



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS ENTRE DERIVADOS DE
QUINAZOLINA Y ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS COMO
AGENTES CITOTÓXICOS: SÍNTESIS, EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y
ACOPLAMIENTO MOLECULAR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIOLÓGICO

P R E S E N T A:

LUIS ROBERTO GARDUÑO VILLAVICENCIO



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	PROFESOR: BLAS FLORES PÉREZ
VOCAL:	PROFESOR: FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
SECRETARIO:	PROFESOR: HÉCTOR GARCÍA ORTEGA
1ER. SUPLENTE:	PROFESOR: JOSÉ LUIS MEDINA FRANCO
2DO. SUPLENTE:	PROFESOR: ANTONIO ELIAS KURI PINEDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 121, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

SUSTENTANTE: LUIS ROBERTO GARDUÑO VILLAVICENCIO

ASESOR DE TESIS: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

ASESOR TÉCNICO: M. en C. AUDIFAS SALVADOR MATUS MEZA



Agradecimientos institucionales

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la que me siento orgulloso de pertenecer. Gracias a todos los profesores que me formaron a lo largo de mi bachillerato y licenciatura. Por ser además de la institución de la que obtuve la mejor educación, mi segundo hogar.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones al presente trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación al mejoramiento de mi tesis.

Expreso mi agradecimiento a la Dirección General del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por la beca otorgada para la realización de esta tesis dentro del proyecto PAPIIT-IN213914.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado en la compra de materiales y reactivos para la realización de los experimentos realizados en este trabajo con el proyecto CB-CONACyT 220664.

A la Facultad de Química por el apoyo otorgado para el financiamiento de los ensayos in vitro en líneas celulares, a cargo de la M. en C. Teresa Ramírez Apán del Instituto de Química, y por el apoyo en la compra y reparación de material de vidriería y pago del registro de espectros de RMN, EM e IR, dentro del programa PAIP 5000 9136.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de RMN (Rosa Isela del Villar Morales) y Espectroscopia IR (Marisela Patricia Gutiérrez Franco).

Al departamento de EM del Instituto de Química, por el registro y elaboración de los espectros.





Índice general

Índice de abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Definición y epidemiología.....	2
2.2 Patología.....	2
2.3 Tratamiento.....	5
2.4 Diseño de híbridos.....	8
2.5 Pruebas biológicas.....	8
2.5.1 Ensayos sobre líneas celulares.....	8
2.5.2 Evaluación de la enzima LDH.....	9
2.5.3 Prueba de Ames.....	10
3. Planteamiento del problema	11
4. Hipótesis	12
5. Objetivo general	13
5.1 Objetivos particulares.....	13
6. Metodología	14
6.1 Síntesis.....	14
6.1.1 Síntesis del compuesto 8 : 2,4-diamino-6-nitroquinazolina.....	15





6.1.2 Síntesis del compuesto 12 : 1-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-2-(4-isobutilfenil)propan-1-ona.....	15
6.1.3 Síntesis del compuesto 17 : <i>N</i> -(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida.....	16
6.1.4 Síntesis del compuesto 18 : 1-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propan-1-ona.....	16
6.1.5 Síntesis del compuesto 19 : <i>N</i> -(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida.....	17
6.1.6 Síntesis del compuesto 20 : <i>N</i> -(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida.....	17
6.1.7 Síntesis del compuesto 21 : <i>N</i> -(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida.....	18
6.2 Evaluación biológica.....	18
6.2.1 Determinación de mutágenos ambientales a través de la prueba de Ames.....	18
6.2.2 Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en líneas celulares tumorales.....	19
6.2.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	20
6.2.4 Determinación de la IC ₅₀ en líneas celulares cancerosas humanas...20	
6.3 Acoplamiento molecular.....	21
6.3.1 Ligando.....	21
6.3.2 Macromoléculas.....	21
6.3.3 Docking.....	22
7. Resultados y análisis.....	23
7.1 Síntesis.....	23





7.1.1 Parte química.....	25
7.1.2 Caracterización espectroscópica y espectrométrica.....	25
7.2 Evaluación biológica.....	31
7.2.1 Determinación de mutágenos ambientales a través de la prueba de Ames.....	31
7.2.2. Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en líneas celulares tumorales.....	32
7.2.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	34
7.2.4 Determinación de la IC ₅₀ en líneas celulares cancerosas humanas...	36
7.3 Acoplamiento molecular.....	37
7.3.1 VEGFR.....	38
7.3.2 COX-2.....	39
8. Conclusiones.....	41
9. Referencias bibliográficas.....	42
Apéndice.....	44
ANEXO I.....	45
ANEXO II.....	57
ANEXO III.....	78





Índice de abreviaturas

AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ccf	Cromatografía en capa fina
COX-2	Ciclooxigenasa subtipo 2
ClogP	Constante de logaritmo de partición
δ	Desplazamiento químico
ΔG	Energía libre de Gibbs o energía de unión
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EM-DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real
EEM	Error estándar de la media
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
IR-ATR	Infrarrojo por refractancia total atenuada
LDH	Lactato deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucléotido de hidrógeno
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser
PDB	Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SRB	Sulforrodamina B
VEGFR	Receptor del factor crecimiento vascular epitelial





Índice de figuras

Figura 1. Progresión de un proceso cancerígeno.....	3
Figura 2. Caja del cáncer.....	4
Figura 3. Generación y eliminación de células cancerígenas.....	5
Figura 4. Estructura del gefitinib (izquierda) y erlotinib (derecha).....	6
Figura 5. Estructura del núcleo de quinazolina.....	6
Figura 6. Reacción llevada a cabo por la LDH.....	10
Figura 7. Ruta sintética para la preparación de los compuestos híbridos.....	14
Figura 8. Formación del compuesto 8	15
Figura 9. Formación del compuesto 12	15
Figura 10. Formación del compuesto 17	16
Figura 11. Formación del compuesto 18	16
Figura 12. Formación del compuesto 19	17
Figura 13. Formación del compuesto 20	17
Figura 14. Formación del compuesto 21	18
Figura 15. Espectros de NOESY de los compuestos 19 y 21	30
Figura 16. Docking entre el compuesto 20 y el receptor VEGFR visualizado en PyMOL.....	39
Figura 17. Docking entre el compuesto 19 y la enzima COX-2 visualizado en PyMOL.....	40
Figura 18. Forma de colocar todos los materiales en el área de trabajo.....	51
Figura 19. Diluciones realizadas de los compuestos para la prueba de Ames.....	53
Figura 20. Diluciones realizadas de los compuestos para la prueba de LDH.....	56
Figura 21. Docking entre el compuesto 17 y el receptor VEGFR.....	79
Figura 22. Docking entre el compuesto 19 y el receptor VEGFR.....	79
Figura 23. Docking entre el compuesto 20 y el receptor VEGFR.....	80
Figura 24. Docking entre el compuesto 21 y el receptor VEGFR.....	80
Figura 25. Docking entre el compuesto 17 y la enzima COX-2.....	81
Figura 26. Docking entre el compuesto 19 y la enzima COX-2.....	81
Figura 27. Docking entre el compuesto 20 y la enzima COX-2.....	82
Figura 28. Docking entre el compuesto 21 y la enzima COX-2.....	82





Índice de tablas

Tabla 1. Reglas empíricas usadas para el diseño de fármacos.....	8
Tabla 2. Líneas celulares utilizadas.....	9
Tabla 3. Caracterización física de las moléculas sintetizadas.....	25
Tabla 4. Datos de caracterización de los compuestos sintetizados.....	26
Tabla 5. Número de colonias en la prueba de Ames.....	31
Tabla 6. Absorbancias de los tratamientos en la determinación de LDH libre.....	32
Tabla 7. Porcentaje de citotoxicidad de los compuestos evaluados.....	33
Tabla 8. Datos de la t-Student para la comparación de tratamientos.....	33
Tabla 9. Valores de inhibición celular de los compuestos evaluados.....	35
Tabla 10. Valores de IC ₅₀ de los compuestos evaluados.....	36
Tabla 11. Energía libre de unión y posibles interacciones con el VEGFR.....	38
Tabla 12. Energía libre de unión y posibles interacciones con la COX-2.....	39
Tabla 13. Reactivos para la prueba de Ames con la cepa TA 98.....	52
Tabla 14. Cantidad de compuesto pesado para preparar las diluciones en la prueba de Ames.....	53
Tabla 15. Tratamientos realizados en tubos Eppendorf.....	54
Tabla 16. Tratamientos realizados en la caja de 96 pozos.....	55
Tabla 17. Cantidad de compuesto pesado en la prueba de LDH.....	55





1. Introducción

El cáncer es una de las enfermedades con mayor recurrencia a nivel mundial y es causante de un gran número de muertes cada año, por lo que existe una constante necesidad de buscar nuevos tratamientos contra este padecimiento, ya que con los que se cuenta en la actualidad presentan un sinfín de contrariedades como la toxicidad, una pobre biodisponibilidad o la baja especificidad, entre otras.

Hanahan y Weinber, definen de manera concreta al cáncer como “*un conjunto de enfermedades caracterizadas por un desequilibrio entre la división y muerte celular*”.^[1] De acuerdo con esto, la quimioterapia se ha enfocado en la creación de nuevas moléculas dirigidas a los procesos de regulación celular.

Entre los fármacos usados en la clínica, se encuentran el erlotinib y el gefitinib, que tienen como principal inconveniente la toxicidad que acompaña al tratamiento. Estos compuestos presentan en su estructura el núcleo de quinazolina, quien interactúa con el receptor del factor de crecimiento vascular epidermal (VEGFR), que está directamente relacionado con las proteínas de tirosina cinasa, que participan en los procesos de regulación de las células.

Se sabe además, que en la generación de un proceso cancerígeno existe inflamación de la zona afectada, es por ello que diversos grupos de investigación han utilizado a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) como agentes quimiopreventivos, ya que estos compuestos inhiben a la enzima ciclooxigenasa (COX), encargada de la síntesis de prostaglandinas, que son las iniciadoras del proceso inflamatorio.

En ese contexto se ubica el presente trabajo de tesis, cuyo objetivo es la síntesis de híbridos integrados por derivados de quinazolina y antiinflamatorios no esteroideos, así como su evaluación biológica en líneas celulares y el estudio de acoplamiento molecular con dianas biológicas que participan en el desarrollo del cáncer.





2. Marco teórico

2.1 Definición y epidemiología

El cáncer es un padecimiento muy complejo, que engloba alrededor de 200 enfermedades. Asimismo, la manera en que se presenta y desarrolla de un paciente a otro es muy variable. Esta variabilidad se presenta tanto a niveles celulares como moleculares.^[2]

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad; en 2012 hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes, además se prevé que el número de casos aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En términos generales, el cáncer se caracteriza por ser un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células que suelen invadir el tejido circundante, proceso conocido como metástasis.^[2]

En 2012, los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado; mientras que en la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.^[3]

Se ha determinado que cinco factores influyen en aproximadamente el 30% de riesgo de presentar este padecimiento; estos factores son: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y de alcohol.^[3]

2.2 Patología

De manera general, el proceso cancerígeno se ilustra en la **Figura 1**^[2], donde se muestran los procesos alterados por factores de riesgo generando células tumorales. El grado de exposición a los agentes generadores de cáncer que tenga el organismo juega un papel muy importante, ya que una dosis por debajo de la necesaria no formarían células malignas.



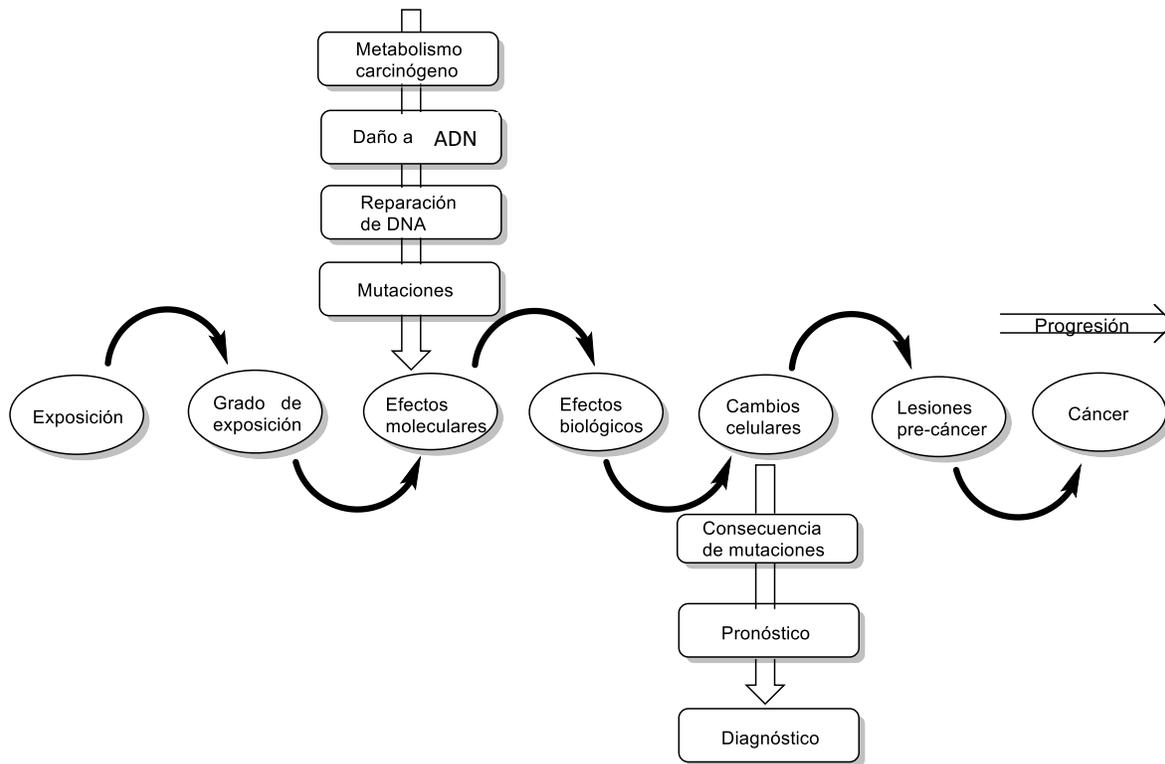


Figura 1. Progresión de un proceso cancerígeno.

A pesar de la diversidad que existe en los procesos cancerígenos, las células operan en esquemas comunes que conducen a los procesos básicos que controlan la proliferación y muerte celular. Como resultado del cáncer, una serie de oncogenes y genes supresores tumorales se alteran con frecuencia, independientemente del sitio del órgano que esté siendo afectado o la causa de la enfermedad. Los productos de estos genes son parte de una red que de manera sincronizada trabajan para controlar la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. La **Figura 2** muestra un esbozo de lo que se define como “la caja del cáncer”, es decir, la red principal de genes y mecanismos que se ven alterados en cualquier proceso de generación de una célula cancerígena. Esta caja implica tres procesos principales de señalización; dos de ellos son promotores del crecimiento (A, B) y el otro de supresión de crecimiento (C).^[2]



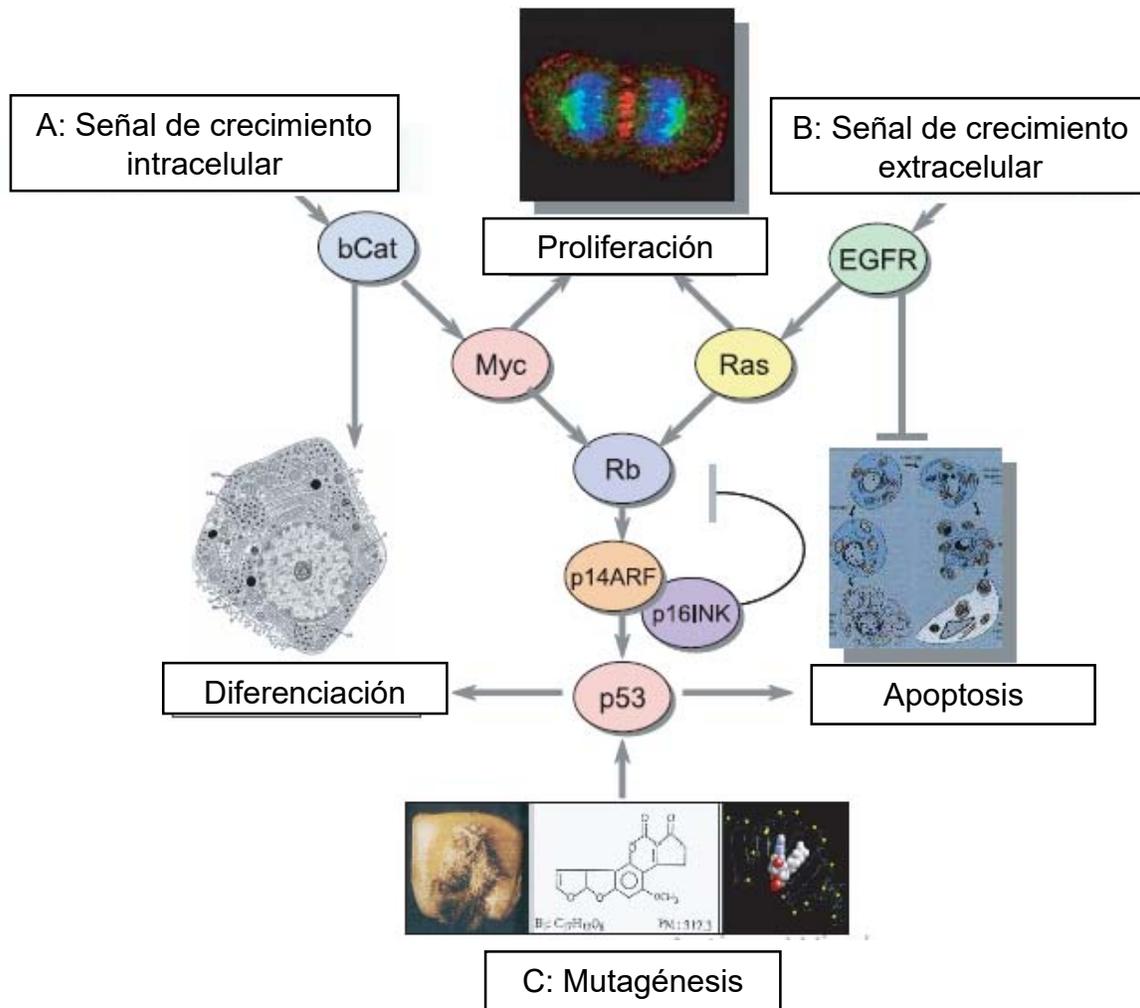


Figura 2. Caja del cáncer.

El proceso tumoral se caracteriza por el daño al material genético del organismo, aunque esto de cierta manera es algo que ocurre en una gran cantidad de células de manera normal. Sin embargo, cuando los mecanismos de reparación del ADN fallan, el número de células dañadas se incrementa, comenzando la formación de tumores en zonas localizadas.

En la **Figura 3**^[4] se ejemplifica el proceso de generación de células tumorales en una terapia citotóxica.



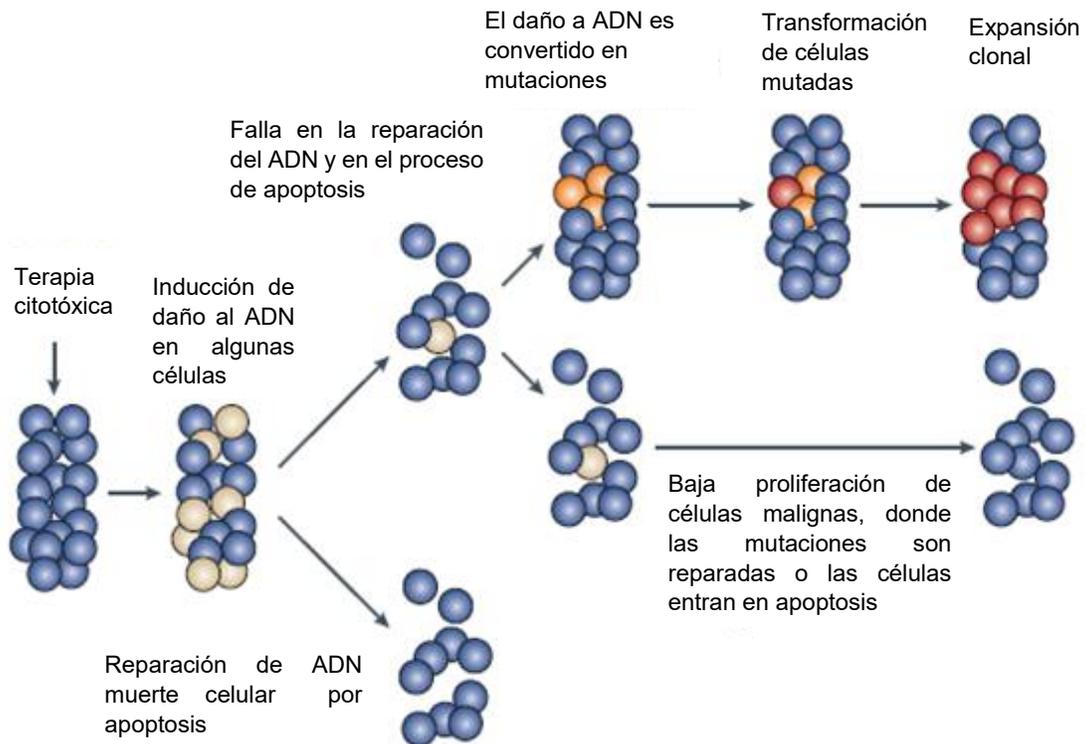


Figura 3. Generación y eliminación de células cancerígenas.

2.3 Tratamiento

Existen diversos tipos de tratamiento contra el cáncer como la radioterapia, cirugía o quimioterapia, siendo esta última la de primera elección en etapas iniciales de un proceso cancerígeno.^[5] Paul Ehrlich fue quien acuñó el término “quimioterapia”, la cual definió como el uso de productos químicos para tratar algún padecimiento.^[6]

Dentro de la quimioterapia del cáncer, existen tres grandes tipos de fármacos que actúan a diferentes niveles en el material genético ^[7]:

1. Alquilantes de ADN
2. De ruptura de hélices de ADN
3. De unión reversible a ADN



Dentro de los agentes de unión reversible al ADN, existe un grupo de fármacos que son inhibidores del VEGFR TK y contienen el núcleo de quinazolina en su estructura, como lo son el gefitinib y el erlotinib (**Figura 4**), los cuáles son utilizados como adyuvantes en la terapia contra el cáncer en combinación con otros compuestos alquilantes y/o radiación.^[8]

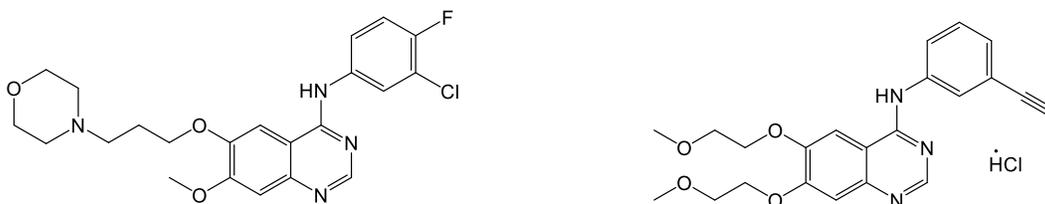


Figura 4. Estructura del gefitinib (izquierda) y erlotinib (derecha).

El diseño de derivados de quinazolina ha atraído la atención de diversos grupos de investigación, debido a su accesible método de síntesis, a la diversa reactividad química en su estructura y a la actividad biológica como por ejemplo, antiinflamatoria, antimalaria, antihelmíntica, como relajantes musculares, antihiperlipidémica, antituberculosa, antimicrobiana y antihipertensiva. La maleabilidad en el núcleo de quinazolina (**Figura 5**) por tanto, ha conducido a la síntesis de una gran variedad de análogos.^[9]

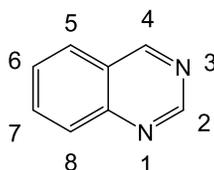


Figura 5. Estructura del núcleo de quinazolina.

Se sabe que las cinasas catalizan la fosforilación de las proteínas y son un mecanismo de regulación celular, el cual frecuentemente se desregulariza en enfermedades humanas. Se ha descubierto que estas enzimas están estrechamente relacionadas a diversos padecimientos, incluyendo el cáncer, desordenes neurodegenerativos y en enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, estas proteínas representan blancos potenciales en la búsqueda y descubrimiento de inhibidores de estas, que sean usados como nuevos agentes terapéuticos.^[10]





En años recientes, la quinazolina ha surgido como un modelo muy versátil en la inhibición de diversos receptores de tipo tirosina cinasa. El más estudiado actualmente es el receptor VEGFR, que se encuentra cristalizado con la molécula de gefitinib, la cual fue el primer agente aprobado en el tratamiento contra el cáncer de hígado.^[11]

También se sabe que la inflamación es un componente vital en la generación de tumores, varios estudios apoyan el hecho de que en la iniciación y progresión del tumor existe una irritación crónica, infección e inflamación en el sitio dañado. Un microambiente inflamatorio obstruye las redes de señalización de moléculas y células antiinflamatorias que son cruciales en el crecimiento de células tumorales.^[12]

Existe una clase de compuestos que son los AINE's, los cuales proporcionan efectos analgésico y antipirético, y en grandes dosis pueden mostrar efecto antiinflamatorio. La importancia de los AINE's en la reducción del riesgo de cáncer ha surgido en años recientes por lo mostrado en estudios preclínicos y clínicos. Estos compuestos también controlan un número de señales de transducción que pueden afectar la proliferación, respuesta inmune, diferenciación celular, muerte celular programada, angiogénesis, adhesión celular e invasión tumoral.^[13]

En 1988, un estudio por Kune *et al.*, mostró una considerable disminución en la incidencia de cáncer de colon en pacientes que usaban AINE's por diversas indicaciones clínicas, surgiendo una nueva era en la prevención del cáncer. Estas moléculas son agentes quimiopreventivos en el cáncer de colon e inhibidores de la enzima COX-2, que cataliza principalmente la síntesis de prostaglandinas, que como principal efecto tienen la generación de la inflamación.^[14]

Un hecho apoyado por varias evidencias epidemiológicas, que tienen como punto de conexión la inflamación y una predisposición en la progresión del cáncer, muestran que la inflamación a largo plazo conduce al desarrollo de células cancerígenas.^[15]





2.4 Diseño de híbridos

Diversos grupos químicos en el núcleo de quinazolina han sido descritos como esenciales para la unión con el VEGFR. De estos estudios se ha derivado que el anillo de pirimidina y un grupo NH₂ libre mejoran la actividad biológica del compuesto. También la incorporación de una anilina en la posición 4 y de sustituyentes de carácter electrodonador en posición 6 y 7 de la quinazolina, resultarían favorables para la actividad.^[16]

De acuerdo a lo anterior, el diseño de las moléculas finales de este trabajo de tesis se basó en algunas de las características antes mencionadas, además de las reglas empíricas de Lipinski y Verber para fármacos que se absorben por difusión pasiva. Estas dos reglas empíricas se enuncian en la **Tabla 1**.^[17]

Tabla 1. Reglas empíricas usadas para el diseño de fármacos.

Reglas de Lipinski	Reglas de Verber
<ul style="list-style-type: none">- Peso molecular menor a 500 Da- No más de 5 átomos donadores de enlace con hidrógeno- No más de 10 átomos aceptores de enlaces con hidrógeno- Un ClogP menor a 5	<ul style="list-style-type: none">- No más de 10 enlaces rotables- Un área polar superficial menor a 140 Å²- Total de donadores y aceptores de enlaces con hidrógeno menor a 12

2.5 Pruebas biológicas

2.5.1 Ensayos sobre líneas celulares

Los ensayos biológicos *in vitro* de los híbridos sintetizados se realizaron en líneas celulares tumorales y una línea primaria.

A continuación se presenta una descripción breve de las características de cada una de ellas, así como de donde provienen.^[18]



**Tabla 2.** Líneas celulares utilizadas

Línea celular	Organismo del que proviene	Tipo de tejido	Enfermedad
FGH	<i>Homo sapiens</i> , humano	Fibroblasto gingival	Cultivo de célula primaria
MCF-7	<i>Homo sapiens</i> , humano	Glándula mamaria	Adenocarcinoma
PC-3	<i>Homo sapiens</i> , humano	Próstata	Adenocarcinoma grado IV
HCT-15	<i>Homo sapiens</i> , humano	Colon	Adenocarcinoma colorectal
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i> , humano	Glándula mamaria	Adenocarcinoma

La determinación del porcentaje de inhibición celular o de CI_{50} se realizó mediante el método de Sulforrodamina B (SRB). Este ensayo es usado para determinar la densidad celular de un cultivo. Se basa en la medición del contenido de proteína por número de células viables. La SRB se une a aminoácidos con carácter básico de células que han sido fijadas a una superficie en presencia de ácido tricloroacético. La cantidad de coloración rosa es directamente proporcional al número de células viables. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 510-515 nm.^[19]

2.5.2 Evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática soluble, la cual está presente en un gran número de células de los organismos. Se libera al espacio extracelular cuando existe una ruptura en la membrana de las células. Para detectar la liberación de esta enzima al medio, se utilizan ensayos que involucran una sal de tetrazolio.





Como primer paso, la LDH reduce al NAD^+ y cataliza la oxidación de lactato a piruvato. En un segundo paso, la sal de tetrazolio es transformada en un producto colorido, el formazano, usando al NADH producido anteriormente en presencia de un aceptor de electrones. La cantidad de formazano, puede ser cuantificado coloriméticamente mediante espectroscopia estándar. La linealidad del ensayo, puede ser usada para determinar el porcentaje de células dañadas.^{[20][21]}

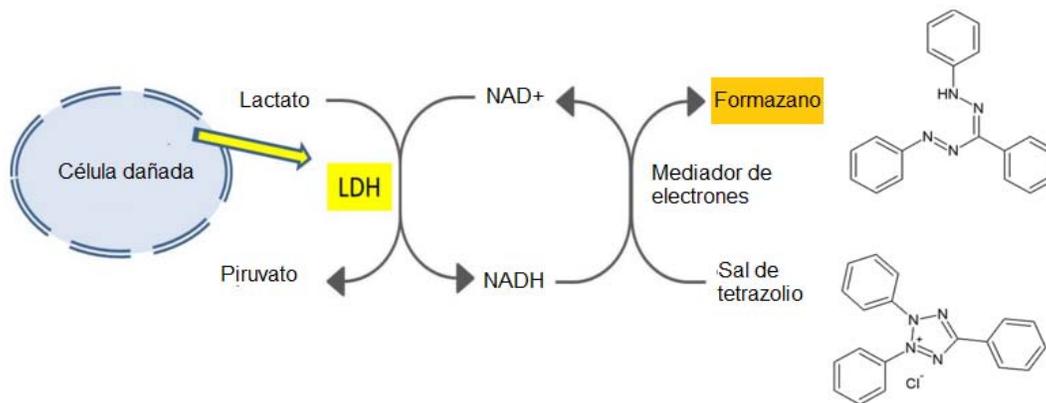


Figura 6. Reacción llevada a cabo por la LDH.

2.5.3 Prueba de Ames

En este ensayo se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium*, que tienen como características el requerimiento de histidina (His (-)), sensibilidad al cristal violeta (mutación en *rfa*), presencia del plásmido R (resistencia a ampicilina), sensibilidad a la luz UV (mutación en *uvrB*) y frecuencia de reversión espontánea.

Para que las colonias bacterianas crezcan en medio mínimo en presencia de la fracción microsomal S9 y del compuesto, requieren de la biotransformación de este para que sea llevada a cabo la mutación del microorganismo. Si crecen en el medio mínimo sin fracción S9, esto indica que no se requiere de biotransformación, es decir, que el compuesto por sí mismo es mutágeno. Y en el caso de que no haya crecimiento bacteriano, es indicio de que el compuesto no fue mutagénico, ya que no propició el cambio de fenotipo de la cepa, devolviéndola a su estado primitivo.^[22]





3. Planteamiento del problema

El cáncer es un conjunto de aproximadamente 200 enfermedades englobadas en la patología de este, el cual afecta a un gran número de personas alrededor de todo el mundo.

Existen diversos factores que pueden propiciar su desarrollo, de los cuales un gran número no son controlables.

En México y Estados Unidos, uno de los tipos más comunes de cáncer es el de colon, que se caracteriza por la inflamación en la zona afectada, antes de que ocurra la metástasis y diseminación de las células tumorales.

El tratamiento del cáncer involucra diversos métodos como radioterapia, la cirugía y quimioterapia, siendo este último el de primera elección en etapas tempranas de la enfermedad.

Actualmente existen diversos fármacos usados en la clínica, que tienen como inconveniente la baja especificidad por las células dañadas, una pobre biodisponibilidad, un elevado índice de toxicidad y por lo tanto una serie de efectos adversos.

Dicho lo anterior, se planteó la siguiente interrogante, ¿si se sintetizan moléculas híbridas con una porción citotóxica y otra antiinflamatoria se mantendrá el efecto antitumoral de los compuestos obtenidos y se observarán valores predictivos de actividad biológica con el acoplamiento molecular?





4. Hipótesis

Al evaluar de manera *in vitro* los compuestos sintetizados entre un derivado de quinazolina y un antiinflamatorio no esteroideo, presentarán un efecto citotóxico en algunos tipos de líneas celulares cancerígenas. Así mismo, el acoplamiento molecular mostrará los enlaces de estos híbridos y las dianas biológicas con la que interaccionan sus componentes.





5. Objetivo general

- Sintetizar híbridos entre un derivado de quinazolina y un antiinflamatorio no esteroideo para evaluar actividad citotóxica y realizar su acoplamiento molecular sobre dos dianas farmacológicas.

5. 1 Objetivos particulares

- Diseñar compuestos híbridos con derivados de quinazolina y antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) como agentes citotóxicos.
- Realizar la síntesis de 4 nuevos híbridos entre un derivado de quinazolina y un AINE.
- Caracterizar físicamente intermediarios y productos finales sintetizados.
- Realizar la caracterización espectroscópica y espectrométrica de los híbridos finales.
- Realizar la evaluación biológica de forma *in vitro*: prueba de Ames y determinación de LDH.
- Enviar las moléculas híbridas a evaluación biológica en 4 líneas celulares tumorales PC-3, HCT-15, MCF-7, MDA MB-231 y la línea primaria FGH, con el fin de obtener el porcentaje de inhibición celular.
- Enviar los derivados finales a evaluación biológica sobre las líneas celulares MCF-7, PC-3, HCT-15, MDA MB-231 para determinar la IC₅₀.
- Realizar el acoplamiento molecular de los compuestos híbridos sobre VEGFR y COX-2.





6. Metodología

6. 1 Síntesis

Para la obtención de los 4 derivados finales, se siguió la ruta sintética descrita a continuación.

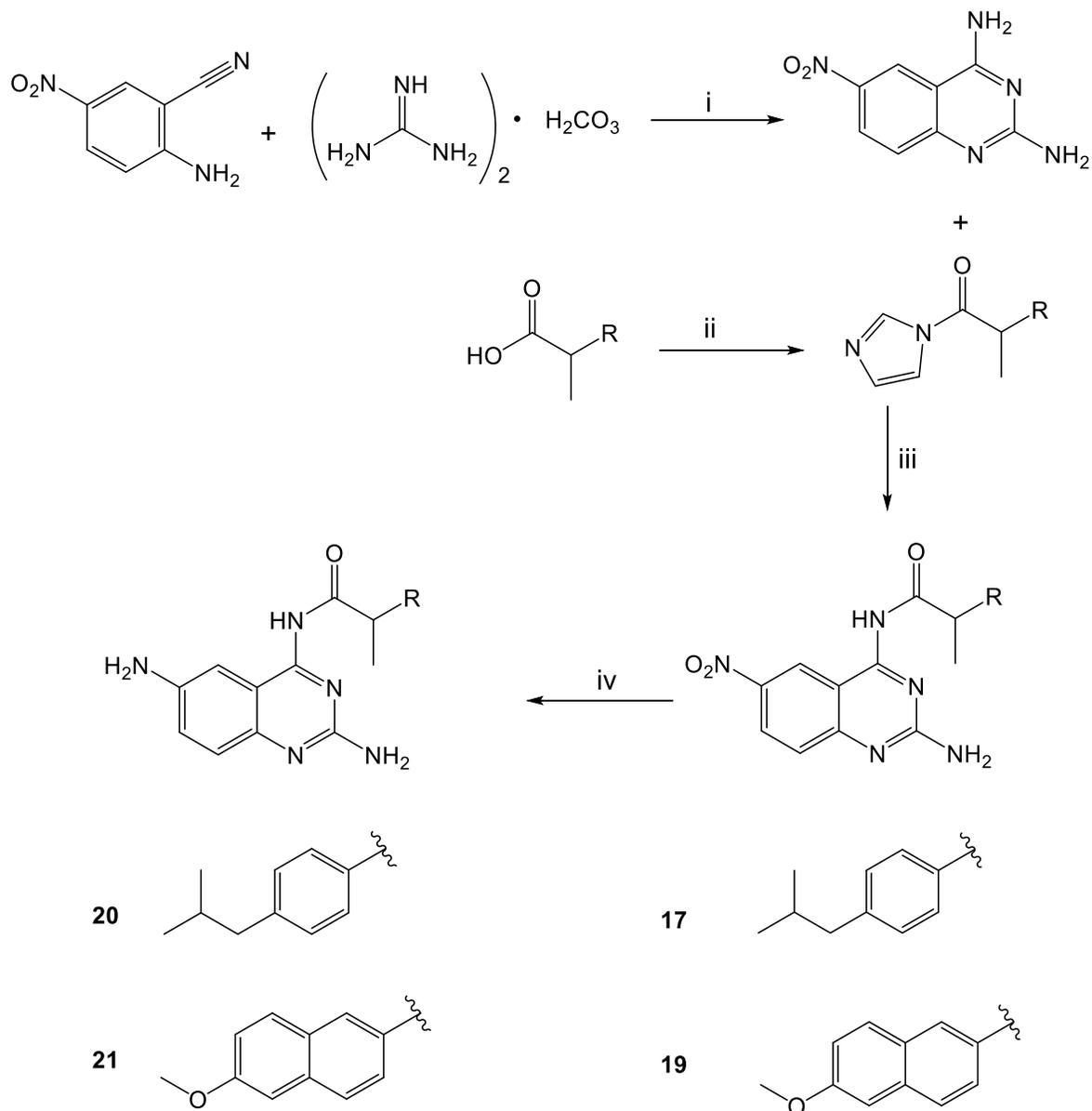


Figura 7. Ruta sintética para la preparación de los compuestos híbridos. i: KOH, EtOH/PrOH. ii: CDI, CHCl_3 . iii: DMF/ CHCl_3 . iv: H_2 , [Pd/C] 10%, MeOH.





La síntesis de cada uno de los intermediarios y productos finales se describe a continuación.

6.1.1 Síntesis del compuesto **8**: 2,4-diamino-6-nitroquinazolina

Se hizo reaccionar 1.50 g (9.19 mmol) de **6** junto con 1.24 g (6.89 mmol) de **7** y 0.61 g (11.03 mmol) de KOH, en 38 mL de una mezcla 1:2 EtOH/PrOH. El sistema se colocó a 90°C, en agitación constante, bajo atmósfera de N₂.

Transcurridas 8 h el sólido se separó por filtración y se le hicieron lavados con H₂O/MeOH hasta alcanzar un filtrado de pH=7.

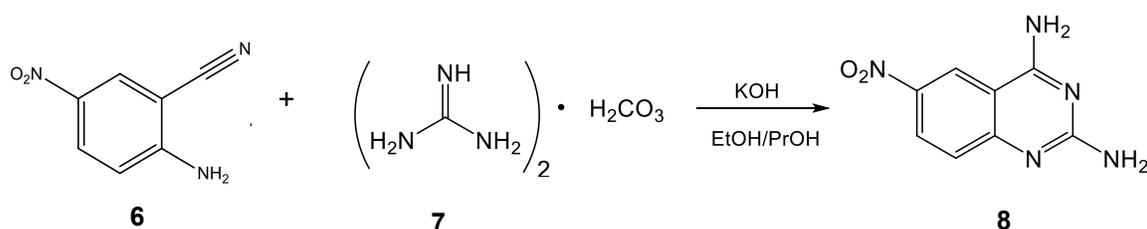


Figura 8. Formación del compuesto **8**.

6.1.2 Síntesis del compuesto **12**: 1-(1H-imidazol-1-il)-2-(4-isobutilfenil)propan-1-ona

Se mezcló 1.00 g (4.77 mmol) de **3** con 0.93 g (5.72 mmol) de CDI en 8 mL de CHCl₃.

El sistema se colocó en agitación constante, bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Después de 2 h se obtuvo el producto de reacción; éste no fue aislado.

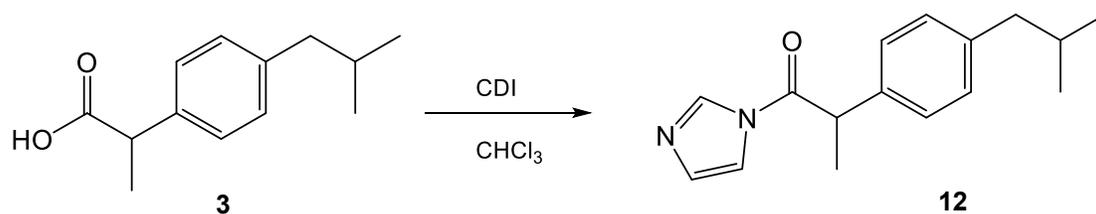


Figura 9. Formación del compuesto **12**.





6.1.3 Síntesis del compuesto **17**: *N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida

Se hizo a reaccionar 0.62 g (2.42 mmol) de **12** disueltos en 8 mL de CHCl_3 junto con 0.24 g (1.21 mmol) de **8** disueltos en 5 mL de DMF. La reacción se colocó a 100°C , en agitación constante y bajo atmósfera de N_2 . Después de 18 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se indujo la precipitación del compuesto con $(i\text{-Pr})_2\text{-O}$.

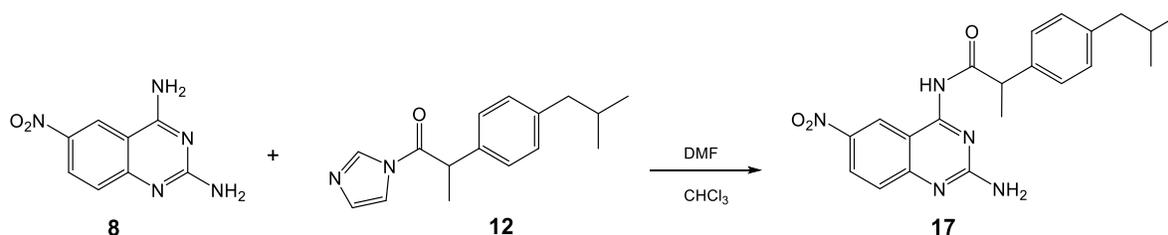


Figura 10. Formación del compuesto **17**.

6.1.4 Síntesis del compuesto **18**: 1-(1H-imidazol-1-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propan-1-ona

Se hicieron reaccionar 0.50 g (2.18 mmol) de **1**, 0.46 g (2.83 mmol) de CDI en 3 mL de CHCl_3 . La mezcla se colocó bajo atmósfera de N_2 , en agitación constante y a temperatura ambiente. La reacción terminó después de 4 h. El producto no fue aislado, haciéndolo reaccionar inmediatamente.

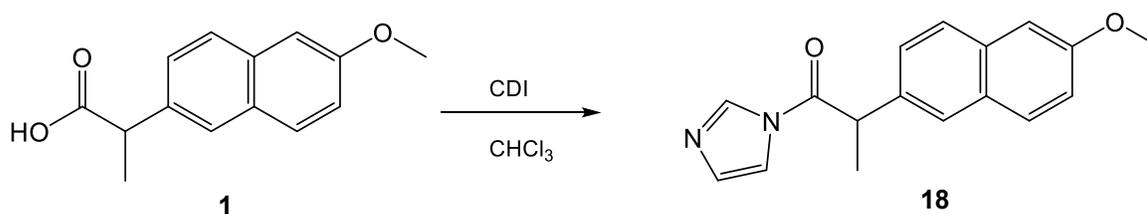


Figura 11. Formación del compuesto **18**.





6.1.5 Síntesis del compuesto **19**: *N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida

Se mezcló 0.61 g (2.18 mmol) de **18** ya disuelto en 3 mL de CHCl_3 con 0.22 g (1.09 mmol) de **8**, el cual se disolvió previamente en 3 mL de DMF. El sistema de reacción se colocó a 100°C , en agitación constante y atmósfera de N_2 . Pasadas 36 h, el producto se precipitó de acetona y el sólido obtenido se lavó con $(i\text{-Pr})_2\text{O}$.

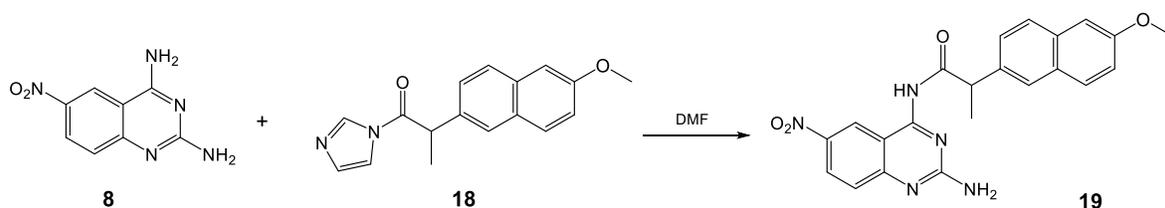


Figura 12. Formación del compuesto **19**.

6.1.6 Síntesis del compuesto **20**: *N*-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida

Empleando 0.21 g de **17** (5.26 mmol) se realizó una reducción catalítica con 0.02 g de Pd/C al 10% en presencia de 100 mL de MeOH. Pasados 25 min de reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se precipitó con $(i\text{-Pr})_2\text{O}$.

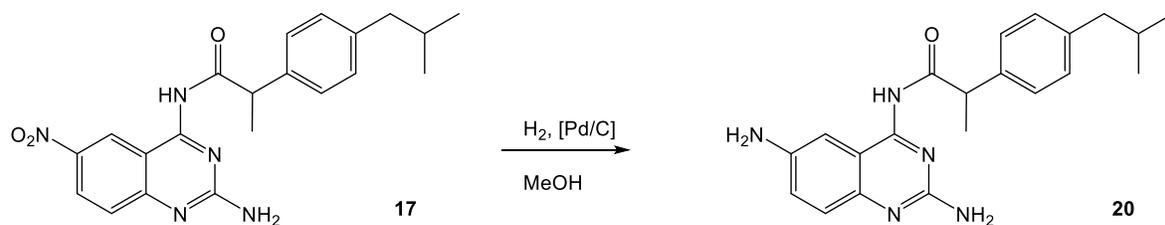


Figura 13. Formación del compuesto **20**.





6.1.7 Síntesis del compuesto **21**: *N*-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida

Se realizó una hidrogenación catalítica a 0.21 g (4.81 mmol) del compuesto **19** con 0.02 g de Pd/C al 10% y 130 mL de MeOH. Después de 35 min la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el sólido se precipitó con (*i*-Pr)₂O.

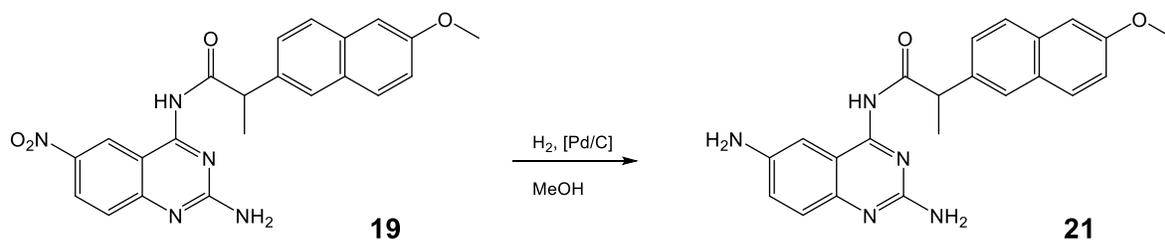


Figura 14. Formación del compuesto **21**.

6.2 Evaluación biológica

Los compuestos finales se evaluaron en 4 ensayos *in vitro*, dos de éstos fueron realizados por parte del sustentante y dos se enviaron a realizar al Instituto de Química. En el **Anexo I** se indica de manera detallada la metodología de dos pruebas biológicas.

6.2.1 Determinación de actividad mutagénica a través de la prueba de Ames

Se realizó el ensayo en el laboratorio 1-E/F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para el ensayo se evaluaron los compuestos **17**, **19**, **20** y **21** a una concentración de 20 μM . No se utilizó un control positivo debido a la dificultad de la adquisición y costo del mismo.





Los derivados se colocaron de manera individual, por duplicado, en cajas Petri, las cuáles contenían agar de superficie, con o sin mezcla S9 y fueron inoculadas con un cultivo de *Salmonella typhimurium* cepa TA 98 de manera como se indicada en la **Tabla 11** en **Anexo I**.

Las cajas se incubaron 48 h a 37°C y posteriormente a 4°C durante 7 días. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó el conteo de colonias revertantes espontáneas e inducidas.

Se considera un resultado positivo cuando el número de colonias revertantes inducidas es igual o superior al doble del número de colonias revertantes espontáneas.

6.2.2 Evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales

Se realizó el ensayo en el laboratorio 1-E/F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los compuestos se evaluaron sobre una línea celular tumoral de origen humano HL-60 (leucemia promielocítica aguda, subtipo M3) a una concentración de 10 µM, siendo el control positivo una disolución de lisis de Tritón X-100 en agua milli-Q.

En una caja de 48 pozos se colocaron los reactivos y las diluciones de los compuestos a evaluar como se indica en la **Tabla 13** del **Anexo I** y posteriormente se añadieron los reactivos de la **Tabla 14** del **Anexo I**.

La caja se incubó 20 min a 37°C y 5% de CO₂. Se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 562 nm.

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad de los compuestos, se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Absorbancia corregida del tratamiento}}{\text{Absorbancia corregida de A}} \times 100$$





Posteriormente, se realizó una prueba estadística t-Student para el tratamiento A contra el E, F, G, H e I a una cola y un intervalo de confianza del 90%, con el fin de determinar si existe una diferencia significativa como para considerar que el disolvente y los compuestos presentan una posible actividad citotóxica.

6.2.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

El ensayo se realizó en el laboratorio de pruebas biológicas LSA del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo de la M. en C Teresa Ramírez Apan.

La evaluación de los compuestos fue mediante el método de SRB sobre cuatro líneas cancerosas PC-3, HCT-15, MCF-7 y MDA-MB231, y en un cultivo primario de células sanas FGH, a 25 o 50 μM , según el caso, siendo solubilizados en DMSO y utilizando como control positivo el tamoxifeno. Cada ensayo se realizó por triplicado a una sola concentración, se incubó por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Al término de la incubación se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm y se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento \pm EEM.

6.2.4 Determinación de IC_{50} en líneas celulares cancerosas humanas

El ensayo se realizó en el laboratorio de pruebas biológicas LSA del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo de la M. en C Teresa Ramírez Apan.

La determinación de la IC_{50} de los derivados finales se realizó mediante el método de SRB en cuatro líneas tumorales PC-3, HCT-15, MCF-7 y MDA-MB-231, en un intervalo de concentraciones de 3 a 60 μM , solubilizándolos en DMSO y utilizando al tamoxifeno como control positivo.

Para obtener el valor de IC_{50} se realizaron curvas de concentración vs inhibición del crecimiento a tres o cuatro valores de manera independiente, cada ensayo se realizó una sola vez. Las células junto con los compuestos se incubaron por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 .





Al término de este periodo se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm obteniéndose el porcentaje de inhibición del crecimiento.

La determinación de $IC_{50} \pm EEM$ se realizó a través del método de mínimos cuadrados, donde la variable Y es el porcentaje de inhibición del crecimiento y la variable X la concentración del compuesto.

6. 3 *Acoplamiento molecular*

Se realizó el acoplamiento molecular de los compuestos **17**, **19**, **20** y **21** en dos dianas farmacológicas, COX-2 (PDB ID: 5F1A) y VEGFR (PDB ID: 1YWN), con el fin de calcular la magnitud de la afinidad y las interacciones presentes entre estos dos elementos, para así asociarlos con una posible actividad biológica.

6.3.1 *Ligando*

La optimización de la geometría de los compuestos se realizó en *Spartan Graphical User Interface v.10*, utilizando un modelo semiempírico tipo PM6 y fueron guardados en formato MOL2, asignando cargas electrostáticas. Usando AutoDockTools-1.5.6 se detectó la raíz de la estructura y se identificaron y visualizaron los enlaces rotables; la estructura del ligando se guardó en formato PDBQT.

6.3.2 *Macromolécula*

Las proteínas fueron obtenidas de PubChem y guardadas en archivo PDB. Mediante AutoDockTools-1.5.6 se retiraron hidrógenos polares, iones, las moléculas endógenas y se asignaron cargas Gasteiger; los archivos se guardaron en formato PDBQT.





6.3.3 Docking

Con el software AutoDockTools-1.5.6 se realizó el docking y el establecimiento del grid entre los ligandos y las macromoléculas.

Se consideraron todos los enlaces rotables para los ligandos y los de las macromoléculas rígidos. El tamaño del grid fue de 70x70x70 con un espacio de 0.375 Å.

Se empleó la función de energía empírica libre y un *Algoritmo Genético Lamarckiano* con un tamaño de población de 150, un número máximo de evaluaciones de 2500000, número de corridas de 10 y con número de generaciones de 27000. Se eligió la energía libre de unión (ΔG) con el valor más bajo del clúster de mayor número de conformaciones y el archivo se guardó en formato PDBQT.

Los resultados del docking se analizaron en PyMOL v.099 para observar posibles interacciones polares por puentes de hidrógeno.

Todos los estudios del acoplamiento molecular se procesaron en una computadora con sistema operativo Windows 8 y 4 Gb de memoria RAM.





7. Resultados y análisis

7.1 Síntesis

A continuación se muestra nuevamente el esquema de reacción de la formación de los intermediarios y los compuestos finales.

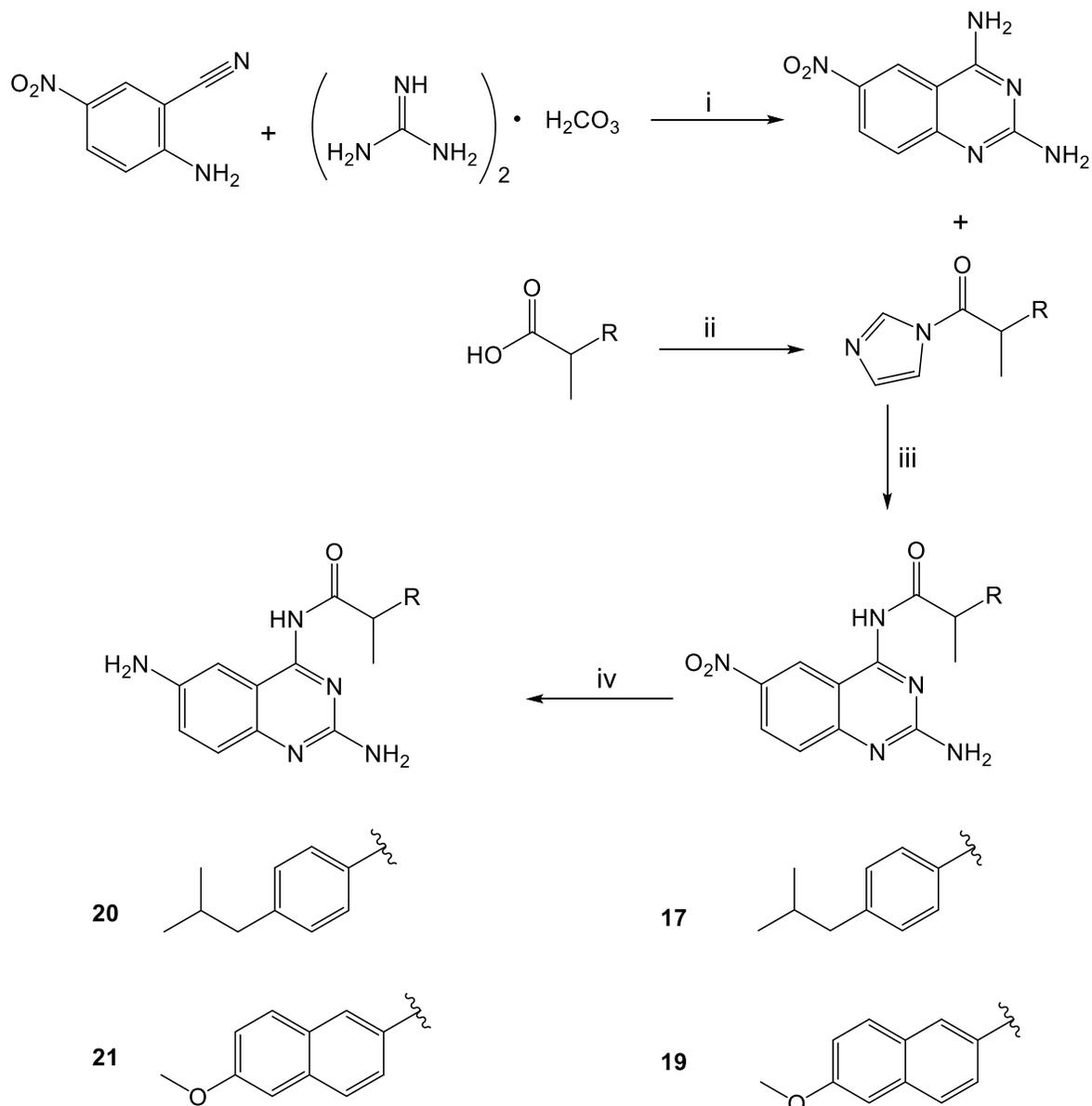


Figura 7. Ruta sintética para la preparación de los compuestos finales. i: KOH, EtOH/PrOH. ii: CDI, CHCl_3 . iii: DMF/ CHCl_3 . iv: H_2 , [Pd/C] 10%, MeOH.





Para la formación del derivado de quinazolina se utilizó una variación de la reacción de Niementowski.

La obtención de los intermediarios **12** y **18** se realizó mediante una reacción de adición/eliminación con CDI para formar el enlace amida con **8**; debido a que la baja reactividad del ácido carboxílico en los antiinflamatorios no esteroideos dificulta su unión con la amina correspondiente. Estos intermediarios además, no fueron aislados por la baja estabilidad de su estructura. Incluso se trató de mantener tanto la reacción como todo el material utilizado para su elaboración, lo menos húmedo posible y así evitar la regeneración del ácido carboxílico.

En la estructura **8** se observan de manera clara dos sitios reactivos, las aminas en posición 2 y 4 de la quinazolina, las cuales podrían reaccionar con el respectivo derivado imidazólico del antiinflamatorio no esteroideo. Sin embargo, se sabe que la formación del enlace amida se realizó en la posición 4, de acuerdo a los resultados observados en los espectros NOESY.

Los rendimientos moderadamente buenos de los productos **17** y **19**, 68 y 73% respectivamente, pueden deberse, como ya se mencionó antes, a que hay dos sitios reactivos, en los que se formaría el enlace amida y más aún, que se forme en ambas posiciones, dando lugar a la diamida. Estas dos posibilidades no pueden ser descartadas; debido a que en las respectivas cromatoplasmas, se observó la formación de dos productos adicionales al compuesto de interés en proporción 5:1, aproximadamente.

Otro factor a considerar en el rendimiento de las moléculas mencionadas, sería el hecho de que, por más cuidado que se tuvo en la activación de los ácidos carboxílicos, al momento de adicionar la quinazolina al matraz de reacción, la humedad del medio ambiente pudo generar que un cierto número de moléculas de los derivados activados se hidrolizara, regenerando al correspondiente ácido carboxílico.





7.1.1 Parte química

Se realizó la caracterización física de intermediarios y derivados finales en la siguiente tabla, (la estructura de cada uno de los compuestos se puede observar en la sección **Metodología**):

Tabla 3. Caracterización física de las moléculas sintetizadas.

Clave	Masa molar (g/mol)	R _f (CHCl ₃ /MeOH (7:3))	Punto de fusión (°C)	Apariencia	Rendimiento (%)
8	205,17	0,52	>300	Sólido naranja	92
12	256,34	0,58	^a ND	^a ND	^a ND
17	393,44	0,73	178-180	Sólido amarillo pálido	68
18	280,32	0,63	^a ND	^a ND	^a ND
19	417,42	0,78	187-188	Sólido amarillo pálido	73
20	363,44	0,58	143-146	Sólido amarillo intenso	90
21	387,44	0,48	155-157	Sólido amarillo intenso	92

^aNo determinado.

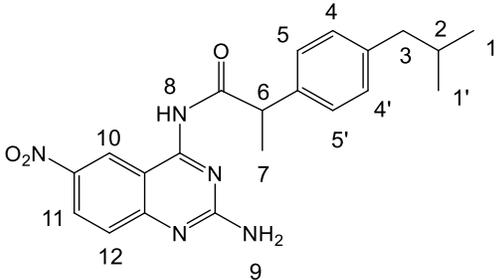
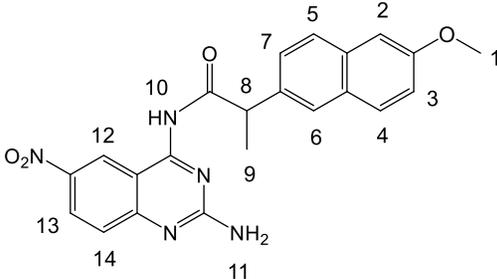
7.1.2 Caracterización espectroscópica y espectrométrica

A continuación se presentan los datos de IR, RMN-¹H, y EM, de los productos finales. Todos los espectros se encuentran en el **Anexo II**. Los datos de NOESY serán presentados de manera independiente.





Tabla 4. Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados.

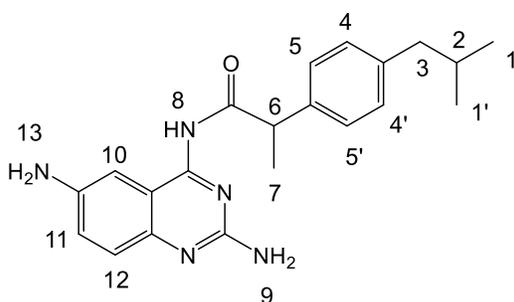
Estructura	Datos de caracterización
 <p><i>N</i>-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)- 2-(4-isobutylfenil)propanamida [17]</p>	<ul style="list-style-type: none">IR-ATR (cm⁻¹): 3424, 3268, 3133 y 1502 (N-H), 1678 (C=O), 1619 y 1463 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1414 (CH₃), 1330 y 1282 (C-NO₂), 730 (CH₂).EM-DART (m/z): M [H⁺] = 394¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.83 [(H_{1-1'}) (d, 6H)], 1.37 [(H₇) (d, 3H)], 1.75 [(H₂) (m, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, 2H)], 4.24 [(H₆) (dd, 1H)], 7.30 [(H_{5-5'}) (d, J = 8.3Hz, 2H)], 7.10 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.8Hz, 2H)], 7.58 [(H₁₂) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 8.09 [(H₉) (sa, 2H)], 8.38 [(H₁₁) (dd, J = 10, 3.4Hz, 1H)], 9.24 [(H₁₀) (d, J = 4.1Hz, 1H)], 10.29 [(H₈) (s, 1H)].
 <p><i>N</i>-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)- 2-(6-metoxinaftalen-2- il)propanamida [19]</p>	<ul style="list-style-type: none">IR, ATR (cm⁻¹): 3467, 3251, 3133 y 1503 (N-H), 1671 (C=O), 1617 y 1466 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1430 (CH₃), 1325 y 1289 (C-NO₂), 1289 (C-O).EM, DART (m/z): M [H⁺] = 418¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.46 [(H₉) (d, 3H)], 3.34 [(H₁) (s, 3H)], 4.43 [(H₈) (dd, 1H)], 7.13 [(H₃) (dd, J = 8.2Hz, 1H)], 7.26 [(H₂) (d, J = 3.9Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 6.3Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 7.74 [(H₄) (d, J = 8.7Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 8.4Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 8.38 [(H₁₃) (dd, J = 8.7Hz, 1H)], 9.25 [(H₁₂) (d, J = 4.2Hz, 1H)], 10.36 [(H₁₀) (s, 1H)].





Estructura

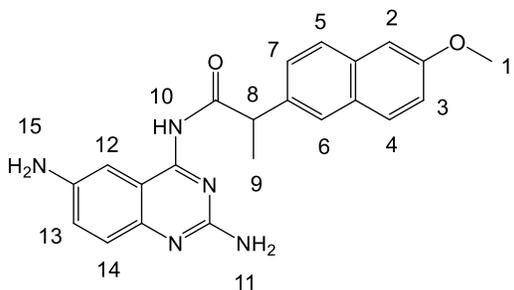
Datos de caracterización



N-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida

[20]

- IR, ATR (cm^{-1}): 3431, 3210, 2953 y 1519 (N-H), 1633 (C=O), 1519 y 830 (C=C_{arom}), 1585 (C=N), 1421 (CH₃), 725 (CH₂).
- EM, DART (m/z): M [H⁺] = 364
- ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.84 [(H_{1-1'}) (d, 6H)], 1.35 [(H₇) (d, 3H)], 1.79 [(H₂) (m, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, 2H)], 4.11 [(H₆) (dd, 1H)], 5.21 [(H₁₃) (s, 2H)], 7.29 [(H_{5-5'}) (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 2H)], 7.08 [(H_{4-4'}) (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H)], 7.09 [(H₁₁) (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 1H)], 7.26 [(H₁) (dd, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H)], 7.27 [(H₁₀) (d, $J = 4.1\text{Hz}$, 1H)], 9.77 [(H₈) (s, 1H)].



N-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida

[21]

- IR, ATR (cm^{-1}): 3332, 3210, 2970 y 1502 (N-H), 1631 (C=O), 1603 y 1447 (C=C_{arom}), 1583 (C=N), 1385 (CH₃), 1295 (C-O).
- EM, DART (m/z): M [H⁺] = 388
- ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.45 [(H₉) (d, 3H)], 3.36 [(H₁) (s, 3H)], 4.28 [(H₈) (dd, 1H)], 5.21 [(H₁₅) (s, 1H)], 7.03 [(H₂) (d, $J = 3.9\text{Hz}$, 1H)], 7.04 [(H₁₃) (dd, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H)], 7.11 [(H₃) (dd, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H)], 7.14 [(H₁₂) (d, $J = 4.2\text{Hz}$, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, $J = 6.3\text{Hz}$, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H)], 7.24 [(H₄) (d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, $J = 4.4\text{Hz}$, (1H))], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 9.81 [(H₁₀) (s, 1H)].





7.1.2.1 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Como se puede ver, en los datos de IR por el método de ATR, se encuentran las bandas características de metilos entre 1420 y 1430cm^{-1} , así como señales asociadas a los metilenos en 720cm^{-1} para los derivados **17** y **20**. En cuanto a los derivados **19** y **21**, se observa la señal característica del grupo funcional éter entre 1290 y 1300cm^{-1} . Esto en cuanto a las regiones alifáticas.

Para todos los compuestos se observa el grupo carbonilo de la amida entre 1630 y 1670cm^{-1} .

Las señales C=N de la quinazolina se encuentra en un rango de 1570 y 1585cm^{-1} , mientras que las señales de carbonos aromáticos para todos los compuestos se encuentran arriba de 1450 y debajo de 1630cm^{-1} .

Por último, la señales del grupo nitro se observan entre 1295 y 1325cm^{-1} , mientras que las señales características de los grupos amino, se ubican arriba de 3200 y abajo de 3300cm^{-1} , además de otra señal complementaria alrededor de 1500cm^{-1} .

7.1.2.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón ($\text{RMN-}^1\text{H}$)

En cuanto a los protones de núcleo de quinazolina, para el H-10, se encuentra un doblete en 9.24 y 9.25ppm en los derivados con el grupo nitro, mientras que los derivados con el grupo amino lo desplazan hasta 7.14 y 7.26ppm . Este efecto es debido a la naturaleza del grupo funcional; el grupo nitro al ser un grupo electroattractor retira densidad electrónica del anillo, con lo que desprotege los protones cercanos y se desplazan a campo bajo; caso contrario con el grupo amino, el cual al ser un grupo electrodonador provee densidad electrónica en el anillo, protegiendo a los protones vecinos y desplazándolos a campo más alto. Este fenómeno también se puede apreciar para los protones 7 y 8, en donde el primero tiene asociada una señal doble de dobles y el segundo un doblete, en ambos casos para los derivados **17** y **19**, las señales se encuentran a campo más bajo y en **20** y **21** son desplazadas a campo alto.





En cuanto al protón de la amida, también se ve influenciado por este efecto, para los compuestos nitrados el desplazamiento del singulete oscila alrededor de 10.3 ppm, en cambio los compuestos con la amina en la misma posición muestran la señal por 7.75 ppm.

Otro efecto que realiza este cambio de naturaleza en los grupos funcionales, es que en la zona aromática, los compuestos con aminas al desplazar a campo alto las señales, estas se traslapan y son más difícilmente distinguibles, en cambio, los compuestos nitrados al desplazar las señales a campo bajo, se vuelven más finas y se encuentran más separadas entre ellas, haciendo más sencilla su interpretación.

El último efecto claramente visible, fue la señal de la amina en posición 2, ésta en primer lugar debería aparecer como un singulete que integre para dos protones, contrario a esto se observan dos señales anchas, no bien definidas que integran cada una para un protón, tal efecto se observa en los compuestos que tienen el grupo nitro en su estructura, mientras que los compuestos con el grupo amino no muestran señal alguna. El efecto de los compuestos nitrados posiblemente se deba a una variante en la tautomería imina-enamina por resonancia de la amina en posición 2 de la quinazolina, que hace que los protones de la amina dejen de ser equivalentes y por lo tanto se diferencien entre ellos.

En cuanto la parte alifática, todas las señales aparecen como se esperaba, en éstas no existe algún efecto provocado por la naturaleza de los grupos funcionales.

La amina que se reduce por hidrogenación catalítica aparece en **20** y **21** como un singulete que integra para dos protones en 5.21 ppm. Esta señal no se ve afectada por ninguno de los efectos antes mencionados.

7.1.2.4 Espectroscopia de resonancia magnética homonuclear (NOESY)

Los espectros de NOESY fueron obtenidos con el fin de determinar la posición en la que se había formado la amida entre el derivado de quinazolina y los AINE's.





En los compuestos nitrados, se observa la interacción del protón del anillo de la quinazolina 10 y 12 en los compuestos **17** y **19**, respectivamente, con el protón de la amida formada en posición 4. Otra señal confirmatoria es la interacción que se presenta entre la amina en posición 6 de los compuestos **20** y **21** con la amida.

A manera de ejemplo se colocaron los espectros de NOESY de **19** y **21**, donde se observan las interacciones descritas.

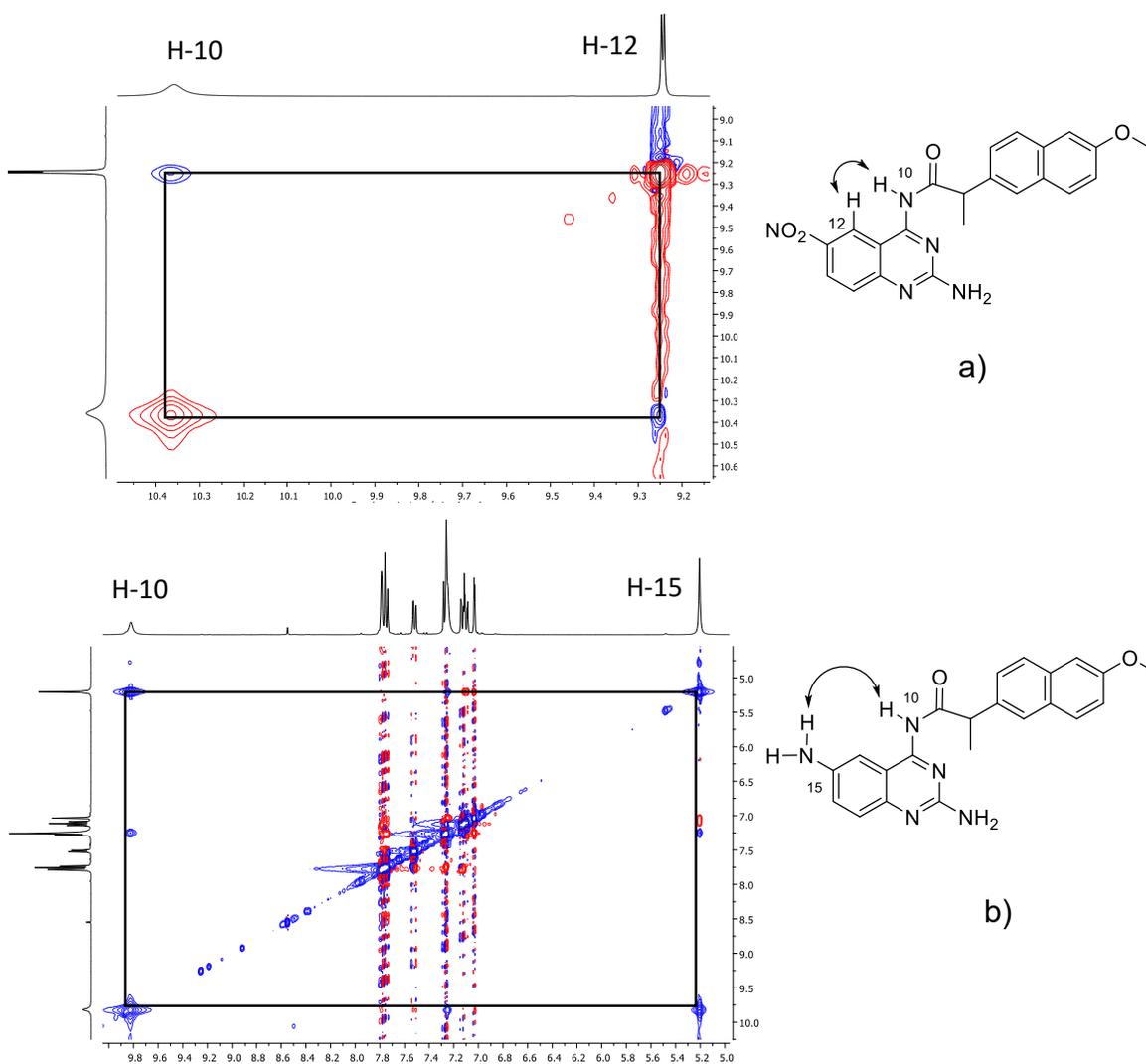


Figura 15. Espectros de NOESY de los compuestos: (a) **19** y (b) **21**.





7.1.2.5 Espectrometría de masas (EM)

En la espectrometría de masas por el método DART se indica la masa molecular del compuesto adicionando la masa de un hidrógeno. En este estudio se obtuvieron los valores esperados para las moléculas. En cuanto a este método no se distingue el patrón de fragmentación de las moléculas, con lo que solo se tomó como referencia el ion molecular para determinar la naturaleza de los compuestos.

7.2 Evaluación biológica

Se determinó la actividad biológica de los derivados finales en 4 ensayos diferentes *in vitro* obteniéndose como resultados: índice de toxicidad, mutagenicidad, citotoxicidad o concentración inhibitoria, según sea el caso.

7.2.1 Determinación de mutágenos ambientales a través de la prueba de Ames.

Se contó el número de colonias de la cepa de *S. typhimurium* TA 98 revertantes espontáneas (aquellas que sólo tienen cultivo bacteriano) y revertantes inducidas (provenientes con y sin fracción S9 que contenían a los compuestos). El número de colonias se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Número de colonias en la prueba de Ames. N.D. No determinado

Clave	Promedio de colonias por cada tratamiento				
	Control negativo	Reversión espontánea	Reversión inducida		
			Sin S9	Con S9	Sólo mutágeno
17	0	37	4	6	0
19	0	37	N.D.	3	0
20	0	37	0	2	0
21	0	37	2	4	0





De acuerdo con los valores obtenidos, se considera que todos los compuestos no son mutagénicos.

Como se sabe, en este ensayo la fracción S9 ayuda a biotransformar los posibles mutágenos con lo que, si el compuesto por sí mismo no es mutagénico, probablemente sus productos del metabolismo pudieran serlo.

Estos resultados son buenos desde el punto de vista en el que no muestran efectos secundarios o tóxicos de las moléculas evaluadas, en cambio, deberían confirmarse mediante repeticiones del mismo estudio para tener un resultado mucho más confiable.

7.2.2 Evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales.

Se registró el valor de absorbancia de cada uno de los tratamientos y los compuestos evaluados sobre la línea celular primaria HL-60 (**Tabla 6**).

Tabla 6. Absorbancias de los tratamientos en la determinación de LDH libre.

Absorbancia ($\lambda = 562 \text{ nm}$)									
Celda	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Repetición									
1	0.051	0.040	0.039	0.040	0.041	0.042	0.043	0.041	0.042
2	0.050	0.040	0.039	0.039	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042
3	0.050	0.039	0.039	0.040	0.042	0.043	0.043	0.042	0.041
Prom.	0.050	0.040	0.039	0.040	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042
D.E.	5.7E ⁻⁴	5.7E ⁻⁴	0	5.7E ⁻⁴					

A=Máxima liberación; B=Blanco de A; C=Blanco de D, E, F, G, H, I; D=Control negativo; E=Control de disolvente; F=Molécula 17; G=Molécula 19; H=Molécula 20; I=Molécula 21.





Posterior al cálculo del promedio para cada tratamiento, se realizó la corrección de datos, restando a cada tratamiento su respectivo blanco, para después determinar el porcentaje de citotoxicidad usando la ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Absorbancia corregida del tratamiento}}{\text{Absorbancia corregida de A}} \times 100$$

Tabla 7. Porcentaje de citotoxicidad de los compuestos evaluados.

Absorbancia ($\lambda = 562 \text{ nm}$)							
Celda	Máxima liberación (A-B)	Control negativo (D-C)	Control disolvente (E-C)	17 (F-C)	19 (G-C)	20 (H-C)	21 (I-C)
Abs	0.010	0.001	0.002	0.003	0.004	0.002	0.003
% Cit.	-	10	20	30	40	20	30

Como tal, el porcentaje de citotoxicidad no indica la naturaleza del compuesto, por lo que se requiere hacer una comparación entre tratamientos. El control positivo (máxima liberación) es aquel que produce el efecto dañino en las células evaluadas, así que se realizó una prueba estadística t-Student para comparar este tratamiento con el de los demás a una cola y con un intervalo de confianza del 90%.

Los datos estadísticos se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Datos de la t-Student para la comparación de tratamientos

t-Student						
Celda	Máxima liberación	Control disolvente	17	19	20	21
Promedio	0.050	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042
D.E.	$5.7E^{-4}$	$5.7E^{-4}$	$5.7E^{-4}$	$5.7E^{-4}$	$5.7E^{-4}$	$5.7E^{-4}$





$$\text{Grados de libertad} = 3+3-2 = 4$$

Hipótesis

H0: μ Control de tratamiento = μ Máxima liberación

H1: μ Control de tratamiento > μ Máxima liberación

Intervalo confianza: $\alpha = 0.1$

Comparación:

Cada tratamiento vs Máxima liberación

t = 1.533						
t₀	-	21.48	17.19	15.04	19.33	17.19
Veredicto	-	t < t ₀				
Conclusión	H ₀ se rechaza					

Los datos de la tabla anterior muestran que existe una diferencia significativa entre el control positivo y todos los tratamientos, lo que indica que los compuestos no serían citotóxicos en este ensayo para la línea celular estudiada.

7.2.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.

Se realizó el ensayo *in vitro* de los híbridos sintetizados sobre 4 líneas celulares tumorales PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama con receptores para estrógenos y progesterona), MDA MB-231 (cáncer de mama sin receptores para estrógenos y progesterona) y sobre una línea celular primaria FGH (fibroblastos gingivales humanos); para evaluar la actividad citotóxica de dichos compuestos expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento celular. En la **Tabla 9** se muestran los resultados obtenidos en un periodo de incubación de 48 horas a una concentración de 25* o 50 μ M para los compuestos. El tamoxifeno se utilizó como control positivo a una concentración de 10 μ M.



**Tabla 9.** Valores de inhibición celular de los compuestos evaluados. NC=No citotóxica.

Clave	% Inhibición de crecimiento \pm EEM				
	Línea celular				
	PC-3	HCT-15	MCF-7	MDA MB-231	FGH
17*	66.4 \pm 3.8	71.9 \pm 7.0	75.5 \pm 4.9	46.5 \pm 4.8	NC
19	75.5 \pm 5.0	63.7 \pm 1.6	66.9 \pm 6.8	52.4 \pm 4.2	NC
20*	90.1 \pm 5.3	99.5 \pm 0.5	100	96.4 \pm 1.8	NC
21	81.3 \pm 6.9	64.0 \pm 1.9	78.4 \pm 6.2	52.7 \pm 6.3	NC
Tamoxifeno	58.9 \pm 7.1	53.6 \pm 0.3	29.6 \pm 2.9	16.9 \pm 1.8	9.9 \pm 0.4

Como se observa en la tabla anterior se obtuvieron resultados muy prometedores, ya que todos los compuestos fueron más activos que el tamoxifeno en todas las líneas celulares evaluadas. La línea FGH será explicada posteriormente.

Los compuestos **17** y **20** fueron evaluados a una concentración más baja puesto que presentaron valores mayores de inhibición a 50 μ M en donde no se observaban datos que pudieran ser cuantificados. Sin embargo, **20** resultó el más activo de los cuatro en todas las líneas celulares, observándose un mayor porcentaje en las líneas HCT-15 (próstata) y MCF-7 (mama). Posiblemente estos resultados sean debidos a que la molécula es más pequeña, en comparación a **19** y **21**, con lo que entra más fácilmente al sitio activo de la enzima con la que interactúa; además, en comparación con **17**, la molécula **20** puede formar un puente de hidrógeno extra por la amina en posición 6 de su estructura, con lo que haría una interacción más fuerte en cuanto a número de enlaces.

Con todo lo anterior si se hace un comparativo, de acuerdo con los compuestos con los mismos sustituyentes, pero que difieren por la posición 6 en cuanto a la amina o al grupo nitro, se observa que los compuestos con aminas, tienen mayores valores de inhibición celular, con lo que se cree que el número de puentes de hidrógeno que forman es la determinante para la actividad biológica.





El dato que en este ensayo debe destacarse es en la línea primaria FGH, que indica nula citotoxicidad por parte de los compuestos en líneas sin ningún tipo de cáncer, lo que es indicativo que los compuestos podrían no presentar como efecto secundario toxicidad en células que no sean tumorales, con esto se resuelve uno de los problemas que tiene el gefitinib y el erlotinib.

7.2.4 Determinación de IC_{50} en líneas celulares cancerosas humanas

Después de obtener los valores en el ensayo de porcentaje de inhibición celular, se procedió a determinar la concentración de compuesto a la cual se inhibe al 50% de células tumorales (IC_{50}). Los resultados obtenidos se describen en la **Tabla 10**. Cada uno de los compuestos se determinó en un rango de concentraciones de 3 a 60 μ M, en un periodo de incubación de 48 h. Se utilizó al tamoxifeno como control positivo en el mismo intervalo de concentraciones.

Tabla 10. Valores de IC_{50} de los compuestos evaluados.

Clave	$(IC_{50} \pm EEM)\mu$ M			
	Línea celular			
	PC-3	HCT-15	MCF-7	MDA MB-231
17	12.5 \pm 0.9	23.4 \pm 1.5	12.3 \pm 0.9	15.9 \pm 1.3
19	15.3 \pm 0.9	43.4 \pm 1.7	26.7 \pm 2.3	48.2 \pm 4.5
20	8.9 \pm 0.9	14.0 \pm 0.8	8.0 \pm 0.3	17.8 \pm 1.5
21	15.4 \pm 1.2	34.9 \pm 2.0	24.5 \pm 1.7	35.1 \pm 2.6
Tamoxifeno	10.9 \pm 0.8	18.4 \pm 0.8	12.3 \pm 1.0	11.5 \pm 0.7





Como se observa en la tabla anterior, el compuesto que mostró el menor valor de IC_{50} fue **20**, el cual supera al control positivo en tres líneas celulares, excepto en MDA MB-231, confirmando los resultados del ensayo anterior. Estos datos son constantes en cada una de las líneas celulares, aunque de nueva cuenta, en la línea celular donde mostró mayor efectividad fue MCF-7.

En esta prueba biológica se observa que los compuestos con el mismo antiinflamatorio, **17** y **20**, fueron más activos que los derivados **19** y **21**, donde aumentó notoriamente el valor de IC_{50} en la línea celular HCT-15.

En este caso no se observa que los compuestos nitrados fueron menos activos que los compuestos con el grupo amino en posición 6, no obstante, estos últimos presentaron mejores valores que **19**, el cual resultó ser el menos efectivo, debido a que como se dijo en el apartado anterior, pudiera deberse al tamaño de la molécula.

7.3 Acoplamiento molecular

Se realizó el estudio *in silico* de los híbridos sintetizados y las dianas farmacológicas VEGFR y COX-2, para observar las interacciones presentes y la energía de unión, y así asociarlas con la actividad biológica que mostraron en la evaluación *in vitro* y la posible acción que podrían mostrar en una prueba biológica en donde esté involucrado el efecto antiinflamatorio.

Los datos obtenidos se muestran en las **Tablas 11 y 12**. Estos fueron calculados con el software AutoDockTools-1.5.6.

La visualización del acoplamiento se realizó con PyMOL para los ligandos con ambos receptores. Todas las imágenes del acoplamiento molecular pueden ser consultada en el **Anexo III**.





7.3.1 VEGFR

Tabla 11. Energía libre de unión y posibles interacciones con el VEGFR

VEGFR (PDB ID: 1YWN)			
Ligando	Energía de unión ΔG (kJ/mol)	Posibles interacciones polares	Número de clúster
17	-2.39	Lys866, Glu883, Arg1025 Asp1044	2
19	-2.66	Ser882, Arg1025	3
20	-3.37	Arg1025, Asp 1044	6
21	-2.57	Asp1044	5

El valor negativo de ΔG indica que la interacción ligando-receptor es favorable. Como se puede observar, todas las energías de enlace de los compuestos están dentro del mismo orden. El compuesto que teóricamente tuvo la mayor actividad fue **20**, pues tiene la menor energía de unión asociada, siendo este resultado concordante con los datos de las pruebas biológicas

Se observa que la mayoría de los compuestos interactúan con el residuo de arginina 1025 y aspartato 1044, con el cual forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carboxilo y con el nitrógeno de la amida respectivamente; además se observó una interacción tipo puente de hidrógeno entre la amina de la posición 6 de la quinazolina del compuesto **20** con el residuo 1025 de arginina. Esto puede indicar la importancia que tiene la amida y la amina antes mencionada en la actividad que ejercen los compuestos.

Por último e igual de relevante, el compuesto con un clúster mayor fue de nueva cuenta **20**, con 6, que son todas las posibles conformaciones que presenta la molécula en el sitio activo. Mientras mayor sea el número de conformaciones, mayores serán las posibles interacciones con los residuos de la enzima.





A modo de ejemplo se colocó el acoplamiento molecular de **20**, el cual resultó ser el más activo (**Figura 16**).

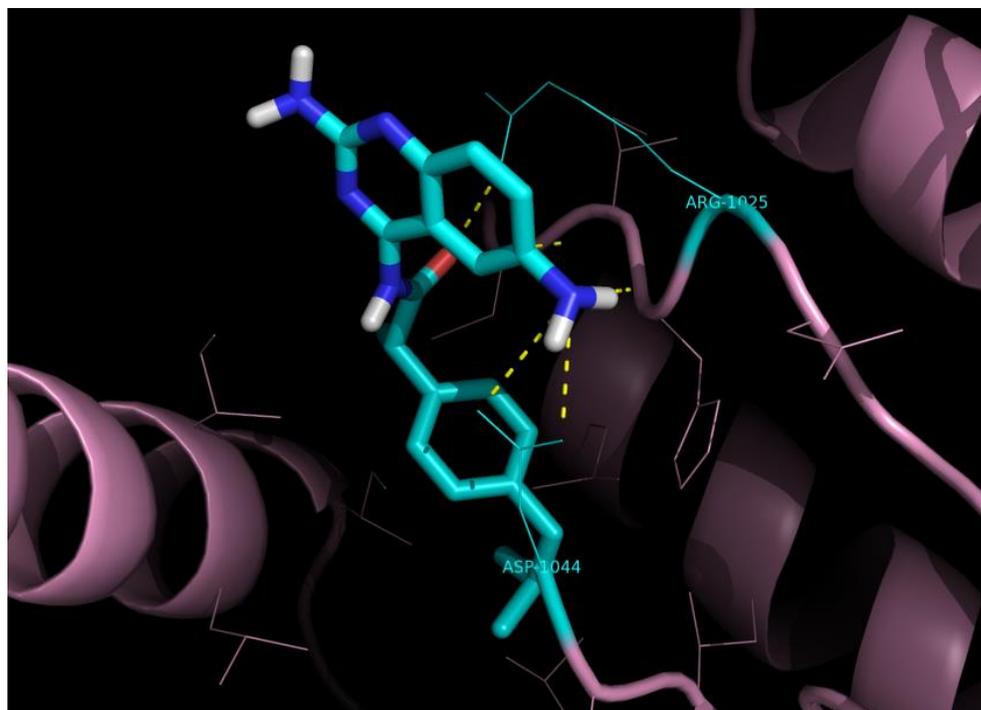


Figura 16. Docking entre **20** y el receptor VEGFR visualizado en PyMOL.

7.3.2 COX-2

Tabla 12. Energía libre de unión y posibles interacciones con la COX-2

COX-2 (PDB ID: 5F1A)			
Ligando	Energía de unión ΔG (kJ/mol)	Posibles interacciones polares	Número de clúster
17	-0.54	Ser119, Arg120, Tyr355, Arg513, Val 523	2
19	-1.62	Ser119, Arg120, Tyr355, Arg513	2
20	-0.77	Arg120, Ser353, Tyr355	1
21	-0.41	Ser119, Tyr355, Glu524	2





Se observa en la tabla anterior, que el compuesto más activo fue **19**, en cuanto a efecto antiinflamatorio respecta. Los residuos que se presentaron en mayoría como interacciones con los ligandos fueron serina, arginina y tirosina, siendo para este último, el 355, el que se comparte en todos los derivados, formando un puente de hidrógeno ya sea con el oxígeno del carboxilo o con el nitrógeno de la amida, resaltando de nueva cuenta la importancia de este grupo funcional.

Si bien presentan energías de unión negativas, estas no son de gran magnitud, debido a que posiblemente el tamaño de las moléculas es mucho mayor al del ligando previamente cristalizado, dificultando así su entrada en el sitio de acción de la enzima.

Otro punto a considerar en cuanto al valor no tan bajo de la energía de unión, es que puede deberse al número de clúster pues para todas las moléculas fue bajo, dando lugar a pocas conformaciones, disminuyendo aún más el número de interacciones y por lo tanto la fuerza del enlace ligando-receptor.

A manera de ejemplo se presenta el acoplamiento molecular del compuesto más activo (**Figura 17**).

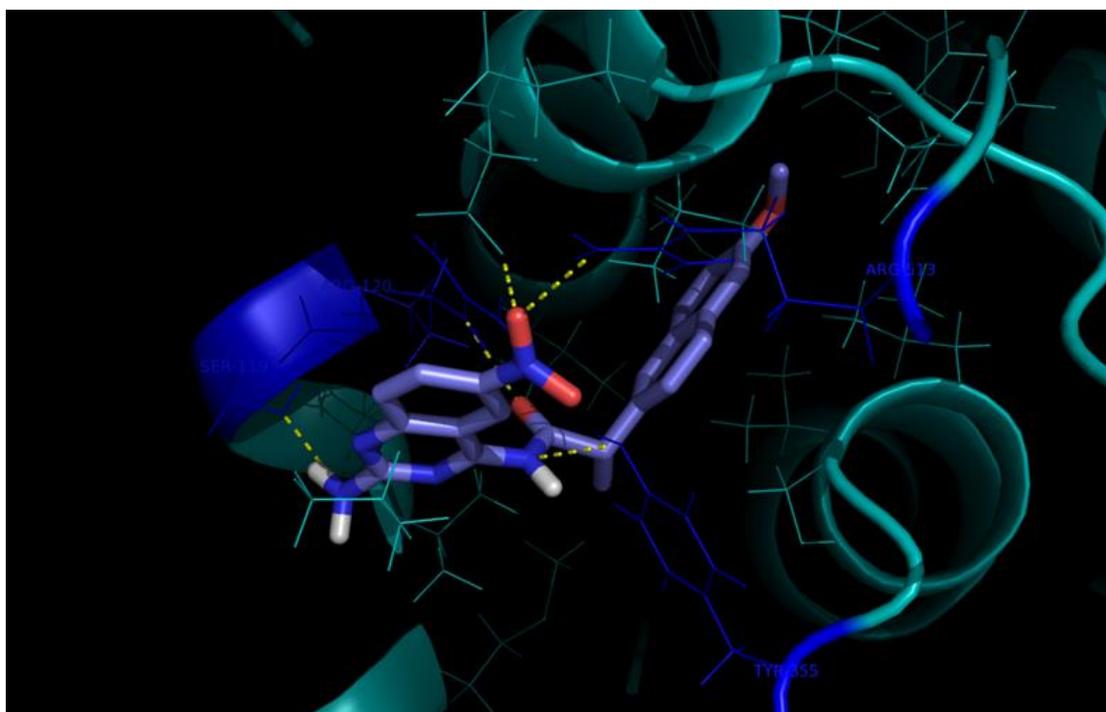


Figura 17. Docking entre **19** y la enzima COX-2 visualizado en PyMOL.





8. Conclusiones

Se obtuvieron cuatro nuevas moléculas híbridas entre un derivado de quinazolina y un antiinflamatorio no esteroideo, y se caracterizaron mediante ^1H -RMN, IR, NOESY y EM.

Se evaluó la actividad antitumoral de los compuestos en líneas celulares cancerígenas, en los que presentaron valores de buenos a excelentes siendo la molécula 20 la que presentó mejores resultados. Además, se realizaron ensayos para determinar si los compuestos eran tóxicos, dando resultado negativo en las tres pruebas.

Se realizó es estudio *in silico* de los derivados finales sobre el receptor VEGFR y la enzima COX-2, obteniéndose resultados aceptables, que si bien pueden ser relacionados con la actividad biológica antes mencionada, por ejemplo para el compuesto 20, cabe recordar que solo es un estudio teórico más no confirmatorio.





9. Referencias bibliográficas

- [1] Hanahan, D. Weinberg, A. R.; Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011, 144, 646-674.
- [2] Merlo L. M., Pepper J. W., Reid B. J.; Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6, 924-935.
- [3] Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Fecha de consulta 12 de diciembre de 2016. Sitio web: www.who.int/topics/cancer/es/
- [4] James J. A., Travis L. B.; Mechanism of therapy-related carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5, 943-955.
- [5] Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W.; Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, 2011, 11, 85-95.
- [6] DeVita V. T., Chu E.; A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 2008, 21, 8643-8653.
- [7] Silverman R. B., Holladay M. W. (2014). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Chapter 6 - DNA-Interactive Agents. Elsevier, 7th ed. United States. pp. 281-283.
- [8] Amin K. M., Anwar M. M., Kamel M. M., Kassem M. M., Syam Y. M., Elseginy S. A.; Synthesis, cytotoxic evaluation and molecular docking study of novel quinazoline derivatives as PARP-1 inhibitors. *Drug Res.*, 2013, 70, 833-849.
- [9] Ravani R. M., Patel L. J.; Synthesis and screening of quinazoline analogues as cytotoxic agents. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, 2016, 8, 91-97.
- [10] Noolvi M. N., Patel H. M.; Synthesis, method optimization, anticancer activity of 2,3,7-trisubstituted quinazoline derivatives and targeting EGFR-tyrosine kinase by rational approach. *Arabian J. Chem.*, 2013, 6, 35-48.
- [11] Chaikuad A., Diharce J., Schröder M., Foucourt A., Leblond B., Casagrande A., Désiré L., Bonnet P., Knapp S., Besson T.; An unusual binding model of the methyl 9-anilinothiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbimidates (EHT 1610 and EHT 5372) confers high selectivity for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 10315–10321.





- [12] Cha Y. I., DuBois R. N.; NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2, *Annu. Rev. Med.*, 2007, 58, 239–252.
- [13] Rigas B., Shiff S. J.; Is inhibition of cyclooxygenase required for the chemopreventive effect of NSAIDs in colon cancer? A model reconciling the current contradiction, *Med. Hypotheses*, 2000, 54 210–215.
- [14] Lu H., Ouyang W., Huang C.; Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer Res.*, 2006, 4 221–233.
- [15] Dvorak H. F.; Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 315 1650–1659.
- [16] Hou T., Zhu L., Chen L., Xu X.; Mapping the binding site of a large site of quinazoline type EGF-R inhibitors using molecular field analyses and molecular docking studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, 43, 273-287.
- [17] Graham L. P. (2013) An introduction of Medicinal Chemistry. Oxford University Press, 5th ed. Great Britain. pp. 154-155.
- [18] American Type Culture Collection (ATCC). Cell Lines. Fecha de consulta 19 de diciembre de 2016. Sitio web: www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines
- [19] Vichai V., Kirtikara K.; Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Prot.*, 2006, 1, 1112-1117.
- [20] Chan, F. K., Moriwaki, K. De Rosa, M. J.; Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Methods in molecular biology. *Mol. Cancer Res.*, 2013, 979, 65-70.
- [21] Departamento de Farmacia. Manual de prácticas de Toxicología. Evaluación de la enzima lactato deshidrogenasa como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales. (2016) UNAM, México. 1-8.
- [22] Departamento de Farmacia. Manual de Prácticas de Toxicología. Determinación de mutágenos ambientales a través de la prueba de Ames. (2016) UNAM, México. 1-15.





Apéndice

- Para la evaporación de disolventes a presión reducida se utilizó un rotaevaporador marca BÜCHI modelo R-114, bomba de vacío marca GAST modelo 0523-v47-6528DX y enfriador marca VWR Scientific modelo 1107.
- El punto de fusión de los compuestos sintetizados se determinó en un aparato Fischer marca BÜCHI modelo B-540 con capilares de vidrio marca Vacubrand propios del equipo. Los puntos de fusión no fueron corregidos.
- La reducción catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación marca PARR modelo 3916-EG adaptado a un tanque de hidrógeno de la compañía INFRA.
- Los espectros de Infrarrojo se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación (USAI). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, fueron realizados en el Instituto de Química.
- Para la nomenclatura de los compuestos se utilizó el software ChemDraw Professional 16.0.
- La visualización y preparación de los espectros de RMN-¹H se realizó con el software MestReNova.
- La preparación de los ligandos se realizó con el software *Spartan Graphical User Interface v.10*.
- La preparación de las macromoléculas y el acoplamiento molecular se realizó con AutoDockTools-1.5.6.
- La visualización de los acoplamientos moleculares fue con el software PyMOL 1.1.





ANEXO I: METODOLOGÍA





10.1 Síntesis

10.1.1 Compuesto 8: *2,4-diamino-6-nitroquinazolina*. En un matraz de fondo redondo de 100 mL boca 14/20 se colocó 1.50 g (1 eq) de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo junto con 1.24 g (0.75 eq) de carbonato de guanidina. Posteriormente se adicionaron 0.62 g (1.2 eq) de KOH al matraz y 30 mL de una mezcla EtOH/PrOH (1:2).

Al matraz de reacción se le colocó una barra de agitación magnética y un adaptador boca 24/40. Se colocó un serpentín para reflujo, se elevó la temperatura del sistema gradualmente hasta llegar a 90°C y se colocó en agitación constante bajo atmósfera de nitrógeno. Pasada una hora se añadieron 8 mL más de la mezcla alcohólica antes mencionada.

Después de 7 horas a reflujo, se realizó una ccf de la reacción (Hex/AcOEt (8:2), $\lambda=254$ nm, 1x) y se comparó contra el compuesto 2-amino-5-nitrobenzonitrilo, observándose un avance de reacción; con lo que se procedió a filtrarla en caliente con ayuda del vacío.

El precipitado obtenido se lavó con 200 mL de agua, seguido de 50 mL de MeOH caliente (45°C) hasta obtener un pH aproximado de 7 en las aguas madre.

El producto se secó al vacío durante 12 horas y posteriormente se realizó una ccf (Hex/AcOEt (8:2), $\lambda=254$ nm, 1x), comparando al producto de reacción con la materia prima antes mencionada y una referencia ya caracterizada. No se observó presencia de alguna impureza, por lo que no requirió de algún método de purificación.

10.1.2 Compuesto 12: *1-(1H-imidazol-1-il)-2-(4-isobutilfenil)propan-1-ona*. En un matraz bola de fondo redondo de 50 mL boca 14/20 previamente secado en la estufa durante 2 horas, se colocó 1.00 g (1 eq) de ácido 2-(4-isobutilfenil) propanoico junto con 0.93 g (1.2 eq) de CDI. Después se adicionaron 8 mL de CHCl₃ y se colocó una barra de agitación magnética.





El sistema se purgó con ayuda de una jeringa de vidrio, colocándose en agitación constante a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno.

Pasadas 2 horas se realizó una ccf fina (Hex/AcOEt (1:1), $\lambda=254$ nm, 1x), comparándose contra la materia prima. Se observó una sola señal en el carril de la reacción, asociada a un R_f diferente al de la materia prima, con lo que se asumió que la reacción había concluido completamente. No se aisló el compuesto debido a su alta reactividad, por lo tanto, no se requirió de algún método de purificación.

10.1.3 Compuesto 17: *N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida. En un matraz fondo redondo de 100 mL boca 24/40 se encontraba ya disuelto 0.62 g (1 eq) del compuesto 12 en 8 mL de CHCl_3 . Se añadieron al matraz 0.25 g (0.8 eq) del compuesto 8 ya disuelto en 5 mL de DMF.

Se colocó una barra de agitación magnética al matraz y se adaptó un serpentín para reflujo junta 24/40. El sistema se colocó en agitación constante y se elevó la temperatura gradualmente hasta alcanzar 100°C bajo atmósfera de nitrógeno.

Pasadas 18 horas de reacción, se realizó una ccf (Hex/AcOEt (1:1), $\lambda=254$ nm, 1x) observándose el producto, aún presencia del compuesto 8 y una impureza adicional en baja proporción comparada con el producto, con lo que se procedió a purificar el compuesto de interés.

Para purificar el compuesto, se eliminó parte del disolvente mediante presión reducida hasta tener una disolución aproximada de 2 mL. Posteriormente la disolución se colocó en un embudo de separación de 150 mL y se añadieron 5 mL de HCl (10%), 25 mL de agua de la llave y 10 mL de CH_2Cl_2 , se procedió a realizar una extracción líquido-líquido repitiendo el volumen de la fase orgánica 3 veces más hasta alcanzar un volumen total de 40 mL. Después la fase orgánica se colocó en un embudo de extracción de 150 mL y se adicionaron 5 mL de NaOH (20 %), 25 mL de agua y 10 mL de CH_2Cl_2 para realizarse una extracción múltiple líquido-líquido, repitiendo el volumen de la fase orgánica 3 veces más, hasta un volumen de 80 mL.





La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y el exceso de disolvente se eliminó mediante presión reducida hasta sequedad.

Se precipitó el compuesto con 3 mL de éter diisopropílico anhidro y se filtró al vacío. Se tomó una ccf (Hex/AcOEt (1:1), $\lambda=254$, 1x) del sólido comparándolo contra el ácido 2-(4-isobutilfenil)propanóico y el compuesto 8.

10.1.4 Compuesto 18: 1-(1H-imidazol-1-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propan-1-ona.

En un matraz fondo redondo boca 24/40 de 100 mL previamente secado en la estufa durante 2 horas, se colocaron 0.50 g (1 eq) de ácido 2-(5-metoxi-2-naftil) propanóico y 0.46 g (1.2 eq) de CDI. Después se añadieron 5 mL de CHCl_3 al matraz y se le colocó una barra de agitación magnética.

El sistema se purgó con una aguja de vidrio y se colocó en agitación constante, bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente.

Pasadas 4 horas se realizó una ccf de la reacción ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2), $\lambda=254$, 1x), en la cual se observó una sola señal en el carril de reacción con un R_f asociado diferente al del compuesto de partida, con lo que se asume que la reacción había concluido. Debido a la reactividad del compuesto obtenido, este no fue aislado, por lo que no se requirió ningún método de purificación.

10.1.5 Compuesto 19: N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida. En un matraz fondo redondo boca 14/20 de 25 mL se encontraban previamente disueltos 0,61 g (1 eq) en 5 mL de CHCl_3 del compuesto 18 junto con una barra de agitación magnética.

Después se añadieron 0.22 g (0.7 eq) del compuesto 8 disueltos en 3 mL de DMF y se adaptó un serpentín para reflujo junta 14/20.

Se elevó la temperatura del sistema de forma gradual hasta alcanzar 100°C y se colocó bajo atmósfera de nitrógeno en agitación constante.





Pasadas 36 horas de reacción se realizó una ccf (Hex/AcOEt (1:1), $\lambda=254$ nm, 1x) en donde ya no se observó presencia de ambas materias primas, con lo que se procedió a realizar la purificación del compuesto de interés.

Para purificar al compuesto, primero se concentró el crudo de reacción en un matraz fondo redondo de 50 mL boca 14/20 mediante presión reducida, hasta obtener un sobrenadante aproximado de 1 mL. El sobrenadante se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL y se añadieron 10 mL de acetona. El vaso se colocó en una parrilla de calentamiento a 70°C y se comenzó a eliminar el exceso de disolvente por evaporación. El compuesto de interés comenzó a precipitar antes de que se eliminara todo el disolvente. El vaso de precipitados se retiró del calentamiento y se indujo la precipitación con ayuda de una espátula de acero.

El sólido obtenido se filtró al vacío y se hicieron lavados con un total de 5 mL de éter diisopropílico anhidro caliente. El producto se dejó secando durante 12 horas al vacío y posterior a este tiempo se tomó una ccf del sólido (Hex/AcOEt (1:1), $\lambda=254$ nm, 1x), comparándolo contra ambas materias primas. Al no observarse impureza alguna en el carril del producto aislado se procedió a calcular el rendimiento de reacción.

10.1.6 Compuesto 20: *N-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida*. Se colocaron 0.21 g del compuesto 17 y 0.02 g de Pd/C al 10% (12% m/m) en un vaso de precipitados de 100 mL y se realizó la mezcla en sólido. Posteriormente se añadieron 20 mL de MeOH absoluto al vaso y se trasvasó la mezcla a un frasco Anton Paar añadiendo además el volumen necesario de MeOH absoluto para completar 100 mL.

El sistema se colocó en el hidrogenador a 30 rpm y 60 lb/in² durante 20 min. Terminado el tiempo de la reacción se filtró. La disolución resultante se concentró a presión reducida a 30 °C en el baño de agua en un matraz fondo de 100 mL boca 14/20. El compuesto se precipitó con ayuda de éter diisopropílico anhidro, colocando el matraz en un baño de hielo.





Se realizó una ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3), $\lambda=254$ nm, 1x) del sólido obtenido y se comparó contra el compuesto 17 y la 2,4,6-triaminoquinazolina, observándose presencia de esta última en baja proporción con lo que se procedió a purificar el compuesto de interés.

Para la purificación se colocó el sólido obtenido en un vaso de precipitados de 100 mL y se adicionaron 10 mL de éter diisopropílico. El vaso se colocó en una parrilla de calentamiento a 40°C en agitación constante durante 30 min. Al término de este tiempo se filtró al vacío el compuesto y se dejó secando por 12 horas.

Se realizó una ccf del sólido ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3), $\lambda=254$ nm, 1x) comparándolo nuevamente contra los compuestos antes mencionados; en el carril de producto de reacción se observó una sola señal por lo que se procedió a calcular el rendimiento.

10.1. 7 Compuesto 21: N-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida. En un vaso de precipitados de 100 mL se colocaron 0.20 g del compuesto 19 y 0.02 g de Pd/C al 10% (12% del peso m/m) y se realizó la mezcla en sólido. Al vaso se añadieron 20 mL de MeOH absoluto y se trasvasó la mezcla a un frasco Anton Paar, añadiendo el volumen necesario para un total de 130 mL de MeOH absoluto.

El frasco se montó en el hidrogenador a 30 rpm y 60 lb/in^2 durante 35 min.

La disolución obtenida se filtró con un embudo poroso y papel filtro, y se eliminó el disolvente mediante presión reducida a 40°C en el baño de agua. Se indujo la precipitación del compuesto con éter diisopropílico anhidro y se filtró al vacío, dejándose secar por 12 horas. Al sólido obtenido se le realizó una ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2), $\lambda=254$ nm, 1x), comparándolo contra el compuesto 19 y la 2,4,6-triaminoquinazolina; en el carril del producto no se observó la presencia más que de una señal, por lo que se procedió a calcular el rendimiento de reacción.





10. 2 Evaluación biológica

10.2.1 Determinación de mutágenos ambientales a través de la prueba de Ames.

Primera sesión.

Para preparar el área de trabajo, ésta se limpió usando jabón líquido e NaClO al 40% y en seguida se sanitizó con EtOH al 70%. En todo momento se usaron guantes de plástico. Para adecuar el área de trabajo en condiciones apropiadas para su utilización se colocaron los materiales descritos en la **Figura 18**.

En la parrilla de calentamiento se fundieron 20 mL de agar de superficie contenidos en un tubo de ensaye de 40x150 a una temperatura constante de 45°C a baño maría y se agregaron 1.5 mL de solución de L-Histidina/Biotina.

Posteriormente, a 9 tubos de ensaye de plástico estériles (para cada uno de los tratamientos), se les retiró la tapa por presión tratando de no tocar los bordes con la mano y se añadieron 2 mL del agar de superficie antes mencionado. Estos tubos también se mantuvieron a 45°C en baño maría para que no se solidificara el agar. Para realizar cada uno de los tratamientos se siguió en orden de adición, los reactivos expuestos en la **Tabla 11** comenzando por el control negativo.



Figura 18. Forma de colocar todos los materiales en el área de trabajo.



**Tabla 13.** Reactivos para la prueba de Ames con la cepa TA 98.

Tratamientos (Tubos)	Control negativo	Reversión espontánea		Sólo mutágeno		Sin S9		Con S9	
		RE ₁	RE ₂	M ₁	M ₂	S/S9 ₁	S/S9 ₂	C/S9 ₁	C/S9 ₂
Código	C-	RE ₁	RE ₂	M ₁	M ₂	S/S9 ₁	S/S9 ₂	C/S9 ₁	C/S9 ₂
Agar de superficie ^a	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Cultivo bacteriano	-	100 µL	100 µL	-	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Compuesto sintetizado	-	-	-	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Mezcla S9 ^b	-	-	-	-	-	-	-	500 µL	500 µL

^aSe mantuvo a 45°C en baño maría. ^bSe mantuvo siempre en hielo.

A continuación, se sacaron de la incubadora 9 cajas Petri de plástico y se etiquetaron en la tapa con cada uno de los códigos de la **Tabla 13**. Cada tubo de plástico se mezcló en un agitador vortex y se vertió su contenido en cada una de las cajas Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner, distribuyendo el agar de superficie con movimientos circulares. Terminada la distribución se dejó solidificar el agar de superficie durante 10 min.

Las cajas se fijaron con cinta adhesiva por su contraparte y se introdujeron de manera invertida a la incubadora a 37°C durante 48 horas. Pasado este tiempo, las cajas se guardaron en el refrigerador a 4°C hasta una semana después, para realizar el conteo de las colonias.

Segunda sesión.

Una semana después de la siembra de las bacterias, en primera instancia se verificó que el crecimiento fuera homogéneo por parte de éstas. Posterior a esto se contó el número de colonias revertantes con ayuda de una lámpara y una lupa, y se marcaron con un plumón de punta fina.





Nota: Un compuesto no pudo ser determinado, ya que no hubo contaminación en la caja Petri.

La preparación de la solución inicial 0.05 M de los compuestos para cada tratamiento se describe en la **Tabla 14** y en la **Figura 19**.

Tabla 14. Cantidad de compuesto pesado para preparar las diluciones en la prueba de Ames.

Compuesto	Peso (mg)
17	9.82
19	9.08
20	10.43
21	9.69

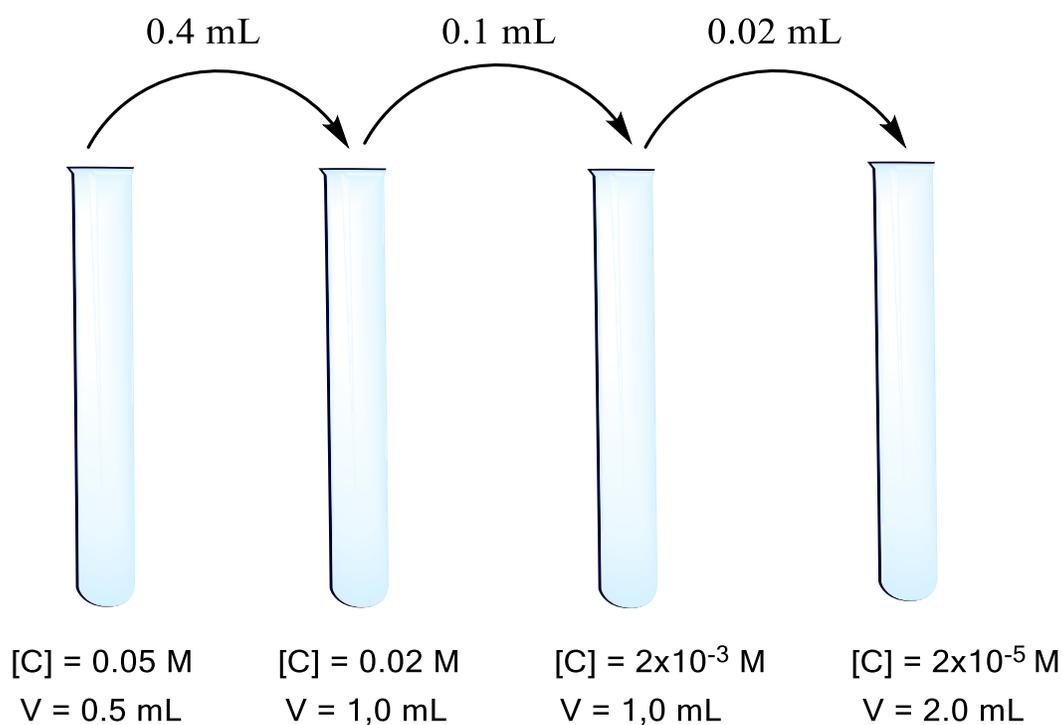


Figura 19. Diluciones realizadas de los compuestos para la prueba de Ames, partiendo de una concentración de 0.05 M y 100% de DMSO hasta llegar a una concentración de 20 μ M y 0.04% de DMSO.





10.2.2 Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en líneas celulares.

Para la realización de la práctica se requirió sanitizar el área de trabajo con una gasa estéril humedecida con EtOH al 70%. Seguido de esto, se marcaron 18 tubos Eppendorf de 1 mL como se muestra en la **Tabla 15**, realizándose cada uno de los tratamientos por duplicado.

Tabla 15. Tratamientos realizados en tubos Eppendorf. Los tubos F, G, H, I contienen los compuestos a evaluar a una concentración de 30 μ M en DMSO.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tubo volumen (μL)	Máxima liberación de LDH	Blanco A	Blanco D, E, F, G, H, I	Control negativo	Control disolvente	17	19	20	21
Medio de cultivo	350	450	500	400	390	390	390	390	390
^aSuspensión celular	100	-	-	100	100	100	100	100	100
Solución de lisis	50	50	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-	10	-	-	-	-
Compuesto	-	-	-	-	-	10	10	10	10
Total	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Incubar 20 minutos a 37°C y 5% de CO₂

^aSuspensión celular: 50,000 células/100 μ L.

Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y posteriormente se colocó el contenido de la **Tabla 16** en una caja de 96 pozos, usando la misma punta de micropipeta para cada repetición, ya que se hizo por triplicado cada tratamiento.





Tabla 16. Tratamientos realizados en la caja de 96 pozos. Los pozos F, G, H, I contienen los compuestos a evaluar a una concentración de 10 μM en DMSO.

Tubo volumen (μL)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Contenido del tubo	Máxima liberación de LDH	Blanco A	Blanco D, E, F	Control negativo	Control disolvente	17	19	20	21
Buffer de LDH	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Agitar dando golpes leves con la palma de la mano en un extremo de la caja durante 30 segundos. Cubrir la caja con papel aluminio e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.									
HCl 1N	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Agitar dando golpes leves con la palma de la mano en un extremo de la caja por 30 segundos.									

Por último se colocó la placa de 96 pozos en el lector de microplacas para leer la absorbancia a $\lambda=562$ nm. Las absorbancias corregidas se calcularon restando el blanco a cada uno de los tratamientos correspondientes.

En la **Tabla 17** se registró el peso de los compuestos para preparar la disolución inicial a 0,01M.

Tabla 17. Cantidad de compuesto pesado en la prueba de LDH.

Compuesto	Peso (mg)
17	1,97
19	2,05
20	2,07
21	1,93





La **Figura 20** muestra las diluciones realizadas para alcanzar la concentración final de $10 \mu\text{M}$ para la prueba de determinación de LDH.

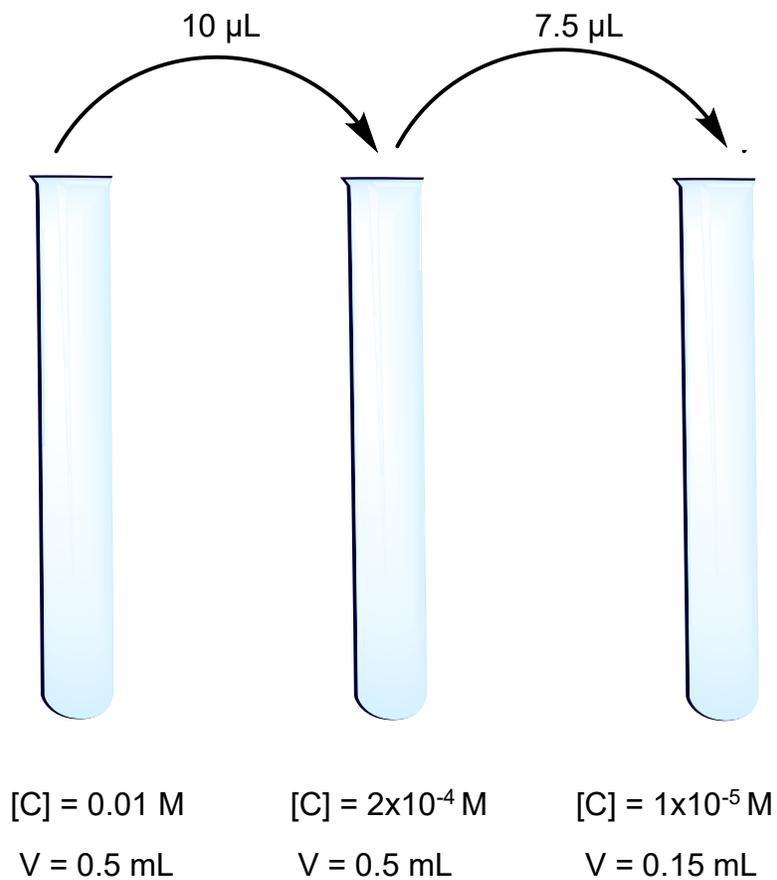


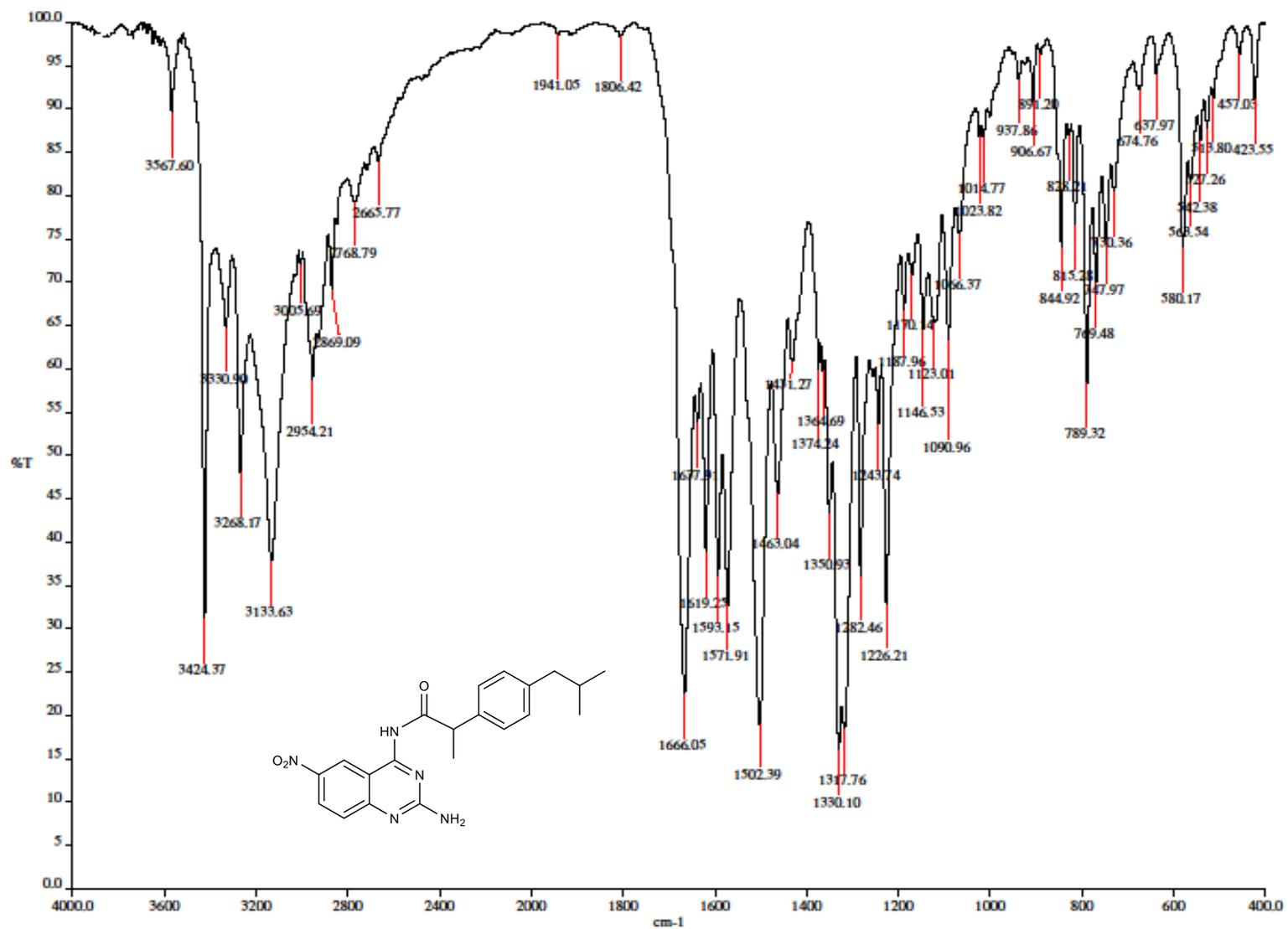
Figura 20. Diluciones realizadas de los compuestos para la prueba de LDH, partiendo de una concentración de 0,01 M hasta llegar a una concentración de 1×10^{-5} M.



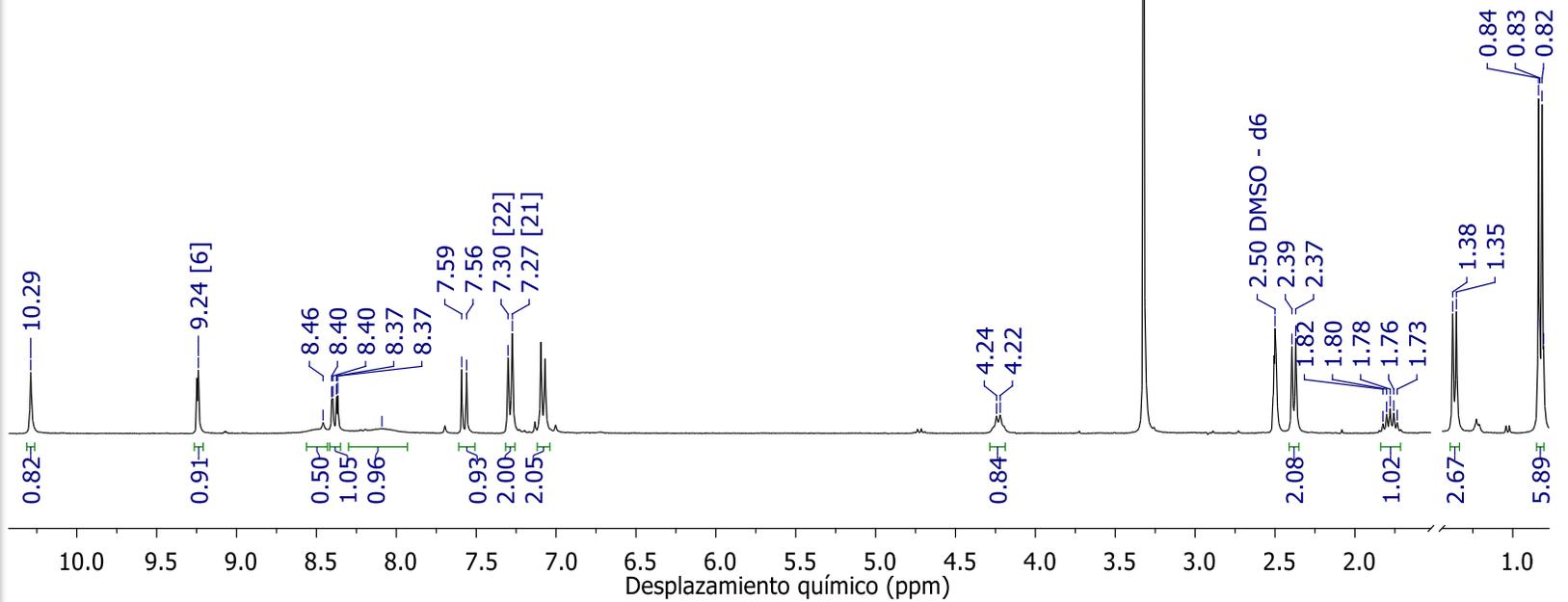
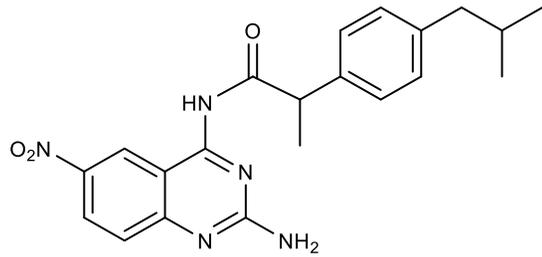


ANEXO II: IR, RMN-¹H, NOESY, EM



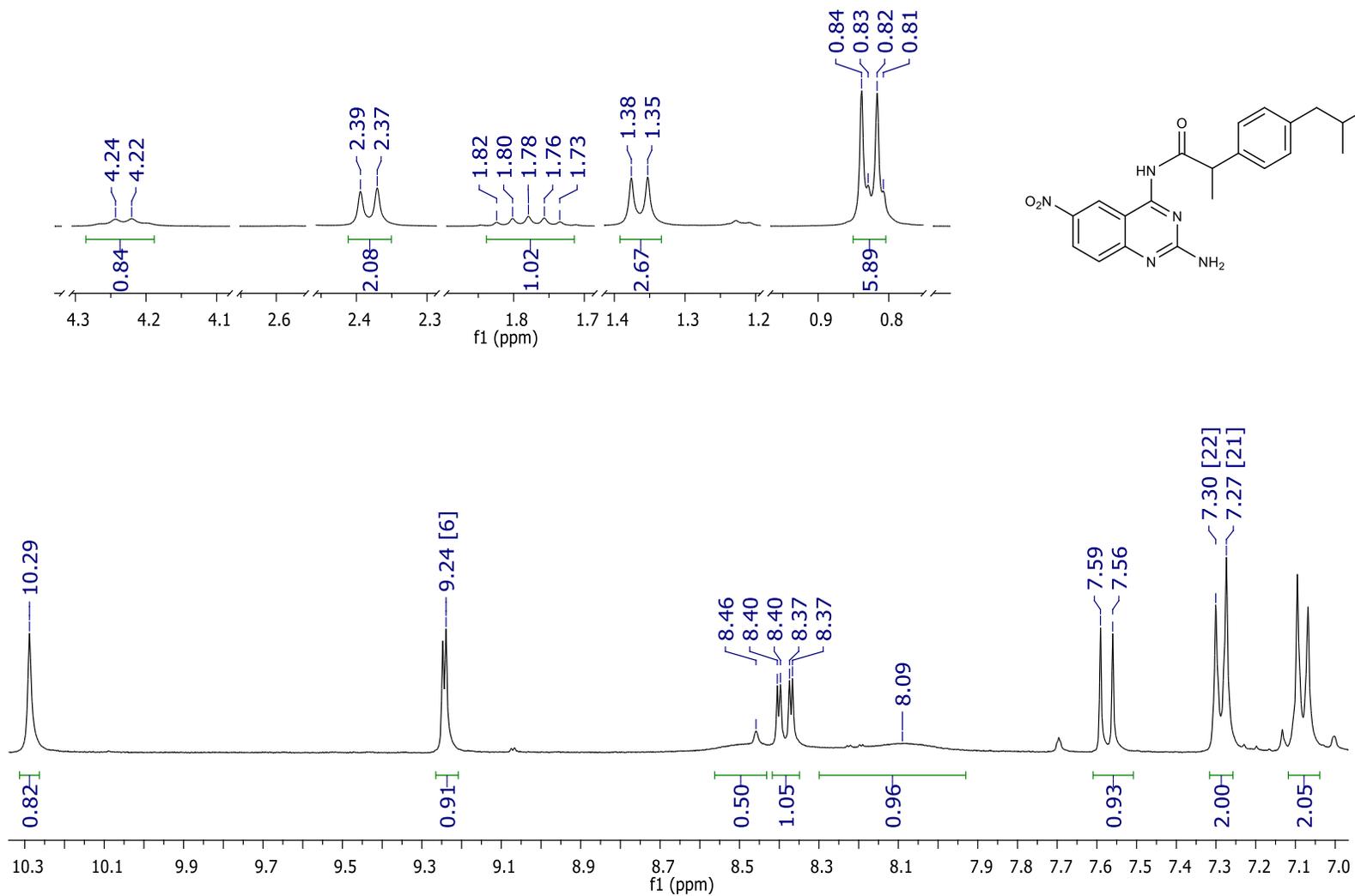


Espectro 1. Espectro de IR-ATR del compuesto 17.

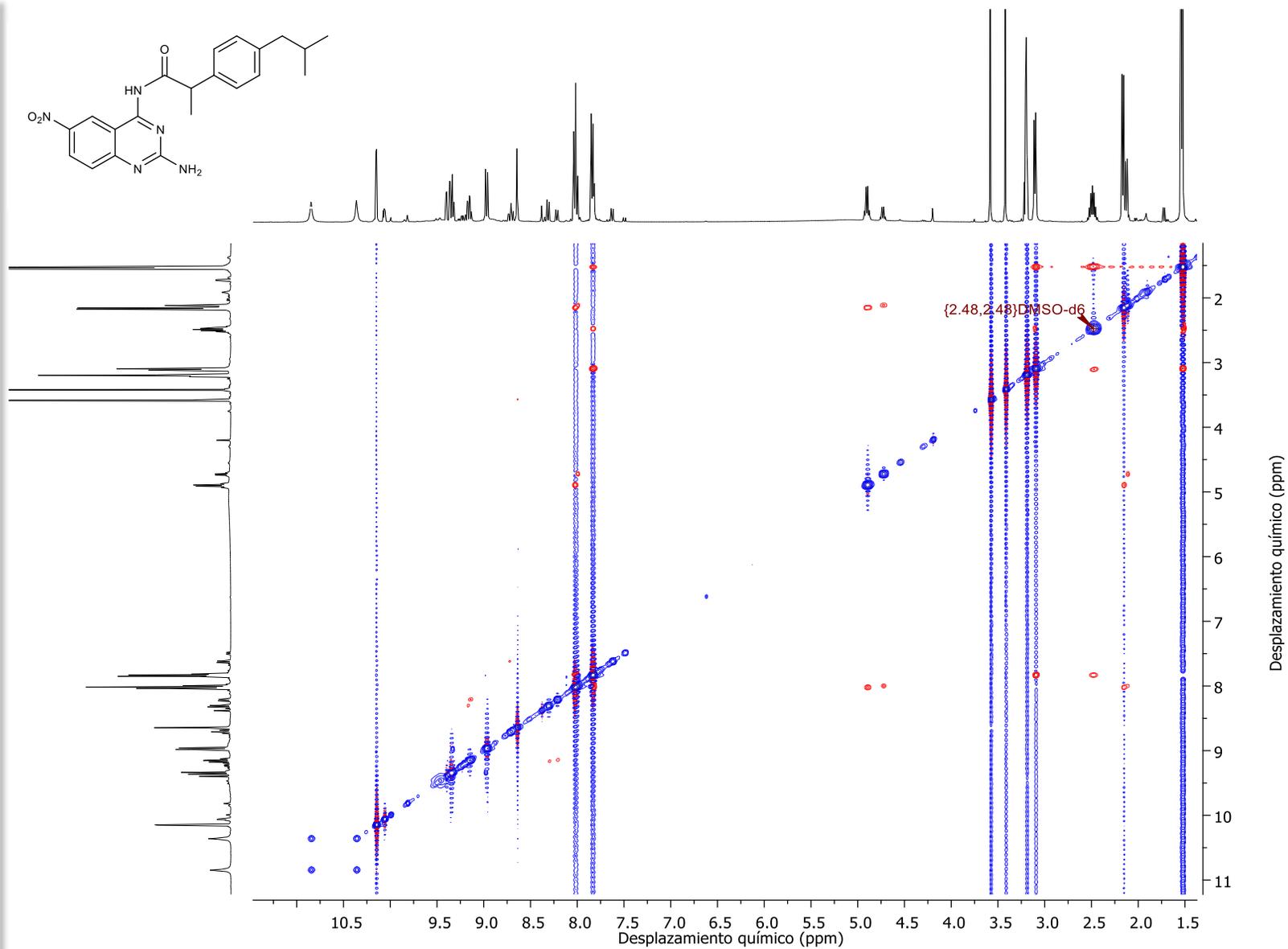
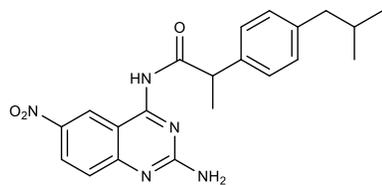


Espectro 2. Espectro de RMN ^1H del compuesto **17** (DMSO-d₆, 400 MHz).

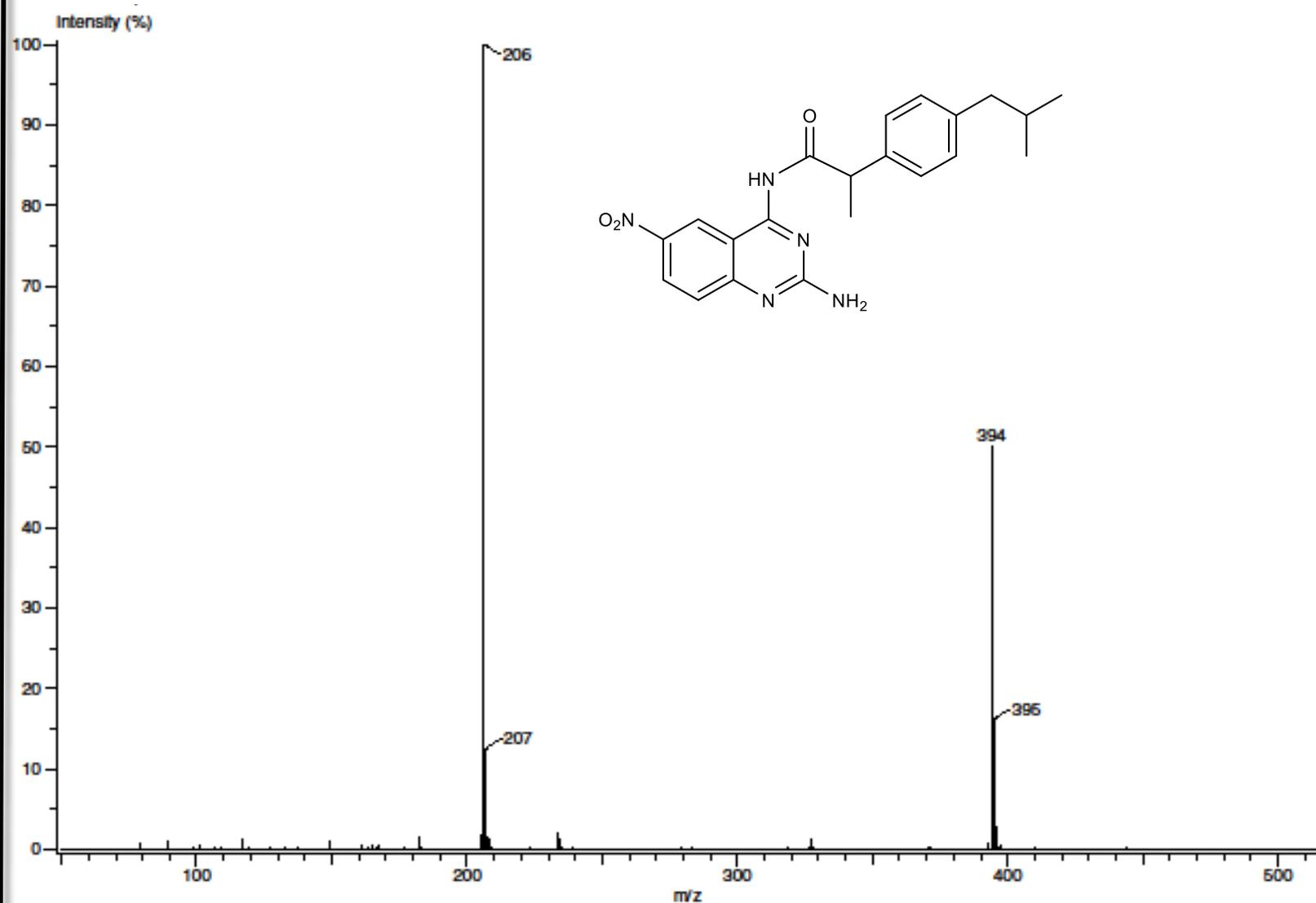




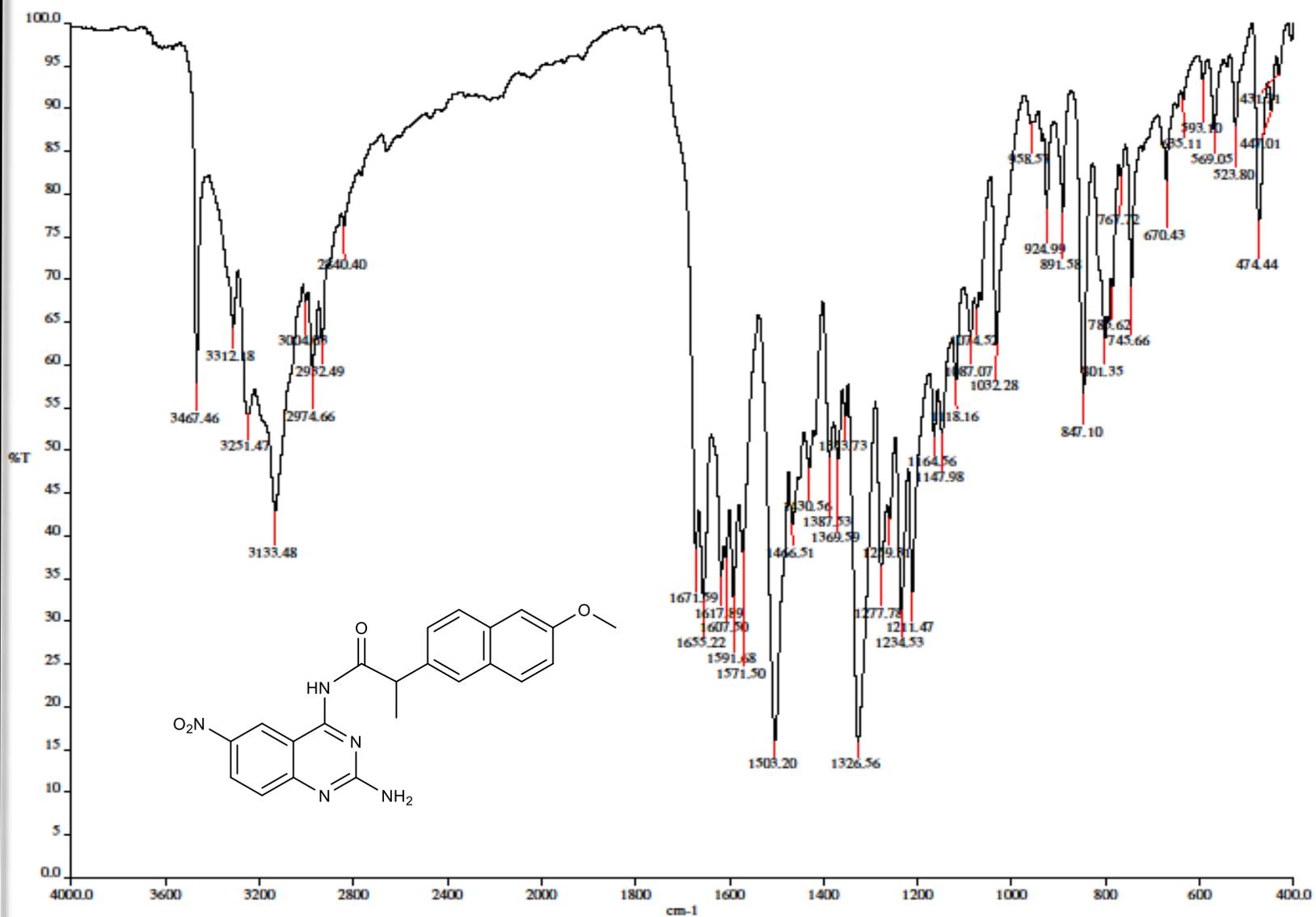
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H del compuesto **17** (DMSO-d₆, 400 MHz). Ampliación.



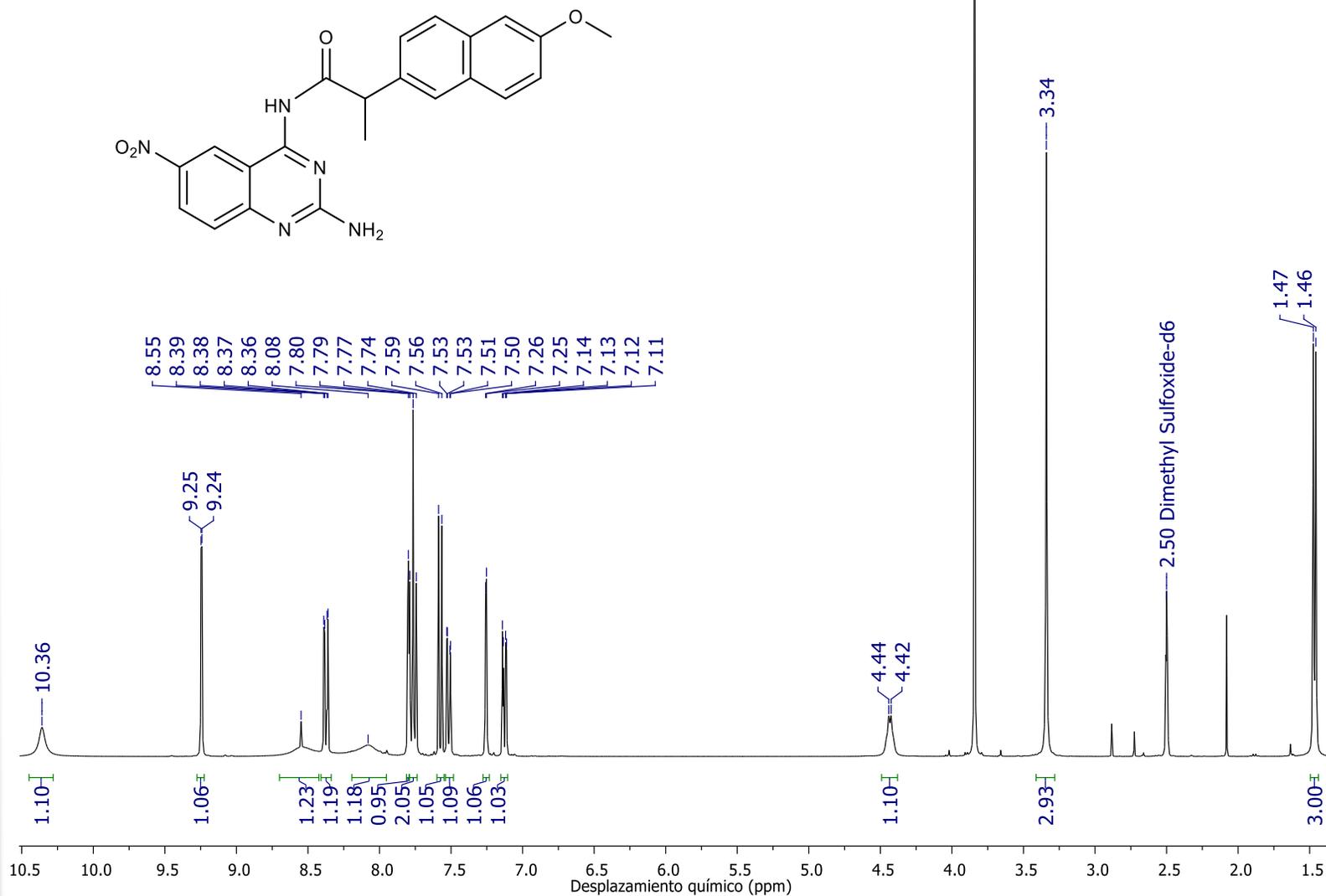
Espectro 4. Espectro de correlación homonuclear NOESY del compuesto 17 (DMSO-d₆, 400 MHz).



Espectro 5. Espectro de masas (DART) del compuesto 17.

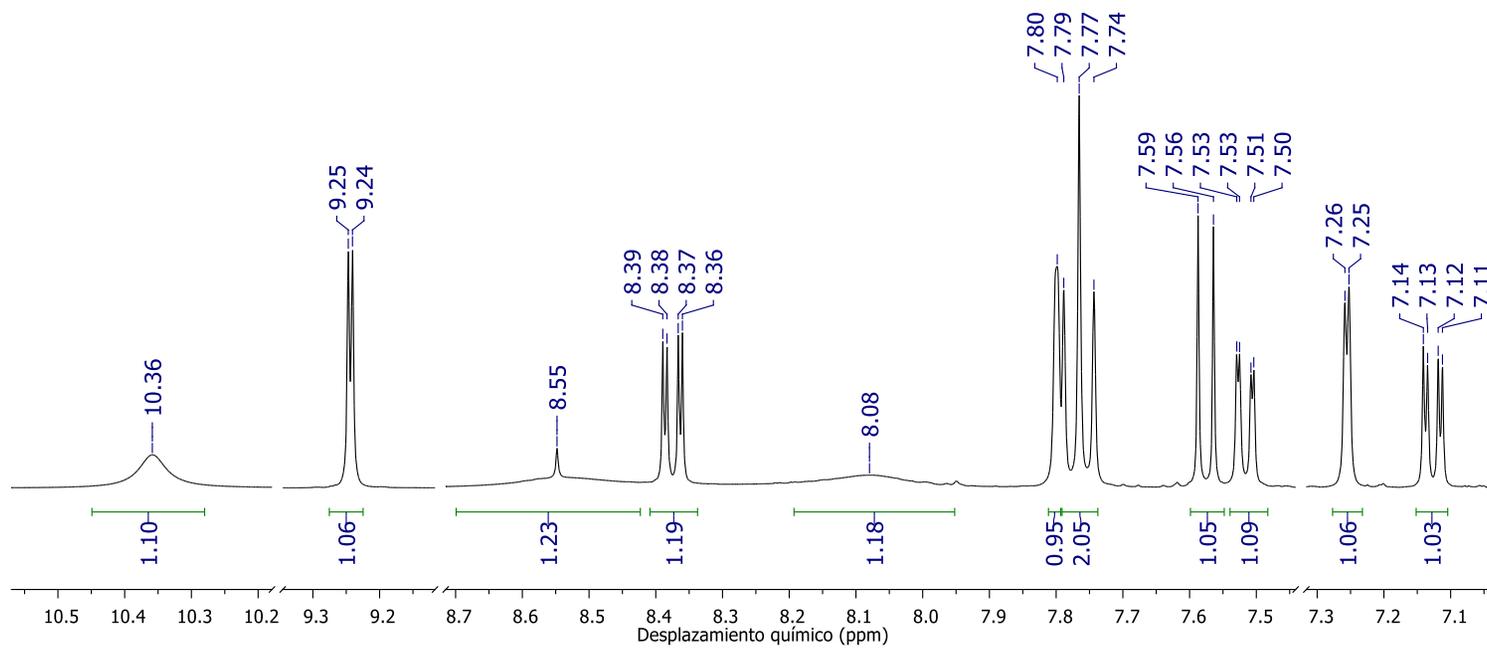
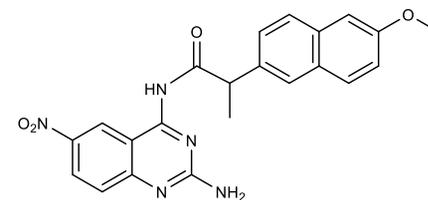
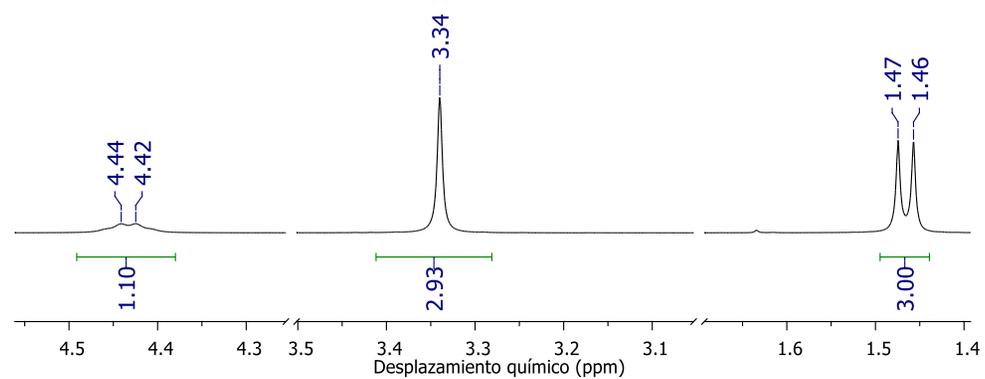


Espectro 6. Espectro de IR-ATR del compuesto 19.

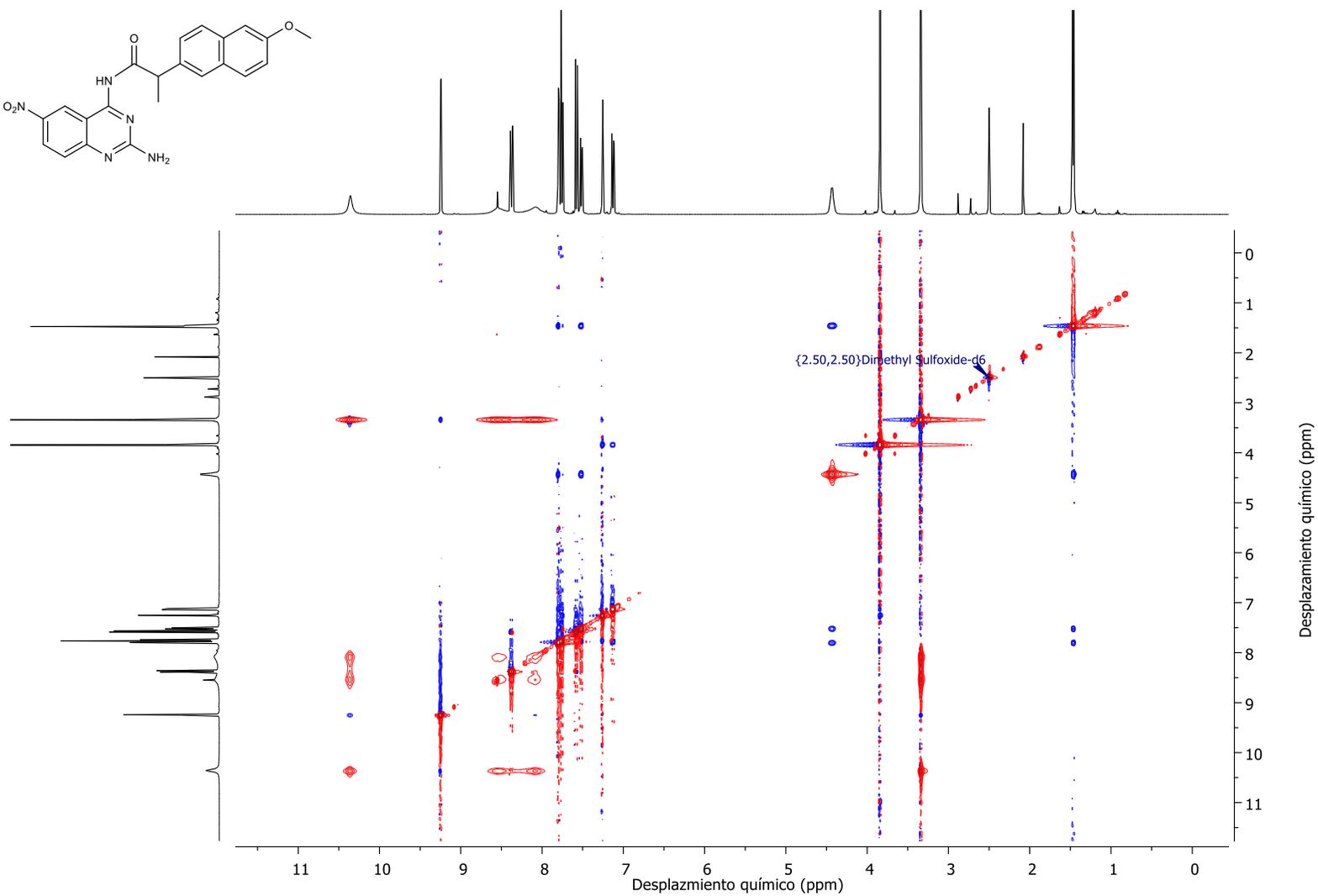
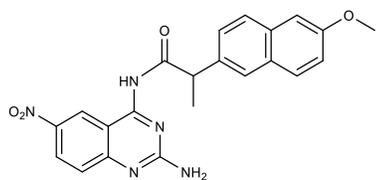


Espectro 7. Espectro de RMN ¹H del compuesto **19** (DMSO-d₆, 400 MHz).

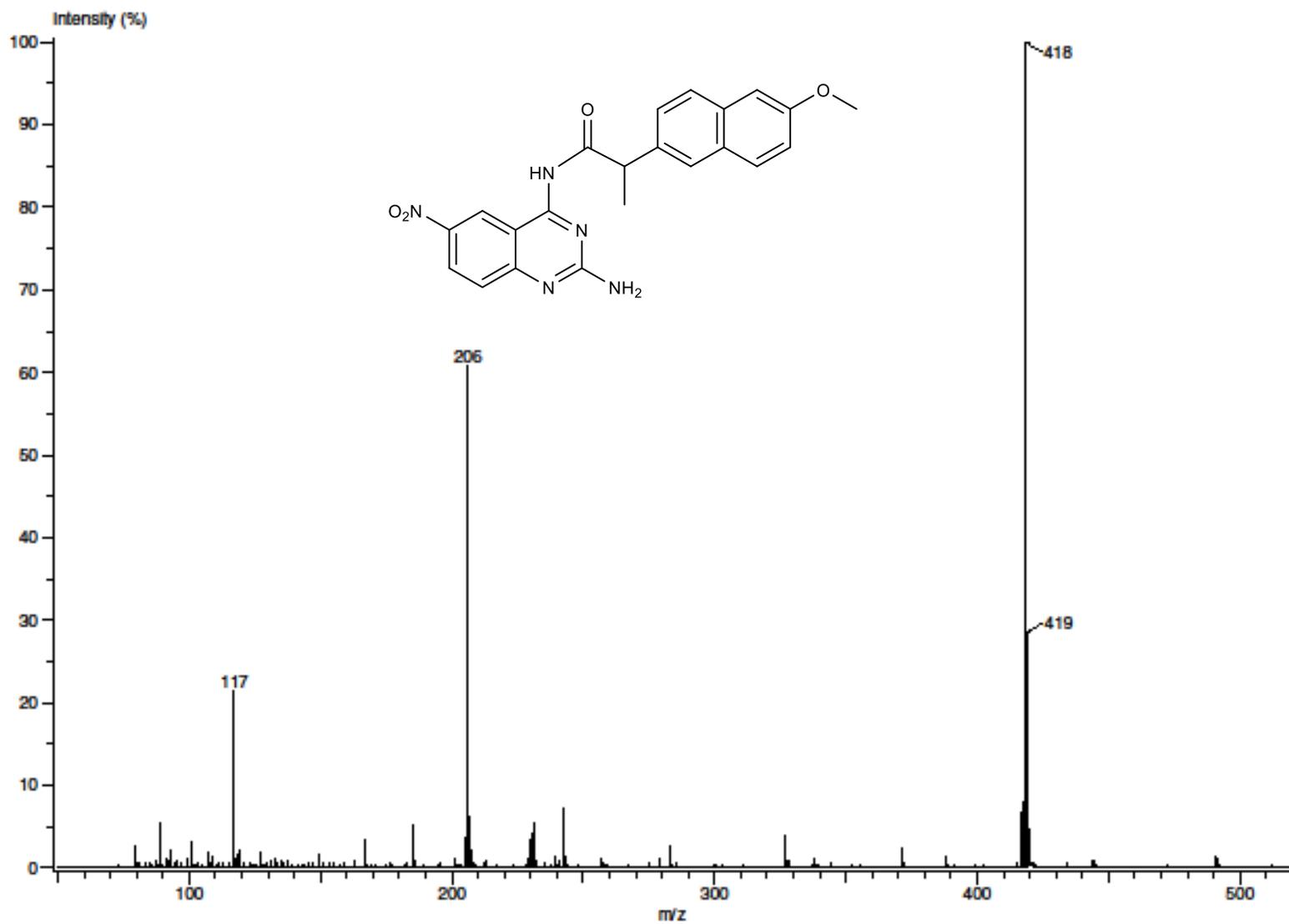




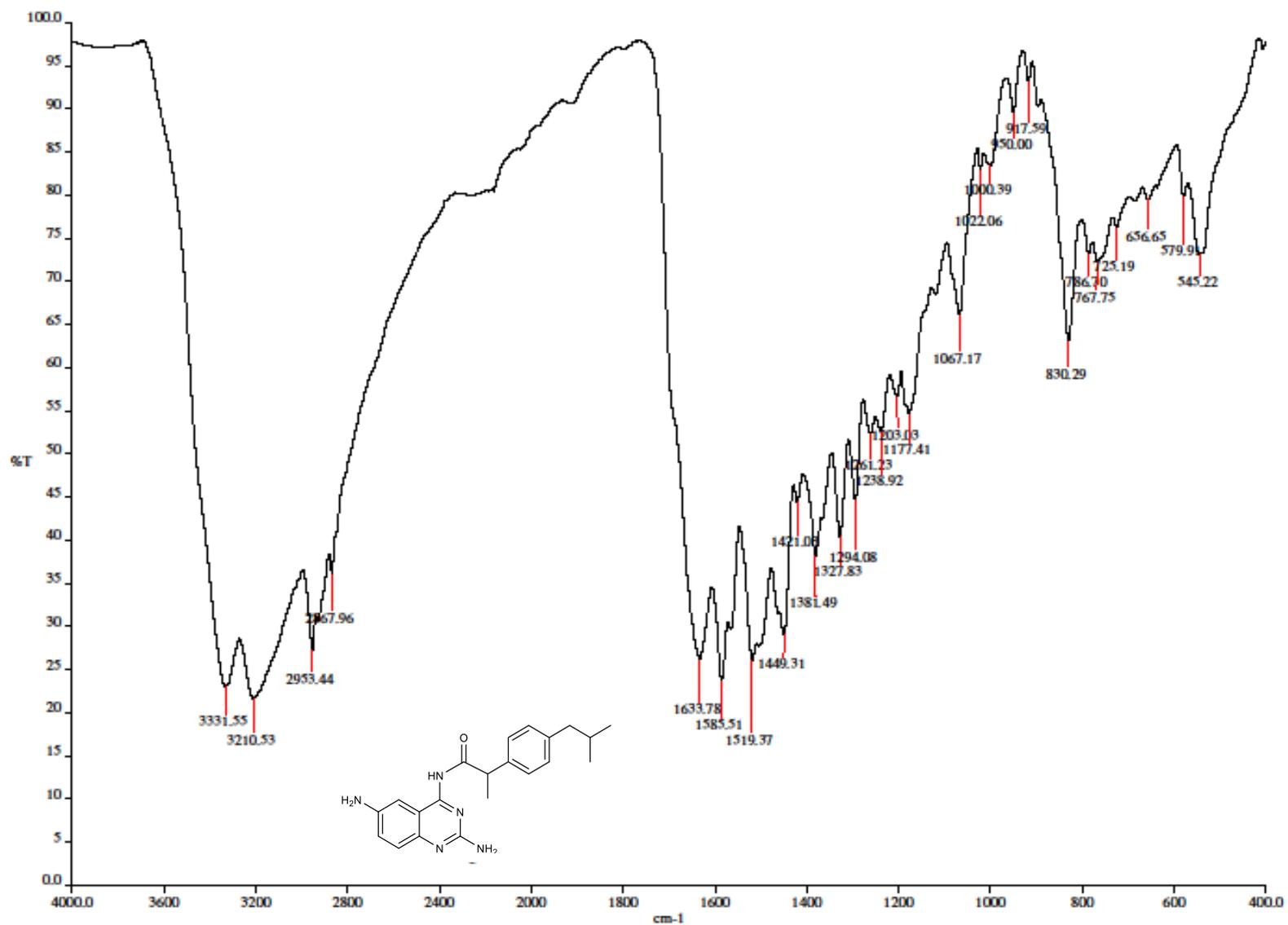
Espectro 8. Espectro de RMN ^1H del compuesto **19** (DMSO- d_6 , 400 MHz). Ampliación.



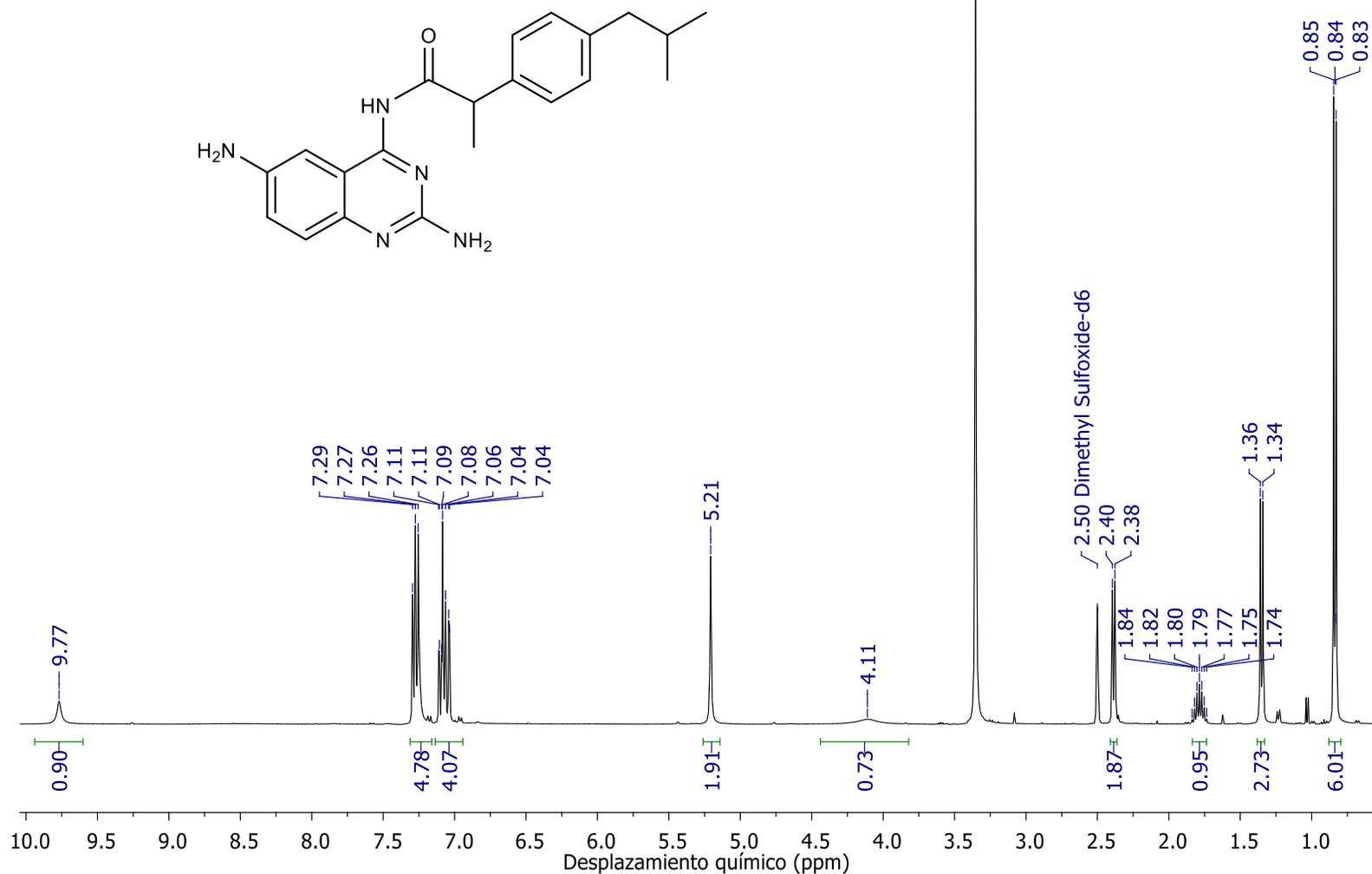
Espectro 9. Espectro de correlación homonuclear NOESY del compuesto **19** (DMSO-d₆, 400 MHz).



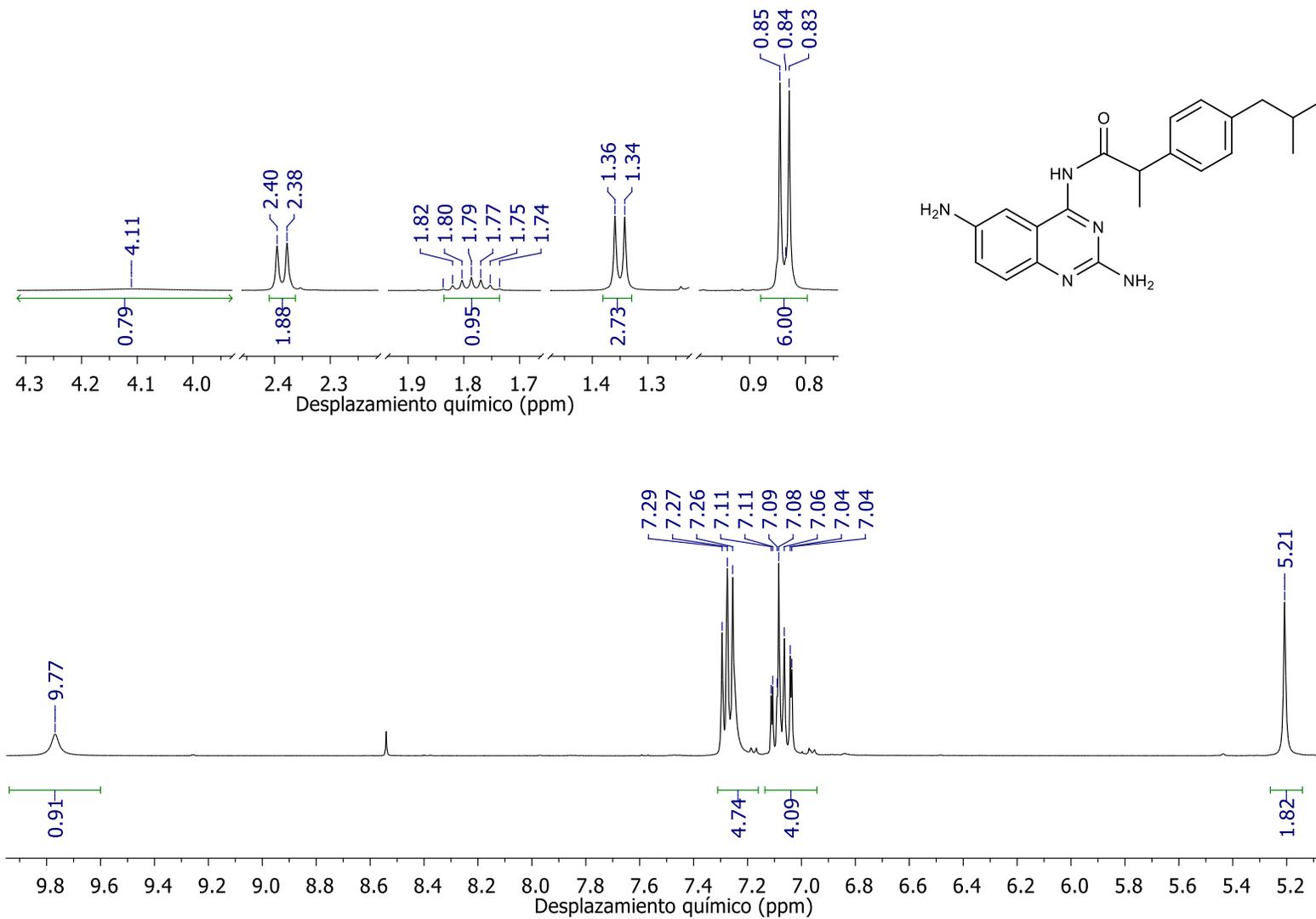
Espectro 10. Espectro de masas (DART) del compuesto 19.



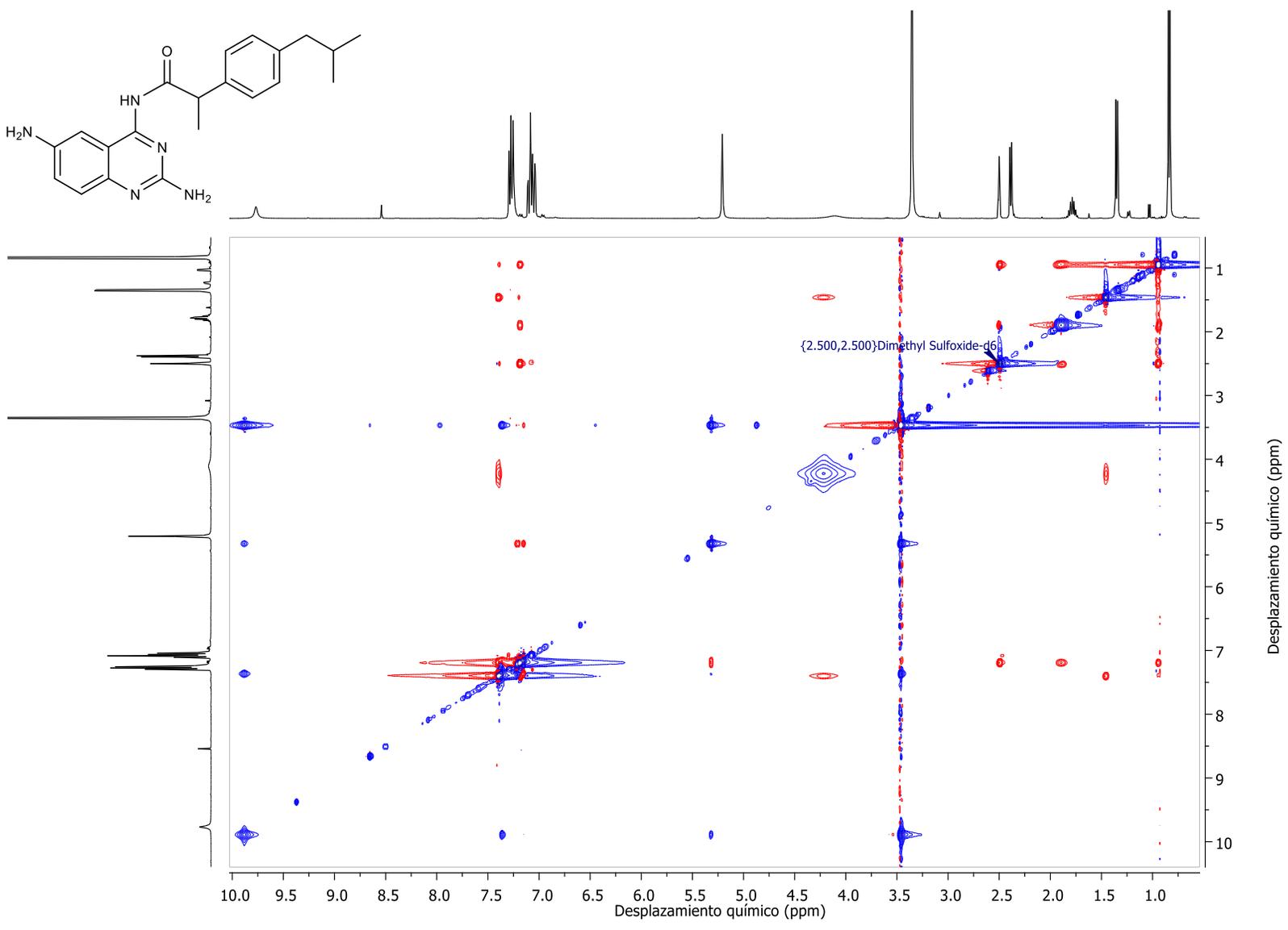
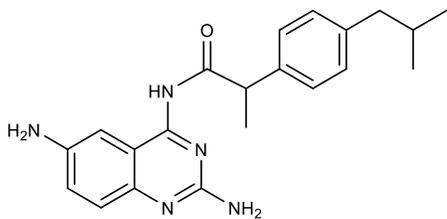
Espectro 11. Espectro de IR-ATR del compuesto 20.



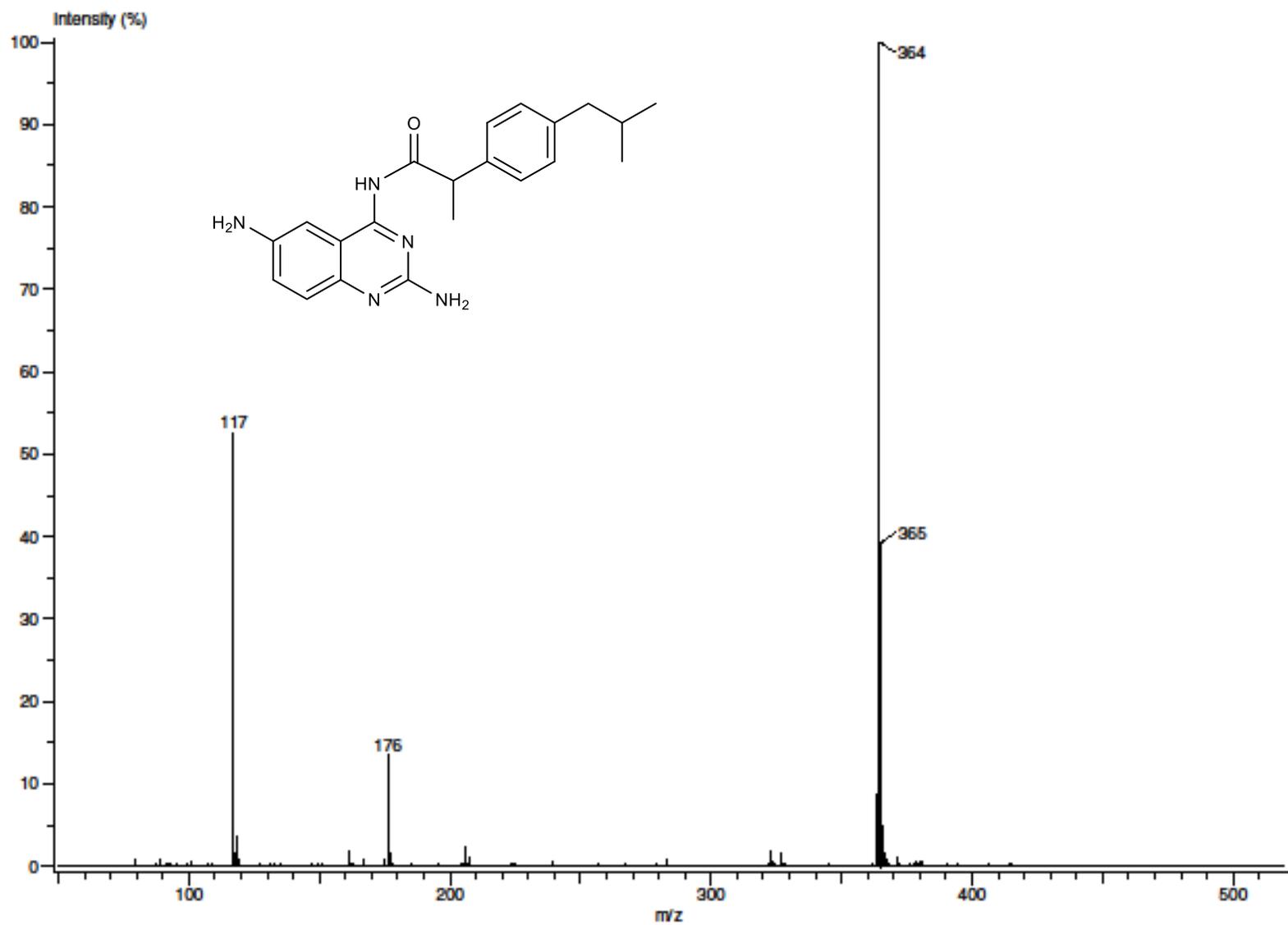
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H del compuesto **20** (DMSO-d₆, 400 MHz).



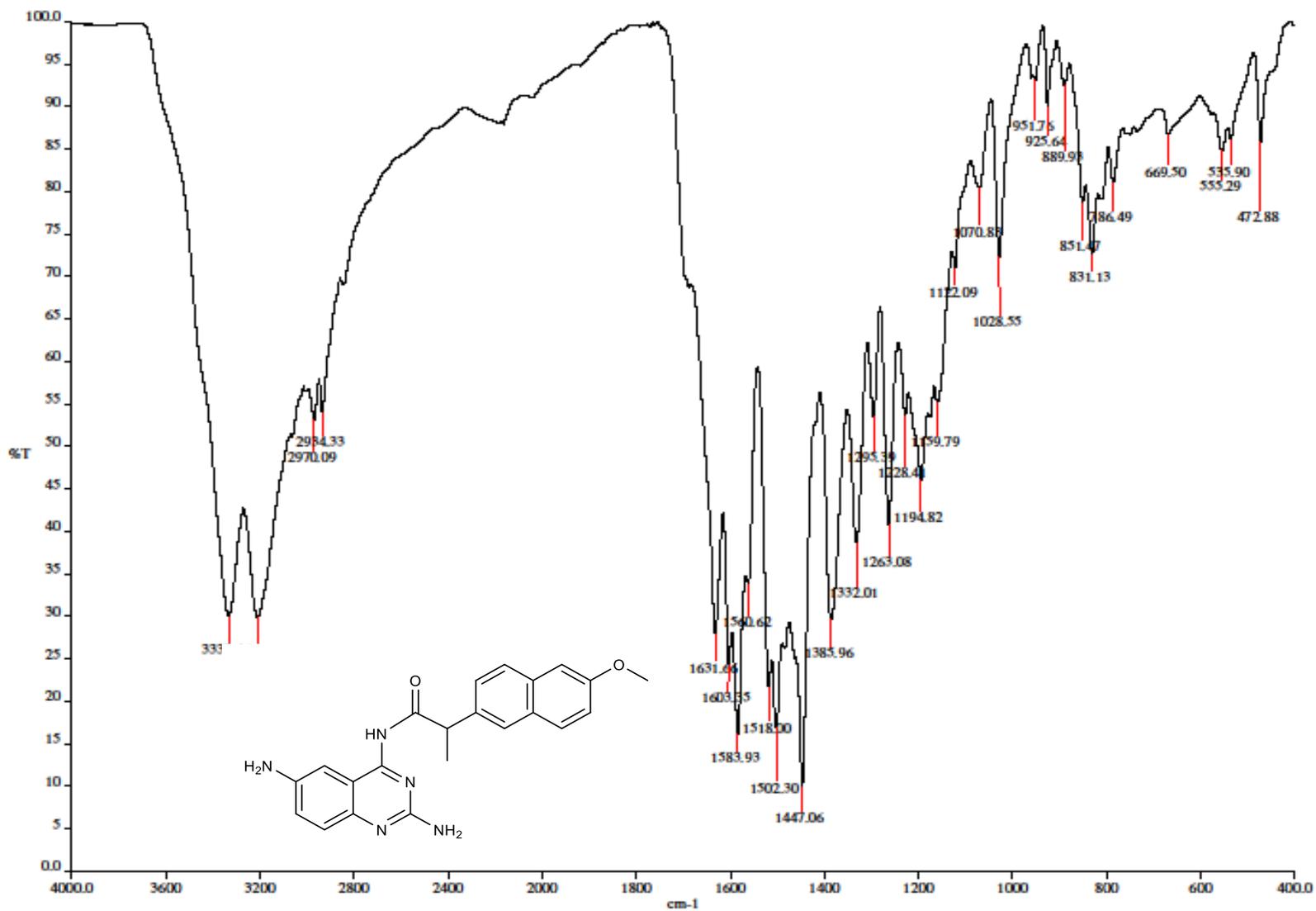
Espectro 13. Espectro de RMN ¹H del compuesto **20** (DMSO-d₆, 400 MHz). Ampliación.



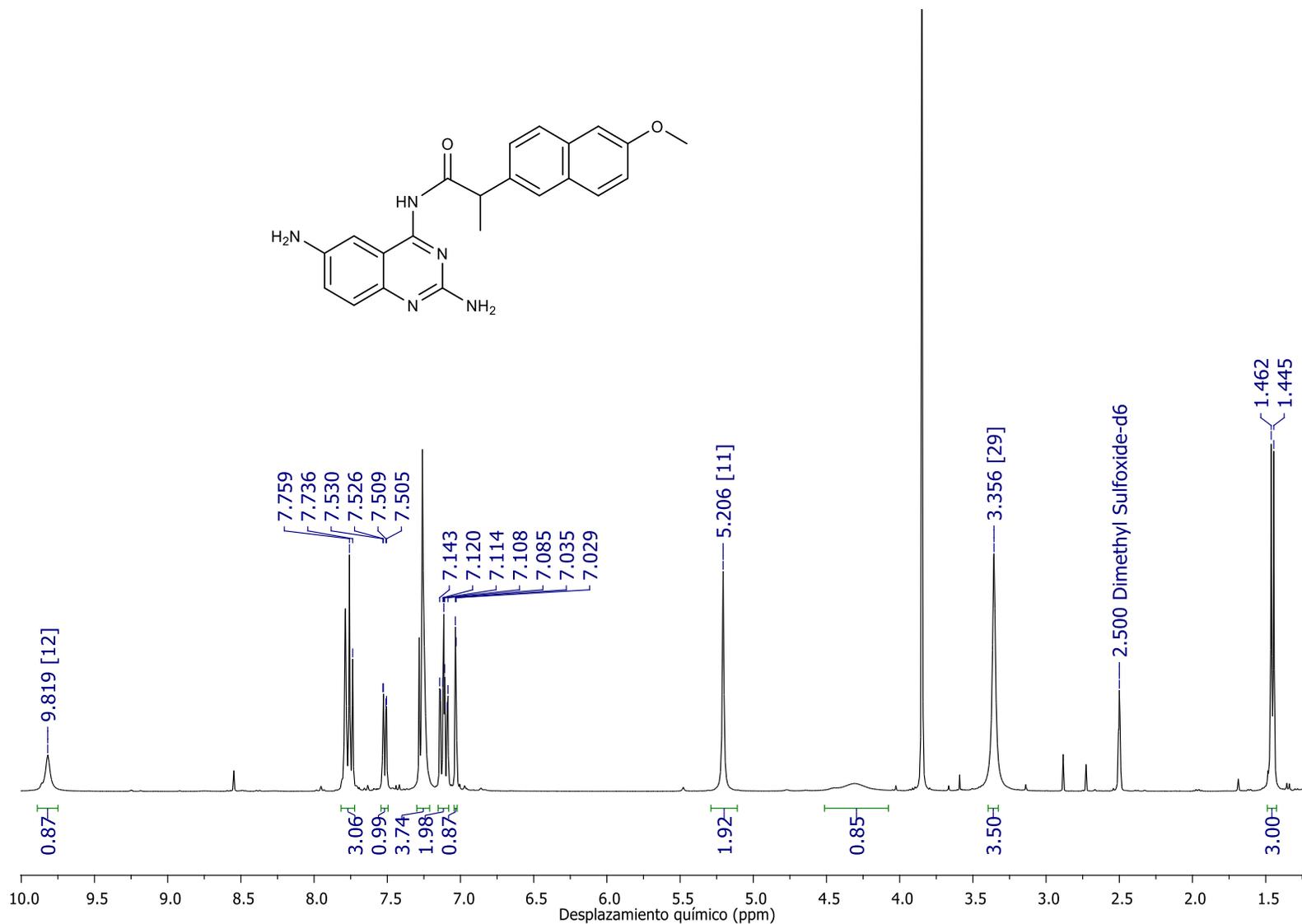
Espectro 14. Espectro de correlación homonuclear NOESY del compuesto **20** (DMSO-d6, 400 MHz).



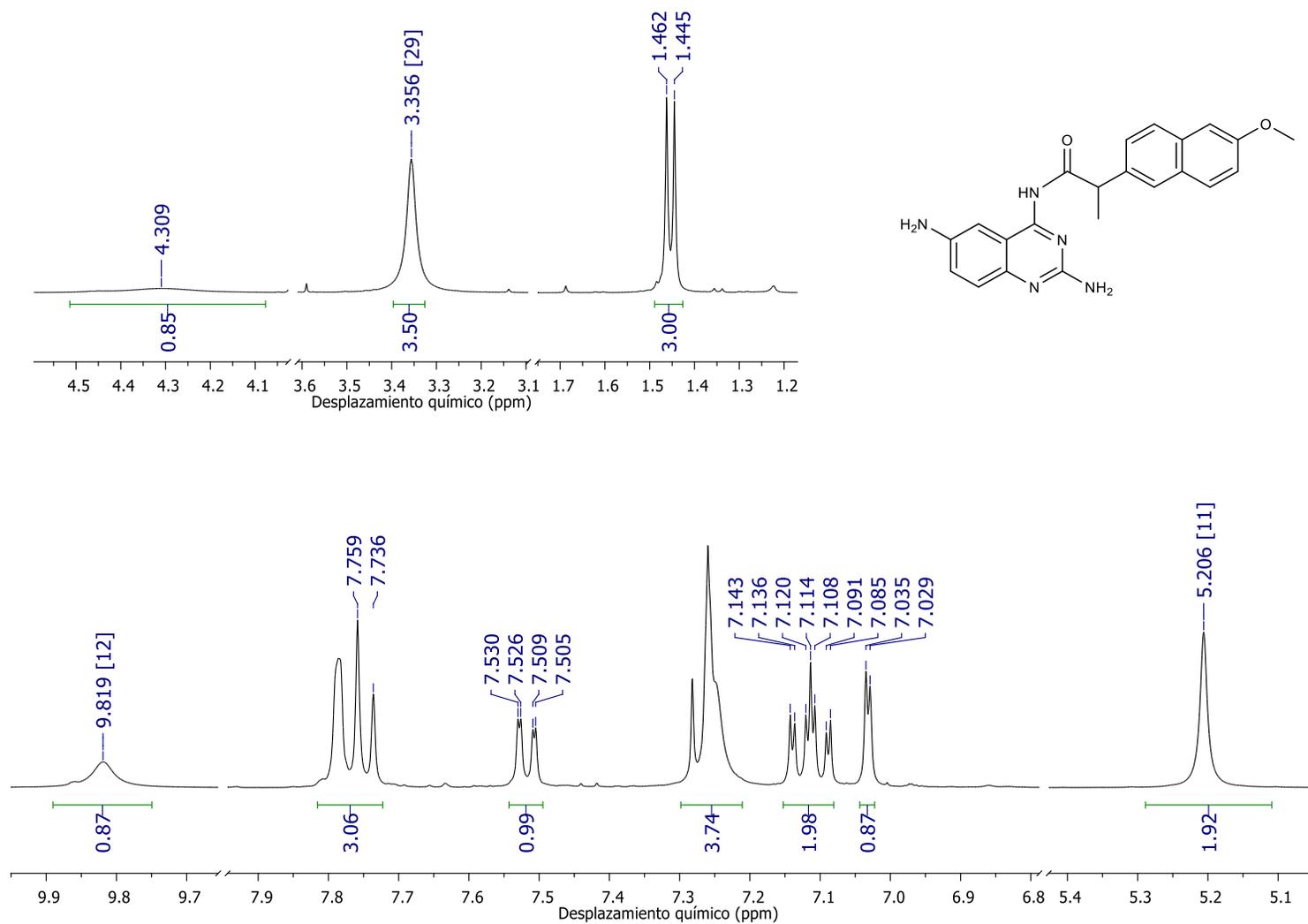
Espectro 15. Espectro de masas (DART) del compuesto 20.



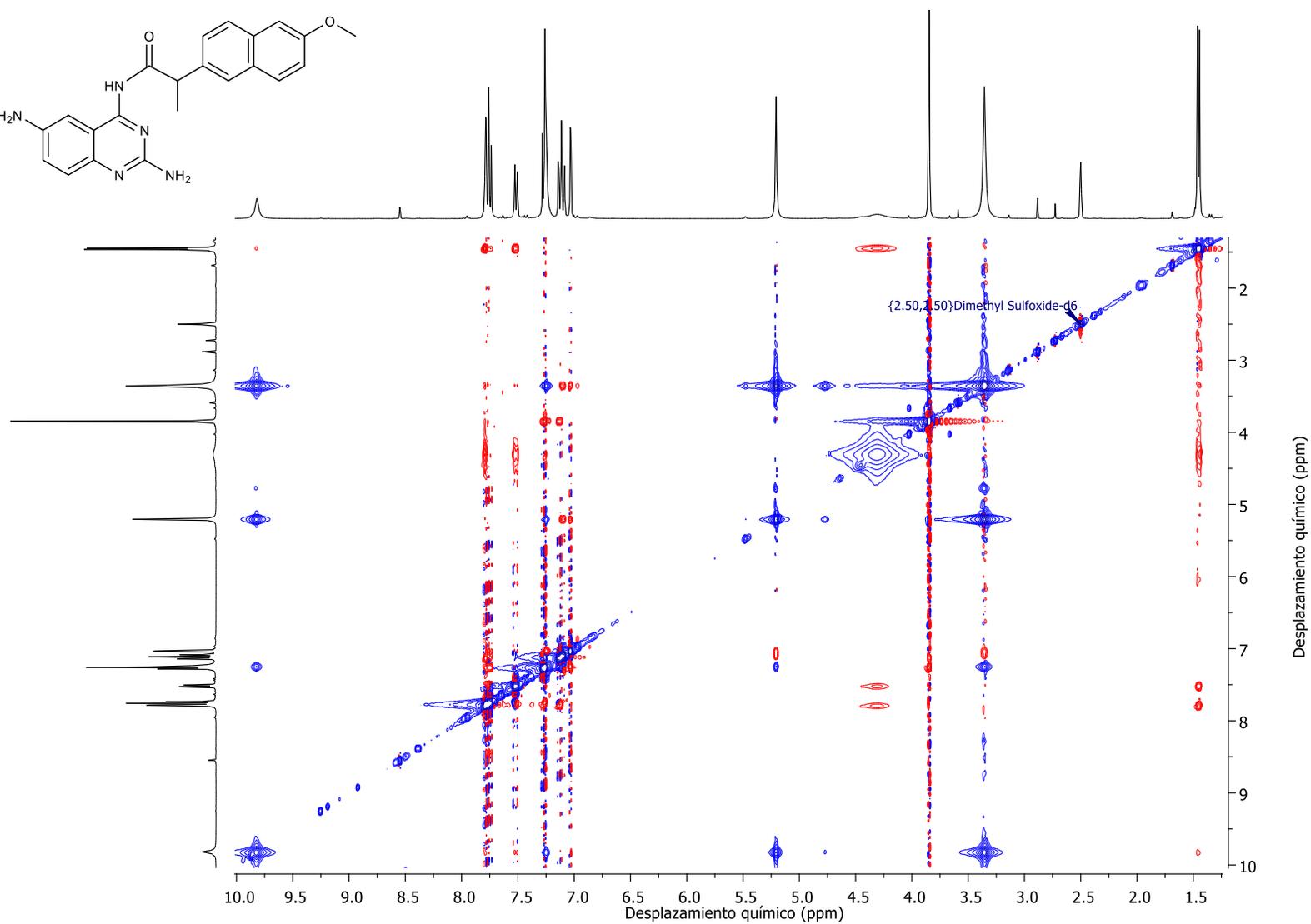
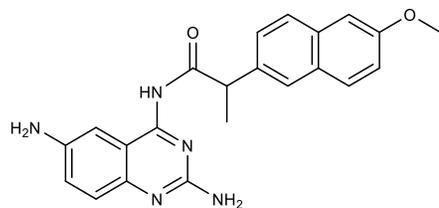
Espectro 16. Espectro de IR-ATR del compuesto 21.



Espectro 17. Espectro de RMN ¹H del compuesto **21** (DMSO-d6, 400 MHz).

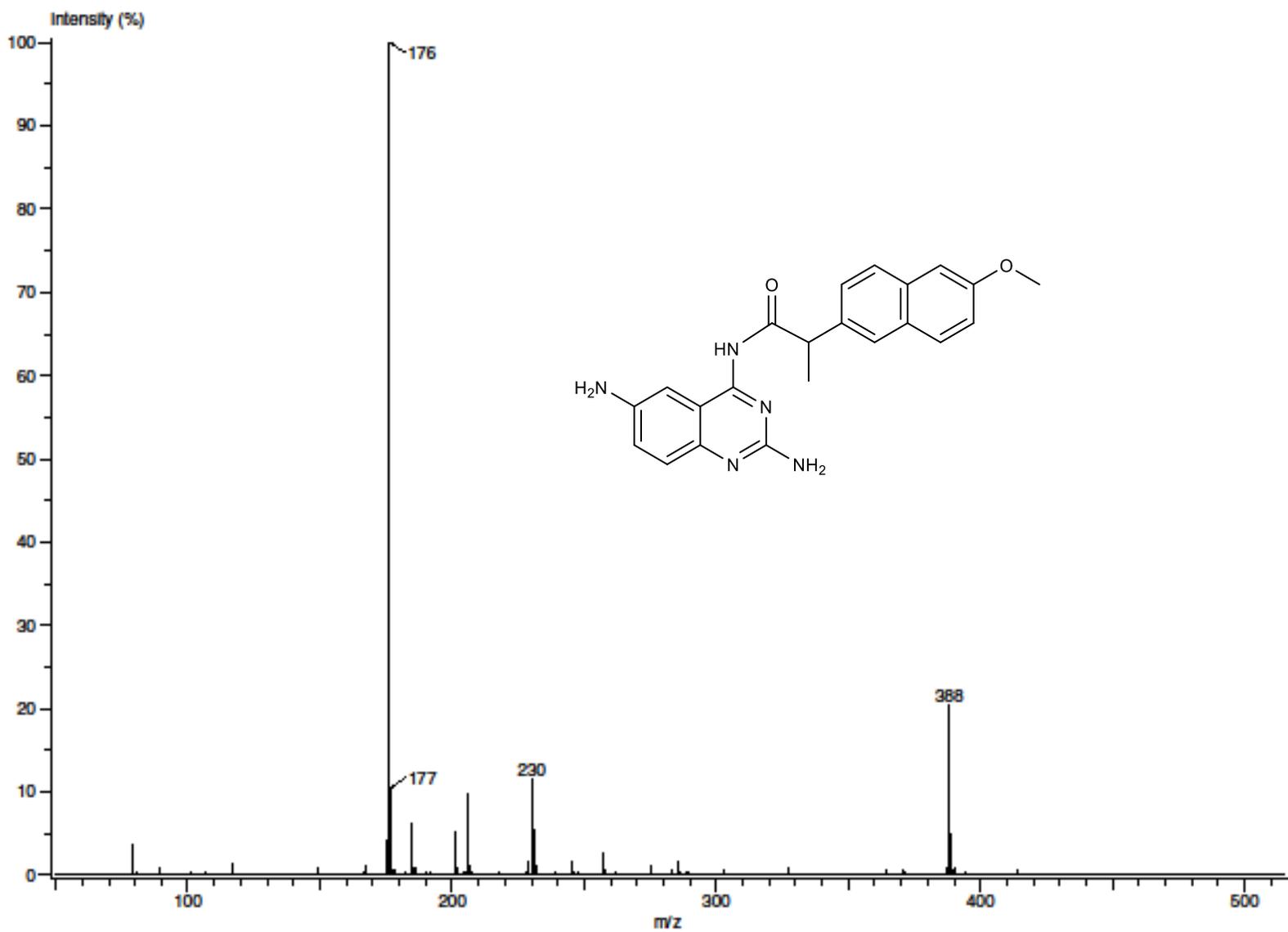


Espectro 18. Espectro de RMN ^1H del compuesto **21** (DMSO- d_6 , 400 MHz). Ampliación.



Espectro 19. Espectro de correlación homonuclear NOESY del compuesto **21** (DMSO-d₆, 400 MHz).





Espectro 20. Espectro de masas (DART) del compuesto 21.



ANEXO III: ACOPLAMIENTO MOLECULAR



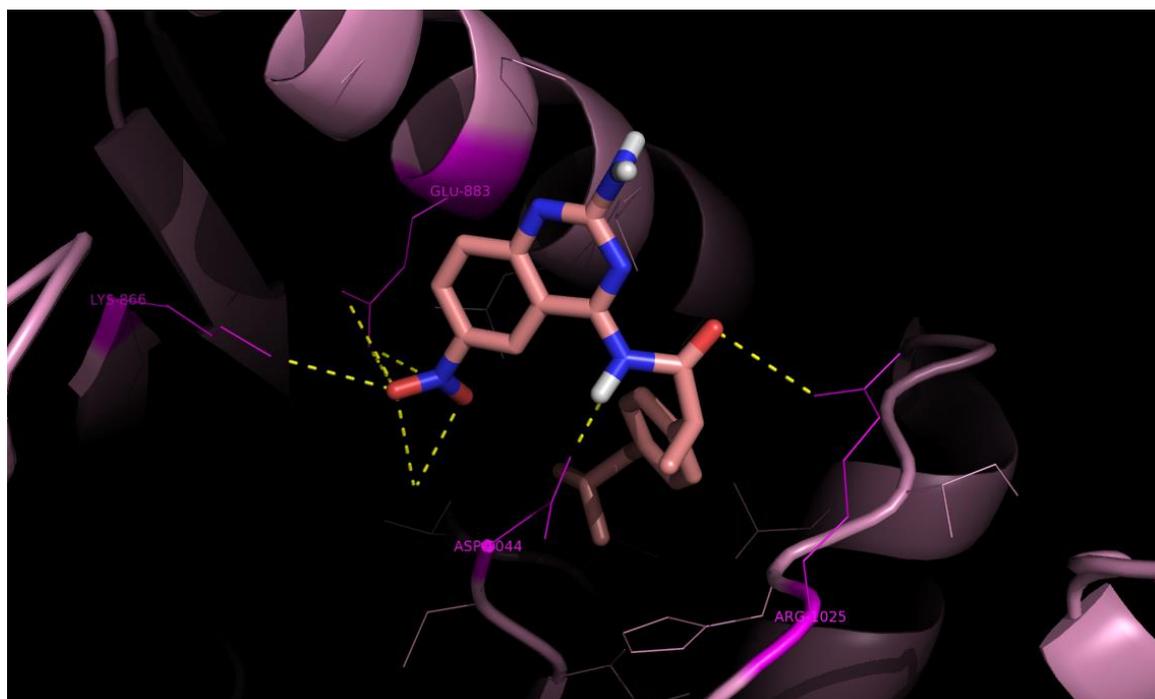


Figura 21. Docking entre el compuesto 17 y el receptor VEGFR.

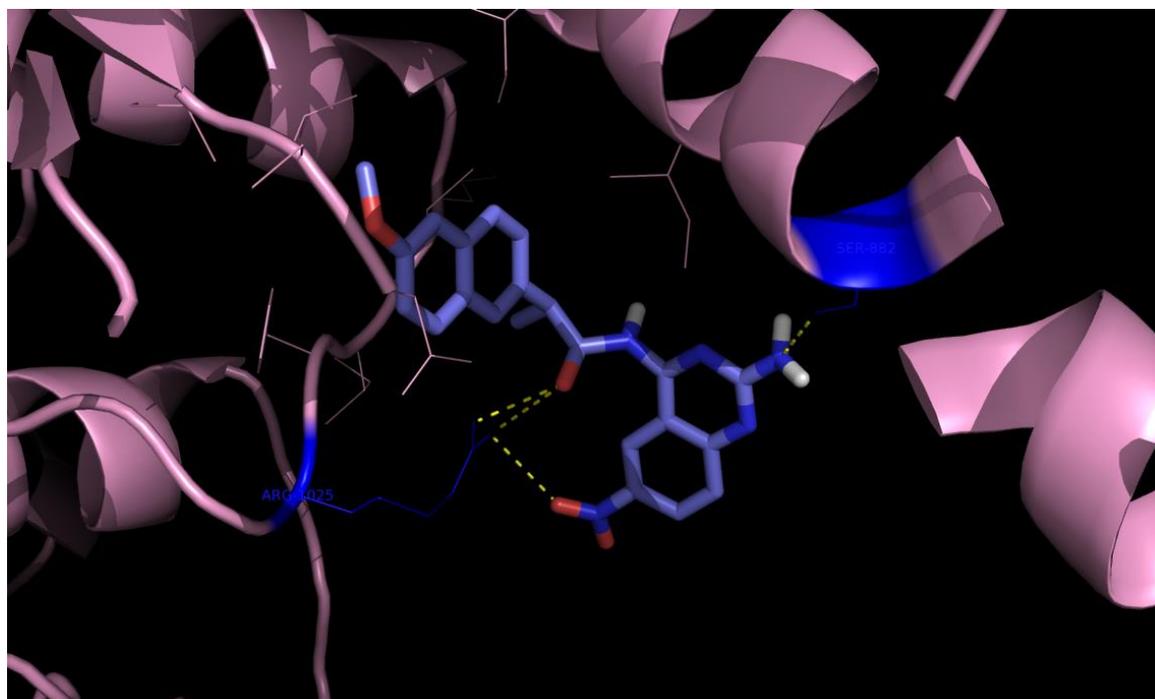


Figura 22. Docking entre el compuesto 19 y el receptor VEGFR.



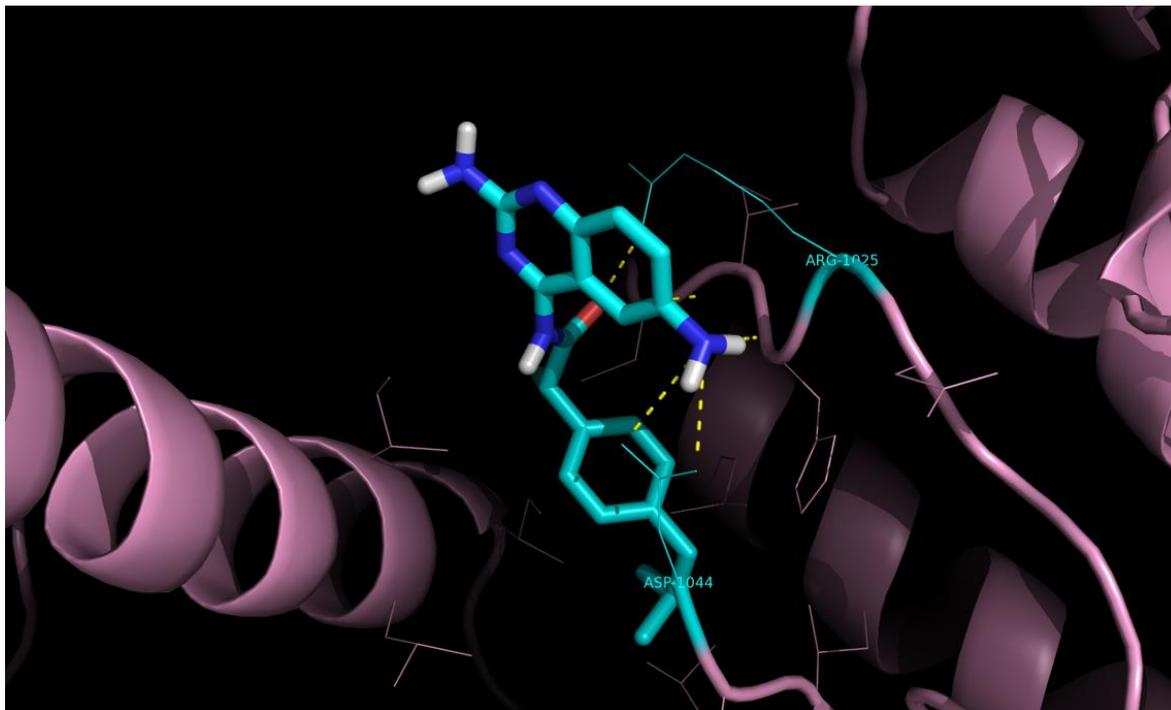


Figura 23. Docking entre el compuesto **20** y el receptor VEGFR.

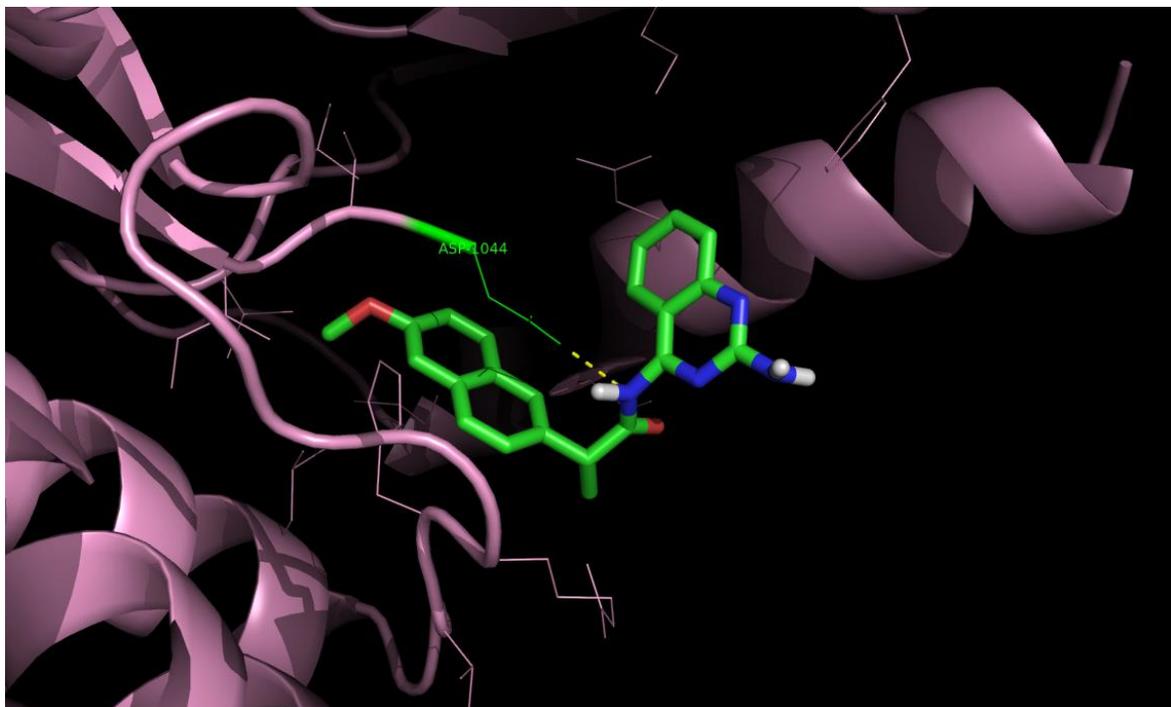


Figura 24. Docking entre el compuesto **21** y el receptor VEGFR.



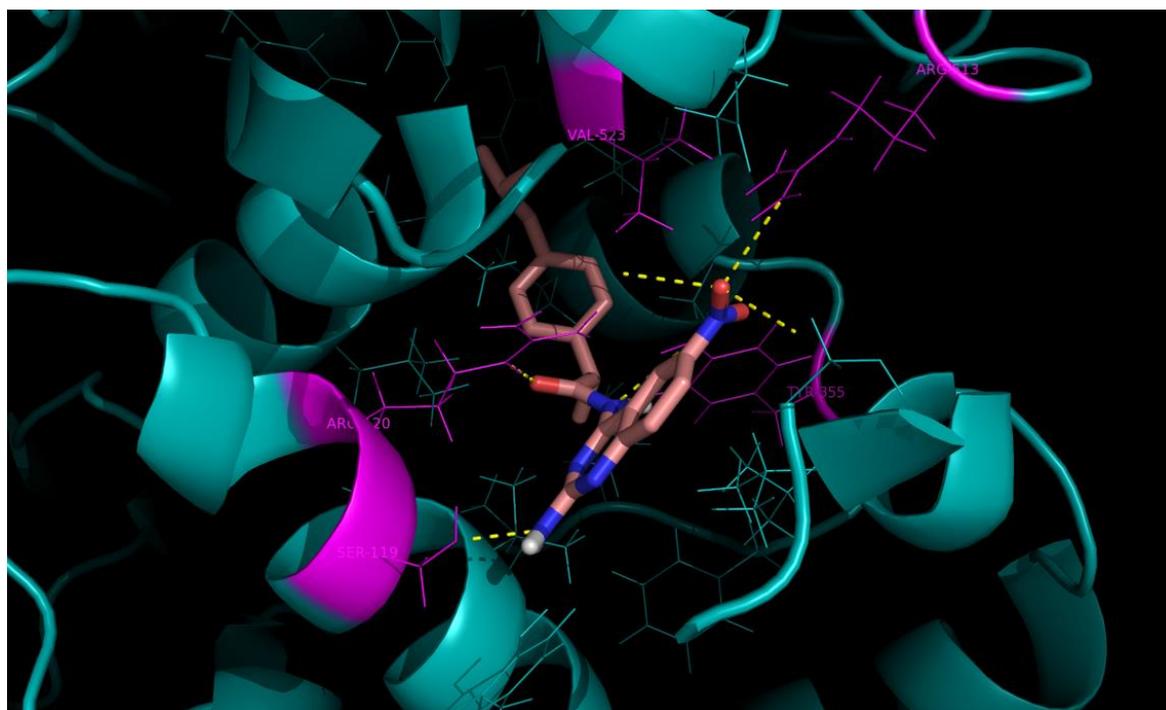


Figura 25. Docking entre el compuesto **17** y la enzima COX-2.

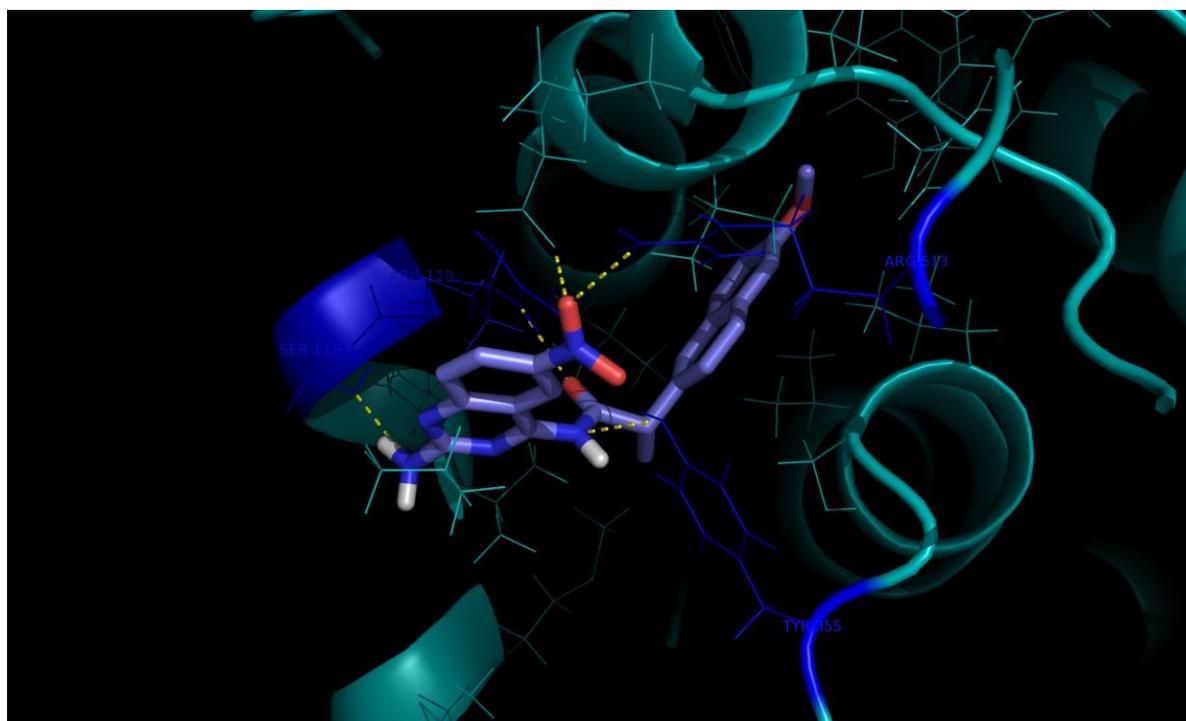


Figura 26. Docking entre el compuesto **19** y la enzima COX-2.



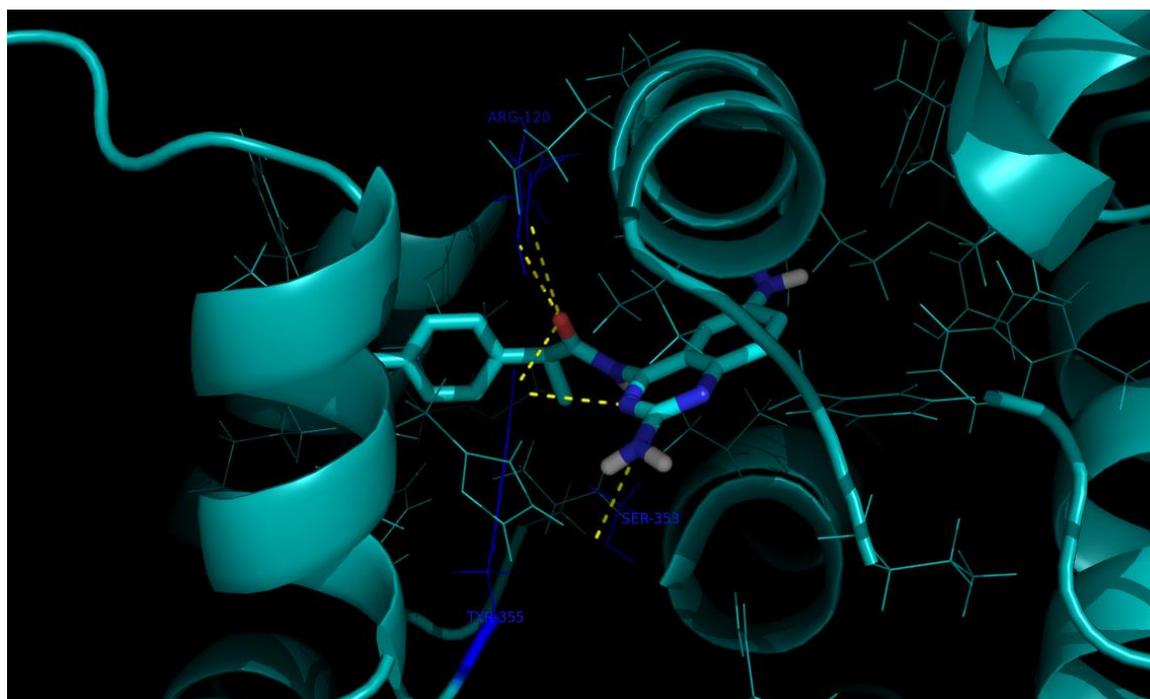


Figura 27. Docking entre el compuesto **20** y la enzima COX-2.

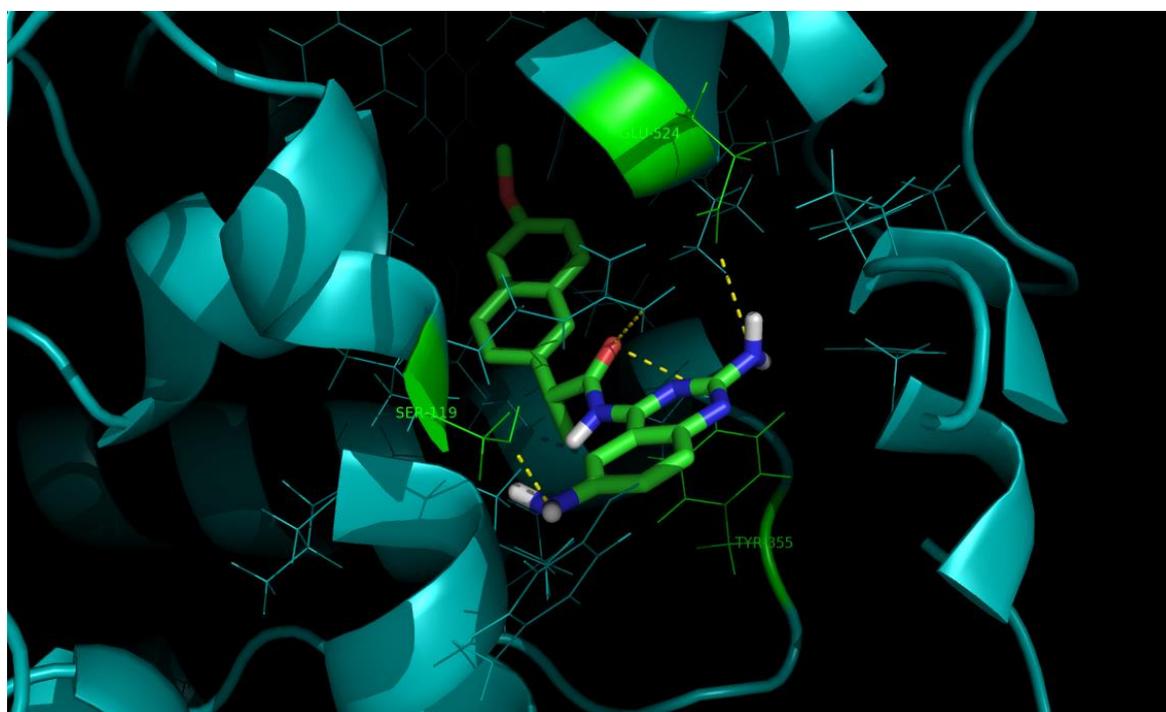


Figura 28. Docking entre el compuesto **21** y la enzima COX-2.

