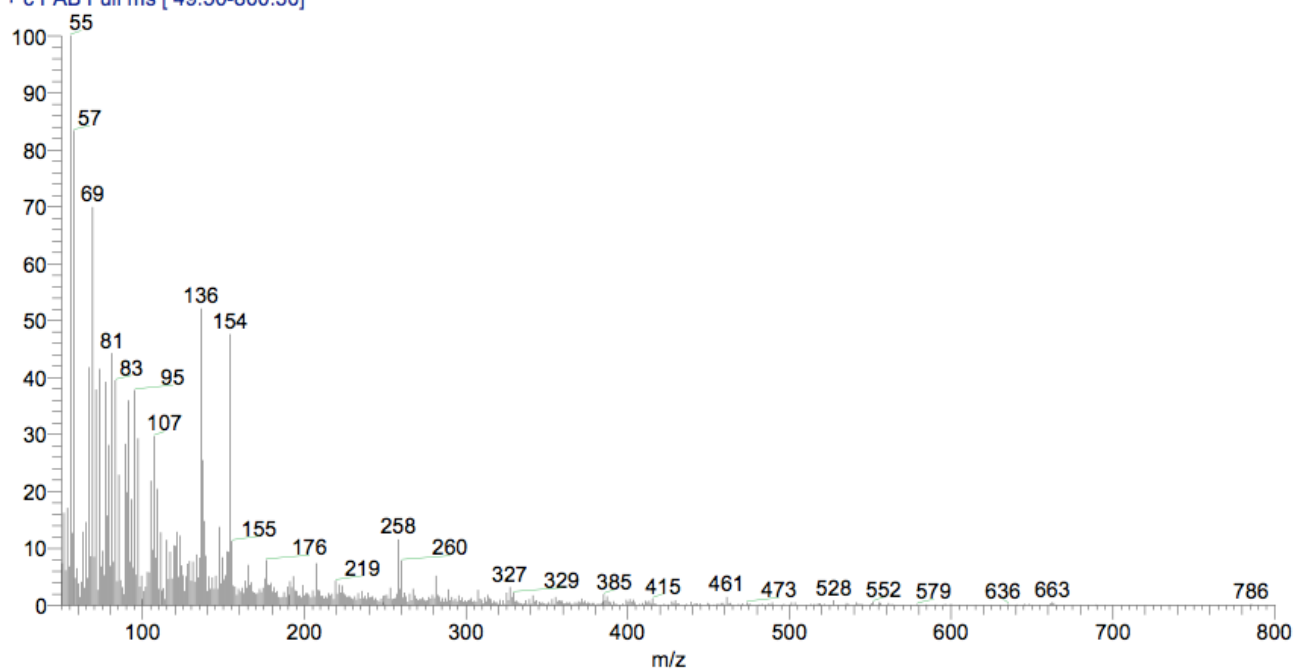


Figura 97. Espectro de RMN ^1H de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

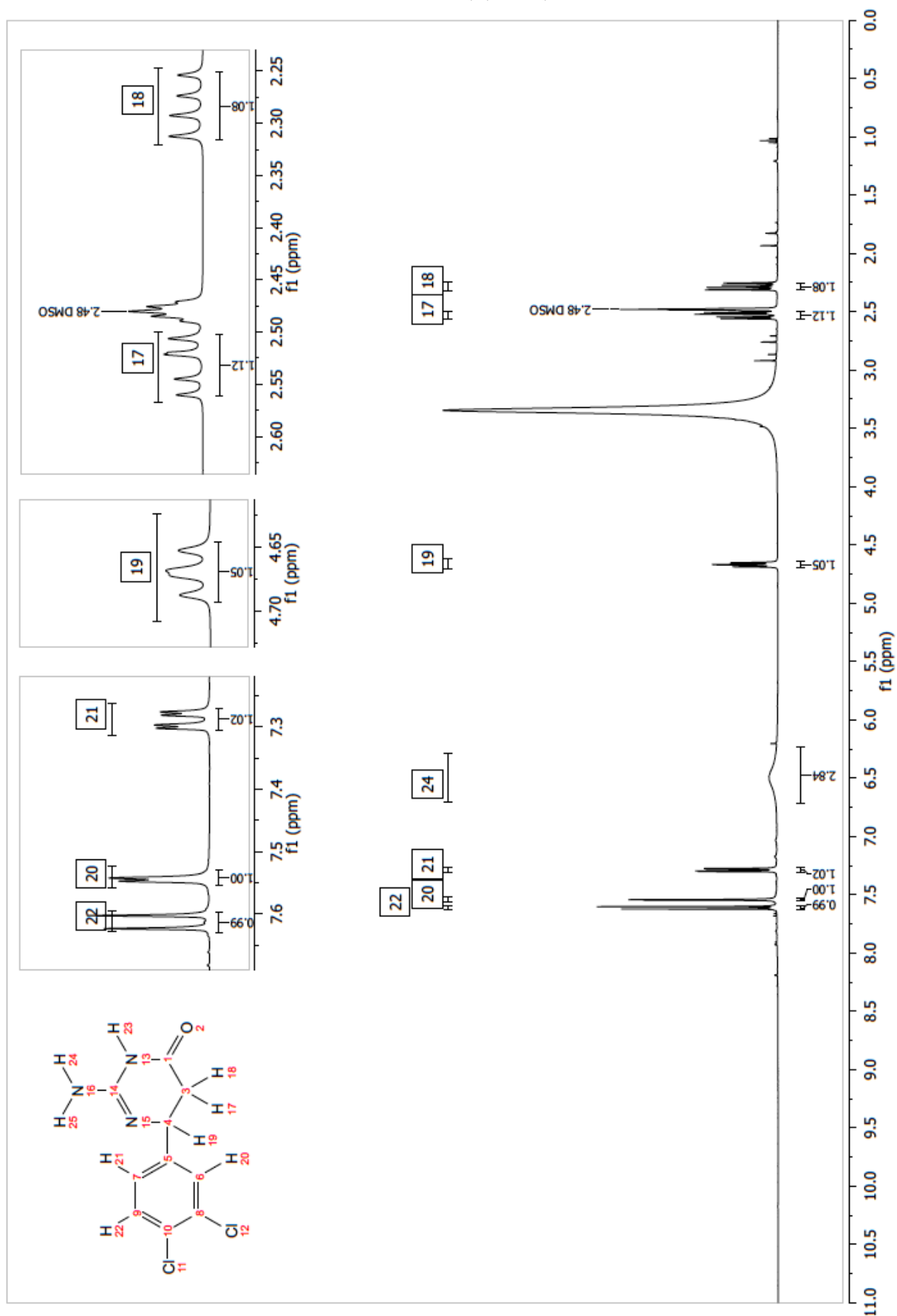


Figura 98. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

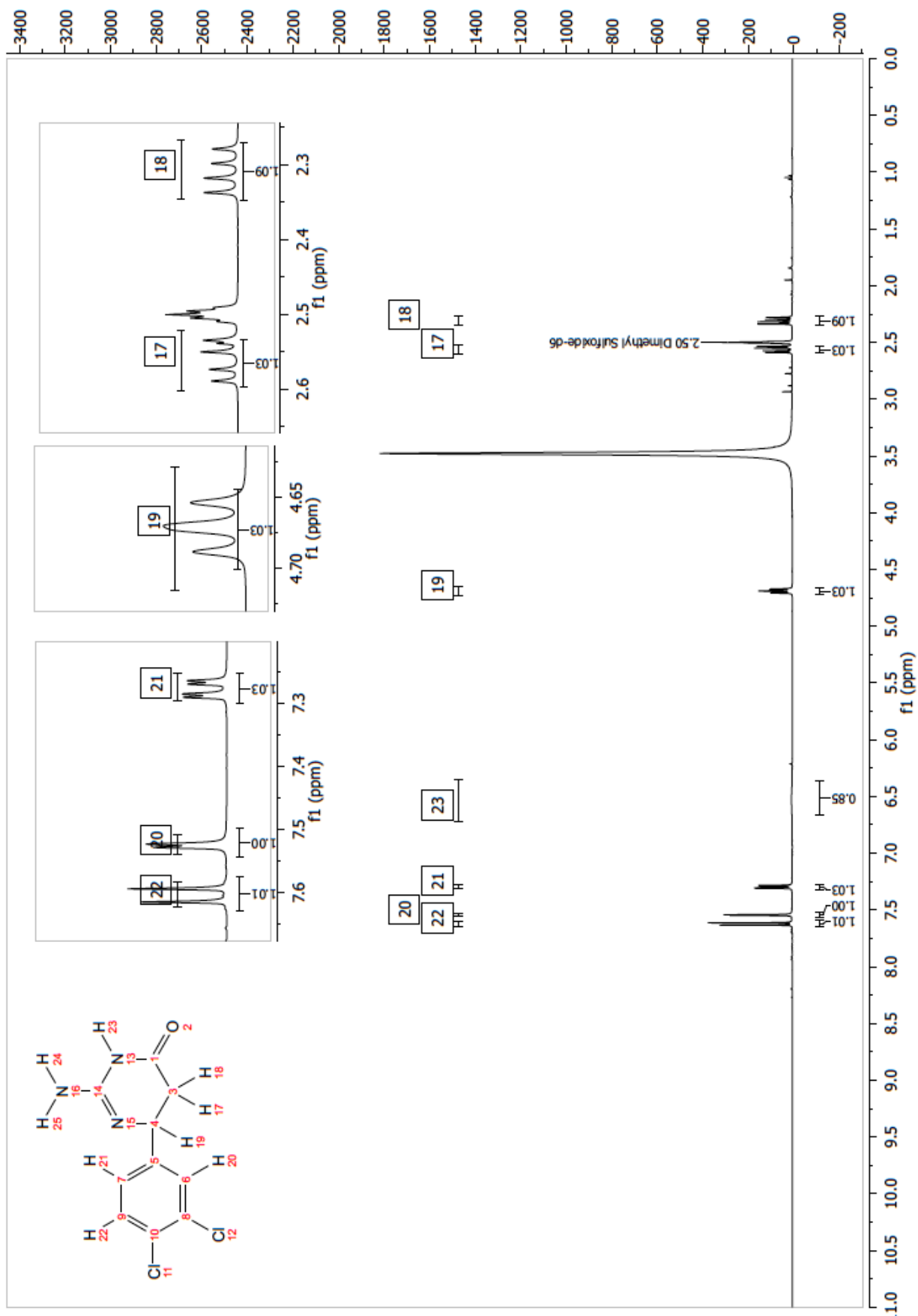


Figura 99. Espectro de RMN COSY de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

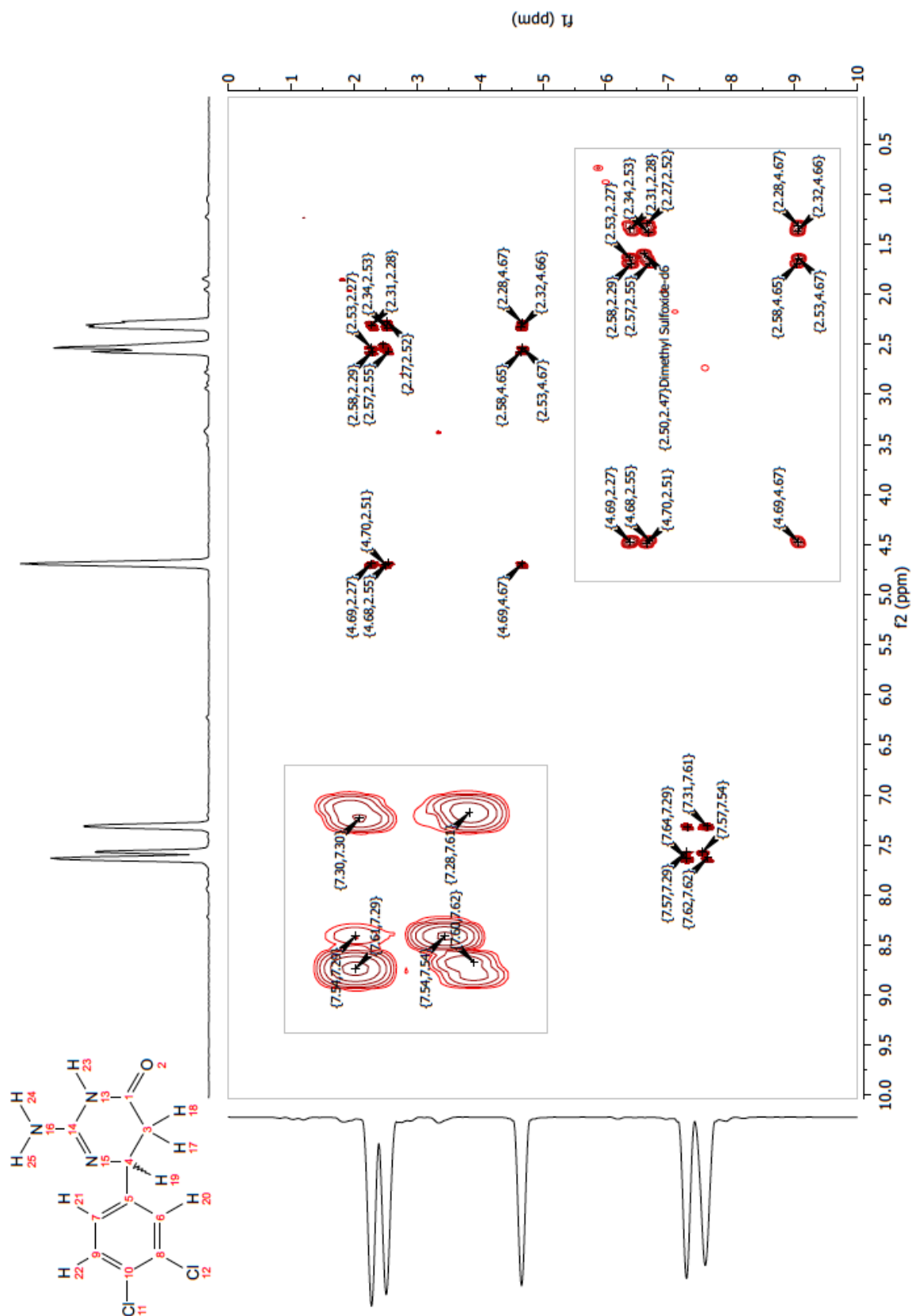


Figura 100. Espectro de RMN ^{13}C de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H-pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

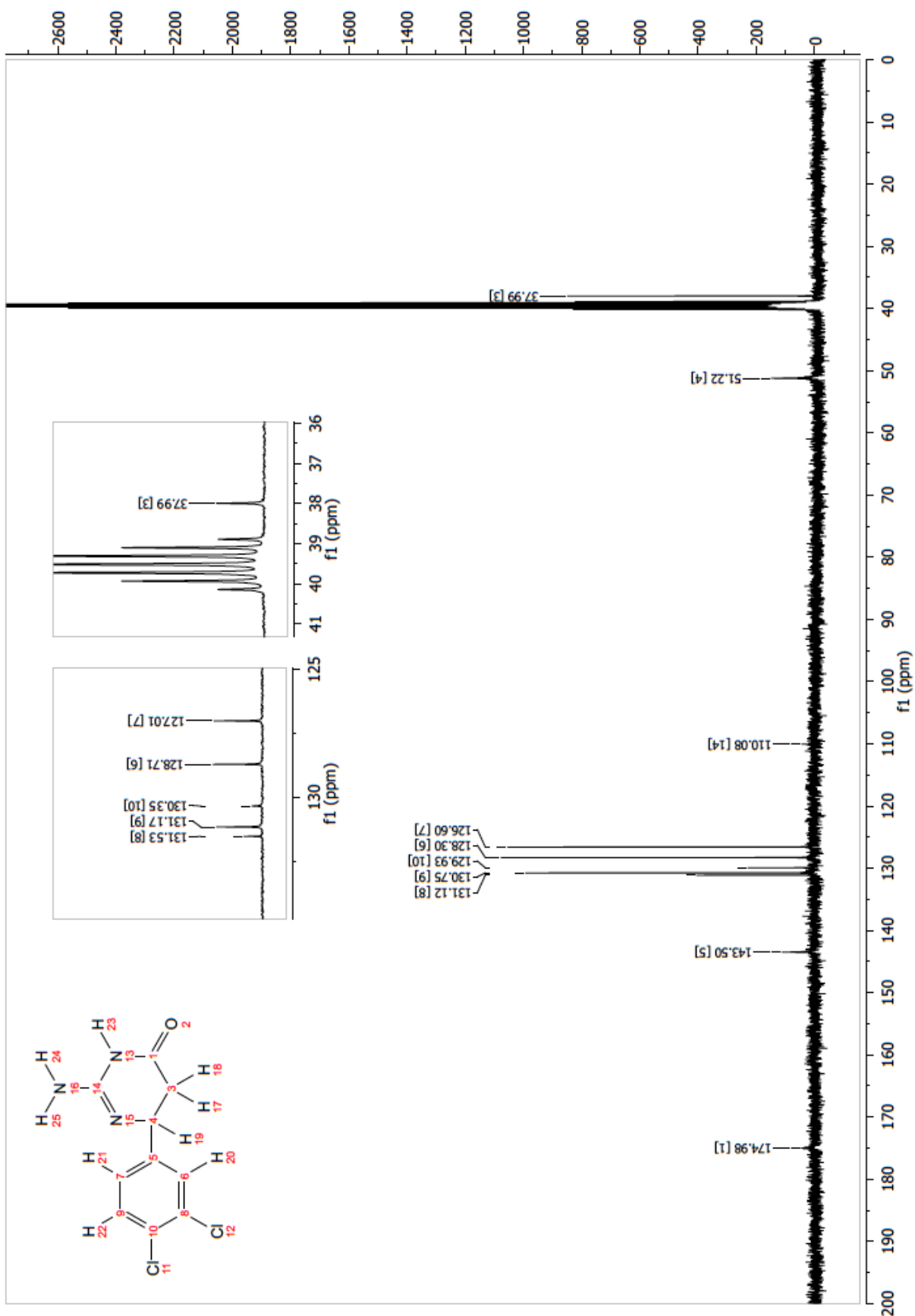


Figura 101. Espectro de RMN HSQC de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

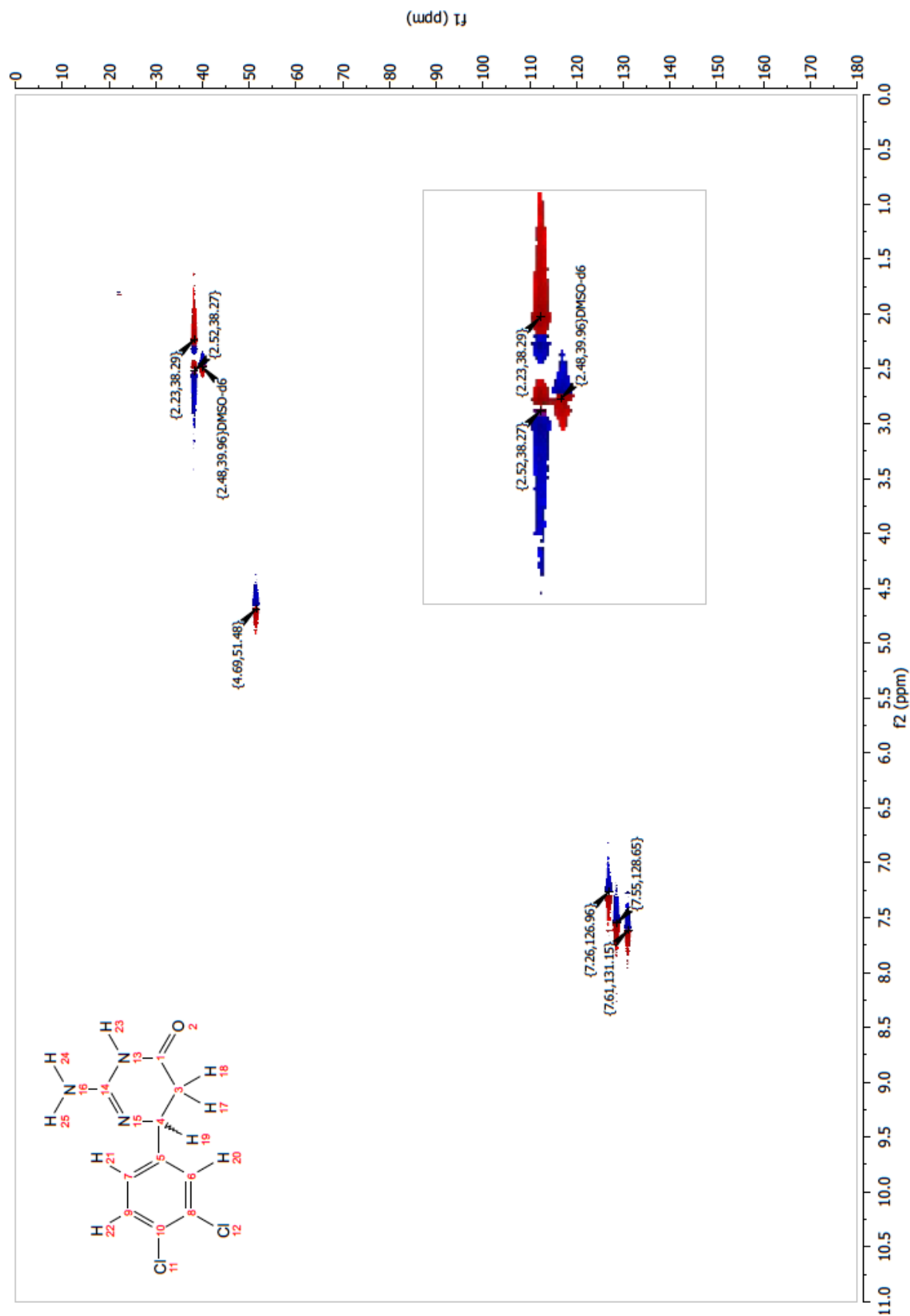


Figura 102. Espectro de RMN HMBC de 2-Amino-6-(3,4-diclorofenil)-5,6-dihidro-3H- pirimidin-4-ona (Estereoquímica indeterminada) (MG12)

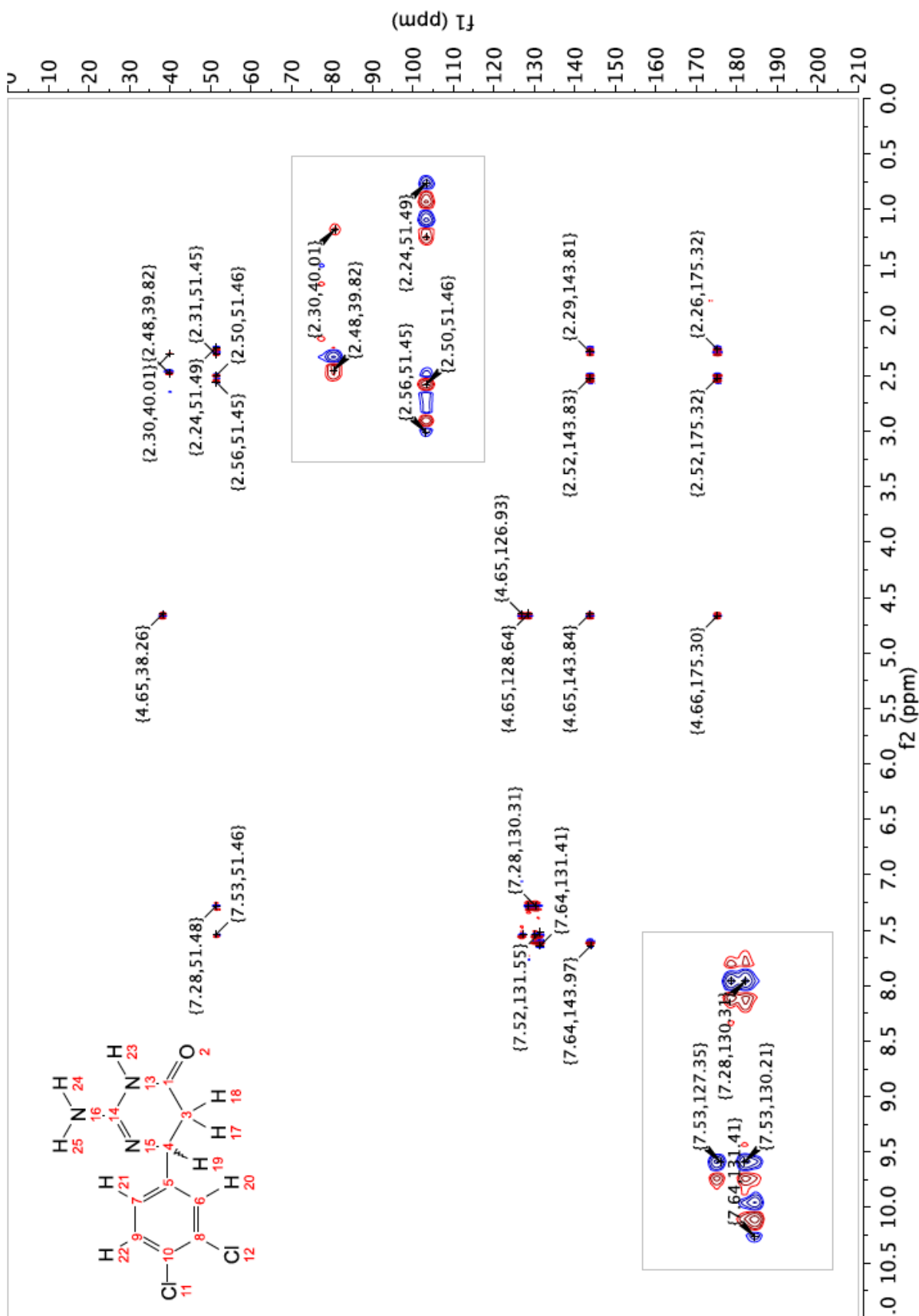


Figura 103. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

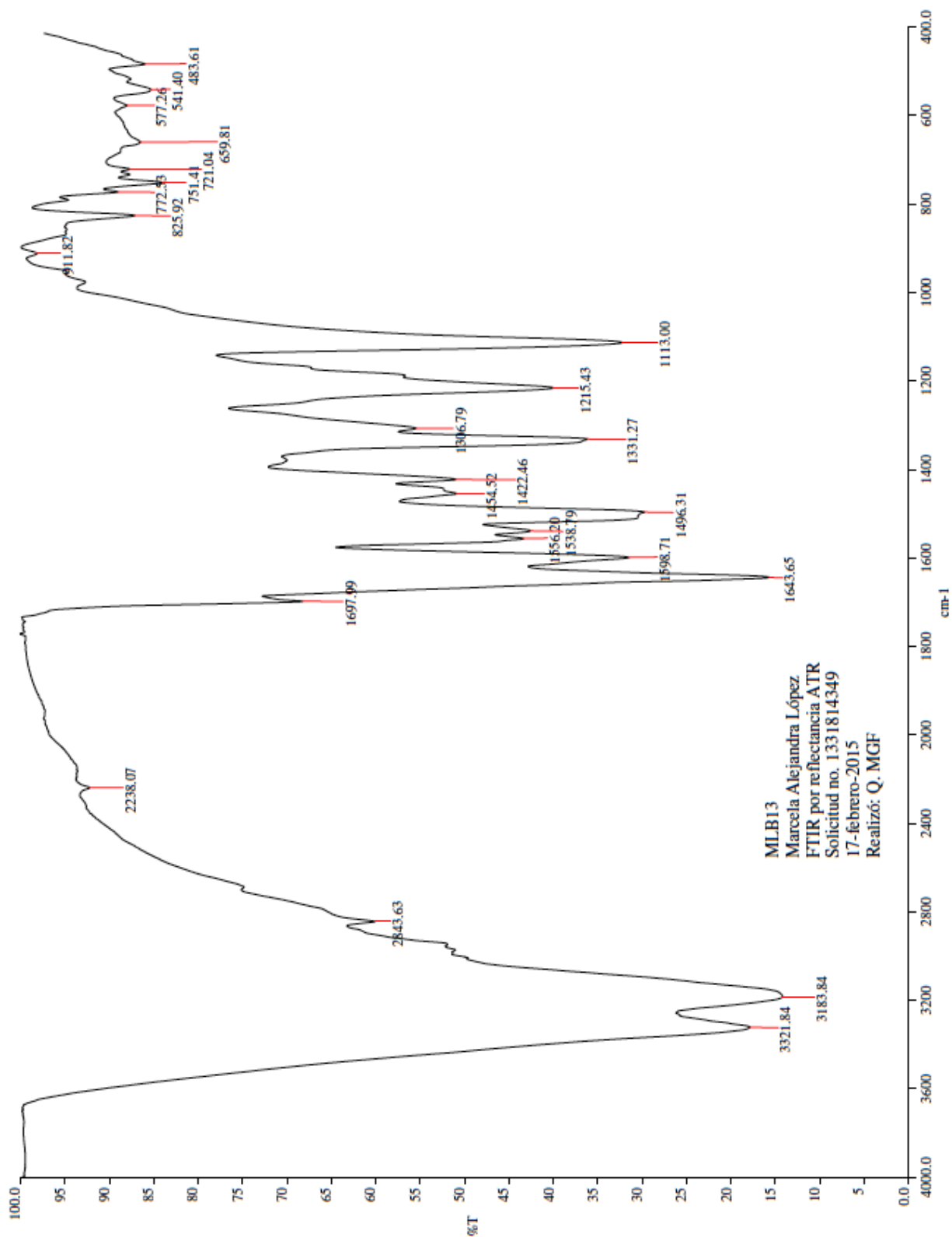


Figura 104. Espectro de masas por DART de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

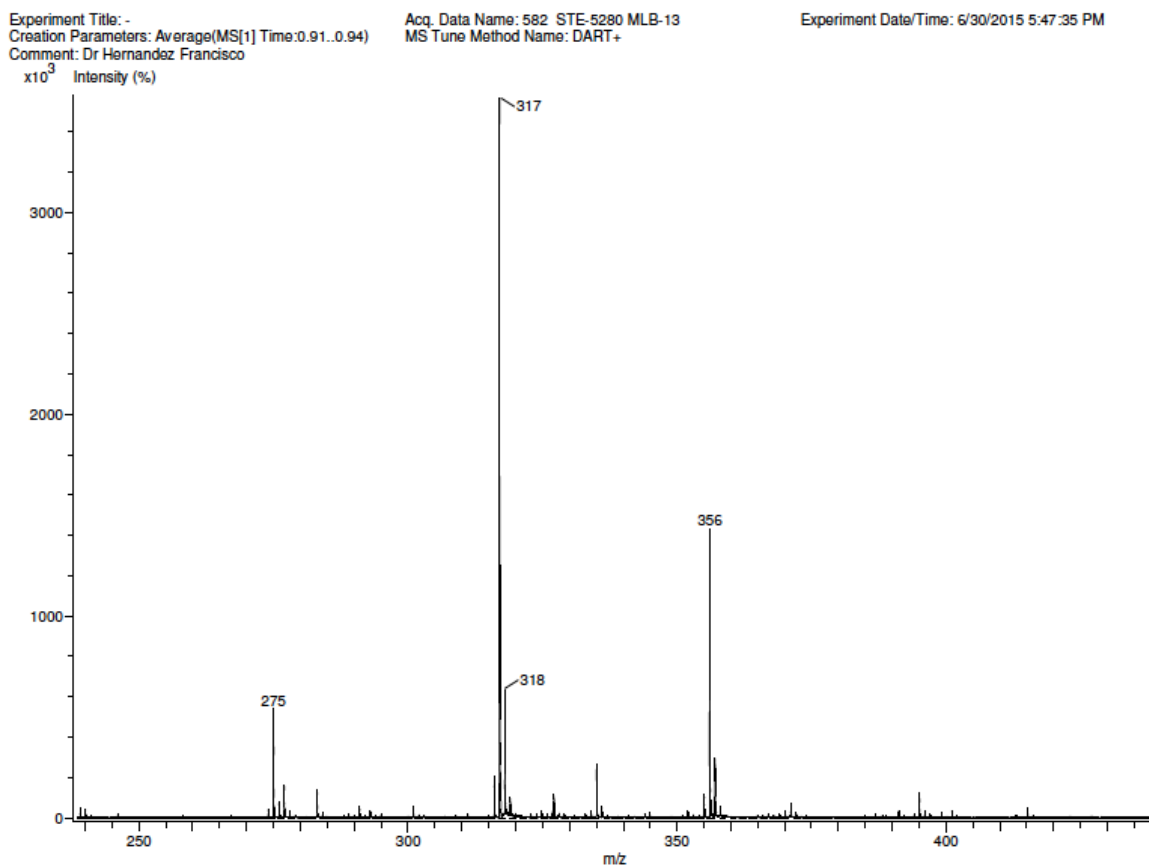


Figura 105. Espectro de masas por ESI de alta resolución de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

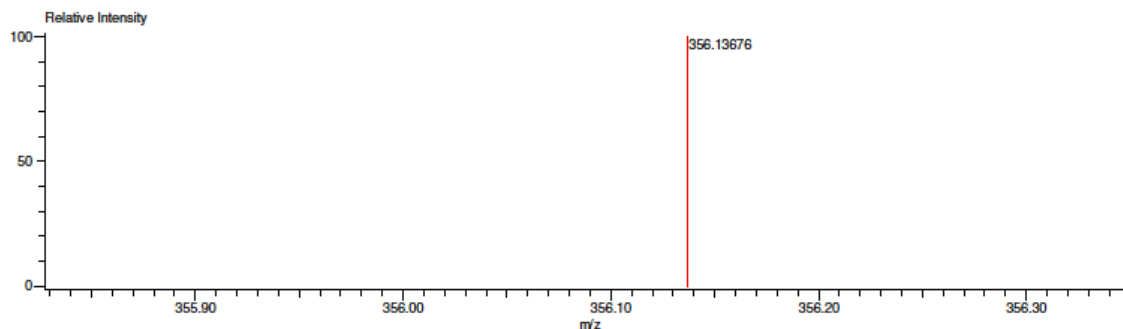
Data: 582 STE-5280 MLB-13
 Sample Name: Dr Hernandez Francisco
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.6...

Acquired: 6/30/2015 5:47:35 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: Cal_Peg_600
 Created: 7/1/2015 7:57:11 AM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 0 .. 100, ¹H: 0 .. 200, ¹⁴N: 2 .. 6, ¹⁶O: 2 .. 5

Tolerance: 3.00(mmu)

Unsaturation Number: 0.0 .. 16.0 (Fraction: .5)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
356.13676	40025.25	356.13588	0.88	¹² C ₁₇ ¹ H ₁₈ ¹⁴ N ₅ ¹⁶ O ₄	11.5

Figura 106. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

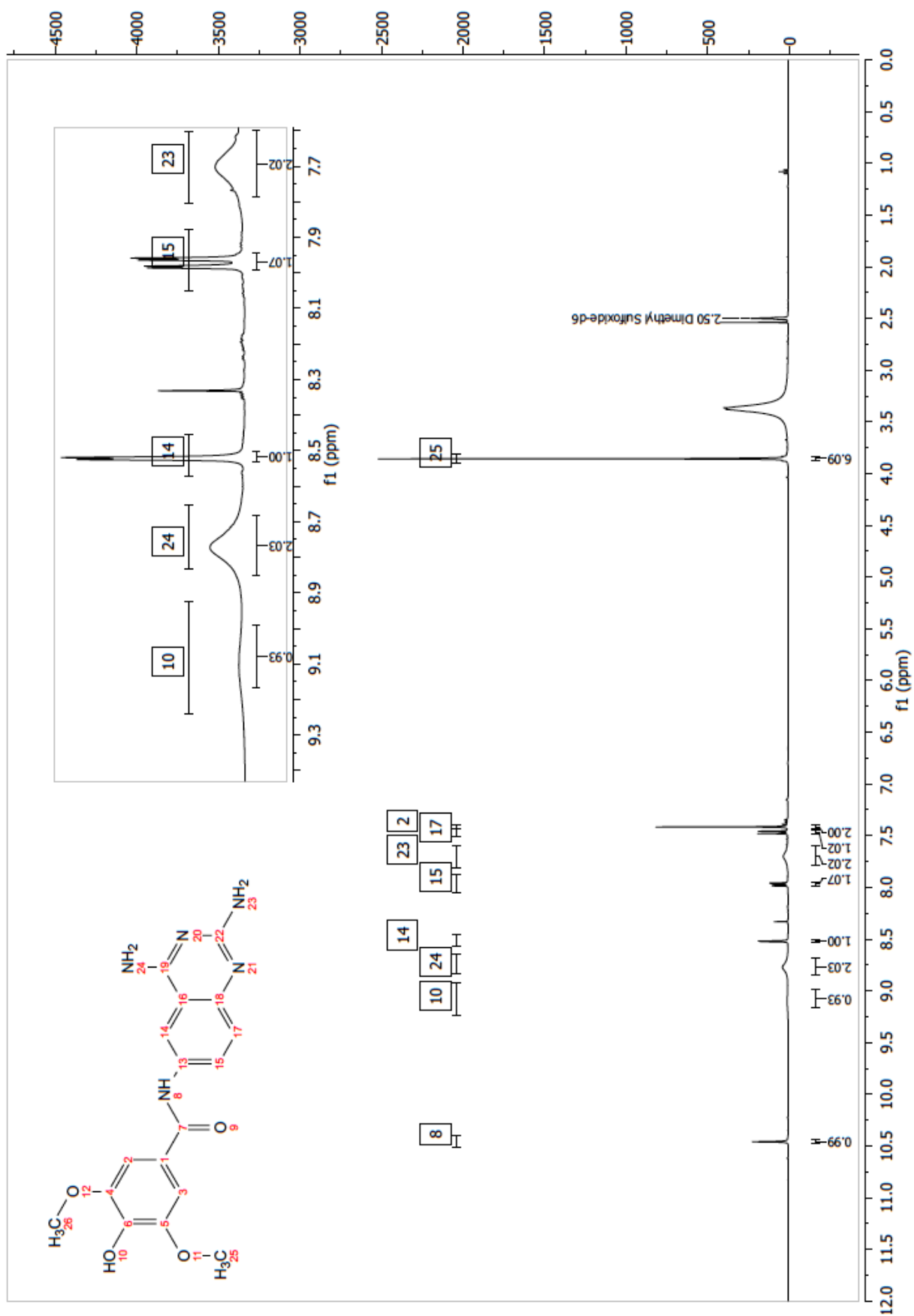


Figura 107. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

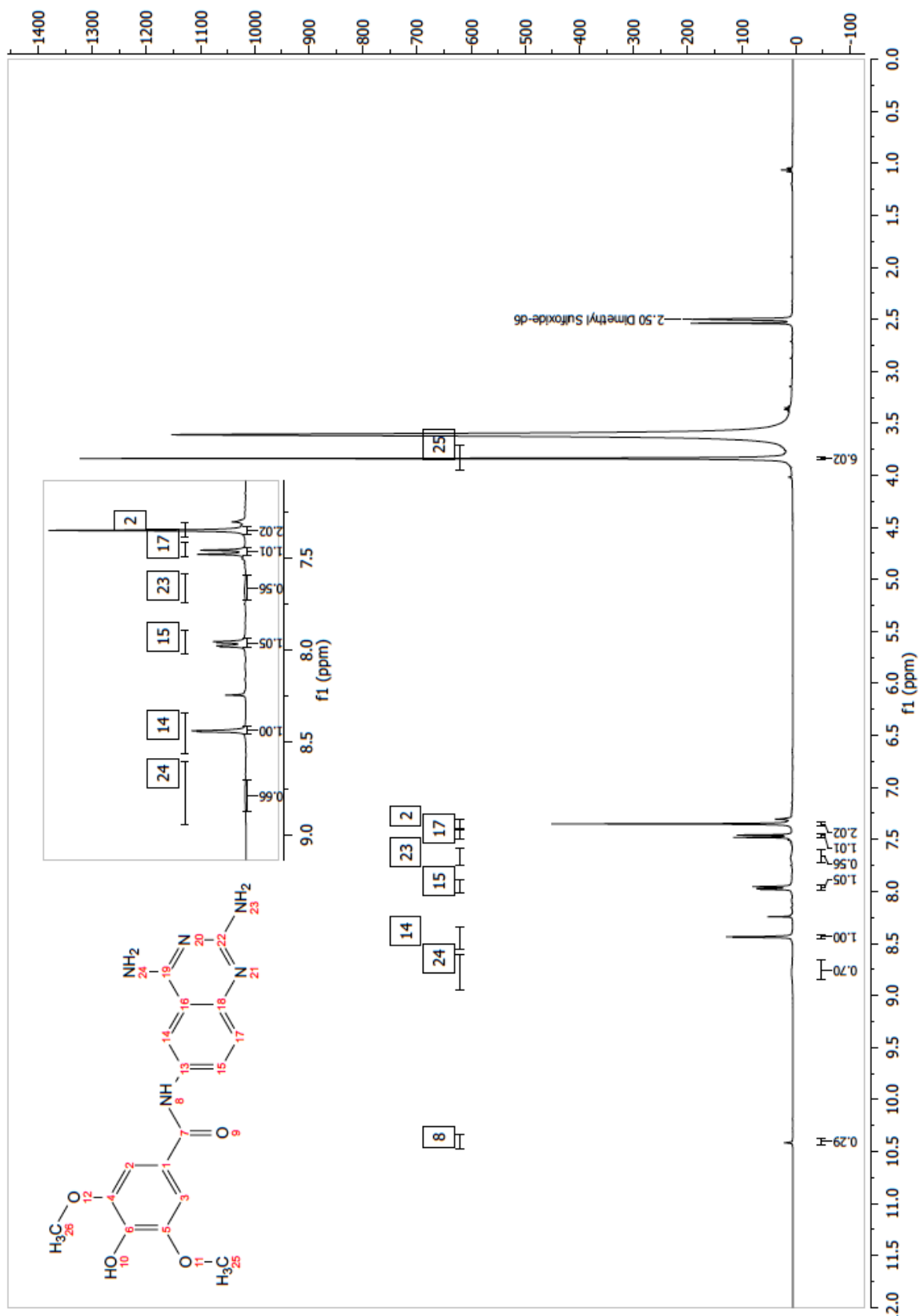


Figura 108. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

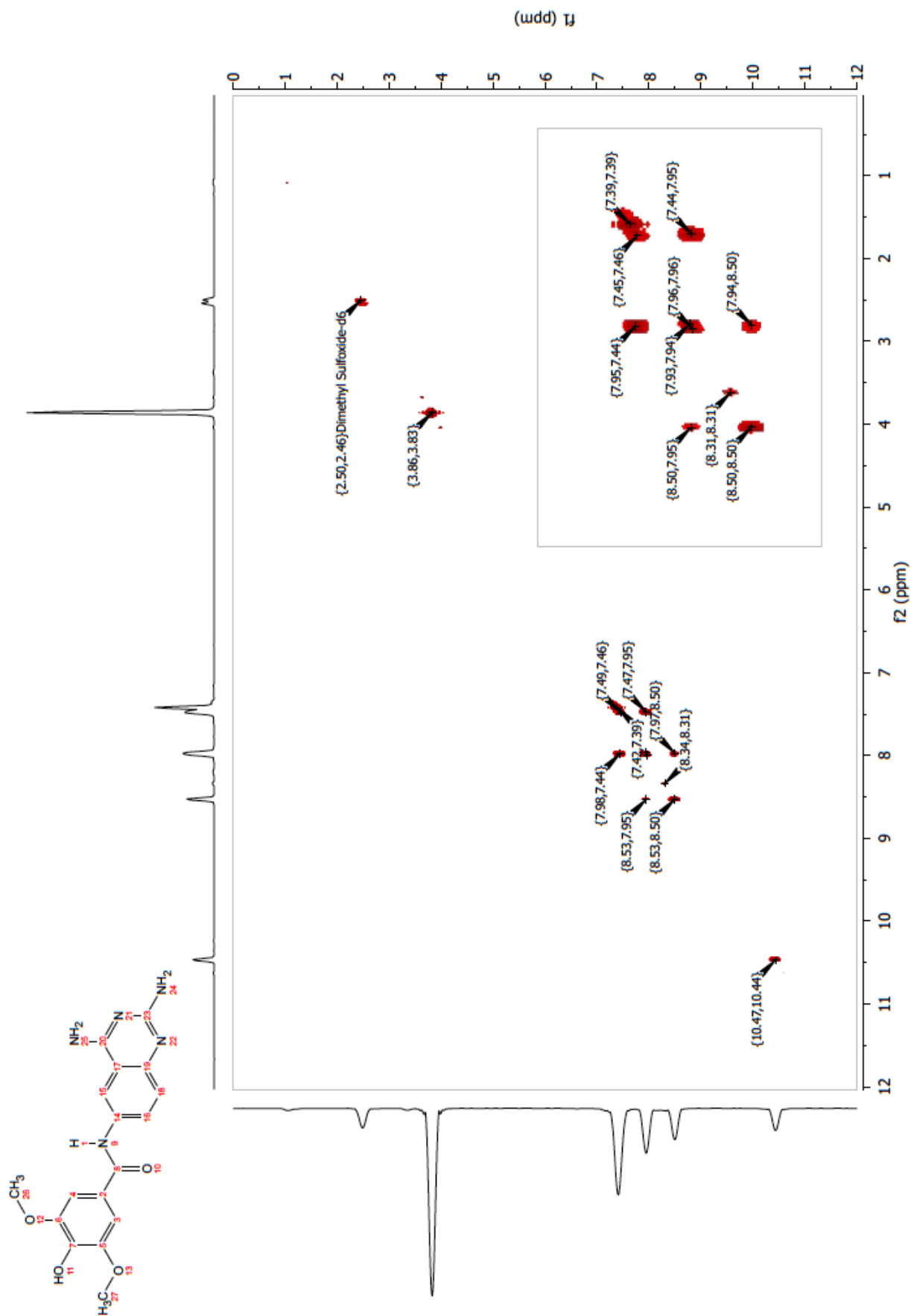


Figura 109. Espectro de RMN ¹³C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

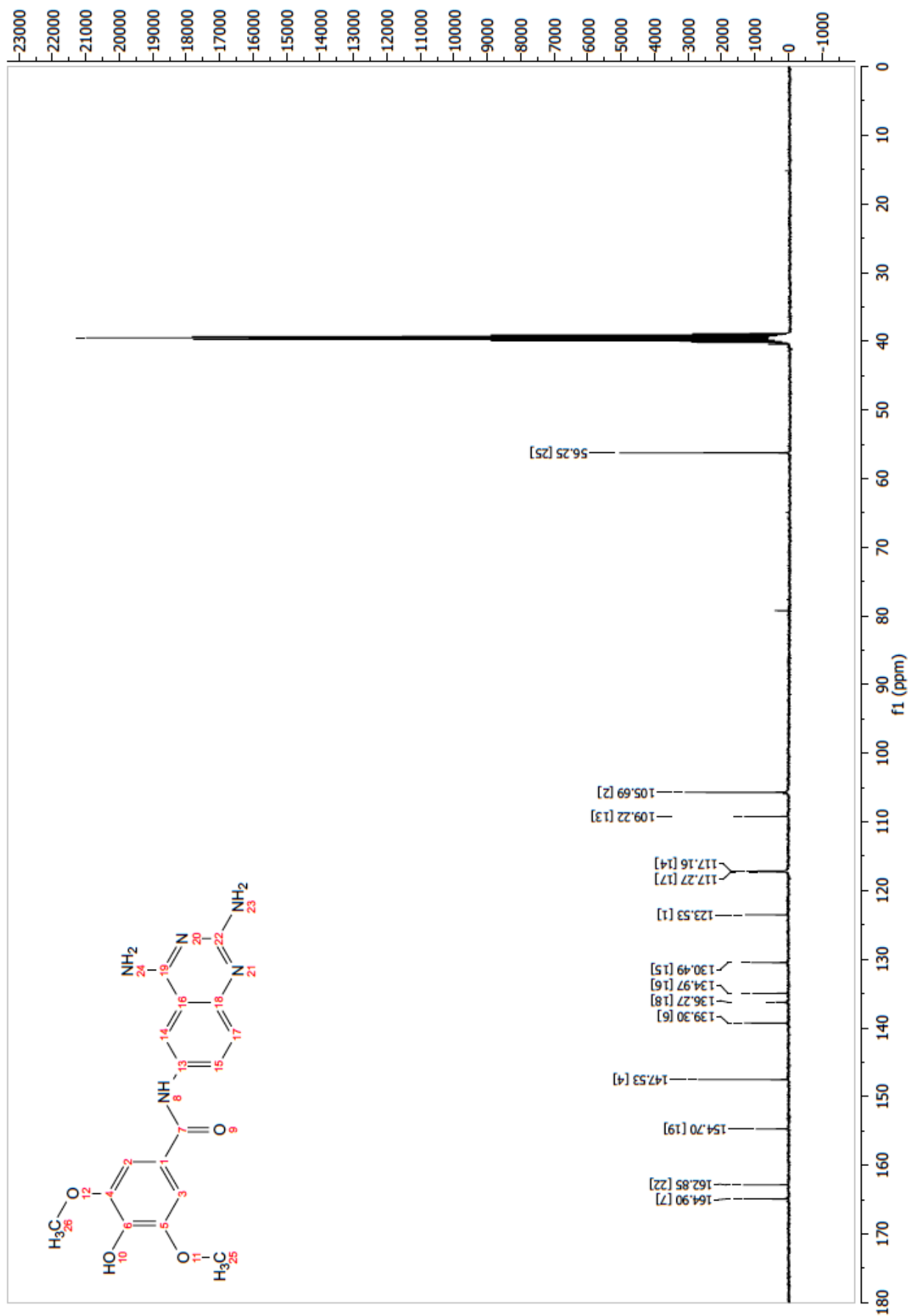


Figura 110. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

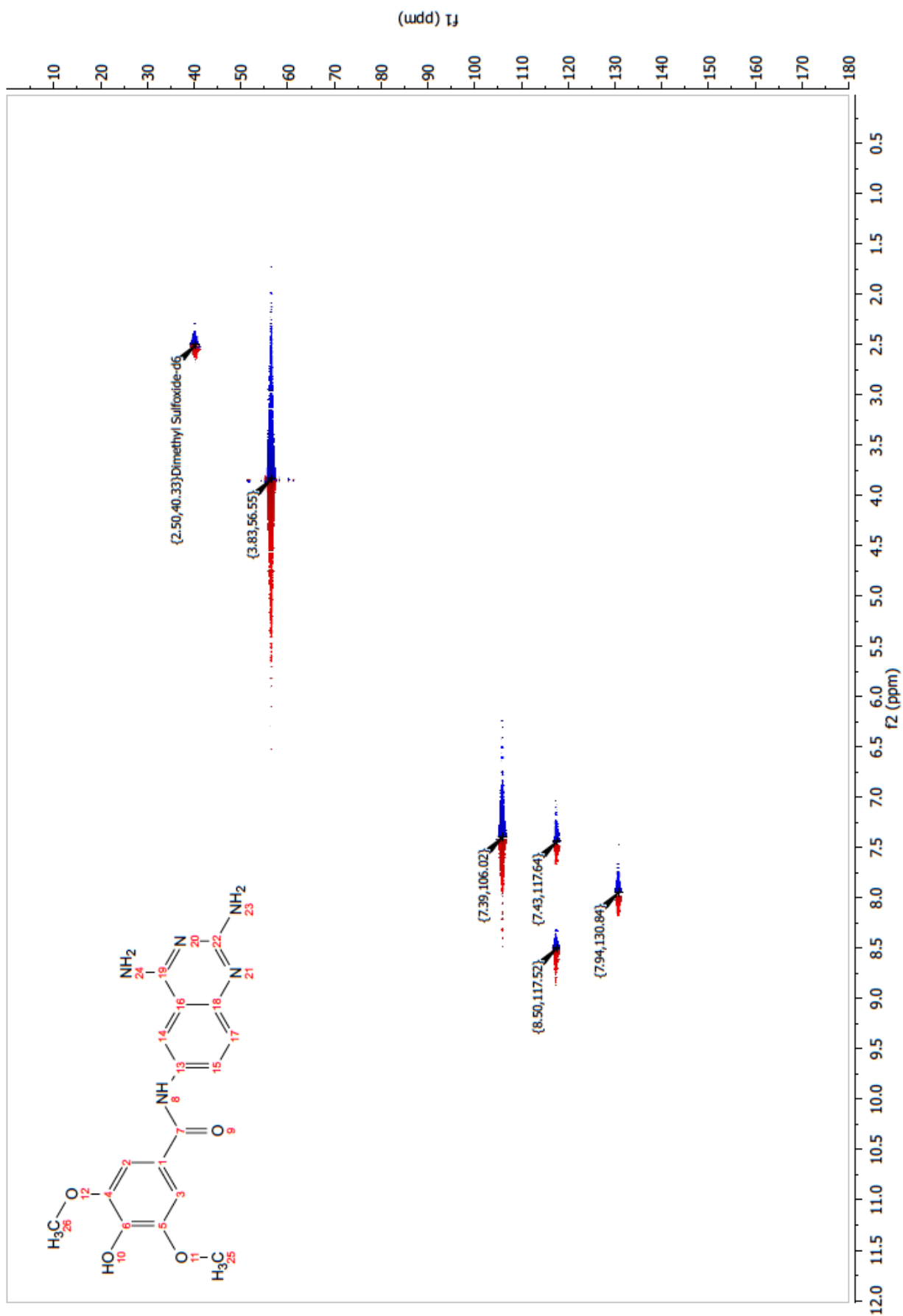


Figura 111. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

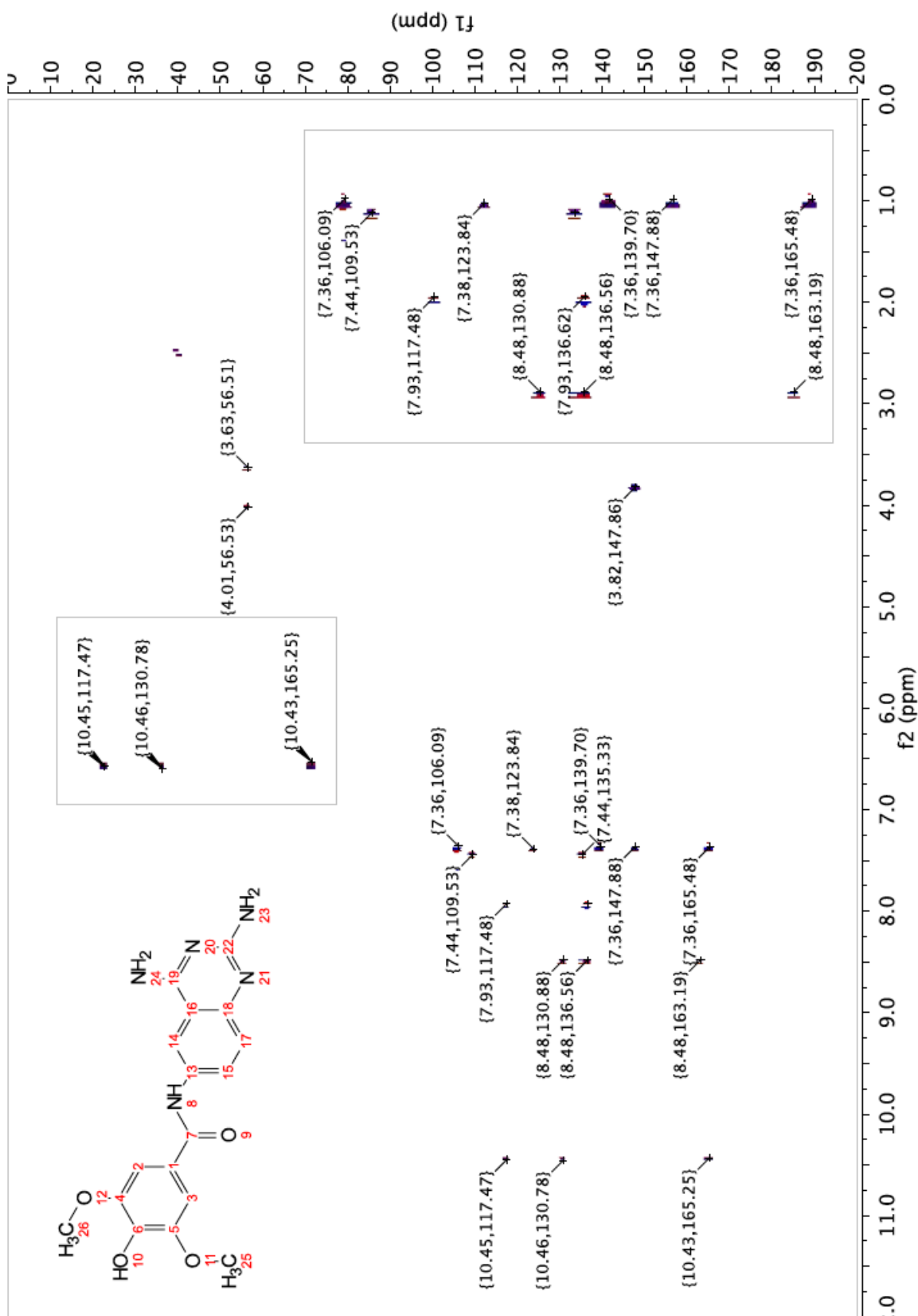


Figura 112. Espectro de RMN NOESY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (B13)

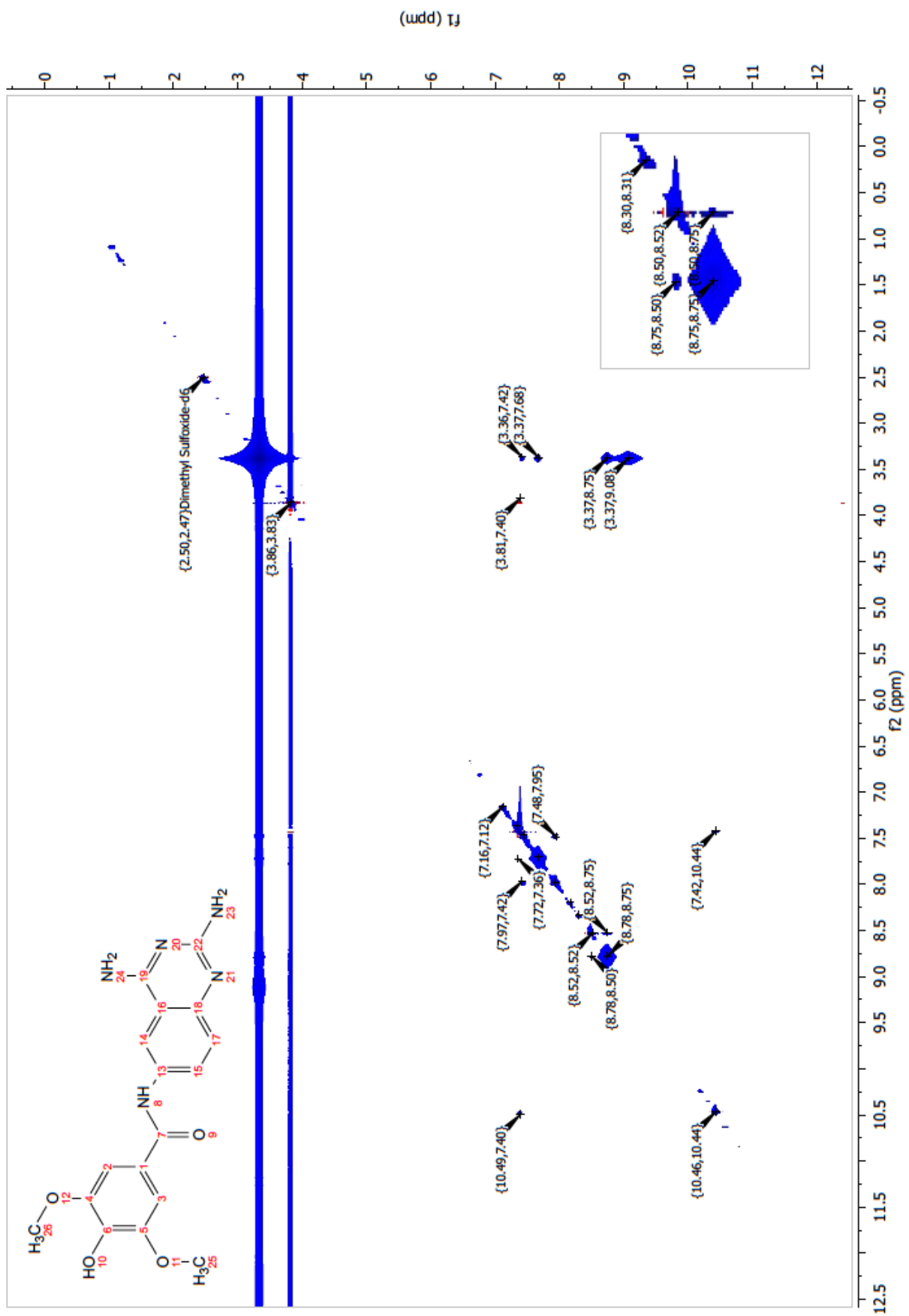


Figura 113. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

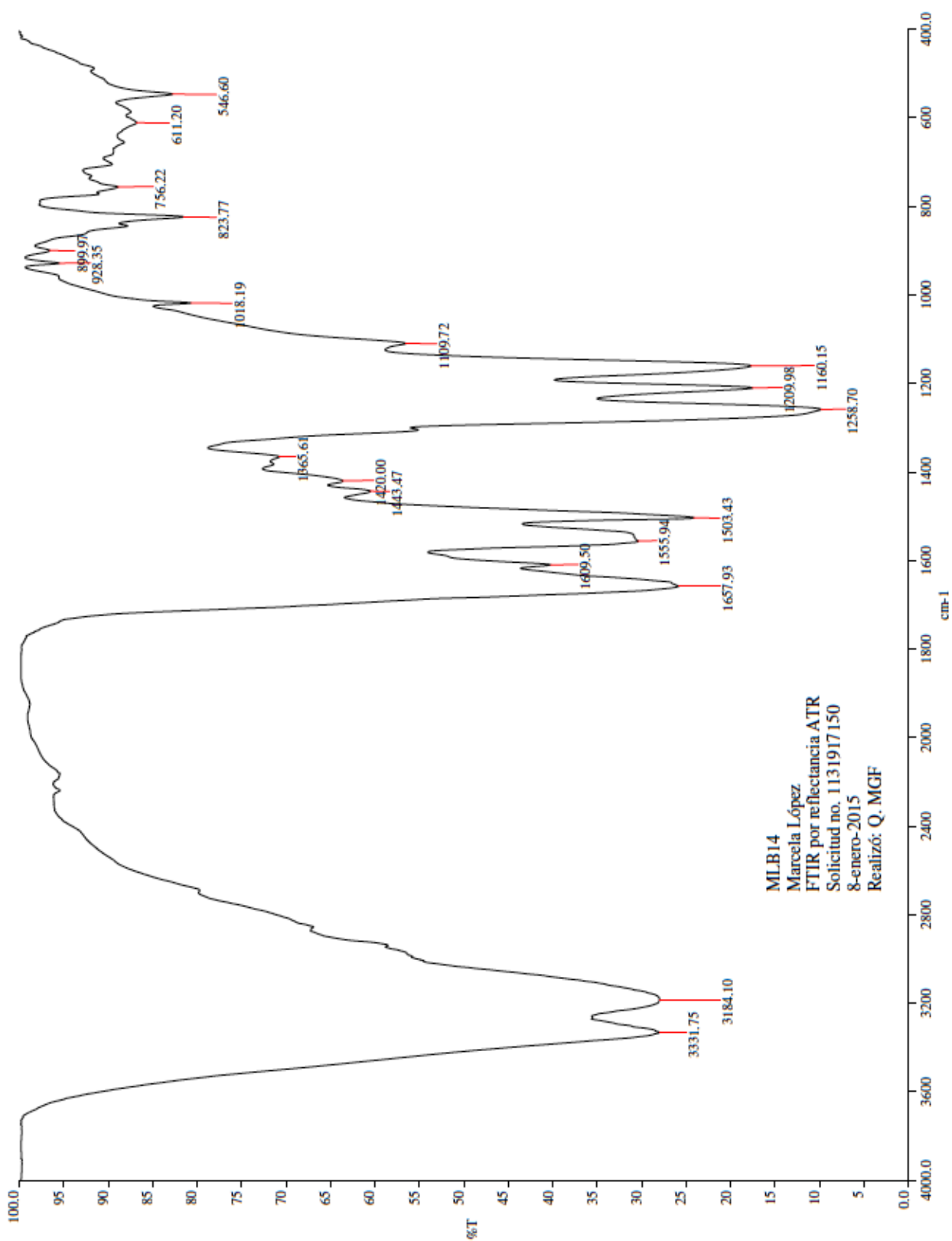


Figura 114. Espectro de masas por DART de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

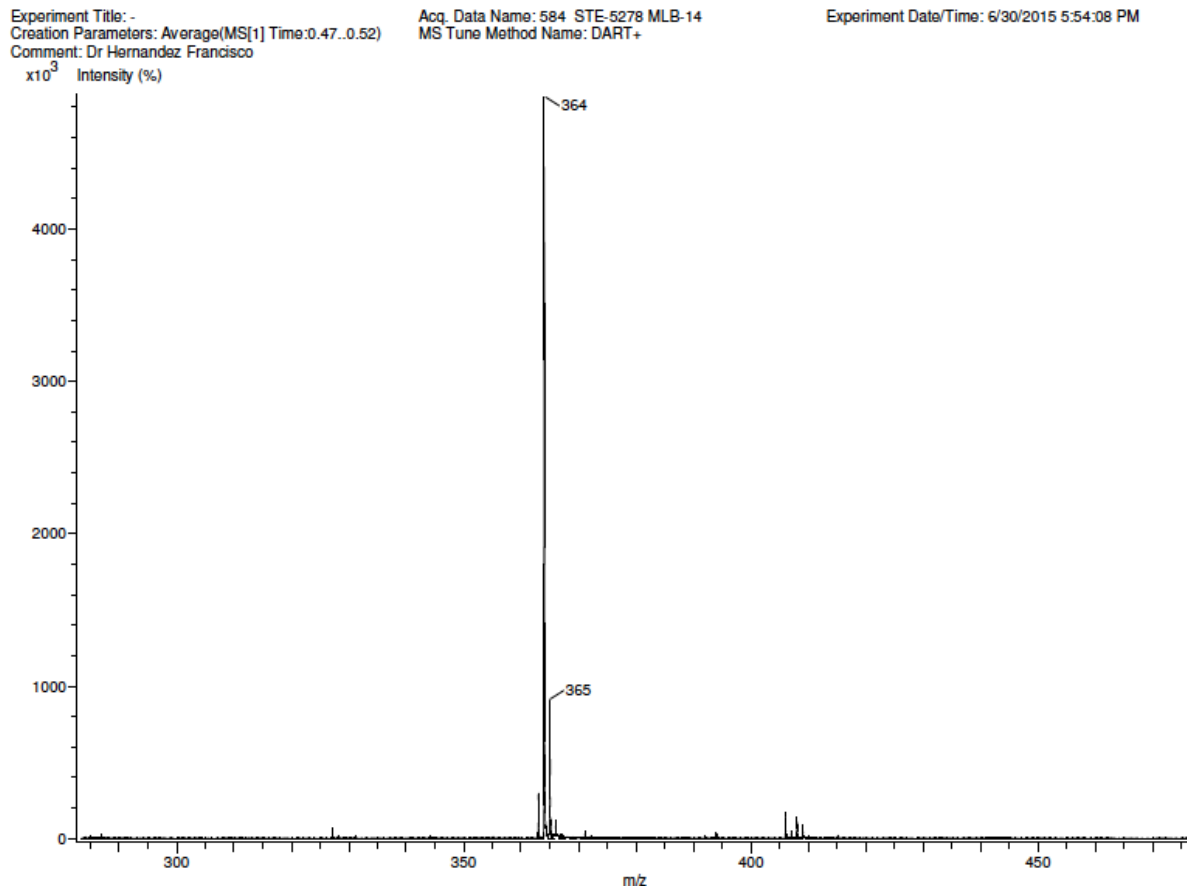
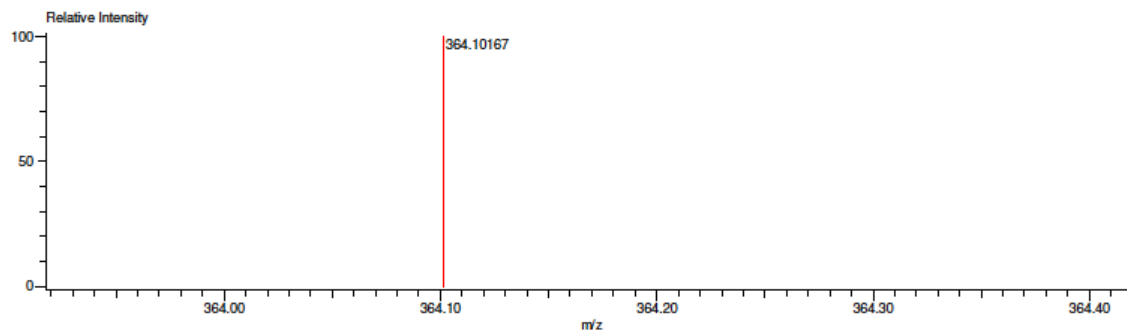


Figura 115. Espectro de masas por ESI de alta resolución de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

Data:584 STE-5278 MLB-14 Acquired:6/30/2015 5:54:08 PM
 Sample Name:Dr Hernandez Francisco Operator:AccuTOF
 Description: Mass Calibration data:Cal_Peg_600
 Ionization Mode:ESI+ Created:7/1/2015 8:31:44 AM
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.4...

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 15.0 (Fraction:.5)
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ¹⁹F:0 .. 3, ¹⁴N:0 .. 6, ¹⁶O:0 .. 3



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
364.10167	138628.95	364.10213	-0.46	¹² C ₁₆ ¹ H ₁₃ ¹⁹ F ₃ ¹⁴ N ₅ ¹⁶ O ₂	11.5

Figura 116. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

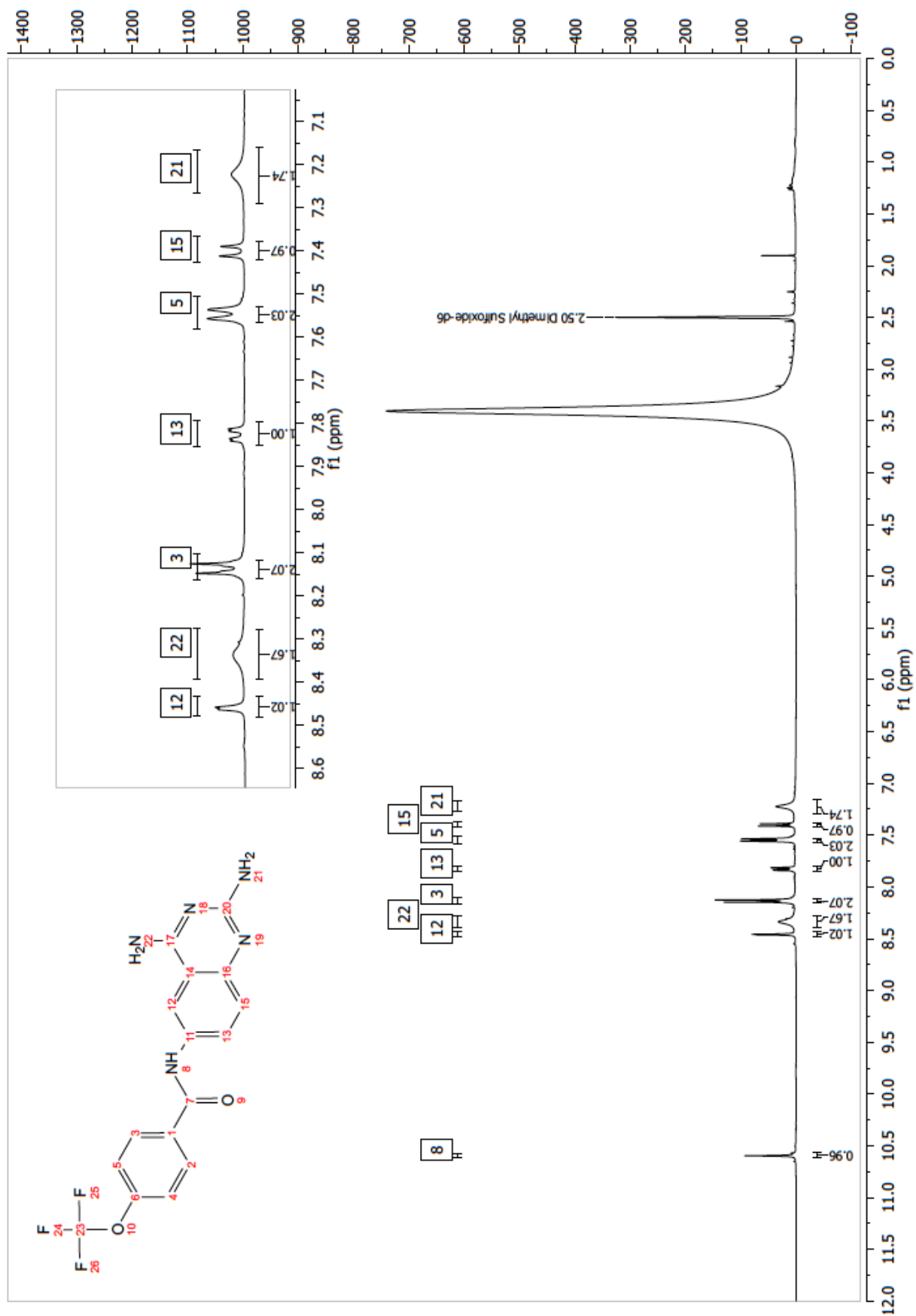


Figura 117. Espectro de experimento de intercambio de D₂O en RMN ¹H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

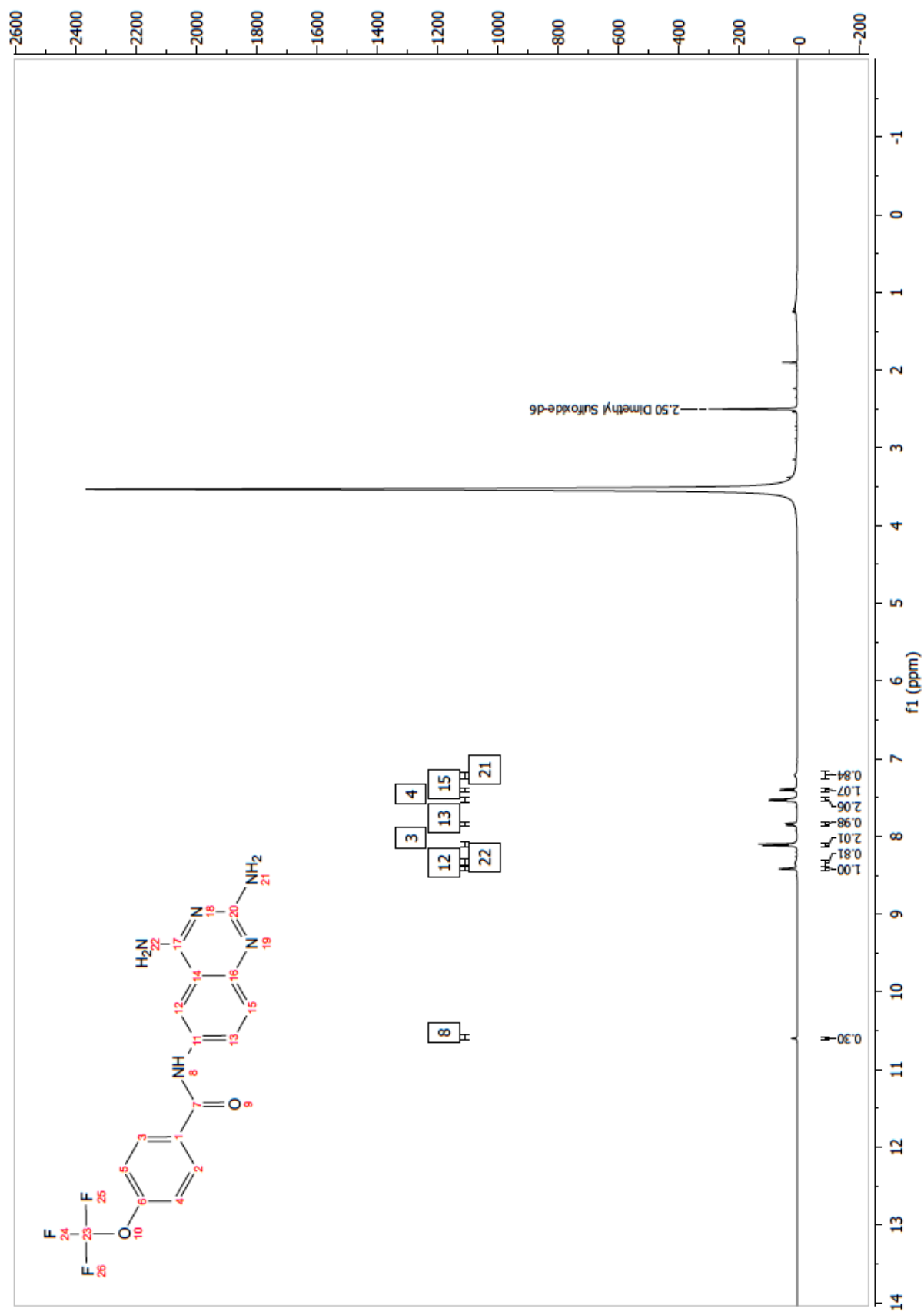


Figura 118. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

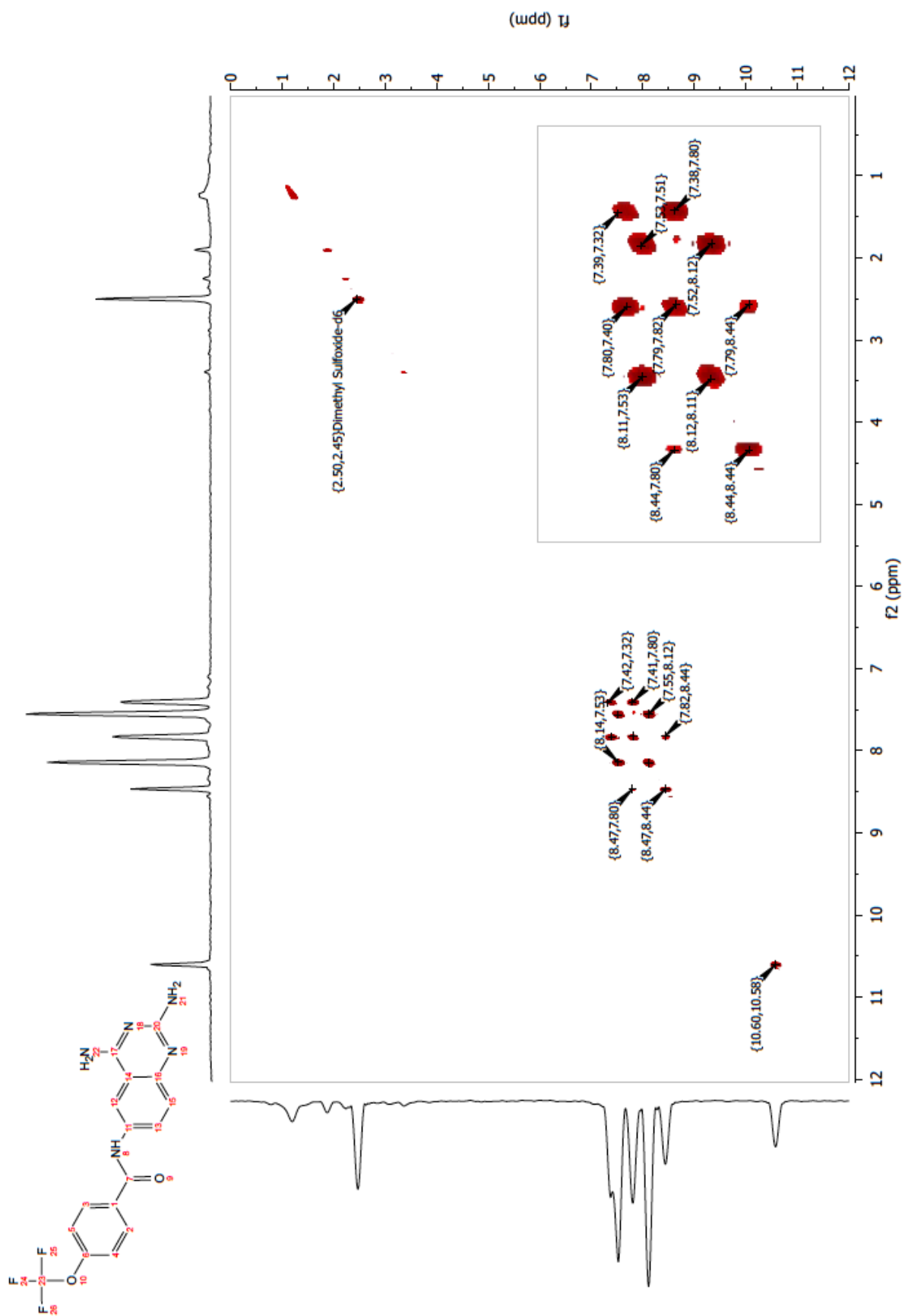


Figura 119. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

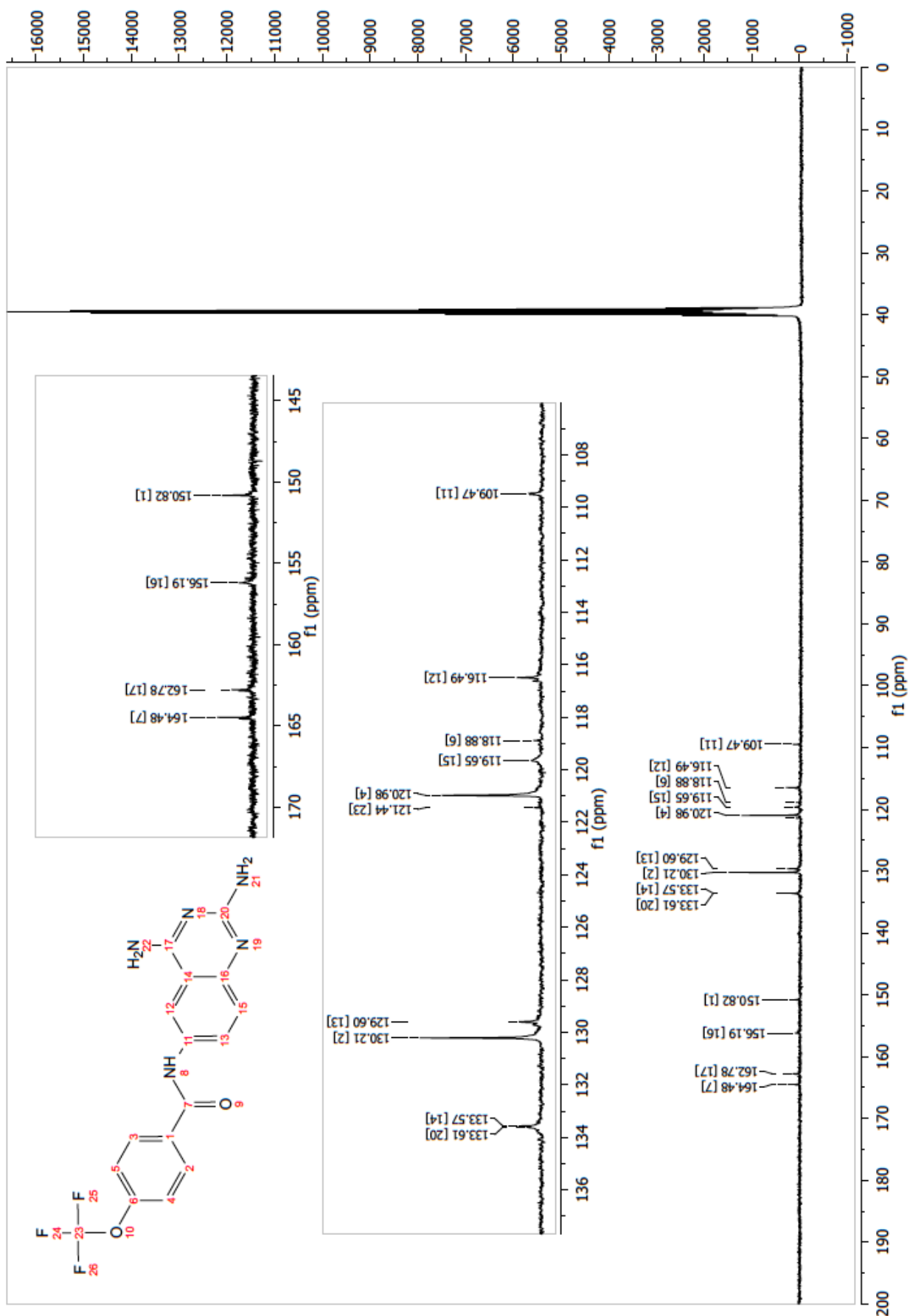


Figura 120. Espectro de RMN HSQC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

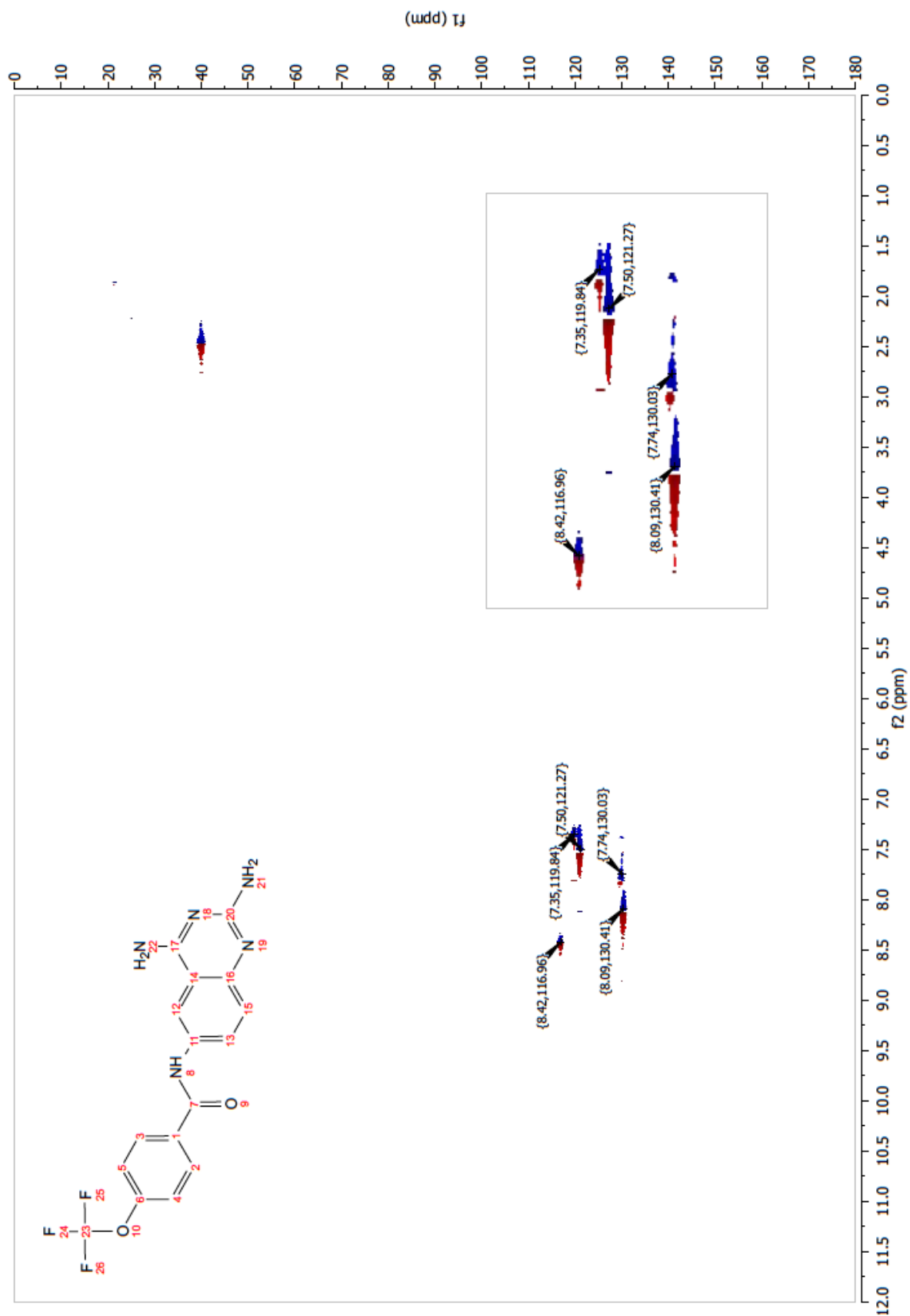


Figura 121. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-trifluorometoxibenzamida (B14)

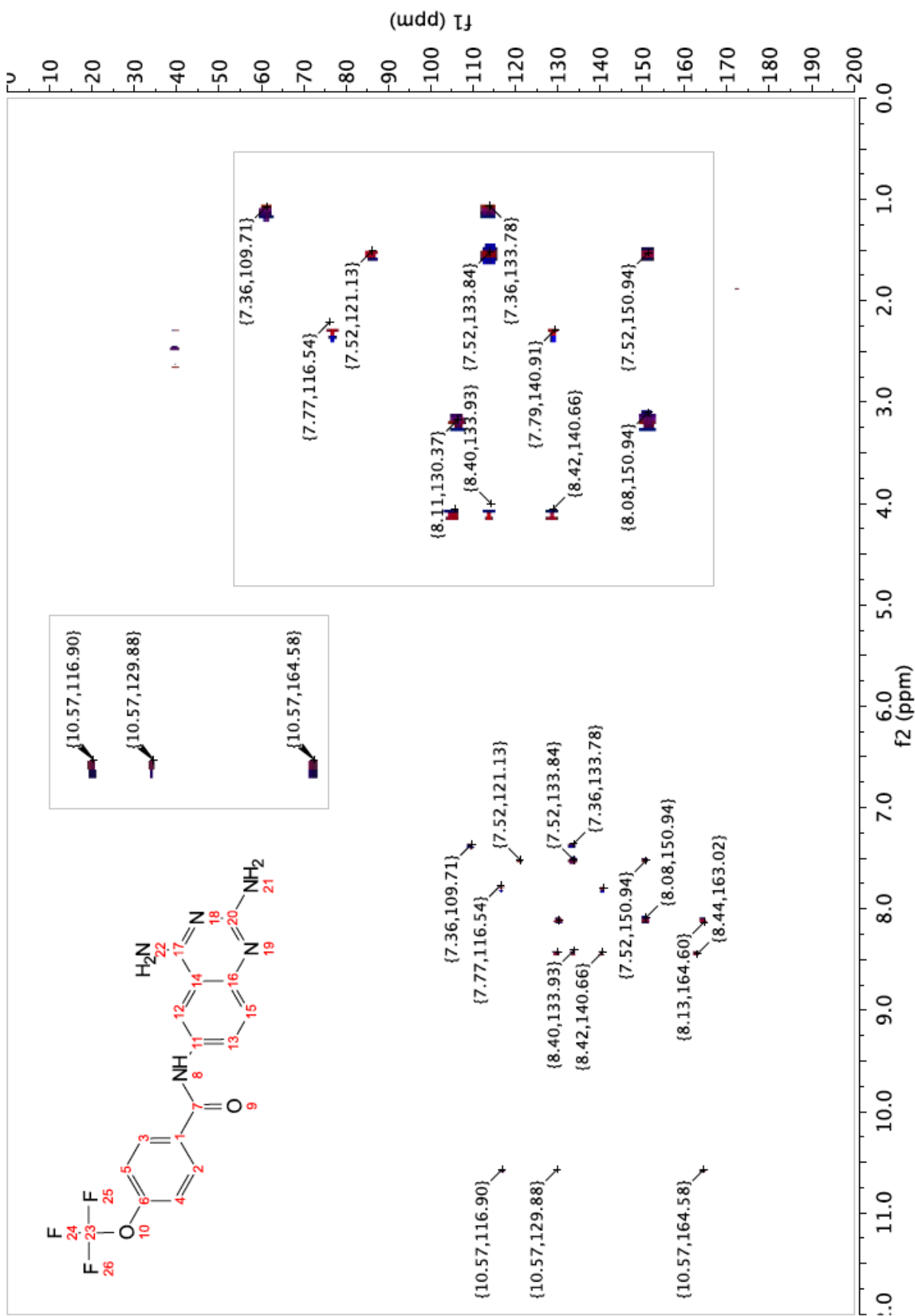


Figura 122. Espectro de FT-IR de *N*-(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C1)

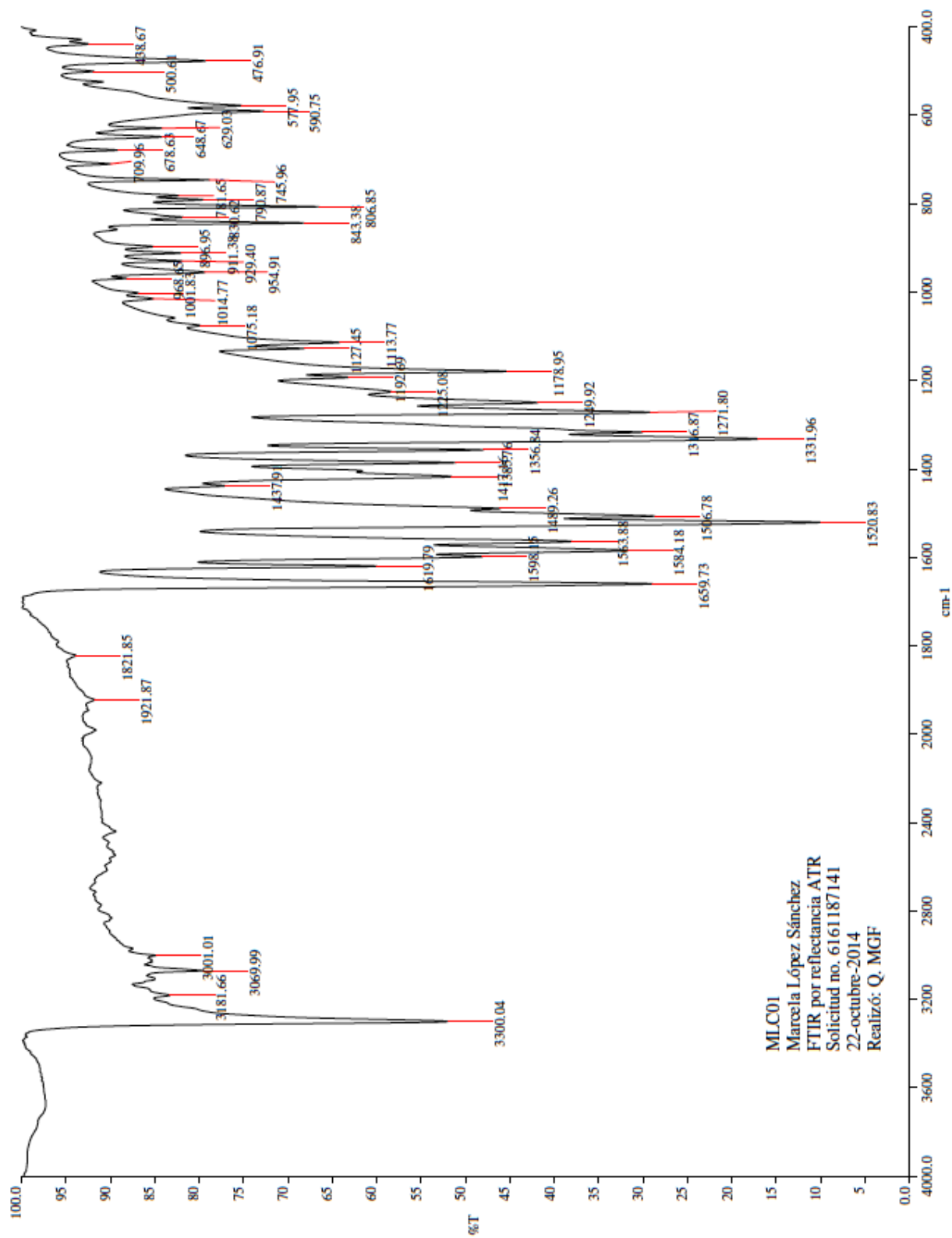


Figura 123. Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C1)

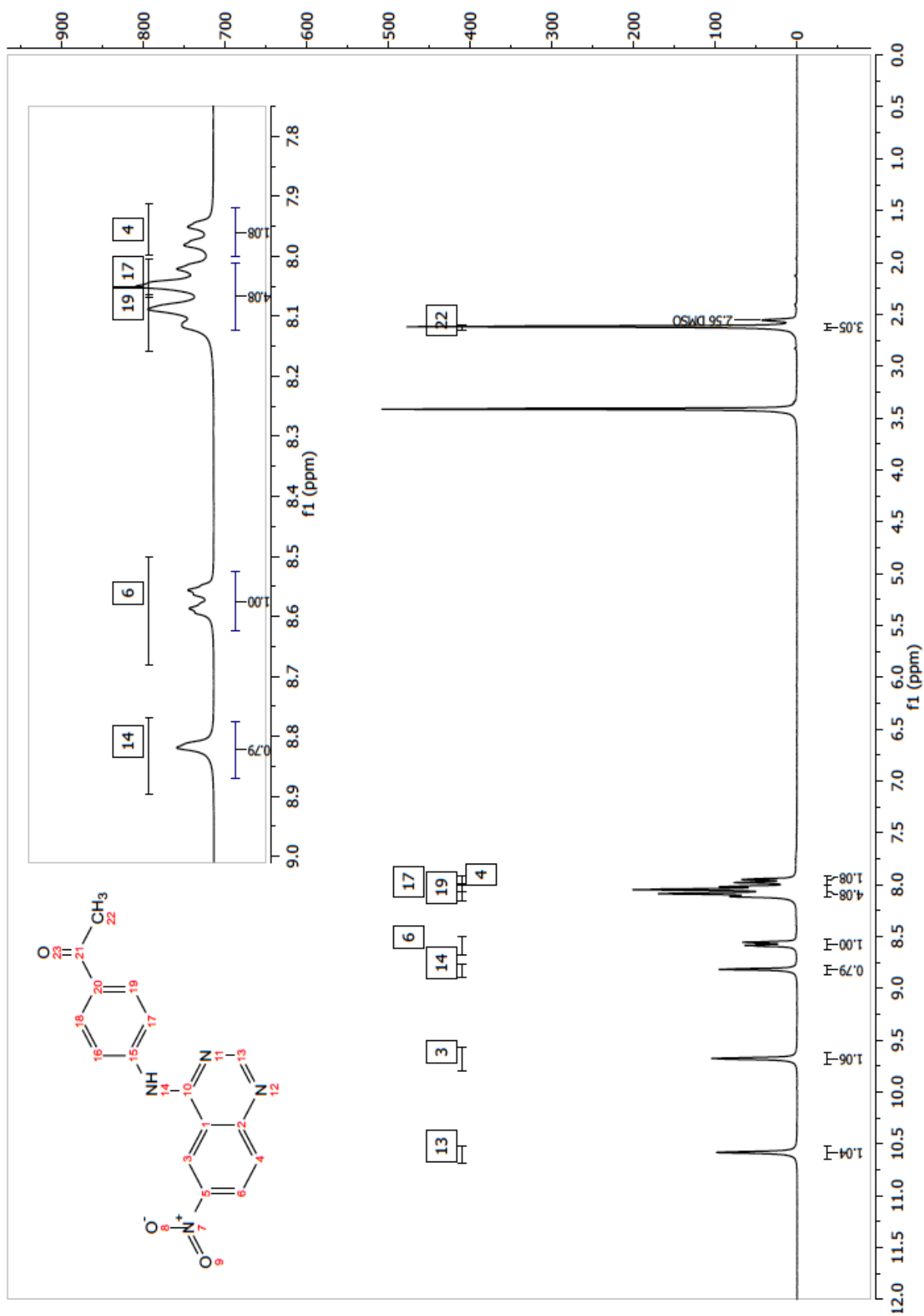


Figura 124. Espectro de FT-IR de Ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico (C2)

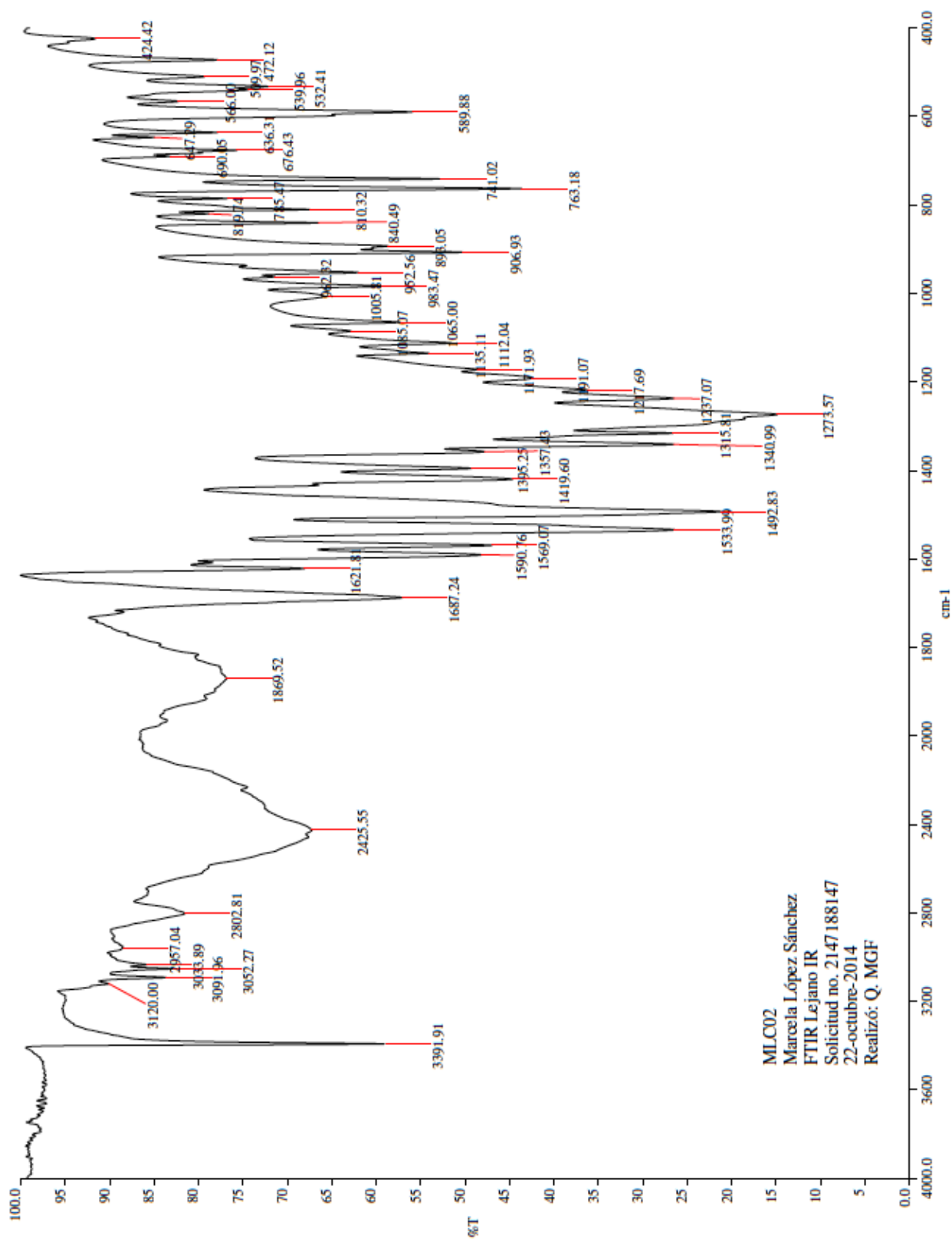


Figura 125. Espectro de RMN ^1H de Ácido 3-[(6-nitroquinazolin-4-il)amino] benzoico (C2)

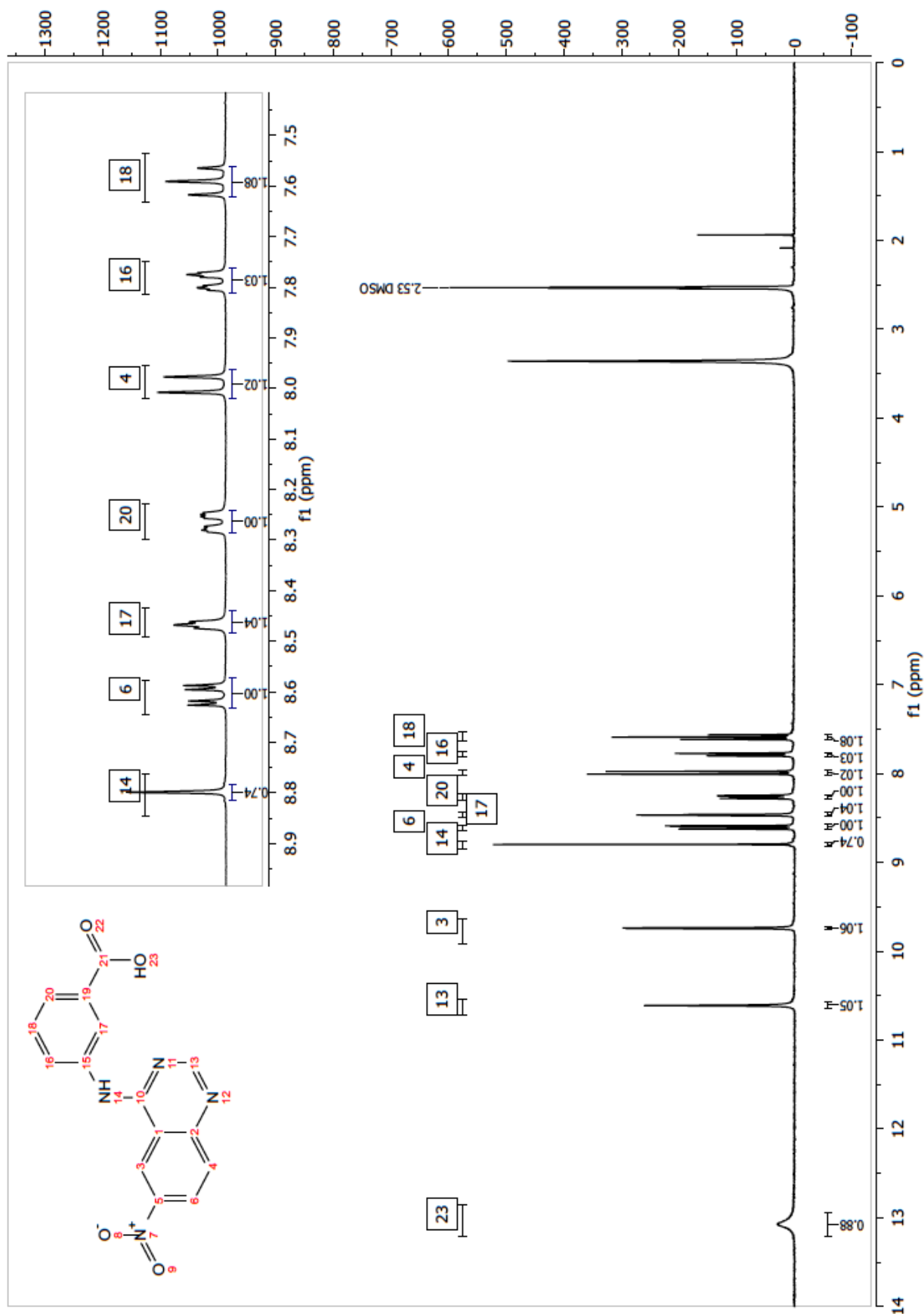


Figura 126. Espectro de RMN ^1H de *N*-(3-acetofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (C3)

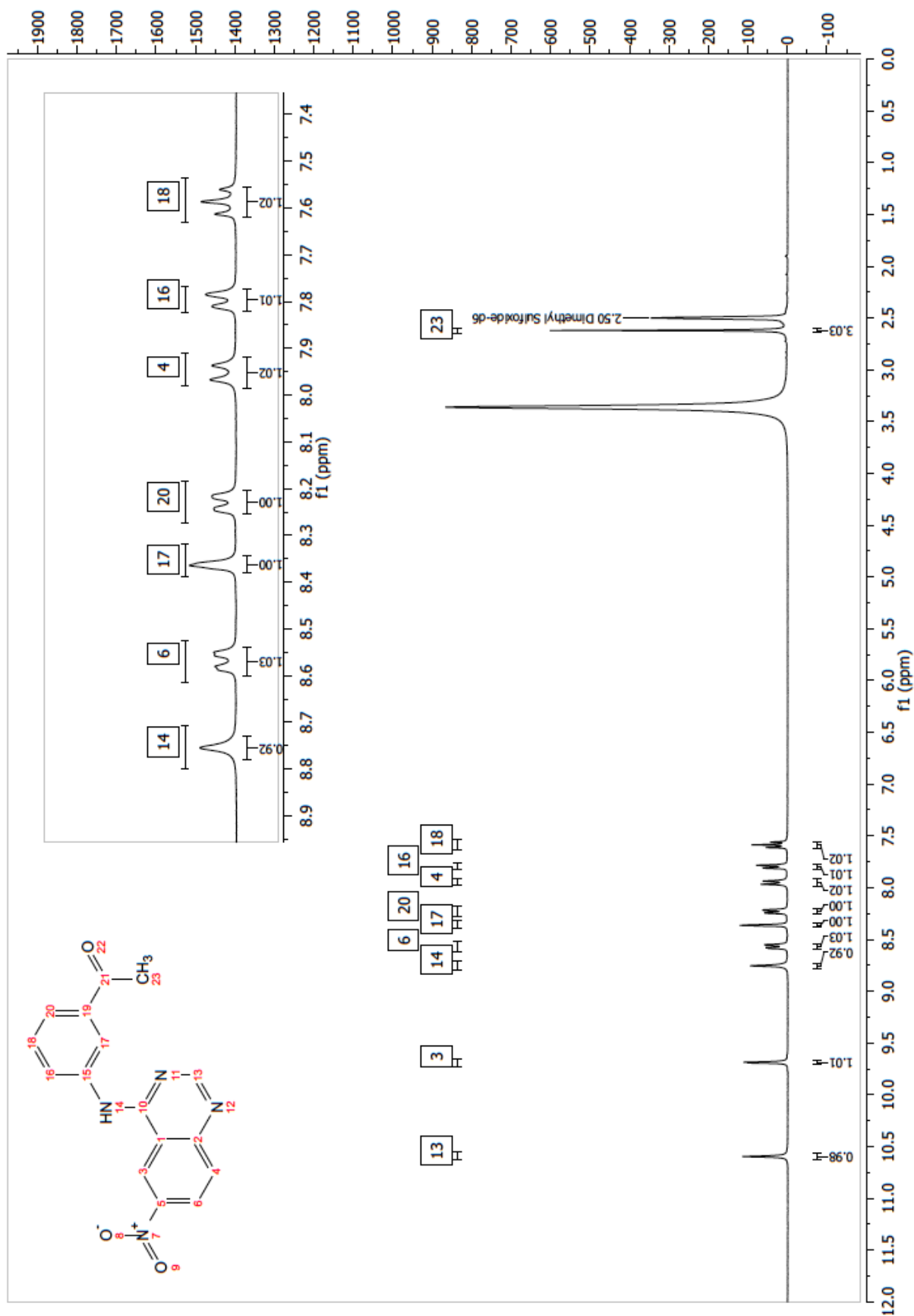


Figura 128. Espectro de masas por DART de *N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)

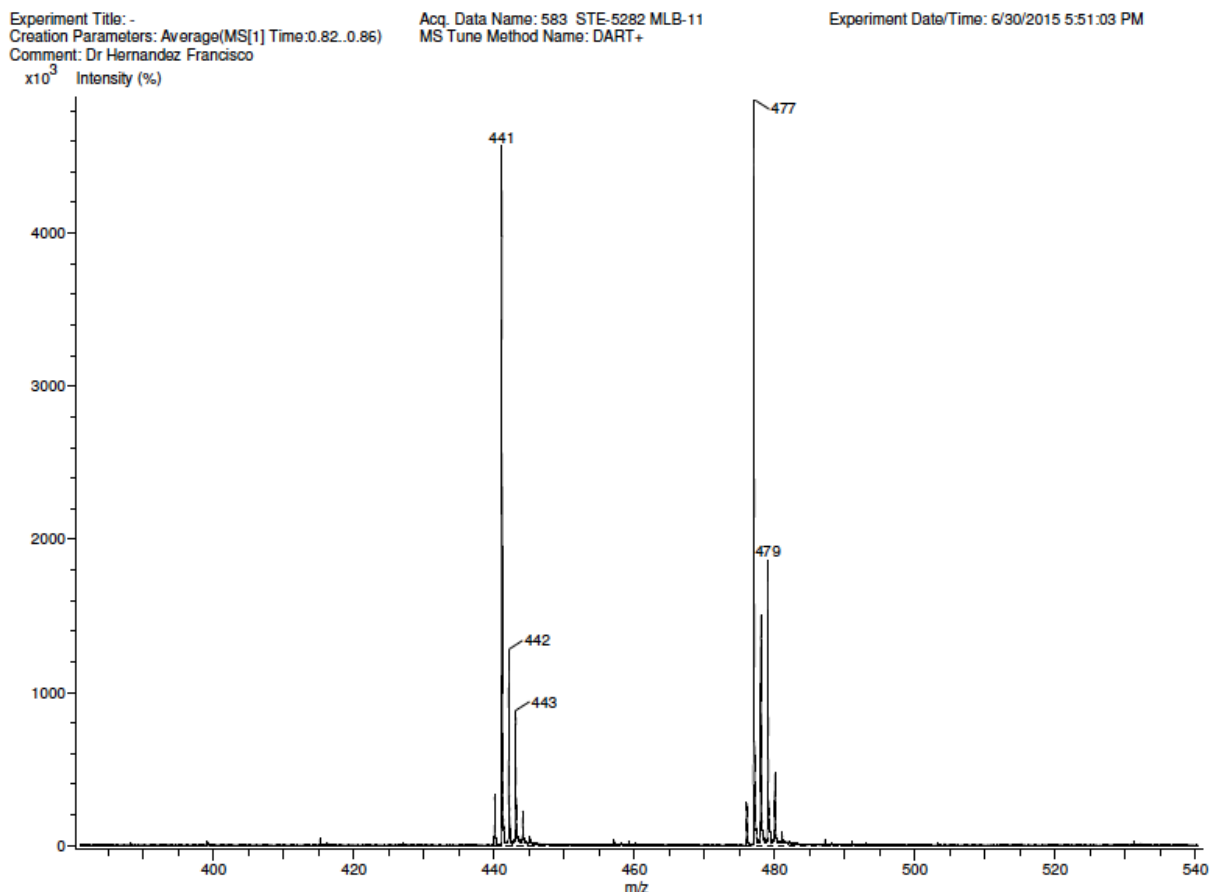


Figura 129. Espectro de masas por ESI de clorhidrato de *N*-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)

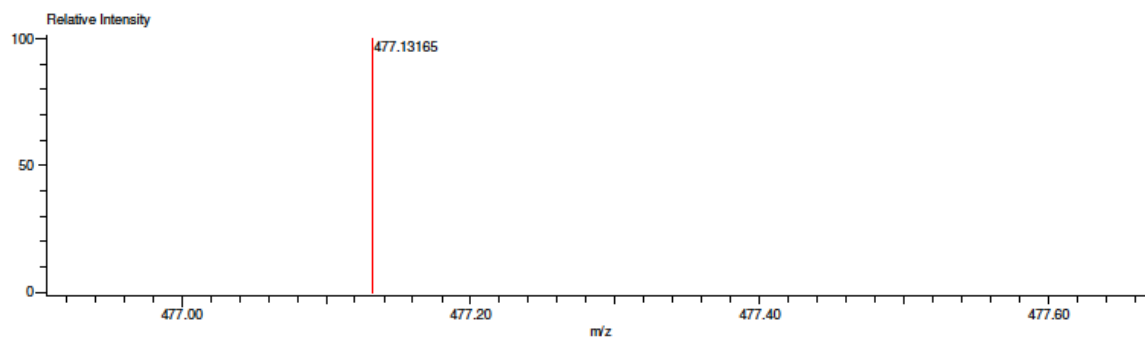
Data:583 STE-5282 MLB-11
 Sample Name:Dr Hernandez Francisco
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[5.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1.2...

Acquired:6/30/2015 5:51:03 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal_Peg_600
 Created:7/1/2015 8:26:42 AM
 Created by:AccuTOF

Charge number:1
 Element:¹²C:0 .. 100, ¹H:0 .. 200, ³⁵Cl:0 .. 1, ¹⁴N:0 .. 6, ¹⁶O:0 .. 5

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 18.0 (Fraction:.5)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
477.13165	385787.38	477.13296	-1.31	¹² C ₂₅ ¹⁴ H ₂₂ ³⁵ Cl ₁ ¹⁴ N ₄ ¹⁶ O ₄	16.5

Figura 130. Espectro de RMN ¹H de N-[4-(4-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E11)

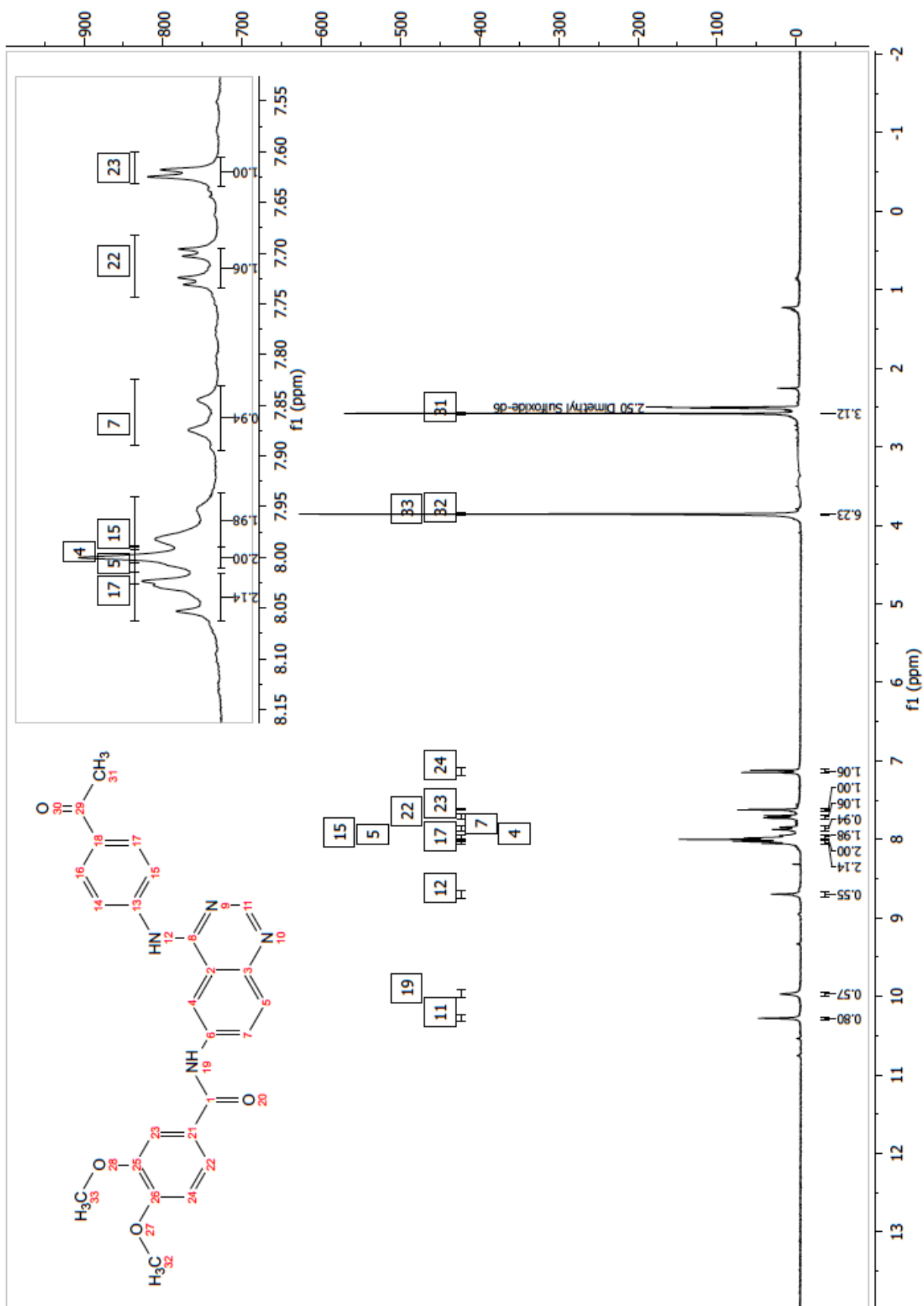
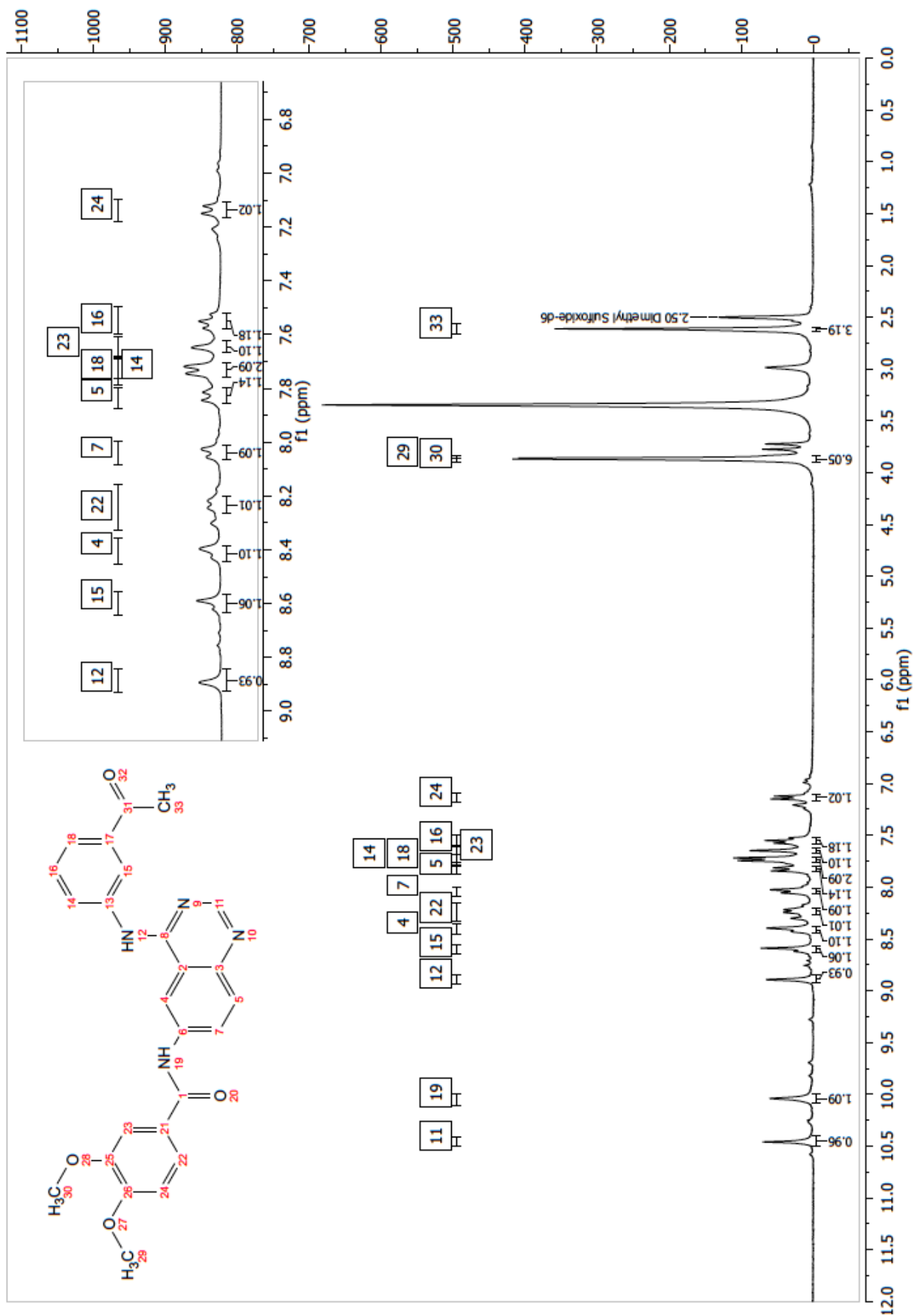


Figura 131. Espectro de RMN ^1H de *N*-[4-(3-acetilnilino)quinazolin-6-il]-3,4-dimetoxibenzamida (E31)



Información general de la evaluación de actividad antioxidante atrapadora de O_2^- mediante el Sistema Xantina Oxidasa bovina (XOb) - Nitroazul de Tetrazolio (NBT), y actividad inhibidora de XOb

Para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos mediante atrapamiento de O_2^- se utilizó el sistema XO-NBT, en el cuál, la enzima XO utiliza como sustrato a la xantina para producir ácido úrico, mediante una hidroxilación oxidativa en la posición 8.

Durante el proceso, se transfieren 2 electrones de la enzima al sustrato, y normalmente estos son aceptados por el NAD^+ para reducirse a NADH, pero bajo ciertas condiciones, estos electrones son transferidos al 1O_2 del medio y se produce el radical O_2^- .

En este ensayo, pueden observarse 2 respuestas que están en competencia, el “atrapamiento del superóxido” por parte de las moléculas evaluadas, al tiempo que el mismo superóxido puede reducir al nitroazul de tetrazolio, para producir formazan, cuya absorción espectrofotométricamente máxima alcanza los 560nm.

Por ello, se emplea un control positivo C(+) en el que se encuentran todos los componentes del sistema, menos la solución de los compuestos a evaluar, para estimar la producción máxima de formazan durante el tiempo de incubación de las pruebas, y así, ser la referencia respecto a la producción de formazan en los ensayos de las muestras a evaluar.

Por lo tanto, se habla de un porcentaje de atrapamiento de radical superóxido tomando también en cuenta que el 100% de producción de formazán representa el 0% de atrapamiento, y entonces, se obtiene la siguiente ecuación para estimar en todas las pruebas el atrapamiento.

$$\% \text{ de atrapamiento de } O_2^- = 100 - \left(\frac{A_{\text{Muestra}} * 100}{A_{C(+)}} \right)$$

Por otra parte, el “Atrapamiento” observado, puede ser atribuido al menos a 2 principales fenómenos. La interacción del compuesto con la enzima, produciendo inhibición en su actividad, y por lo tanto, la inhibición en la producción de superóxido; o bien, la reacción de atrapamiento de superóxido directamente con las moléculas.

Por ello, se evalúa la actividad de la enzima XO en presencia de los compuestos, mediante el monitoreo de producción de ácido úrico por la absorción espectrofotométrica máxima a la longitud de onda de 295nm.

De la misma manera, se emplea un control positivo «C(+)» para poder determinar la máxima producción de ácido úrico, atribuyéndole el 100% de actividad enzimática con las condiciones a las que serán sometidas todas las pruebas, y siendo dicho valor, al mismo tiempo, el 0% de la inhibición de la XO.

La ecuación para calcular dicho porcentaje de inhibición queda así:

$$\% \text{ de inhibición de la XO} = 100 - \left(\frac{A_{\text{Muestra}} * 100}{A_{C(+)}} \right)$$

Para realizar estos ensayos, se requiere que el medio en el que se desarrolla la reacción mantenga constantes la temperatura, pH e iluminación. Por ello se enlistan los reactivos al final de este apéndice.

Para establecer la actividad de la enzima XO, y el tiempo de incubación adecuado para la prueba de XO/NBT e inhibición de XO, se midió la actividad de una solución de 0.8 mg de liofilizado de XO bovina en 5.0mL de PBS (pH = 7.45). La gráfica 1 del apéndice IV, muestra la absorbancia registrada en experimentos que se incubaron en el tiempo indicado. Así, se estableció que 40 minutos de incubación eran los adecuados para las 2 pruebas. La regresión lineal se realizó con el fin de verificar que la tendencia de incremento en la producción fuera constante, y para calcular la actividad enzimática. La tabla 1 del apéndice IV muestra las condiciones de los tubos usados para medir dicha producción.

La pendiente en esta recta, indica la rapidez del incremento de la absorbancia a 295nm, atribuida a la producción de ácido úrico. Con el coeficiente de absortividad molar de $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del ácido úrico a 295nm a un pH=7.5 y la ley de Lambert y Beer, se calculó la rapidez del incremento en la producción de ácido úrico. Posteriormente, se calculó la actividad de la enzima.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \alpha \cdot l \cdot \frac{\Delta C}{\Delta t} \rightarrow \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t}}{\alpha \cdot l} = \frac{0.00947 \text{ min}^{-1}}{(9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})(1 \text{ cm})} = 0.0009865 \text{ mM min}^{-1}$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 0.9865 \mu\text{M min}^{-1}$$

$$U [=] \mu\text{mol min}^{-1} = 1.1 \text{ mL} \left(\frac{0.9865 \mu\text{mol min}^{-1}}{1,000 \text{ mL}} \right) = 0.001085 \mu\text{mol min}^{-1}$$

$$\frac{U}{\text{mg de liofilizado}} = \frac{0.001085 \mu\text{mol min}^{-1}}{0.15 \text{ mL} \left(\frac{0.8 \text{ mg liofilizado}}{5.0 \text{ mL}} \right)} = 0.0452 \text{ U/mg liofilizado}$$

Las especificaciones indican que la actividad de la enzima esta entre 0.4 y 1.0 U/mg de proteína, y que 0.713 U/mg de proteína. No se determinó la cantidad de proteína en mg, sin embargo, se utilizó el valor determinado experimentalmente para el liofilizado.

Otro punto a considerarse fueron los ajustes necesarios para determinar la actividad del control positivo. Como el volumen de DMSO no sería el mismo para cada una de las concentraciones a evaluar en las curvas de concentración-efecto de inhibición, se procedió a efectuar el experimento de efecto de DMSO en la actividad de la enzima. La máxima proporción a usarse en la prueba es de 20 μL , sin embargo, se probaron 4 volúmenes más, para una mejor estimación del efecto.

Se realizó un análisis de regresión lineal mediante GraphPad Prism 6.0, y se encontró que aproximadamente, por cada μL adicional de DMSO que se añade a la prueba, la enzima disminuye la producción de ácido úrico en una proporción de 0.0047 unidades de absorbancia a 295nm. Por lo tanto, se decidió que cada concentración a evaluar tendría su propio control positivo para calcular de una mejor manera el efecto producido por los compuestos.

Otro punto a considerar fue la adición del mismo volumen de solución de los compuestos evaluados al blanco de lectura, dado que en sus espectros de absorción al UV, dichos compuestos pueden absorber a 295nm e interferir con la interpretación del análisis, dando lugar a un error en el que no se observe la inhibición de la enzima. En el caso de la prueba de XO-NBT, también tiene como fin observar si los compuestos reducen por sí solos al NBT.

Una vez decididas todas estas cuestiones se realizó un “screening” de actividad de 3 compuestos, con 3 repeticiones en la prueba de atrapamiento de superóxido, con buenos resultados, sin embargo, se procedió a buscar si el mecanismo fue el atrapamiento directo por parte de la molécula o mediante inhibición de la enzima.

Tabla 1. Porcentaje de atrapamiento de superóxido en la prueba XO-NBT

Prueba (C=59 μM)	% Atrapamiento de superóxido (n=3)	
	Promedio	Desviación estándar
B1	98.7	4.9
B2*	82.1	11.7
B13*	87.5	8.0
Alopurinol*	69.4	-

No existen diferencias significativas entre el porcentaje de atrapamiento de superóxido de B2, B13 y alopurinol, a una concentración = 59 μM (ANOVA, *post hoc*: Dunnet, $P = 0.005$, GraphPad Prism 6.0)

Posteriormente, se comparó el porcentaje de inhibición de la XO, a la misma concentración evaluada anteriormente (59 μM), obteniéndose los resultados de la tabla 13 del apéndice IV.

De los resultados obtenidos, se concluyó que B1, B2, B3, B5, MG12 y B13 habían producido resultados sin diferencias significativas respecto al Alopurinol (ANOVA, *post hoc*: Dunnet, $P = 0.005$), sin embargo, para evaluar la concentración inhibitoria media, se decidió que únicamente se evaluarían los que mostraron más de un 90% de inhibición de la enzima XO, que en este caso, fueron B1, B3 y MG12.

Las concentraciones elegidas para la construcción de las curvas dosis-efecto de inhibición se eligieron en base a ensayos previos en los que no se observaron cambios significativos entre concentraciones cercanas a 59.1 μM , es decir, eligiendo usar valores de 100, 90, 80, 70, 60 y 50 microlitros de la solución 650 μM .

Al no observarse un cambio en el efecto de inhibición significativo, se procedió a usar diluciones de la solución 1:10 de dicha solución, y usar una escala logarítmica para las 5 concentraciones a evaluar.

Reactivos

Para preparar las soluciones, los reactivos Xantina, Nitroazul de Tetrazolio, Alopurinol, EDTA disódico, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2]$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y KCl se usaron sin purificación previa y provienen de Sigma Aldrich™. La sal $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y el DMSO provienen de J.T. Baker™ y las sales Na_2CO_3 , NaHCO_3 , y NaCl, también se usaron sin purificación previa y provienen de Química Alvi.

El agua desionizada fue proporcionada por el laboratorio 112 de Biofarmacia, mediante un aparato MilliQ 3000.

Se utilizó un medidor de pH/mV/°C portátil con ATC y calibración automática marca Hanna Instruments cuya calibración se realizó previamente con los buffers de referencia de pH 4, 7 y 10, de Sigma Aldrich™.

Para realizar los ensayos se utilizaron tubos Eppendorf™ de 1.5mL de fondo cónico, 1 micropipeta de 100-1000µL marca Sartorius™, así como una de 20-100µL y de 10-100µL marca Transferppete Brand™ y se incubaron en un aparato Thermostat de Eppendorf™, a 27°C y 600rpm.

Se utilizó la enzima Xantina Oxidasa de leche bovina, en su forma liofilizada, de Sigma Aldrich™, de especificaciones 0.4-1.0 U/mg de proteína (Con una actividad de 0.0452U/mg de polvo liofilizado al momento de realizarse los ensayos) y reconstituyendolo en PBS, según lo requerido e indicado en cada prueba.

Las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro UV/Visible Genesys 10S Thermo™ con una celda de cuarzo marca Starna™ tipo 9/Q/10, Spectros II, semimicro, para rango de mediciones entre 170-2700nm, con una longitud de paso óptico de 10mm de capacidad de 1mL. Se enjuagó entre cada medición con PBS, agua desionizada y por último, acetona Q.P.

Preparación de soluciones de reactivos

1.- Solución amortiguadora salina isotónica de fosfatos 11.8mM, 137mM de NaCl, 2.7mM KCl, pH = 7.45 (PBS)

Se pesaron las cantidades de reactivo indicadas en la siguiente tabla, se disolvieron en aproximadamente 1.9L de agua desionizada y antes de llevar a 2.0L, se confirmó el valor de pH con el potenciómetro. Se completó el aforo y se reconfirmo el valor de pH.

Reactivo	Cantidad (g)	Cantidad (Milimoles/L)
NaCl	16.0126	137
KCl	0.4026	2.7
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.4968	10
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	7.1628	1.8

2.- Solución Na₂CO₃ 0.4M

Se pesaron 2.12g de Na₂CO₃ y se aforo a 50.0mL con agua desionizada.

3.- Solución amortiguadora de bicarbonato de sodio-carbonato de sodio 84 mM, pH 10.2

Se pesaron 970 mg de NaHCO₃ y 1.01 g de Na₂CO₃, y se disolvieron con agua desionizada. Se ajusto el pH a 10.2 y se aforó a 250.0mL.

4.- Xantina 1.5 mM

Se pesaron 11.3 mg de xantina, se agregó solución de Na₂CO₃ 0.4 M hasta solubilizar y se aforó a 50.0mL con solución amortiguadora de carbonatos.

5.- Nitroazul de tetrazolio 0.1 M

Se pesaron 20.5 mg de nitroazul de tetrazolio y se aforaron a 25.0mL con agua desionizada.

6.- EDTA 0.1 mM

Se pesaron 74.4 mg de EDTA disódico dihidratado, se disolvieron con agua desionizada, y se aforó a 2.0L con más agua.

7.- Solución de Xantina Oxidasa Bovina (0.0136U de actividad/mL)

Se pesaron 1.5 mg de liofilizado de xantina oxidasa bovina, y se aforó a 5.0mL de PBS.

8.- Nitrato de cobre 1.3mM Cu(NO₃)₂

Pesar 15.7 mg de Cu(NO₃)₂ · H₂O y aforar a 50.0mL con agua desionizada.

9.- Soluciones de compuestos de prueba 0.65 μ M al 40% de DMSO para pruebas comparación de actividad contra el alopurinol

Se pesaron las cantidades indicadas en la siguiente tabla, y se disolvió en 4 mL de DMSO, aforando con solución PBS a 10.0mL. Las soluciones se prepararon 2 veces, y cada solución fue evaluada 2 veces.

Molecula	Peso Molecular	Solución Acuosa (10.0mL / 0.65mM)	
		Cantidad a Pesar	Cantidad Pesada
B1	325.3	2.1	2.1
B2	300.3	2.0	2.0
B3	337.3	2.2	2.2
B5	365.4	2.4	2.4
B6	319.3	2.1	2.1
B7	331.3	2.2	2.2
B8	333.4	2.2	2.2
B11	369.4	2.4	2.4
MG12	256.1	1.7	1.7
B13	355.4	2.3	2.3
B14	363.3	2.4	2.4
E11	442.5	2.9	2.9

10.- Soluciones Stock en DMSO para hacer diluciones en pruebas de evaluación de CE₅₀

Se pesaron las cantidades indicadas en la tabla, y posteriormente se llevó a aforó de 10.0mL con DMSO.

Molecula	Peso Molecular	Cantidad Pesada para Solución Stock
B1	325.3	10.7
B3	337.3	2.2
MG12	256.1	1.7
Alopurinol	136.1	2.3

11.- Soluciones 650 μ M (1:1 de PBS y DMSO) para hacer diluciones en pruebas de evaluación de CE₅₀

Se tomo el volumen de solución stock en DMSO indicado en la siguiente tabla y posteriormente se llevó a aforo de 10.0mL con PBS.

El volumen promedio de DMSO que contienen los 100 μ L de solución que se usan para las pruebas es 20 μ L, así que ese es el volumen que se considerara para añadir al control positivo en la prueba en la evaluación de esta concentración.

Molécula	Volumen de solución Stock para preparar solución 650 μM (μL)	Volumen de DMSO a agregar al control positivo «C(+)» (μL)
B1	1,963	20
B3	2,115	
MG12	1,683	
Alopurinol	871	

12.- Diluciones de las soluciones preparadas anteriormente para pruebas de evaluación de CE_{50}

Se tomo el volumen de la solución indicada en la tabla, para preparar las soluciones a la concentración especificada en la misma y se llevó a aforo de 10.0mL con buffer PBS.

Concentración final en la prueba (μM) (Volumen 1,100 μL)	Volumen requerido de la solución de prueba (μL)	Concentración de la solución requerida para la prueba (μM)	Volumen de solución 650 μM llevado a 10.0mL con PBS (mL)	Volumen de solución 65 μM llevado a 10.0mL con PBS (mL)	Volumen de DMSO a agregar al control positivo «C(+)» (μL)
59.09	100	650	-	-	20
11.8	200	65	1.0	-	4*
5.9	100	65		-	2*
1.18	200	6.5	-	1.0	0.4*
0.59	100	6.5	-		0.2*

* El volumen de DMSO que sería necesario agregar al control positivo (4, 2, 0.4 y 0.2 μL) no produce un efecto de inhibición de la enzima XO significativo, (-0.02 (2%), -0.01 (1%), -0.002 (0.2%), -0.001 (0.1%)) así que fue omitido en los controles positivos de estas pruebas.

Determinación de actividad de Xantina Oxidasa para estandarización de tiempos de incubación

Tabla 1. Reactivos empleados para pruebas para establecer tiempo de incubación.

<i>Reactivo</i>	Blanco (μL)	Control positivo (μL)
<i>a. Xantina 1.5mM</i>	100	100
<i>b. EDTA 0.115mM</i>	100	100
<i>c. PBS</i>	860	710
<i>d. DMSO</i>	40	40
<i>e. XO*</i>	-	150
VOLUMEN TOTAL	1100	1100

Tabla 2. Datos de absorbancias a 295 nm para determinación de actividad de XO

Tiempo	Absorbancia
10	0.135
20	0.203
30	0.34
40	0.405

Gráfica 1. Regresión lineal de la absorbancia de ácido úrico de las muestras a 295nm

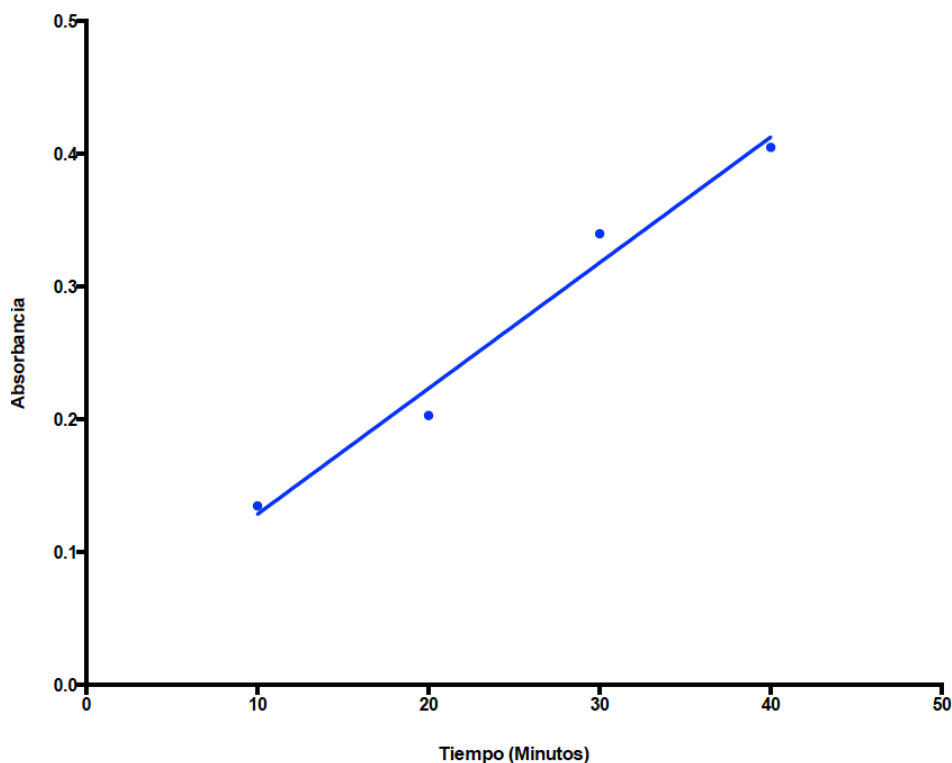


Tabla 3. Análisis de regresion lineal obtenido de GraphPad Prism 6.0

Best-fit values	
Slope	0.00947 ± 0.0009981
Y-intercept when X=0.0	0.0340 ± 0.02734
X-intercept when Y=0.0	-3.590
1/slope	105.6
95% Confidence Intervals	
Slope	0.005175 to 0.01377
Y-intercept when X=0.0	-0.08362 to 0.1516
X-intercept when Y=0.0	-28.28 to 6.294
Goodness of Fit	
R square	0.9783
Sy.x	0.02232
Is slope significantly non-zero?	
F	90.01
DFn, DFd	1.000, 2.000
P value	0.0109
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	4
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	4
Number of missing values	0
Equation	$Y = 0.00947 * X + 0.0340$

Determinación de la influencia del DMSO en la actividad de Xantina Oxidasa

Tabla 4. Reactivos empleados para la prueba

Tipo	REACTIVO					Volumen total (μL)
	a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. DMSO (μL)	e. XO* (μL)	
Blancos	100	100	900	0	0	1,100
			890	10		
			880	20		
			870	30		
			860	40		
			850	50		
			800	100		
Pruebas	100	100	600	0	300	1,100
			590	10		
			580	20		
			570	30		
			560	40		
			550	50		
			500	100		

Tabla 5. Datos de absorbancia a 295nm para experimento

MICROLITROS DE DMSO	1ª CORRIDA	2ª CORRIDA
0	0.903	0.92
10	0.864	0.845
20	0.814	0.812
30	0.763	0.758
40	0.739	0.748
50	0.583	0.711
100	0.436	0.421

Gráfica 2. Regresión lineal de absorbancia de ácido úrico de las muestras a 295nm

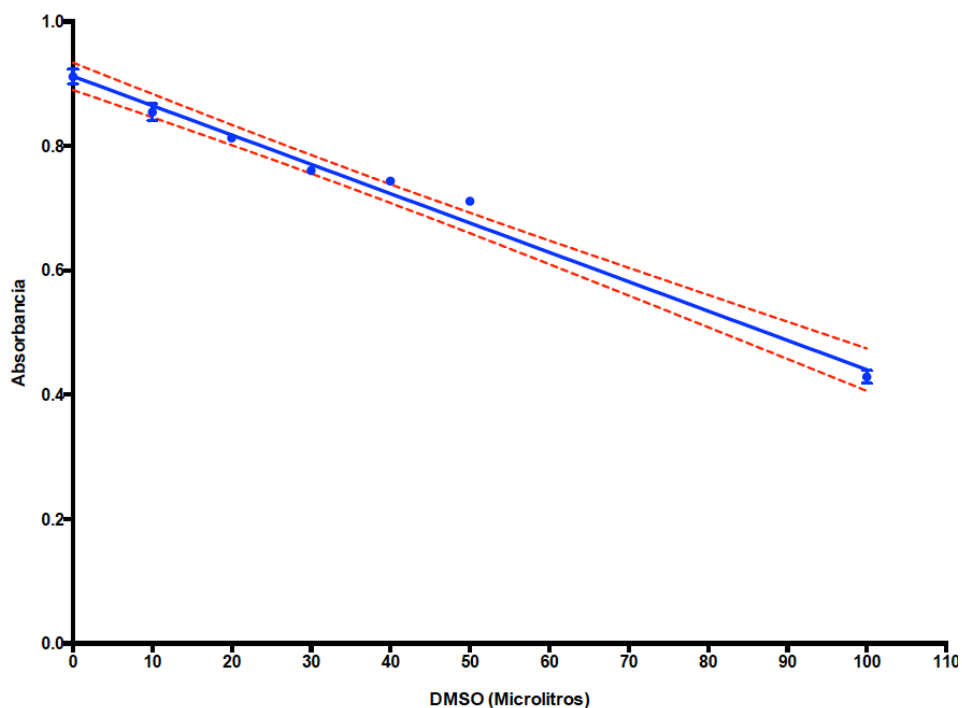


Tabla 6. Análisis de regresión lineal obtenido de GraphPad Prism 6.0

Best-fit values	
Slope	-0.004718 ± 0.0001514
Y-intercept when X=0.0	0.9121 ± 0.007087
X-intercept when Y=0.0	193.3
1/slope	-211.9
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.005052 to -0.004385
Y-intercept when X=0.0	0.8965 to 0.9277
X-intercept when Y=0.0	182.6 to 205.6
Goodness of Fit	
R square	0.9888
Sy.x	0.01721
Is slope significantly non-zero?	
F	971.7
DFn, DFd	1.000, 11.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	2
Total number of values	13
Number of missing values	8
Equation	Y = -0.004718*X + 0.9121

Ensayo de atrapamiento de superóxido mediante el sistema XO-NBT (C = 59 μ M)

Tabla 7. Reactivos empleados para la prueba.

Tipo de tubo		REACTIVOS									
		a. Xantina 1.5mM (μ L)	b. EDTA 0.115mM (μ L)	c. PBS (μ L)	d. NBT 0.1M	e. Sol. Compuesto de prueba 65mM (μ L)	f. DMSO (μ L)	g. XO* (μ L)	Incubación (min)	h. Cu(NO ₃) ₂ 1.3 mM (μ L)	V _{total final} (μ L)
Blancos	Control (+)	100	100	550	300	-	50	-	40	200	1,300
	Compuesto de prueba			500		100	-	-			
Pruebas	Control (+)	100	100	250	300	-	50	300	40	200	1,300
	Compuesto de prueba			200		100	-				

Tabla 8. Datos de absorbancia a 560nm y porcentajes de atrapamiento de superóxido de las muestras

Prueba	1ª Corrida		2ª Corrida		3ª Corrida	
	Absorbancia	% Atrapamiento de superóxido	Absorbancia	% Atrapamiento de superóxido	Absorbancia	% Atrapamiento de superóxido
Control (+)	0.051	0	0.186	0	0.052	0
B1	-0.002	100	0.004	97.8	0.003	94.2
B2	0.016	68.6	0.02	89.2	0.006	88.5
B13	0.011	78.4	0.012	93.5	0.005	90.4
Alopurinol	-	-	0.057	69.4	-	-

Gráfica 3. Promedio de porcentaje de atrapamiento de superóxido de las muestras

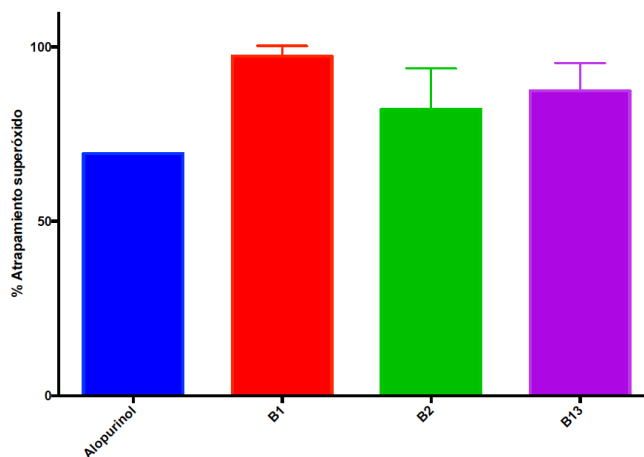


Tabla 9. ANOVA obtenido de GraphPad Prism 6.0

Table Analyzed	One-way ANOVA data				
ANOVA summary					
F	5.495				
P value	0.0295				
P value summary	*				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.7019				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.4959 (3, 7)				
P value	0.6965				
P value summary	ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	984.3	3	328.1	F (3, 7) = 5.495	P = 0.0295
Residual (within columns)	418.0	7	59.71		
Total	1402	10			
Data summary					
Number of treatments (columns)	4				
Number of values (total)	11				

Tabla 10. Análisis *post hoc* de Dunnet, obtenido de GraphPad Prism 6.0

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary		A-?		
Alopurinol vs. B1	-27.93	-48.89 to -6.976	Yes	*		B	B1	
Alopurinol vs. B2	-12.70	-33.66 to 8.257	No	ns		C	B2	
Alopurinol vs. B13	-18.03	-38.99 to 2.924	No	ns		D	B13	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Alopurinol vs. B1	69.40	97.33	-27.93	7.054	2	3	3.960	7
Alopurinol vs. B2	69.40	82.10	-12.70	7.054	2	3	1.800	7
Alopurinol vs. B13	69.40	87.43	-18.03	7.054	2	3	2.556	7

Ensayo de inhibición de XO (C= 59 μ M)

Tabla 11. Reactivos empleados para la prueba.

Tipo de tubo		REACTIVOS							V _{total} (μ L)	Incubación (min)
		a. Xantina 1.5mM (μ L)	b. EDTA 0.115mM (μ L)	c. PBS (μ L)	d. Sol. Compuesto de prueba 65mM (μ L)	e. DMSO (μ L)	f. XO* (μ L)			
Blancos	Control (+)	100	100	850	-	50	-	1,100	40	
	Compuesto de prueba			800	100	-	-			
Pruebas	Control (+)	100	100	550	-	50	300	1,100	40	
	Compuesto de prueba			500	100	-				-

Tabla 12. Datos de absorbancia a 295nm de las muestras

Corrida	% de inhibición de XO													
	Control (+)	B1	B2	B3	B5	B7	B8	B11	MG12	B13	B14	E11	TAQ	Alopurinol
1	1.341			0.122	0.179	0.163	0.258	0.184	0.04					0.022
2	1.16			0.117	0.213	0.323	0.348	0.235						0.039
3	0.92								0.059					0.047
4	1.004			0.16	0.085	0.226	0.169	0.101	0.042					0.036
5	0.772			0.076	0.16	0.194	0.266	0.175	0.035					0.044
6	1.303	0.053	0.157							0.115	0.347	1.254	0.46	0.099
7	1.229	0.117	0.211							0.181	0.356	0.981	0.431	0.075
8	1.321	-0.057	0.154							0.169	0.22	1.404	0.579	
PROMEDIO	1.145	0.038	0.174	0.119	0.159	0.227	0.260	0.174	0.044	0.155	0.308	1.213	0.490	0.052
Desviación estándar	0.201	0.088	0.032	0.034	0.054	0.069	0.073	0.055	0.010	0.035	0.076	0.214	0.078	0.026

Tabla 13. Datos de porcentaje de inhibición de las muestras

Corrida	% de inhibición de XO													
	B1	B2	B3	B5	B7	B8	B11	MG12	B13	B14	E11	TAQ	Alopurinol	
1			90.9	86.7	87.8	80.8	86.3	97					98.4	
2			89.9	81.6	72.2	70.0	79.7						96.6	
3								93.6					94.9	
4			84.1	91.5	77.5	83.2	89.9	95.8					96.4	
5			90.2	79.3	74.9	65.5	77.3	95.5					94.3	
6	96	88.3							91.4	74.1	6.5	65.7	92.6	
7	89.9	81.8							84.4	69.3	15.4	62.8		
8	100	84.7							83.2	78.1	0	42.3	92.5	
PROMEDIO	95.3	84.9	88.8	84.8	78.1	74.9	83.3	95.5	86.3	73.8	7.3	56.9	95.1	
Desviación estándar	5.1	3.3	3.1	5.4	6.8	8.5	5.8	1.4	4.4	4.4	7.7	12.8	2.2	
Sin diferencia significativa vs Alopurinol (P=0.05)	*	*	*	*			*	*					*	

Gráfica 4. Promedio de porcentaje de inhibición de XO de las muestras

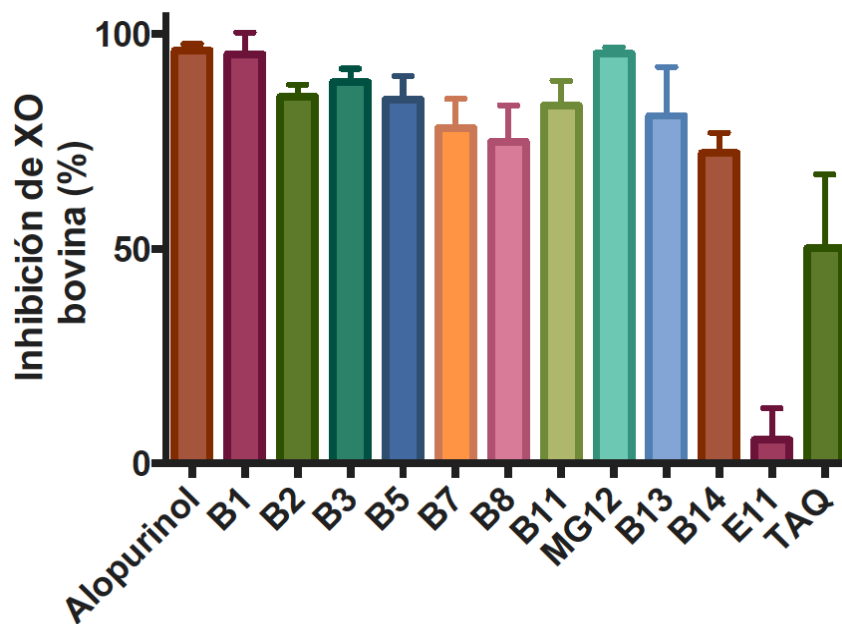


Tabla 14. ANOVA obtenido de GraphPad Prism 6.0

Table Analyzed	Repeated measures one-way ANOVA data				
ANOVA summary					
F	53.65				
P value	< 0.0001				
P value summary	****				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.947				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1.184 (12, 36)				
P value	0.331				
P value summary	ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	21571	12	1798	F (12, 36) = 53.65	P < 0.0001
Residual (within columns)	1206	36	33.5		
Total	22777	48			
Data summary					
Number of treatments (columns)	13				
Number of values (total)	49				

Tabla 15. Análisis *post hoc* de Dunnett, obtenido de GraphPad Prism 6.0

Number of families	1							
Number of comparisons per family	12							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary		A-?		
Alopurinol vs. B1	-0.2	-11.85 to 11.45	No	ns		B	B1	
Alopurinol vs. B2	10.17	-1.486 to 21.82	No	ns		C	B2	
Alopurinol vs. B3	6.325	-4.259 to 16.91	No	ns		D	B3	
Alopurinol vs. B5	10.33	-0.2587 to 20.91	No	ns		E	B5	
Alopurinol vs. B7	17	6.416 to 27.58	Yes	***		F	B7	
Alopurinol vs. B8	20.23	9.641 to 30.81	Yes	****		G	B8	
Alopurinol vs. B11	11.8	1.216 to 22.38	Yes	*		H	B11	
Alopurinol vs. MG12	-0.375	-10.96 to 10.21	No	ns		I	MG12	
Alopurinol vs. B13	8.767	-2.886 to 20.42	No	ns		J	B13	
Alopurinol vs. B14	21.27	9.614 to 32.92	Yes	****		K	B14	
Alopurinol vs. E11	87.8	76.15 to 99.45	Yes	****		L	E11	
Alopurinol vs. TAQ	38.17	26.51 to 49.82	Yes	****		M	TAQ	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Alopurinol vs. B1	95.1	95.3	-0.2	3.994	7	3	0.05007	36
Alopurinol vs. B2	95.1	84.93	10.17	3.994	7	3	2.545	36
Alopurinol vs. B3	95.1	88.78	6.325	3.628	7	4	1.743	36
Alopurinol vs. B5	95.1	84.78	10.33	3.628	7	4	2.846	36
Alopurinol vs. B7	95.1	78.1	17	3.628	7	4	4.686	36
Alopurinol vs. B8	95.1	74.88	20.23	3.628	7	4	5.575	36
Alopurinol vs. B11	95.1	83.3	11.8	3.628	7	4	3.252	36
Alopurinol vs. MG12	95.1	95.48	-0.375	3.628	7	4	0.1034	36
Alopurinol vs. B13	95.1	86.33	8.767	3.994	7	3	2.195	36
Alopurinol vs. B14	95.1	73.83	21.27	3.994	7	3	5.324	36
Alopurinol vs. E11	95.1	7.3	87.8	3.994	7	3	21.98	36
Alopurinol vs. TAQ	95.1	56.93	38.17	3.994	7	3	9.555	36

Ensayo de inhibición de XO, para determinación de CE_{50}

Tabla 16. Reactivos empleados para la prueba, para evaluación de $C = 59.1\mu M$

Tipo de tubo		REACTIVOS							
		a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. Sol. Compuesto de prueba 650 μM (μL)	e. DMSO (μL)	f. XO* (μL)	V_{total} (μL)	Incubación (min)
Blancos	Control (+)	100	100	880	-	20	-	1,100	40
	Compuesto de prueba			800	100	-	-		
Pruebas	Control (+)	100	100	580	-	20	300	1,100	40
	Compuesto de prueba			500	100	-			

Tabla 17. Reactivos empleados para la prueba, para evaluación de $C = 11.8\mu M$

Tipo de tubo		REACTIVOS							
		a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. Sol. Compuesto de prueba 65 μM (μL)	e. DMSO (μL)	f. XO* (μL)	V_{total} (μL)	Incubación (min)
Blancos	Control (+)	100	100	900	-	-	-	1,100	40
	Compuesto de prueba			700	200	-	-		
Pruebas	Control (+)	100	100	600	-	-	300	1,100	40
	Compuesto de prueba			400	200	-			

Tabla 18. Reactivos empleados para la prueba, para evaluación de $C = 5.91\mu M$

Tipo de tubo		REACTIVOS							
		a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. Sol. Compuesto de prueba 65 μM (μL)	e. DMSO (μL)	f. XO* (μL)	V_{total} (μL)	Incubación (min)
Blancos	Control (+)	100	100	900	-	-	-	1,100	40
	Compuesto de prueba			800	100	-	-		
Pruebas	Control (+)	100	100	600	-	-	300	1,100	40
	Compuesto de prueba			500	100	-			

Tabla 19. Reactivos empleados para la prueba, para evaluación de $C = 1.18\mu\text{M}$

Tipo de tubo		REACTIVOS							V_{total} (μL)	Incubación (min)
		a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. Sol. Compuesto de prueba 6.5 μM (μL)	e. DMSO (μL)	f. XO* (μL)			
Blancos	Control (+)	100	100	900	-	-	-	1,100	40	
	Compuesto de prueba			700	200	-	-			
Pruebas	Control (+)	100	100	600	-	-	300	1,100	40	
	Compuesto de prueba			400	200	-				

Tabla 20. Reactivos empleados para la prueba, para evaluación de $C = 0.59\mu\text{M}$

Tipo de tubo		REACTIVOS							V_{total} (μL)	Incubación (min)
		a. Xantina 1.5mM (μL)	b. EDTA 0.115mM (μL)	c. PBS (μL)	d. Sol. Compuesto de prueba 6.5 μM (μL)	e. DMSO (μL)	f. XO* (μL)			
Blancos	Control (+)	100	100	900	-	-	-	1,100	40	
	Compuesto de prueba			800	100	-	-			
Pruebas	Control (+)	100	100	600	-	-	300	1,100	40	
	Compuesto de prueba			500	100	-				

Tabla 21. Datos de absorbancia a 295nm de las muestras

[C] μM	Absorbancias														
	Control (+) (DMSO)			Allopurinol			B1			B3			MG12		
0.59	0.857			0.797			0.612	0.599	0.65	0.686					0.891
1.18	0.720			0.631			0.358	0.388	0.393	0.484	0.461	0.512	0.598	0.607	
5.9	0.679			0.426			0.094	0.041		0.28	0.238		0.285	0.235	
11.8	0.941			0.078			0.04	0.043		0.21	0.188		0.165	0.136	
59.1	0.520	0.517	0.522	0.035	0.008		0.005	-0.013	0.021	0.041		0.085	0.036	0.034	

Tabla 22. Datos de porcentaje de inhibición de XO de las muestras

[C] μM	Alopurinol			B1			B3			MG12		
0.59	7.0			28.6	30.1	24.2	20.0					0
1.18	12.4			50.3	46.1	45.4	32.8	36.0	28.9	16.9	15.7	
5.9	37.3			86.2	94.0		58.8	64.9		58.0	65.4	
11.8	91.7			95.7	95.4		77.7	80.0		82.5	85.5	
59.1	93.3	98.5		99.0	102.5	96.0	92.1		83.6	93.1	93.5	

Gráfica 5. Curva porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración

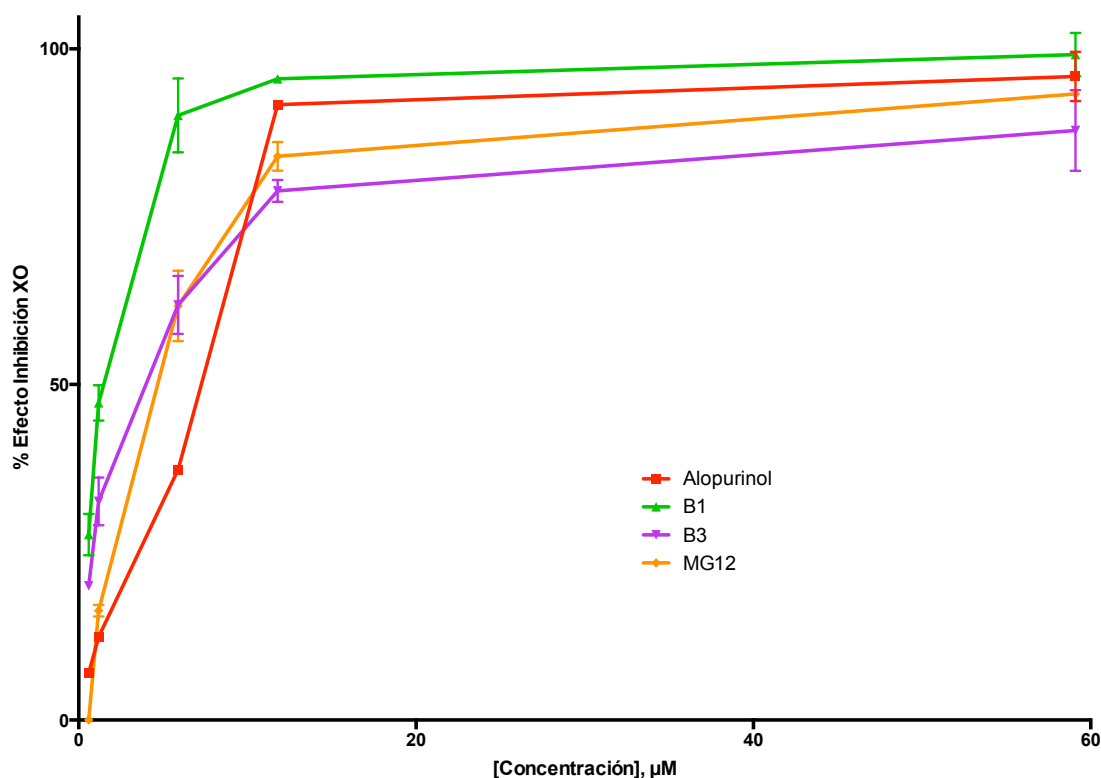


Tabla 23. Datos de inversos de porcentajes de inhibición de XO y de inversos de concentración.

1/[C]	Alopurinol			B1			B3			MG12		
1.6949	0.142833			0.034980	0.033217	0.041401	0.050117					
0.8475	0.080899			0.019890	0.021687	0.022018	0.030508	0.027799	0.034615	0.059016	0.063717	
0.1695	0.026838			0.011607	0.010643		0.017018	0.015397		0.017234	0.015293	
0.0847	0.010904			0.010444	0.010479		0.012873	0.012497		0.012126	0.011689	
0.0169	0.010722	0.010156		0.010097	0.009756	0.010421	0.010857		0.011956	0.010744	0.010700	

Gráfica 6 y 7. Regresión lineal de inversos de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs inversos de concentración, sin intervalos de confianza y con intervalos de confianza del 95%

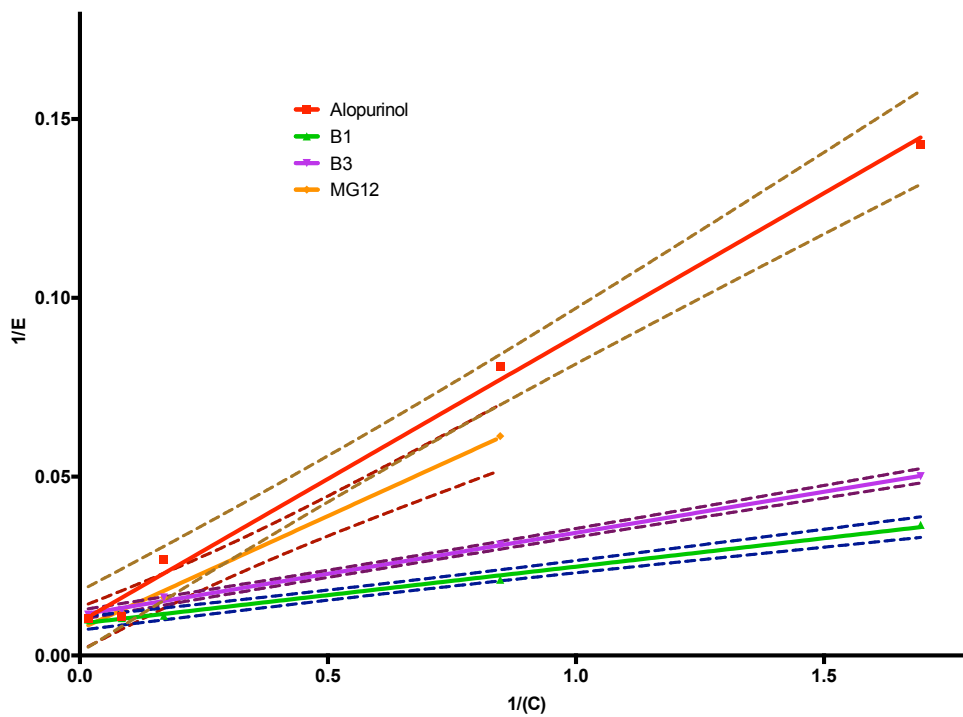
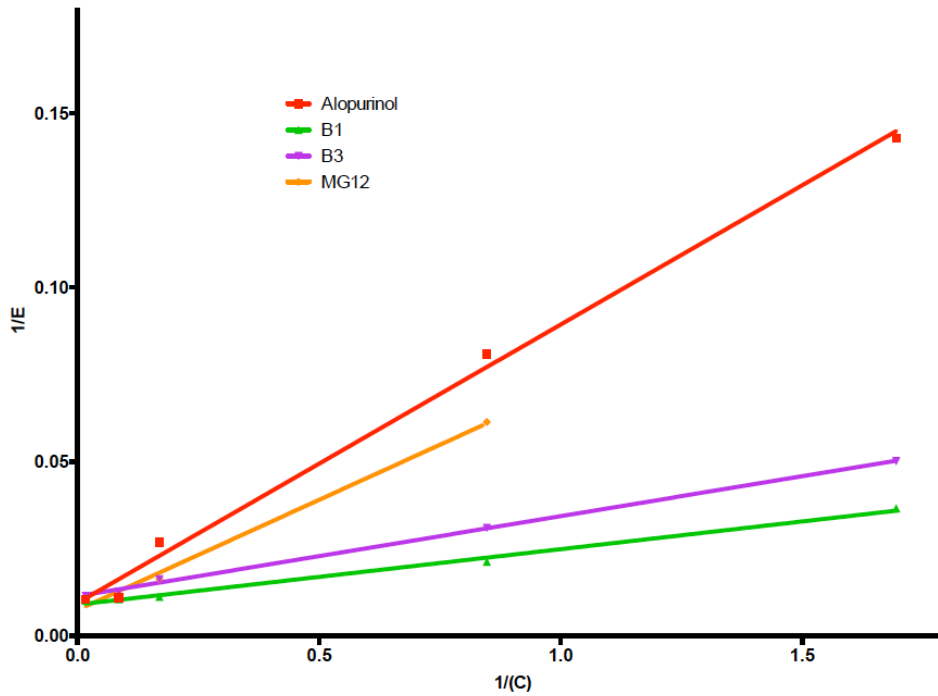


Tabla 24. Análisis de regresión lineal de inversos de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs inversos de concentración obtenido de GraphPad Prism 6.0

	Alopurinol	B1	B3	MG12
Best-fit values				
Slope	0.07989 ± 0.003162	0.01591 ± 0.0006951	0.02295 ± 0.0004889	0.06322 ± 0.003259
Y-intercept when X=0.0	0.009428 ± 0.002693	0.008930 ± 0.0005920	0.01137 ± 0.0004164	0.007386 ± 0.001415
X-intercept when Y=0.0	-0.1180	-0.5613	-0.4953	-0.1168
1/slope	12.52	62.86	43.58	15.82
95% Confidence Intervals				
Slope	0.06983 to 0.08995	0.01370 to 0.01812	0.02139 to 0.02450	0.04920 to 0.07724
Y-intercept when X=0.0	0.0008572 to 0.01800	0.007046 to 0.01081	0.01004 to 0.01269	0.001296 to 0.01347
X-intercept when Y=0.0	-0.2481 to -0.009901	-0.7663 to -0.4006	-0.5843 to -0.4160	-0.2568 to -0.01790
Goodness of Fit				
R square	0.9953	0.9943	0.9986	0.9947
Sy.x	0.004521	0.0009937	0.0006989	0.002165
Is slope significantly non-zero?				
F	638.2	523.9	2203	376.4
DFn, DFd	1.000, 3.000	1.000, 3.000	1.000, 3.000	1.000, 2.000
P value	0.0001	0.0002	< 0.0001	0.0026
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant	Significant
Data				
Number of X values	5	5	5	4
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1
Total number of values	5	5	5	4
Number of missing values	0	0	0	1
Equation	Y = 0.07989*X + 0.009428	Y = 0.01591*X + 0.008930	Y = 0.02295*X + 0.01137	Y = 0.06322*X + 0.007386

¿Son iguales las pendientes?

F = 441.474. DFn=3 DFd=29

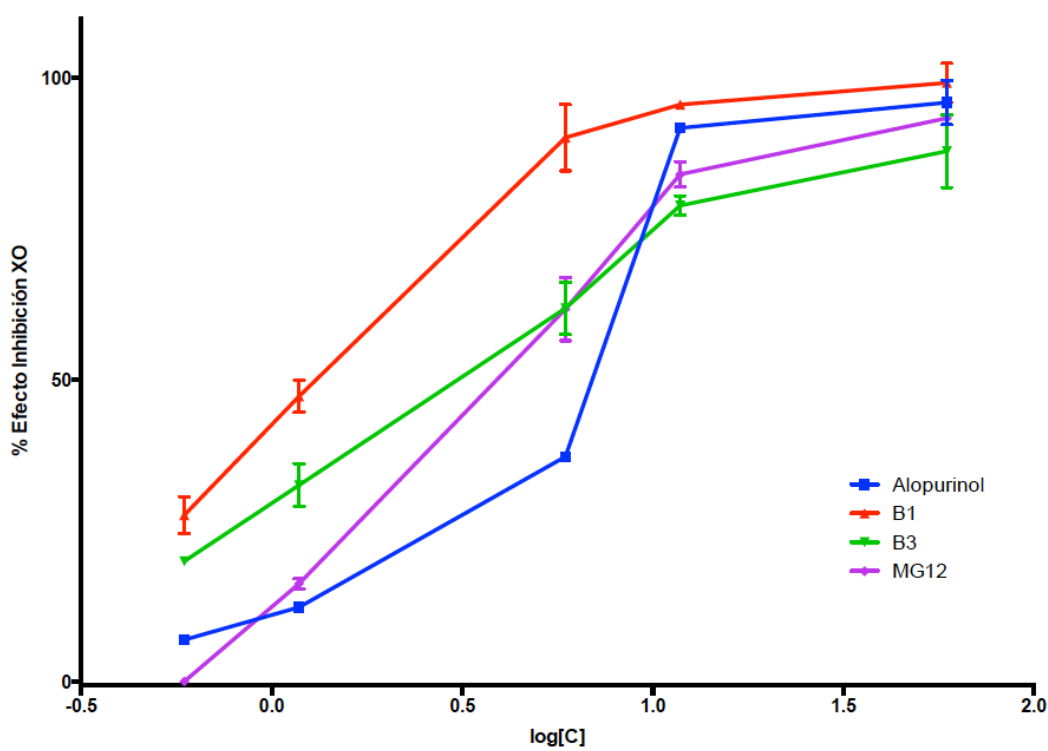
P<0.0001

Si las pendientes globales son idénticas, existe una probabilidad de menos del 0,01% de elegir al azar puntos de datos formando parte de pendientes diferentes. Se puede concluir que las diferencias entre las pendientes son muy significativas. Debido a que las pendientes difieren tanto, no es posible comprobar si las intersecciones difieren significativamente.

Tabla 25. Datos de porcentajes de inhibición de XO y de logaritmo de concentración.

log [C]	Allopurinol			B1			B3			MG12		
-0.2291	7.0			28.6	30.1	24.2	20.0					0
0.0719	12.4			50.3	46.1	45.4	32.8	36.0	28.9	16.9	15.7	
0.7709	37.3			86.2	94.0		58.8	64.9		58.0	65.4	
1.0719	91.7			95.7	95.4		77.7	80.0		82.5	85.5	
1.7716	93.3	98.5		99.0	102.5	96.0	92.1		83.6	93.1	93.5	

Gráfica 8. Curva de logaritmo de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración



Gráfica 9. Curva de porcentaje de inhibición de XO de las muestras vs concentración mediante metodo de Hill, obtenida mediante GraphPad Prism 6.0

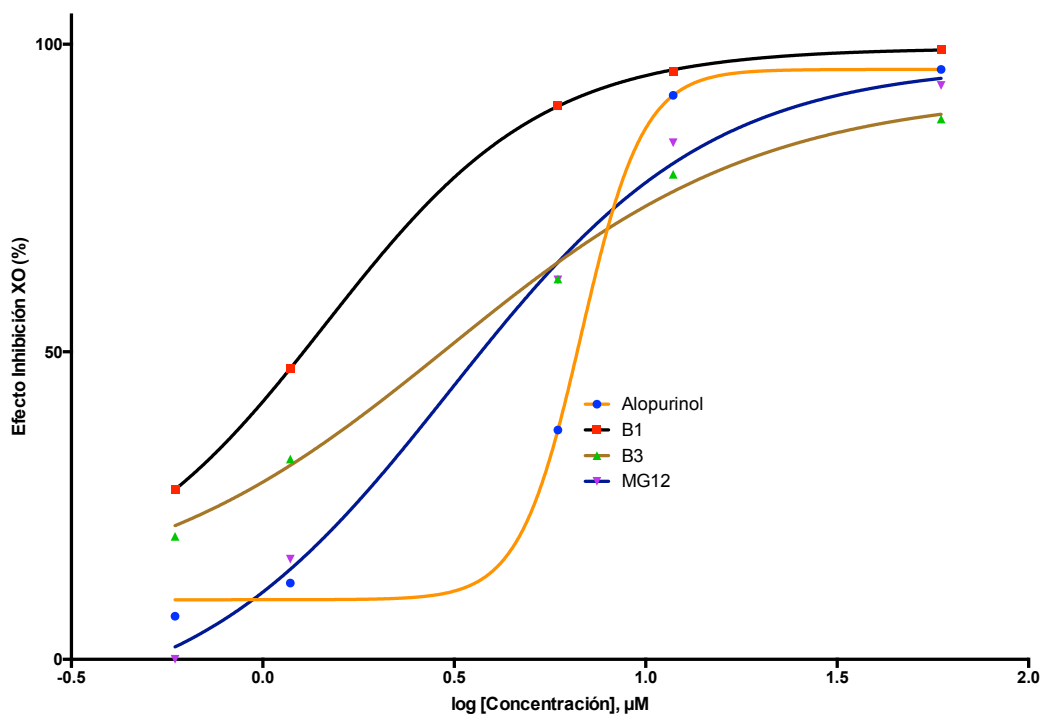


Tabla 26. Análisis estadístico de Hill para calcular CI₅₀ obtenido de GraphPad Prism 6.0

	Alopurinol	B1	B3	MG12
log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)				
Best-fit values				
Bottom	9.695	9.741	9.285	-9.428
Top	95.91	99.37	92.12	96.85
LogIC50	0.8318	0.1647	0.4846	0.4892
HillSlope	5.367	1.532	1.054	1.278
IC50	6.788	1.461	3.052	3.085
Span	86.21	89.63	82.84	106.3
Std. Error				
Bottom	2.650	9.188	18.81	12.44
Top	2.650	1.875	5.883	4.032
LogIC50	0.02488	0.06932	0.2144	0.1108
HillSlope	1.618	0.2673	0.4060	0.2889
Span	3.751	10.19	22.89	14.82
95% Confidence Intervals				
Bottom	-1.706 to 21.10	-11.04 to 30.53	-36.74 to 55.31	-41.40 to 22.55
Top	84.50 to 107.3	95.13 to 103.6	77.73 to 106.5	86.48 to 107.2
LogIC50	0.7247 to 0.9388	0.007853 to 0.3215	-0.03995 to 1.009	0.2045 to 0.7740
HillSlope	-1.596 to 12.33	0.9276 to 2.137	0.06019 to 2.047	0.5353 to 2.021
IC50	5.305 to 8.686	1.018 to 2.096	0.9121 to 10.21	1.601 to 5.943
Span	70.07 to 102.4	66.58 to 112.7	26.82 to 138.8	68.18 to 144.4
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	2	9	6	5
R square	0.9969	0.9927	0.9805	0.9922
Absolute Sum of Squares	28.06	84.78	120.0	83.86
Sy.x	3.746	3.069	4.473	4.095
Number of points				
Analyzed	6	13	10	9

Acerca de la predicción del metabolismo *in vivo* mediante MetaPrint2D y MetaPrint2d-React

MetaPrint2D fue desarrollado por Samuel Adams, en colaboración con Lars Carlsson, Scott Boyer y Robert Glen, como parte de un esfuerzo en la exploración de la relación entre la similitud de las moléculas y la información existente sobre el metabolismo que sufren dichas moléculas.

La herramienta se encuentra disponible como un proyecto (software-librería) de código abierto, que se basa en la minería de datos para predecir el metabolismo de xenobioticos, mediante un algoritmo, que realiza un análisis estadístico entre el número de similitudes entre los *fingerprints* o huellas de átomos de los sustratos y metabolitos de una base de datos. Adicionalmente, se asigna un puntaje para determinar el intervalo de confianza de las predicciones que genera. Este es llamado NOR, (*De normalised occurrence ratio*), o bien, proporción normalizada de incidencia de metabolismo.

La metodología que se siguió, fue obtener las estructuras de las moléculas, en formato SMILES, que es una notación para describir la naturaleza y topología de las estructuras moleculares, mediante la aplicación incluida en el software ACD/Labs®, para posteriormente realizar la búsqueda en ambas bases de datos, con el modelo de predicción de metabolismo en humano (Metabolite 2010.2).

Los resultados que se obtuvieron, es decir, la lista de reacciones y el sitio de la molécula que sufriría éstas, se analizaron únicamente en función de un NOR (*Normal Occurance Ratio*) de 0.66 a 1, es decir, las zonas marcadas con rojo en la molécula, debido a que existe una mayor probabilidad de que ocurra el metabolismo en ese sitio.

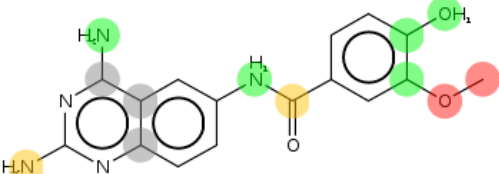
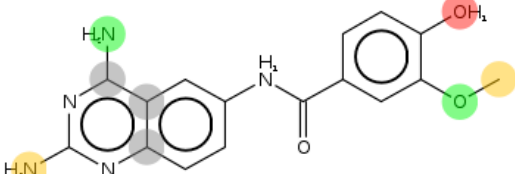
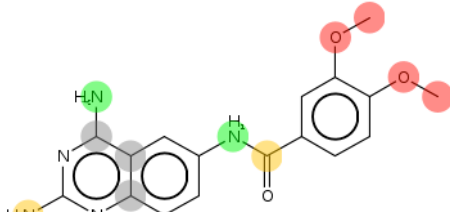
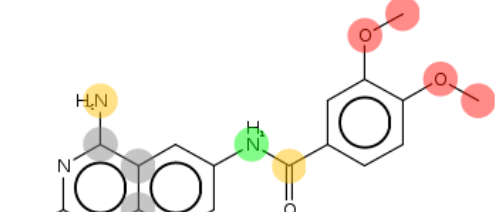
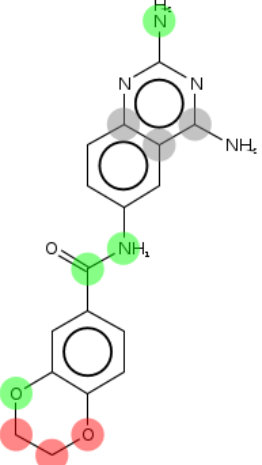
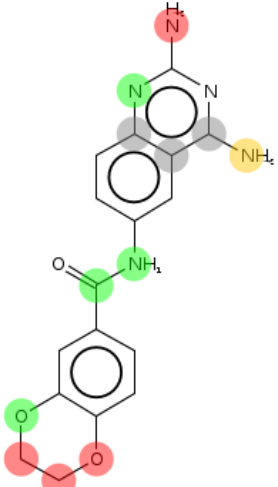
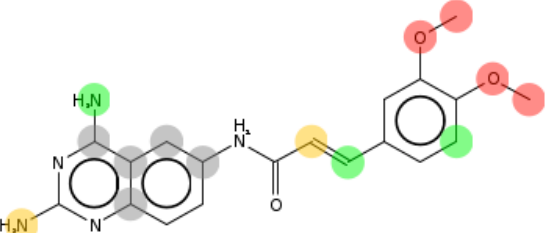
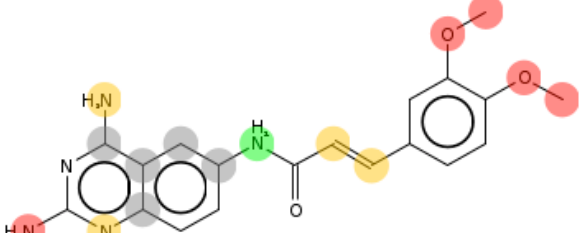
MetaPrint estima una mayor probabilidad de ciertos sitios en la molécula para sufrir reacciones de metabolismo de fase I, y MetaPrint-2D estima la probabilidad de los sitios de la molécula de sufrir reacciones de metabolismo de cualquier tipo, y estima el metabolito que se podría formar.

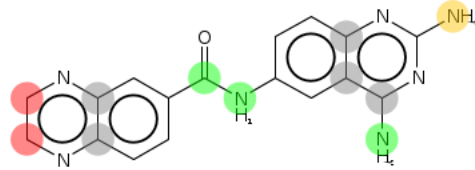
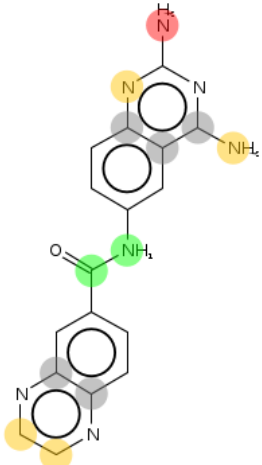
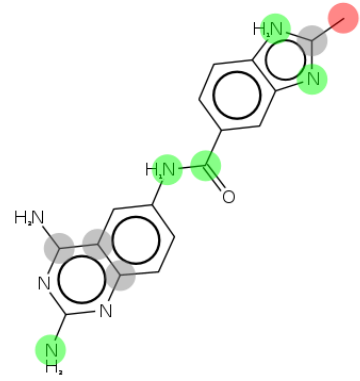
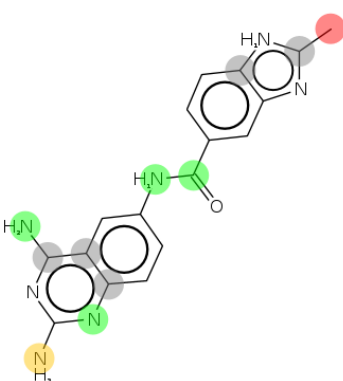
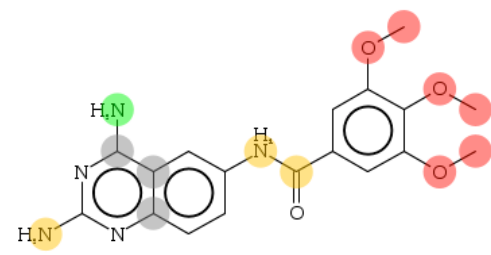
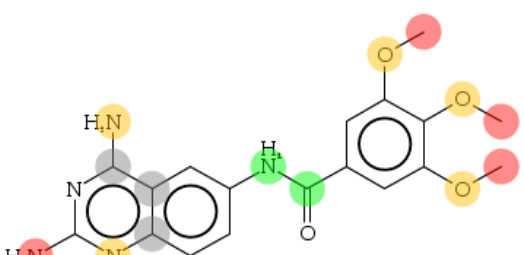
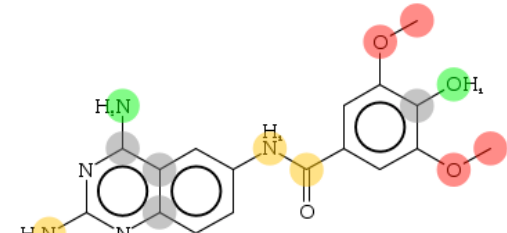
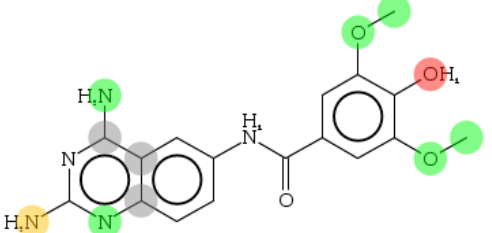
Esto implica que la predicción de metabolitos no considera que toda la molécula sea metabolizada, sino únicamente un sitio, y con ello, la probabilidad de que se produzcan otros metabolitos es posible, sin embargo, proporciona información importante para hacer ajustes en el diseño de fármacos.

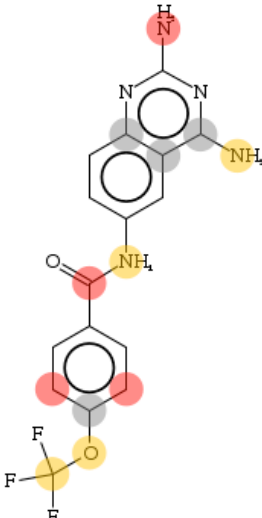
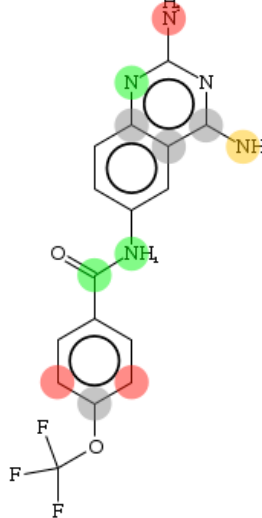
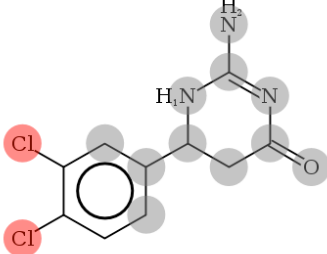
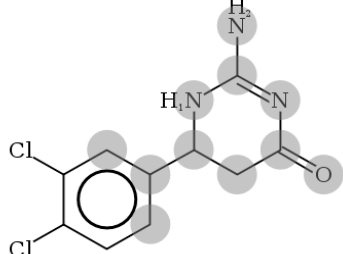
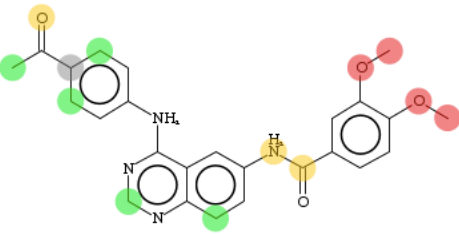
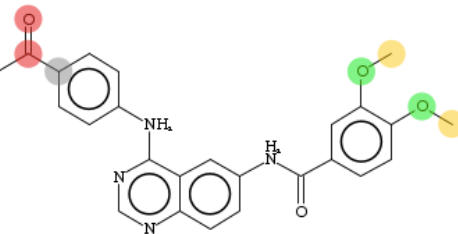
Tabla 1. Probabilidad de que las reacciones especificadas ocurran en el metabolismo, con base a NOR

Rojo	0.66 <= NOR <= 1.00
Naranja	0.33 <= NOR < 0.66
Verde	0.15 <= NOR < 0.33
Blanco	0.00 <= NOR < 0.15
Gris	Muy pequeña/Sin datos para realizar predicción

Tabla 2. Probabilidad de que las reacciones especificadas ocurran en el metabolismo, con base a NOR

Molécula	Predicción de sitios susceptibles de metabolismo de fase I mediante METAPRINT2D	Predicción de sitios de reacción de metabolismo mediante METAPRINT2D-React
B1	 <p>Chemical structure of B1 (4-(aminomethyl)-2-aminoquinoline-3-carboxamide) with predicted metabolic sites highlighted in green (aromatic ring, amide nitrogen, amine nitrogen) and yellow (amide carbonyl).</p>	 <p>Chemical structure of B1 with predicted reaction sites highlighted in red (amide carbonyl, amine nitrogen) and yellow (aromatic ring).</p>
B2	 <p>Chemical structure of B2 (4-(aminomethyl)-2-aminoquinoline-3-carboxamide) with predicted metabolic sites highlighted in green (aromatic ring, amide nitrogen, amine nitrogen) and yellow (amide carbonyl).</p>	 <p>Chemical structure of B2 with predicted reaction sites highlighted in red (amide carbonyl, amine nitrogen) and yellow (aromatic ring).</p>
B3	 <p>Chemical structure of B3 (4-(aminomethyl)-2-aminoquinoline-3-carboxamide) with predicted metabolic sites highlighted in green (aromatic ring, amide nitrogen, amine nitrogen) and yellow (amide carbonyl).</p>	 <p>Chemical structure of B3 with predicted reaction sites highlighted in red (amide carbonyl, amine nitrogen) and yellow (aromatic ring).</p>
B5	 <p>Chemical structure of B5 (4-(aminomethyl)-2-aminoquinoline-3-carboxamide) with predicted metabolic sites highlighted in green (aromatic ring, amide nitrogen, amine nitrogen) and yellow (amide carbonyl).</p>	 <p>Chemical structure of B5 with predicted reaction sites highlighted in red (amide carbonyl, amine nitrogen) and yellow (aromatic ring).</p>

<p>B7</p>		
<p>B8</p>		
<p>B11</p>		
<p>B13</p>		

B14		
MG12		
E11		
E31	