



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Diseño, síntesis y evaluación biológica de un *set* de quinazolinas como potenciales inhibidores de tubulina

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. Frida Samantha Herrera Vázquez

Tutor: Dr. Francisco Hernández Luis
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, septiembre del 2019



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:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet	Facultad de Química
VOCAL:	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química
VOCAL:	Dra. Lilián Yépez Mulia	IMSS CM siglo XXI
VOCAL:	Dr. Marcos Hernández Rodríguez	Instituto de Química
SECRETARIO:	Dr. José Luis Medina Franco	Facultad de Química

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El trabajo se realizó en los siguientes lugares: Laboratorio 121, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN siglo XXI, IMSS bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Parte de este proyecto se presentó en los siguientes congresos:

- “Quinazoline derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors”. Cartel.- 257th American Chemical Society Meeting, *Chemistry for new frontiers*, celebrado en Orlando, Fl, los días del 31 de marzo al 4 de abril de 2019.
- “Synthesis of a set of quinazoline derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors”. Premio al mejor cartel.- Quinto Simposio de Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos, celebrado en el vestíbulo del A de la Facultad de Química, UNAM, Cd.Mx., 20 de junio de 2019.

Durante la estancia de maestría se participó en la elaboración de la siguiente publicación en colaboración:

- Herrera-Vázquez, F.S; Hernández-Luis, F; Medina-Franco, J.L. “Quinazolines as inhibitors of chromatin-associated proteins in histones”. *Medicinal Chemistry Research*, 2019, 28(4), 395-416. (doi: 10.1007/s0044-019-02300-0)

AGRADEMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación continua en el ámbito profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría (CVU No. 848984/629489), así como por el apoyo en la compra de los materiales requeridos para la realización de los ensayos biológicos a través del proyecto CONACyT-SEP CB-220664.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia a congresos.

A la Dirección General de Profesiones (DGAPA) por el apoyo otorgado para la compra de reactivos y materiales para los procesos de síntesis de los compuestos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto número IN218117.

A la Facultad de Química, UNAM por el apoyo para la realización de los estudios de espectroscopía y espectrometría a través del PAIP 5000-9136.

Índice

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
<i>II.1. Cáncer</i>	9
<i>II.2. Panorama de enfermedades en México</i>	10
<i>II.2.1. Incidencia en la población</i>	10
<i>II.3. Hallmarks del cáncer</i>	11
<i>II.3.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento</i>	11
<i>II.3.2. Insensibilidad a señales para regular el crecimiento</i>	12
<i>II.3.3. Evasión a la respuesta del sistema inmune</i>	12
<i>II.3.4. Inflamación debido a la promoción del tumor</i>	13
<i>II.3.5. Invasión del tumor y metástasis</i>	13
<i>II.3.6. Angiogénesis continua</i>	13
<i>II.3.7. Mutación e inestabilidad genómica</i>	14
<i>II.3.8. Evasión de apoptosis</i>	14
<i>II.3.9. Desregulación celular energética</i>	14
<i>II.3.10. Potencial ilimitado de replicación</i>	14
<i>II.4 Tubulina como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer</i>	15
<i>II.4.1. La dinámica de los microtúbulos</i>	15
<i>II.4.2. Expresividad en tejidos tumorales y en tejidos específicos de las distintas isoformas de β-tubulina</i>	16
<i>II.4.3. Agentes de unión a la tubulina (TBAs)</i>	17
<i>II.5 Quinazolininas</i>	20
<i>II.5.1. Principales blancos de quinazolininas como agentes anticancerígenos</i>	20
II.5.1.1. Inhibidores de cinasas	20
II.5.1.2. Inhibidores de proteínas asociadas a histonas	21
II.5.1.3. Inhibidores de topoisomerasa I.....	21
II.5.1.4. Inhibidores de la apoptosis	22
II.5.1.5. Inhibidores de la polimerización de tubulina	23
III. JUSTIFICACIÓN	24

IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	25
<i>V.1. Objetivo general</i>	25
<i>V.2. Objetivos particulares</i>	25
VI. Diseño de derivados de quinazolina	26
<i>VI.1. Metodología</i>	26
VI.1.1. Preparación de ligandos.....	26
VI.1.2. Preparación de las proteínas.....	26
VI.1.3. Acoplamiento molecular	26
<i>VI.2. Resultados y Discusión</i>	26
VI.2.3 Estudios de acoplamiento molecular.....	31
VI.2.1 Predicción de propiedades ADMET	34
VII. Síntesis de compuestos	36
<i>VII.1. Síntesis de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina</i>	36
VII.1.1. Obtención de los compuesto FSHV1 y FSHV2	36
VII.1.2. Obtención de los compuestos FSHV3 a FSHV11	36
<i>VII.2. Resultados y Discusión</i>	38
VII.2.1 Análisis retrosintético	38
3.4.2. <i>Propuestas del mecanismo de ciclocondensación de ambas rutas planteadas.</i>	39
VII.2.2 Síntesis de intermediarios para la obtención de FSHV1 y FSHV2	39
VII.2.3 Síntesis de intermediarios Int2-00/ Int2-11	41
VII.2.4 Síntesis de productos FSHV1-FSHV11	45
VIII. Ensayos biológicos	65
<i>VIII.1. Actividad biológica in vitro</i>	65
VIII.1.1. Evaluación de actividad citotóxica.....	65
VIII.1.2. Cálculo de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀).....	66
VIII.1.3. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta	66
VIII.1.4. Análisis de Western blot de la tubulina soluble y polimerizada.	67
<i>VIII.2. Resultados y discusión</i>	68
<i>VIII.2.1 Determinación de la actividad antiproliferativa</i>	68
<i>VIII.2.2 Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀)</i>	71

<i>VIII.2.3 Análisis de la distribución de la β-tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta</i>	72
<i>VIII.2.4 Análisis cuantitativo por Western blot de la tubulina soluble y polimerizada.</i>	76
IX. CONCLUSIONES	77
X. PERSPECTIVAS	79
XI. REFERENCIAS	80
ANEXO I. "Diseño de compuestos"	87
ANEXO II "Síntesis de compuestos"	97
ANEXO III. "Ensayos Biológicos"	206

Abreviaturas y Acrónimos

APCI	Ionización química a presión atmosférica	GED	Grupo electrodonador
Ac.	Anticuerpo	GFRs	Receptor asociado al Factor de Crecimiento
BRDTs	Subfamilia de Bromodominios	GTP	Guanosín Trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina	GDP	Guanosín Difosfato
CCF	Cromatografía en capa fina	G9a	Mono y dimetilasa de la histona 3 lisina 9
COL	Colchicina	HBD	Donadores de puente de hidrógeno
COS-7	Línea celular de riñón de mono	HBA	Aceptores de puente de hidrógeno
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear	HCT-15	Adenocarcinoma colorrectal
Ctrl	Control sin tratamiento	HDACs	Histona deacetilasas
%CV ₅₀	Porcentaje de viabilidad 50	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol	HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
DHFR	Dihidrofolato reductasa	HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
Desv	Desviación estándar	HSQC	Correlación heteronuclear a un enlace.
DNA	Ácido desoxirribonucleico	HRP	Peroxidasa de rábano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	IARC	Agency for Research on Cancer
DMF	Dimetilformamida	IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DMSO	Dimetilsulfóxido	IEL	Índice de eficiencia del ligando
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	IgG	Inmunoglobulina G
EGFR	Factor de Crecimiento Epidérmico	IHME	Institute of Health Metrics and Evaluation
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución	IR	Infrarrojo
FDA	Food and Drug Administration	LKB1	Liver Kinase B1
GEA	Grupo electroattractor	LSD1/KDM1	Desmetilasa 1 de lisinas
		LogP	Logaritmo del coeficiente de partición

Abreviaturas y Acrónimos

MCF-7	Adenocarcinoma de mama triple positivo	TBAs	Agentes de unión a la tubulina
mRNA	Ácido ribonucleico	TCA	Ácido tricloroacético
<i>Myc</i>	MYC Proto-Oncogen	TDA's	Agentes desestabilizadores de la polimerización de tubulina
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	TEMED	Tetrametiletilendiamina
NF2	Neurofibromin 2	TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
NZ	Nocodazol	TOP1	Topoisomerasa I
OMS	Organización Mundial de la Salud	tPSA	Área polar superficial
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	TP53	Gen que codifica para la proteína supresora de tumores
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos	Tris	2-hidroximetil-propano-1,3-diol
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	TSAs	Agentes estabilizadores de la polimerización de tubulina
PDB	Protein Data Bank	TX	Taxol
PMS	N-metilfenacina metosulfato	XO	Xantina oxidasa
PSA	Persulfato de Amonio	XTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-difeniltetrazolium
PTR	Pteridin reductasa		
RB	Enlaces rotables		
RMN	Resonancia Magnética Nuclear		
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute		
<i>ta</i>	temperatura ambiente		
SAC	Spindle Assembly Checkpoint		
SDS	Dodecilsulfato sódico		
SN _{Ac}	Sustitución acilnucleofílica		
SK-LU-1	Adenocarcinoma de pulmón		
SRB	Sulforrodamina B		

RESUMEN

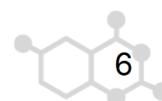
El cáncer es un conjunto de enfermedades que han tomado relevancia en los últimos años debido al continuo aumento en el número de casos. A la fecha, se han reportado diferentes agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de estos padecimientos. En nuestro grupo de investigación, se han sintetizado alrededor de 80 derivados de quinazolin-2,4,5-triamina que han mostrado potencial actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales.

La evidencia en torno al núcleo de quinazolina como estructura base ha ido creciendo en estos años, debido a que su estructura se encuentra presente en fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, así como en distintas moléculas bioactivas con actividad anticancerígena. Por lo anterior, se puede decir que la presencia de la quinazolina es fundamental para que éstos derivados muestren actividad. Por su parte, información cristalográfica reciente ha demostrado que diversos análogos y/o derivados de quinazolina presentan actividad anticancerígena, siendo su mecanismo de acción como agentes desestabilizadores de la polimerización de tubulina (TDAs) como por ejemplo: nocodazol (NZ), colchicina (COL), G2N, entre otros.

En el presente trabajo se propuso el diseño de once derivados de quinazolin-2,4,6-triamina como TDAs para ocupar el sitio de la colchicina y el nocodazol en la β -tubulina. Para esto se llevó a cabo la síntesis de estos derivados, así como la caracterización estructural por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Posteriormente se realizaron las evaluaciones biológicas de los once derivados en cinco líneas tumorales (pulmón, mama, próstata, útero y colon) y dos líneas celulares benignas (polimorfonucleares PBMCs y células de riñón de mono COS-7). Con base en los resultados obtenidos en estas primeras evaluaciones, se determinó la concentración de inhibición media (CI_{50}) de los compuestos más activos obtenidos en este primer screening. Esto se realizó en dos de las líneas tumorales de mayor interés debido a su alta incidencia en la población o carencia en tratamiento efectivos (i.e. adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1 y de mama triple negativo MDA-MB-231).

Para evaluar la actividad de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina como potenciales TDAs, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y *Western Blot* con tres compuestos (**FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8**) que presentaron mayor actividad antiproliferativa en líneas tumorales. Los resultados provenientes de estos estudios muestran que estos tres derivados interfieren en la dinámica de microtúbulos, principalmente **FSHV4** y **FSHV7** tienen una potencial actividad como TDAs.

En resumen, el presente trabajo de investigación contribuye con la síntesis de nuevos derivados de quinazolina, y la demostración de su actividad antiproliferativa preferente en líneas celulares tumorales, así como su potencial actividad como TDAs. Lo anterior permitirá la continuidad de los estudios en la fase de desarrollo de fármacos anticancerígenos en el campo de la Química Farmacéutica.



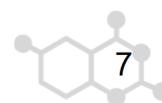
ABSTRACT

Cancer involves a very complex and diverse group of ailments, that has gain importance due to the increase of the number of cases. Our research group has previously synthesized derivatives of quinazolin-2,4,6-triamin with antiproliferative activity in different cancer cell lines. Quinazoline core is present in different molecules or FDA approved drugs that have been previously been reported as inhibitors of different kind of targets involved mainly in cancer. Recently some studies have identified quinazoline derivatives or analogues which were co-crystallized with the $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer in which hydrophobic interactions were important to act as microtubule disruptor agents.

Herein we propose the design of eleven quinazolin-2,4,6-triamin derivatives based on previous structures of known depolymerization agents, which are known to interact with two main cavities within β -tubulin heterodimer: Nocodazole's and Colchicine's binding site. Therefore, for the synthesis of quinazoline derivatives, two known synthetic routes were followed obtain their structural characterization was determined by spectroscopic and spectrometric techniques. Further biological evaluation was carried measuring their antiproliferative activity were performed in different cancer cell lines (i.e. lung, breast, prostate, uterus and colon) and two benign cell lines (i.e. blood cells and monkey kidney cells). These previous evaluations enable us to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the most active compounds in lung and breast cancer cell lines. Compounds FSHV4, FSHV7 and FSHV8 were the most active (4.77-4.99 μ M, 8.22-10.75 μ M and 8.60-10.70 μ M) against MDA-MB-231 and SK-LU-1 tumor cell lines.

The activity of FSHV4, FSHV7 and FSHV8 as depolymerization agents analized by indirect immunofluorescence and *Western blotting* these data obtained indicate that show that all three compounds interfere in microtubules dynamic, FSHV4 and FSHV7 showed potential TDAs.

The contribution of this research area relies in the proposal of new quinazoline derivatives, as tubulin polymerization inhibitors, displacing their structure within two different binding sites: NZ and COL. Taken altogether the results obtained demonstrated that quinazoline derivatives act in a selective manner towards cancer cell lines, and as potential TDAs. Although further studies are required in order to confirm their activity. This work contributes in the Medicinal Chemistry area to the development of new continuity anticancer drugs.



I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México y en el mundo. La agencia de investigación en cáncer (IARC, *Agency for Research on Cancer*) reportó que este conjunto de enfermedades es la segunda causa de muerte a nivel mundial, habiendo un aproximado de 8.8 millones de casos al año.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido el término genérico neoplasia maligna para diferenciar a este grupo de aproximadamente 200 enfermedades. Estas se caracterizan por un crecimiento anormal celular, en el que una o más células se independizan de los mecanismos que regulan la proliferación normal de una célula. Aunque existen muchas causas asociadas a este conjunto de padecimientos, y en algunos aún no se conoce la razón, en términos generales se pueden agrupar en factores ambientales y por predisposición genética.

Parte de estos mecanismos se asocia a la desregulación de proteínas implicadas en la división celular, dentro de los que se encuentran principalmente los microtúbulos (los heterodímeros α y β). Estas estructuras están involucradas en la formación de huso mitótico y otras funciones de mantenimiento celular (ej. transporte, señalización celular, entre otras). El monómero de β -tubulina ha demostrado ser un blanco terapéutico importante en distintas enfermedades, empleándose principalmente como diana para el tratamiento del cáncer. El complejo patrón de expresión de las diversas isoformas de β -tubulina en distintos tipos de cáncer y en un fenotipo no tumoral ha sido relevante para que la terapia sea dirigida. Entre las isoformas cinco isoformas que toman mayor relevancia en estirpes tumorales se encuentran principalmente las clases I (βI) y y III (βIII), asociándose su sobreexpresión con adenocarcinoma pulmonar, de ovario, útero, próstata y de mama. Sin embargo, la expresión de la isoforma βVI es característica de células hematopoyéticas sanas, por lo cual se busca inhibir a las isoformas βI y βIII sin afectar a esta última.

Alrededor de quince estudios reportados anteriormente por distintos grupos de investigación han identificado derivados y análogos de quinazolininas como potenciales desestabilizadores de la polimerización, varios de los cuales han sido co-cristalizados en el sitio de unión de colchicina (COL) ubicado en la interfaz del heterodímero de $\alpha\beta$ tubulina. Recientemente se encontró que el sitio del nocodazol (NZ), el cual se encuentra adyacente al de COL, presenta diferencias a nivel de secuencia que permitirían el diseño de compuestos selectivos hacia las isoformas βI y βIII .

En el presente trabajo se reporta la síntesis de once derivados de quinazolin-2,4,6-triamina como potenciales agentes inhibidores de la polimerización diseñados para ocupar el sitio de COL y NZ en la β -tubulina. Para lo anterior, se realizaron ensayos antiproliferativos en líneas celulares tumorales y benignas, junto con estudios de inmunofluorescencia y *Western Blot* para observar el efecto en la polimerización de los microtúbulos.

II. ANTECEDENTES

II.1. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido el término genérico de “neoplasia maligna” para asociar a un grupo de aproximadamente 200 enfermedades que constituyen al cáncer.¹ Estos padecimientos se caracterizan por un crecimiento anormal de células, en el que una o más células se independizan de los mecanismos que regulan la proliferación normal.

El desarrollo del cáncer es un proceso que involucra dos fases principales: la conversión y el desarrollo neoplásico. El proceso de conversión se asocia a modificaciones en el fenotipo de una célula normal, transformándola en una célula neoplásica. Por su parte, el desarrollo neoplásico de las células malignas conlleva 3 etapas: iniciación, promoción y progresión. La representación de estas etapas se ilustra en la **Figura 2.1**.²

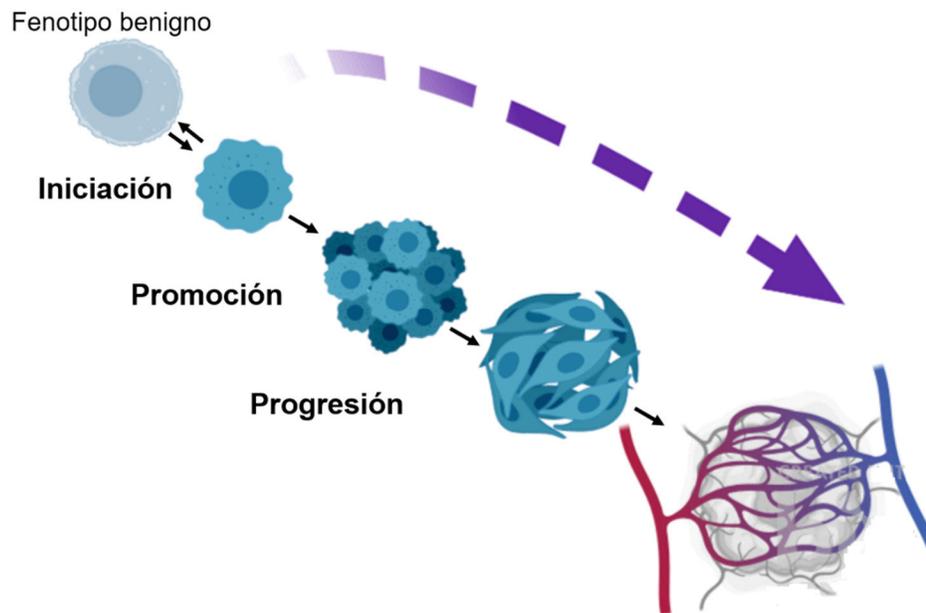


Figura 2.1. Etapas características de la progresión del cáncer: Iniciación, Promoción y Progresión.

La iniciación es el primer proceso patológico en el que las células presentan alteraciones genéticas asociadas a la presencia de agentes físicos, químicos o virales, denominados carcinógenos. Dichas modificaciones conllevan a desarrollar diferentes mecanismos de evasión a la muerte programada de la célula (apoptosis), dando lugar a las llamadas células senescentes (inmortales). Cabe mencionar que estos mecanismos pueden ocurrir en cualquier punto a lo largo de las diferentes vías que regulan este proceso celular.

En la etapa de promoción existe un incremento descontrolado de la proliferación de estas células causado por agentes promotores, dando lugar al neoplasma diferenciado (tumor benigno). El potencial ilimitado de replicación se asocia a la autonomía de estas células a responder a ciertas señales de crecimiento, que, en conjunto con la evasión apoptótica, promueven la progresión celular.³

Finalmente, en la etapa de progresión, el tumor benigno se transforma en un neoplasma no diferenciado, también denominado célula maligna. En este proceso ocurren modificaciones en el cariotipo asociado con alteraciones bioquímicas y morfológicas en las células que conllevan al incremento en la proliferación. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de las células malignas limita la disponibilidad de oxígeno y nutrientes al tumor, por lo que se requiere de un proceso de vascularización, llamado angiogénesis. Esta vascularización se asocia a la diseminación del cáncer a partir del órgano afectado hacia otras partes del organismo; a dicho mecanismo se le conoce como metástasis.^{4,5}

II.2. Panorama de enfermedades en México

Un estudio realizado por la OMS en el 2012 mostró que las cinco principales enfermedades que afectan a la población mexicana son la *Diabetes mellitus*, enfermedades del sistema cardiovascular, diferentes tipos de cáncer, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades del hígado.^{4 5}

II.2.1. Incidencia en la población

El cáncer es un problema de salud pública importante al ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (**Figura 2.2**). De acuerdo al *International Agency for Research on Cancer* (IARC), en el 2017 se registraron un total de 8.8 millones de defunciones causadas por estos padecimientos, de las cuales se identificaron cinco tipos de cáncer como los responsables del mayor número de fallecimientos: pulmonar (1.69 millones), hepático (788 000), colorrectal (774 000), gástrico (754 000) y mama (571 000).^{6,7} Se estima que el número de casos incrementará 1.96 veces en los siguientes 22 años a partir del año 2018 (**Figura 2.3A**).¹ La IARC notificó que la incidencia de cáncer ha ido en aumento durante la última década. Entre los años 1955-2001, se reportó un incremento del 142.7 % del número de casos en la población (**Figura 2.3B**). En la **Figura 2.3C** se muestra a manera de esquema los tipos de cáncer más comunes reportados en ambos sexos de la población durante ese periodo.^{4,5} Por lo que es de particular interés el estudio de la etiología, prevención y tratamiento de este conjunto de padecimientos.

En la República Mexicana, el índice de mortalidad por la presencia de tumores malignos ha sufrido cambios en su incidencia. En el periodo de 1955 a 1957, el cáncer ocupó el noveno sitio como causa de mortalidad, mientras que en el 2017 se posicionó en segundo lugar, al provocar más de 75 mil defunciones en ese año.⁵ En 2018, ese instituto de salud informó que en México 13.68% de las muertes estaban asociadas a este conjunto de padecimientos.^{4,5,8}

Un estudio reciente indicó que los tres tipos de cáncer con mayor incidencia en países desarrollados son el de próstata, pulmón y colorrectal en hombres, mientras que en mujeres fueron el de mama, el colorrectal y el de pulmón (**Figura 2.3C**).⁹ Por su parte, la incidencia de la enfermedad en países en vía de desarrollo registra al cáncer de próstata, pulmón y estómago como los más frecuentes en la población masculina, y los de mama, cervicouterino e hígado y pulmón en el caso de las mujeres.⁹

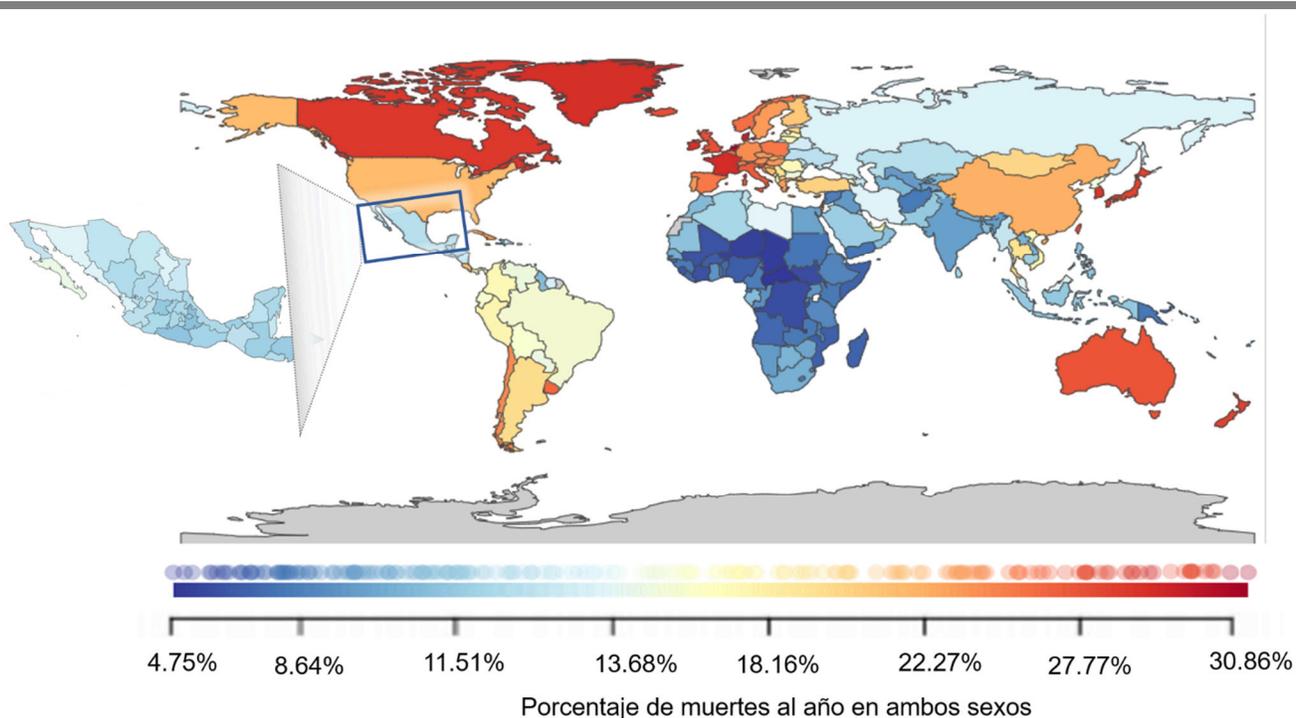


Figura 2.2. Tasa de mortalidad a nivel mundial y en México en el año 2018. El código de color indica las secciones con menor y mayor número de defunciones por tumores malignos (imagen modificada a partir del servidor GBD Compare del Institute of Health , Metrics and Evaluation (IHME)).^{1,8}

II.3. Hallmarks del cáncer

El grupo de Weinberg realizó la caracterización en las etapas de iniciación y desarrollo para la reversión a un fenotipo tumoral en distintos tipos de cáncer (**Figura 2.3**). Estas características se denominaron *hallmarks* (i.e. autosuficiencia e insensibilidad a las señales de crecimiento, evasión del sistema inmune, inflamación, invasión, metástasis, inestabilidad genómica, evasión a apoptosis, desregulación energética y potencial ilimitado de replicación).

II.3.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento

El tejido con fenotipo no tumoral se caracteriza por estar altamente regulado en términos de producción y liberación de factores asociados al crecimiento, la división celular, energía metabólica y supervivencia celular. Por lo contrario, en células tumorales estos parámetros se encuentran altamente desregulados. Asimismo, las células neoplásicas adquieren la capacidad de producir sus propios ligandos que funcionan como factores de crecimiento mediante la sobreexpresión de receptores afines a estímulos autocrinos. En ciertos casos, la independencia que estas células adquieren está asociada a la activación constitutiva de ciertos componentes en distintas vías de señalización, por lo que la activación por medio de la interacción de algún ligando con su respectivo receptor no siempre es necesaria.

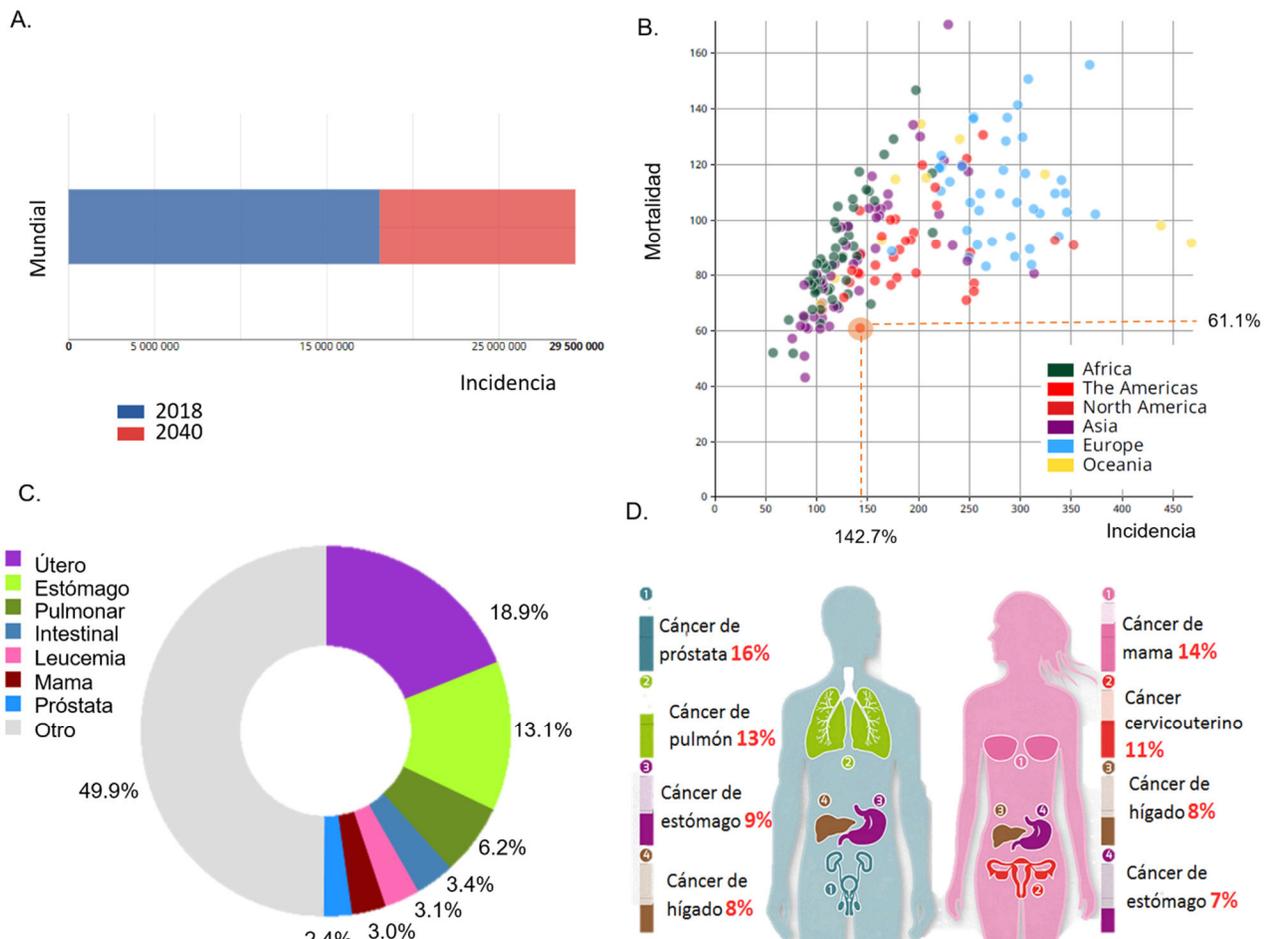


Figura 2.3. Tasa de mortalidad e incidencia a nivel mundial y en México. **A.** Estimación de la incidencia en el número de casos a nivel mundial en los próximos 22 años (2014-2040). **B.** Gráfico de incidencia en función de la tasa de defunción a nivel mundial en el 2018 en ambos géneros. **C.** Gráfico que ilustra los tipos de cáncer más comunes en México durante 1955 y 2001. **D.** Tipos de cáncer que tiene mayor recurrencia en hombres y en mujeres en países subdesarrollados.⁹

II.3.2. Insensibilidad a señales para regular el crecimiento

Hay una gran variedad en genes supresores de tumores que actúan en distintos niveles de la regulación del crecimiento y proliferación celular. En el cáncer, algunos de estos genes no logran expresarse debido al silenciamiento o represión asociados a diversos mecanismos epigenéticos (p.ej. metilación del DNA, o la tri-metilación de la lisina nueve, entre otras).¹⁰

II.3.3. Evasión a la respuesta del sistema inmune

Se han identificado una gran variedad de factores que se asocian a este *hallmark*, pero se han caracterizado principalmente dos: 1) mecanismos de evasión e inhibición del contacto celular y 2) promoción al fenotipo tumoral maligno por asociación con $TGF-\beta$ y LKB1. El primero involucra al producto del gen supresor de tumor *NF2* (Merlin), lo que da lugar a un tipo de neurofibromatosis que inhibe a su vez el contacto celular.¹¹ El segundo consiste en la

promoción a un fenotipo maligno, el cual está asociado a una proteína epitelial LKB1 que regula al oncogen *Myc* en su forma quiescente, por lo que su supresión de LKB1 tiene el efecto contrario. Por otra parte, *TGF- β* ha sido identificado en varias etapas avanzadas del proceso tumoral debido a que la vía de señalización de este factor promueve el mecanismo de activación celular programada.

II.3.4. Inflamación debida a la promoción del tumor

La inflamación puede contribuir a múltiples condiciones dentro del tumor, debido a que en este proceso se secretan especies reactivas o “quimiotransmisores” (i.e. especies reactivas de oxígeno, interleucinas, etc.) al microentorno o microambiente, favoreciendo la progresión al fenotipo tumoral.¹²

II.3.5. Invasión del tumor y metástasis

Las células invasivas a nivel local suelen generar metástasis debido a cambios en su matriz extracelular. Se ha reportado que la regulación de una vía denominada “transición epitelial-mesenquimal” (EMT, por sus siglas en inglés) está implicada en la transformación de células epiteliales, adquiriendo el fenotipo invasivo, resistencia a apoptosis, y a la diseminación.

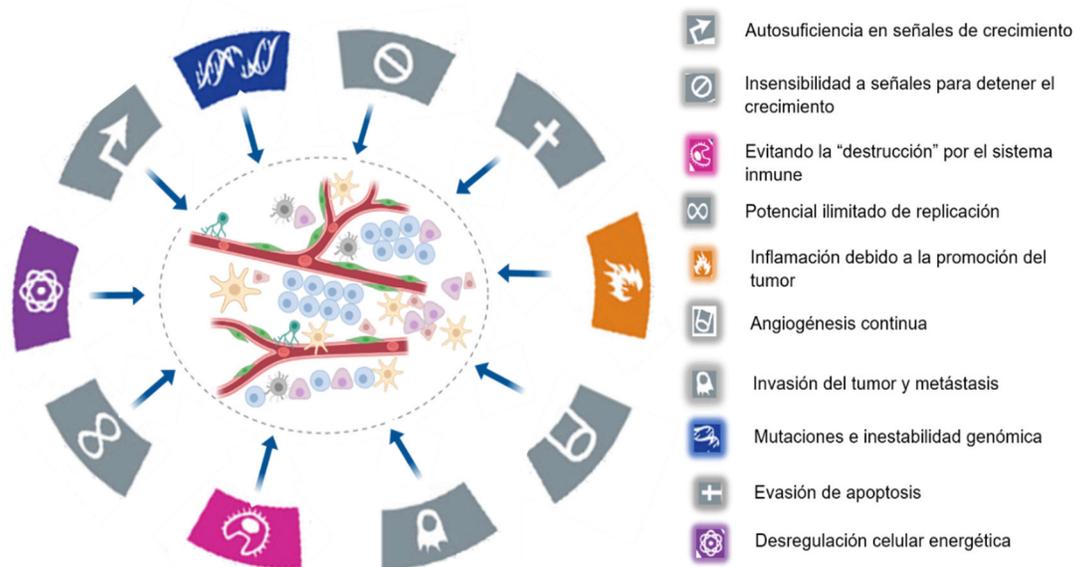


Figura 2.4. Hallmarks características de una estirpe tumoral celular.

II.3.6. Angiogénesis continua

Como se mencionó anteriormente, la vascularización es requerida para que el tumor pueda nutrirse y oxigenarse. Durante este proceso ocurren modificaciones en el entorno del tumor que afectan a las células vecinas (ej. cambio del pH). Además, la vascularización se

asocia al proceso metastásico que involucra la diseminación del cáncer a partir del órgano afectado hacia otras partes del organismo.

II.3.7. Mutación e inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica propicia la acumulación de mutaciones en células cancerosas, lo cual tiene por consecuencia una rápida evolución en el genoma de estas células con una rápida respuesta debido al cambio del “microambiente”.^{10,13} La hipótesis de Knudson establece que el cáncer es el resultado de mutaciones acumuladas del DNA en las células, en el cual se produce un primer evento (primer *hit*) en la línea germinal y el segundo evento (segundo *hit*) a nivel de células somáticas. A partir de esta hipótesis surgieron dos modelos: el modelo clonal (inicio genético) y el modelo del progenitor epigenético. En el modelo clonal se establece que debido a una serie de cambios genéticos que afectan oncogenes y genes supresores de tumor ocurre una transición de un tumor primario a un tumor secundario, por lo que hay un proceso de adaptación de éste.¹⁴ Por otra parte, el modelo del progenitor epigenético enuncia que los primeros cambios que ocurren a nivel de células progenitoras son modificaciones epigenéticas, afectando la expresión de oncogenes y de genes supresores de tumores.¹⁴

II.3.8. Evasión de apoptosis

La muerte celular por apoptosis funge como una barrera natural para el desarrollo del cáncer. La elucidación de las vías de señalización de la activación en respuesta al estrés fisiológico en el proceso tumoral ha sido de gran importancia para su estudio en este conjunto de enfermedades. Asimismo, el desbalance de los niveles de señalización para la activación de oncogenes, así como el daño a DNA, ha sido asociado con una mayor proliferación celular.

II.3.9. Desregulación celular energética

Las células cancerígenas reprograman su producción de energía por medio de glucólisis, lo cual conlleva a un estado de “glucólisis anaeróbica”. Varios estudios mostraron que la utilización de glucosa como fuente primaria de carbono se relaciona directamente con la activación de oncogenes. En algunos tumores se han encontrado subpoblaciones de células tumorales que difieren en las rutas metabólicas utilizadas para la obtención de energía: las dependientes de glucosa (“Efecto Warburg”) secretando lactato y las que utilizan el lactato secretado como su fuente principal.¹⁵

II.3.10. Potencial ilimitado de replicación

Las células cancerosas tienen un potencial ilimitado para replicarse, siendo un mecanismo crucial para la generación de tumores macroscópicos. La senescencia (inmortalidad) de las células cancerosas se observa en la preservación secuencial de las regiones teloméricas TATA por la actividad de la telomerasa durante la proliferación, las cuales disminuyen progresivamente en células con fenotipo benigno.¹⁶

II.4 Tubulina como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer

En la actualidad, se han reportado un número creciente de dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.^{17,18} La heterogeneidad de este conjunto de enfermedades es lo que hace tan complejo la selección de una diana o blanco “ideal”. Los procesos quirúrgicos, la radioterapia y la quimioterapia son los principales tratamientos empleados para la eliminación de las células cancerígenas. Para la quimioterapia es necesario conocer la diana biológica de la molécula bioactiva y su selectividad, de ahí que las terapias puedan basarse en dos ámbitos: la terapia dirigida o la polifarmacología. Las terapias dirigidas se basan en la selectividad del ligando por una sola diana. La polifarmacología, por su parte, considera la interacción del ligando con distintas dianas implicadas en el padecimiento.

Entre las dianas que han cobrado gran importancia en estos últimos años se encuentran los microtúbulos, debido a que estas superestructuras macromoleculares se encuentran relacionadas directamente con el *hallmark* denominado potencial ilimitado de replicación. Dada la complejidad estructural de los microtúbulos, los compuestos bioactivos que modulan su formación exhiben una tremenda diversidad estructural, por lo que han sido empleados para una gran variedad de padecimientos, entre los que se encuentran la enfermedad de Alzheimer, parasitosis, cáncer, entre otras. De forma particular, para el tratamiento del cáncer se han reportado agentes que alteran la dinámica de los microtúbulos.

Los microtúbulos están involucrados en distintos procesos biológicos como: diferenciación celular, desarrollo y mantención de la forma celular, transporte de vesículas, señalización, división celular y mitosis.¹⁹ Debido al papel crucial que tiene los microtúbulos en la división celular y mitosis, estas estructuras se consideran blancos interesantes para el diseño de fármacos para el tratamiento del cáncer. Para la mejor comprensión de las funciones anteriormente mencionadas, es importante comprender la dinámica de los microtúbulos, por ejemplo: el alargamiento o acortamiento de estos heterodímeros así como la polaridad positiva y/o negativa asociada.

Estas estructuras proteicas se asocian de manera lateral formando protofilamentos; los cuales tienen un diámetro externo de 25 nm y de longitud variada. Los microtúbulos están constituidos por dos heterodímeros α/β - tubulina (proteínas globulares con un PM \approx 50 kDa). Están. Cada heterodímero contiene dos sitios de unión a nucleótidos de guanina (GDP/GTP). El sitio de unión a GTP se localiza en la subunidad de α -tubulina, denominado *N* (no-intercambiable), en el cual se forma una unión irreversible y no hidrolizable. Por otra parte, la molécula de GTP se une de forma reversible en el heterodímero β (sitio-E) para ser hidrolizado a su forma difosforilada (GDP).

II.4.1. La dinámica de los microtúbulos

La dinámica de los microtúbulos puede cambiar drásticamente, de un rápido crecimiento o un acortamiento de los mismos (resultando en la forma polimerizada y despolimerizada), esto se logra hasta alcanzar un estado estable, en donde el crecimiento y el acortamiento se encuentran en la misma proporción. Estudios realizados *in vivo* muestran dos principales mecanismos: inestabilidad dinámica e intercambio rotatorio. El primero involucra la adición y

pérdida de subunidades de tubulina al segmento terminal del microtúbulo, mientras que el intercambio rotatorio ocurre a través de la ganancia en extremo positivo y la pérdida en el extremo negativo.

En la inestabilidad dinámica, la polimerización del microtúbulo ocurre cuando cada uno de los heterodímeros α (sitio-N) y β (sitio-E) unen GTP, por el intercambio de éste por GDP libre en el sitio-E. Por el contrario, en la despolimerización el GTP se hidroliza a GDP en la subunidad β -tubulina, quedando unida a la misma, por lo que se vuelve menos estable promoviendo así la “forma D”. En esta última se pierde la última capa de β -tubulina unida con GTP, favoreciendo la apertura del sitio del GDP liberándose así ambos heterodímeros al citoplasma.

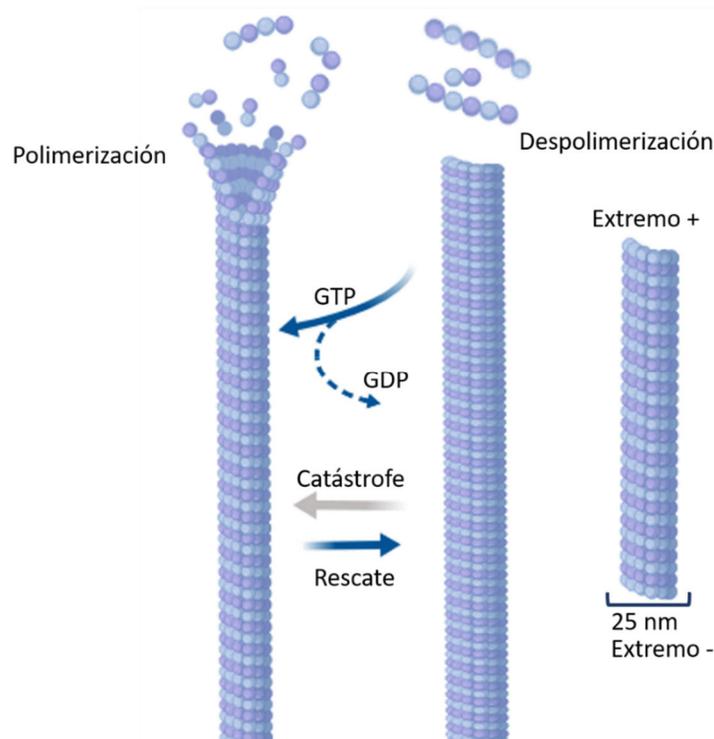


Figura 2.5. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos, la composición estructural y dimensional de los microtúbulos.

II.4.2. Expresión de las distintas isoformas en β -tubulina en tejidos tumorales y en tejidos específicos

Los monómeros de β -tubulina son codificados por una familia de multigenes con un complejo patrón de expresión. Al ser este un blanco importante de unión a fármacos en los microtúbulos es de vital importancia conocer su distribución en el organismo.

Diez distintas isoformas de β -tubulina han sido identificadas en células de humano con variaciones en su nivel de expresión dependientes del tipo y localización en el organismo. Un estudio realizado por Leandro-García y colaboradores¹⁸ reportó diferencias a nivel de expresión de mRNA de las distintas isoformas en células tumorales como pulmón, próstata, colon, ovario y cáncer de mama. En la **Tabla 2.1** se observa que la mayor parte de los tejidos

tumorales sobreexpresan las isoformas de clase I (β I, gen *TUBB*) y clase III (β III, gen *TUBB3*), resaltándolos como dianas interesantes para el diseño de tratamientos anticancerígenos. El diseño de compuestos selectivos hacia este tipo de isoformas permitiría reducir los efectos secundarios asociados a la terapéutica actual. Adicionalmente, varios estudios experimentales han mostrado que la sobreexpresión de la isoforma β III se asocia con la resistencia al paclitaxel, utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.²⁰ De forma complementaria, el estudio de Leandro-García et al. mostró que en leucocitos y médula ósea se encuentra altamente expresada de forma normal la isoforma de clase VI (β VI, gen *TUBB1*). Dado que la inhibición de esta estirpe celular se ha asociado a hematotoxicidad, se ha buscado identificar compuestos que no afecten su función estructural.

Tabla 2.1. Cambios en el nivel de expresión del mRNA de la β tubulina a nivel tejido específico con fenotipo tumoral¹⁸

Gen	Isoforma	Colon	Ovario	Riñón	Próstata	Mama	Pulmón
<i>TUBB</i>	β I	↑	≈	↑	↓	↑	↑
<i>TUBBIIa</i>	β IIa	↓	↑	↓	↑	↓	↑
<i>TUBB3</i>	β III	↓	↑	≈	≈	↑	↑
<i>TUBB2C</i>	β IVb	↓	↓	↓	↑	≈	↓
<i>TUBB6</i>	β V	↓	↓	↑	↓	↓	↓

* ↑ ó ↓ indican un incremento o disminución dependiendo de la muestra analizada

II.4.3. Agentes de unión a la tubulina (TBAs)

Hoy en día existen más de mil compuestos que se unen a la tubulina. Estos agentes interactúan principalmente con el heterodímero de β -tubulina. Se clasifican con base en su mecanismo de acción: a) agentes estabilizadores (*tubulin stabilizing agents*, TSAs), b) los desestabilizadores de microtúbulos (*tubulin destabilizing agents*, TDAs). Los TSAs alteran el equilibrio dinámico de polimerización de los microtúbulos al evitar que los protofilamentos se disocien en el proceso; algunos de los compuestos más representativos son: los taxanos, la epotilona y el laulimalido. Por otra parte, los TDAs irrumpen la interacción entre los heterodímeros α/β contiguos, impidiendo que el microtúbulo alcance su forma polimerizada. Algunos compuestos que componen el grupo de los TDAs son: la vinblastina, la rizoxina, el nocodazol, la colchicina, entre otros. Ambos grupos detienen la mitosis, produciendo la muerte celular tanto en células tumorales como benignas; sin embargo, las células cancerosas son más susceptibles dada la sobreexpresión que requieren para mantener un estado de división continuo.

Los TBAs pueden fungir como estabilizadores o desestabilizadores de la polimerización de microtúbulos resultando en un daño a nivel del huso mitótico. Recientemente, Romagnoli y colaboradores²¹ reportaron que bajo la exposición de ciertos TBAs, las células presentan un

fenotipo caracterizado por mega núcleos, multinucleación, síntesis incompleta de DNA y condensación prematura de cromosomas, a cuyo proceso se le ha denominado como catástrofe mitótica.²¹

El término catástrofe mitótica ha sido utilizado para denotar la muerte celular resultante de un proceso mitótico “aberrante” al censar este tipo de fallas, conduciendo a las células a tres mecanismos principales: necrosis, apoptosis y senescencia.²² Debido a la heterogeneidad en este proceso se han identificado tres características distintivas. La primera, es que su origen comienza con la perturbación del aparato mitótico, por lo que se ve reflejado en la segregación de cromosomas, así como todo el complejo que asegura que este proceso se lleve de forma adecuada. La segunda es que esta catástrofe se relaciona con un cierto grado de arresto en la división celular. Finalmente, la tercera indica que las células mitóticas son las sensibles a distintas señales que favorecen este proceso (i.e. especie oxidantes, regulación de los receptores que regulan la muerte celular).²³ Se cree que la catástrofe mitótica constituye un defecto de la cascada de señalización vías oncosupresoras, así como una vía selectiva para combatir la proliferación en células cancerígenas.²⁴

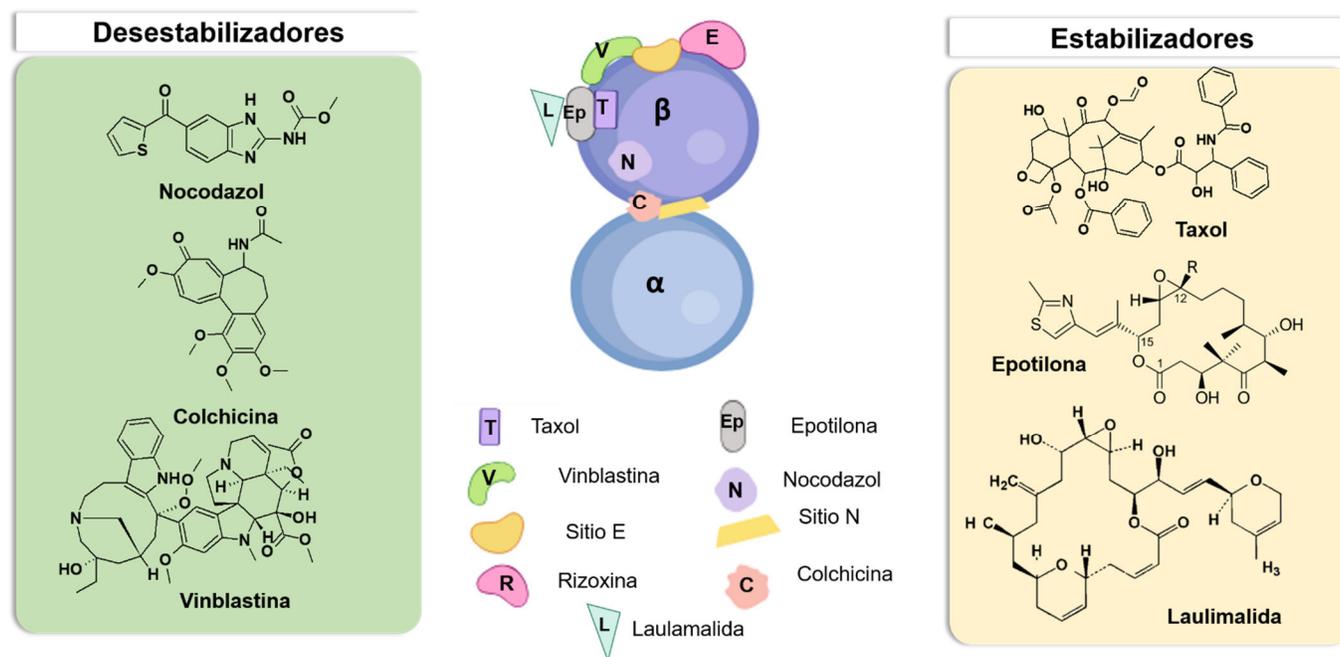


Figura 2.6 Representación de los sitios de unión de las moléculas al heterodímero de α/β -tubulina, así como representación en 2D de los compuestos conocidos como TBAs y TSAs.

Agentes químicos que inducen la catástrofe mitótica tienen tres mecanismos de acción conocidos. El primero consiste en afectar la integridad del DNA (cuando el punto de control de G2 se encuentra desregulado por ausencia de TP53, las células presentan catástrofe mitótica antes de que algún proceso de reparación del DNA pueda modificarlo). El segundo interfiere con la maquinaria que regula la integridad del material genético (principalmente se identifica a los microtúbulos). Y el tercero se asocia con la activación de la catástrofe mitótica por medio de vías de señalización que no se han caracterizado (i.e. shock térmico).²³

De los agentes que interfieren en la maquinaria (i.e. TDAs y TSAs) se asocian directamente con la tubulina, relacionándose de forma directa con la segregación de los cromosomas en la penúltima fase de la mitosis. El punto de control del ensamble del huso mitótico (SAC) previene que la anafase ocurra, y por ende, la segregación de cromosomas.²³

El mecanismo de acción de los TBAs depende del sitio de unión en el heterodímero de tubulina. A continuación, se describen brevemente los mecanismos y sitios de unión reportados para los tres principales grupos de TSAs y TDAs.

- **Taxanos (T):** Son compuestos que se unen a microtúbulos polimerizados dentro del lumen del polímero. Estabilizan el GDP unido a β tubulina de los protofilamentos al unirse a un sitio próximo al asa-M. Esta interacción permite la estabilización de la unión del dímero de tubulina con la α -hélice de la tubulina lateral.
- **Epotilonas (Ep):** Este tipo de compuestos son de origen bacteriano. Su mecanismo de acción es muy similar al de los taxanos y, aunque compiten con el paclitaxel, fármaco de referencia de los taxanos, por la unión de microtúbulos, estos se acoplan a un sitio aledaño en la β -tubulina.
- **Laulamalido (L):** En conjunto con el pelorusido A, son compuestos de origen natural, presentando un sitio y modo de unión similar entre ambos compuestos al situarse en la superficie de la parte externa de los microtúbulos de la β -tubulina, contiguo al de los taxanos. La estabilidad de los microtúbulos se da en dos niveles: a) por la estabilización del loop M de β -tubulina; b) debido a que el núcleo estructural de ambas moléculas interacciona con un segundo dímero de tubulina. Ambos compuestos ejercen un efecto alostérico que favorece la unión de los taxanos, provocando un efecto sinergista entre ambas moléculas.
- **Vincas (V):** El compuesto representativo de este grupo es la vinblastina, el cual es un inhibidor de la formación de microtúbulos durante el proceso de división celular. Su sitio de unión se encuentra localizado entre el dímero α/β -tubulina próximo a la cavidad de intercambio de GDP en el extremo positivo.
- **Colchicina (C):** Es un agente despolimerizante de origen natural, se une a la interfase del heterodímero α/β tubulina próximo al sitio de unión de GTP. La unión de la colchicina y otros derivados como la esteganacina y la combrestatina A promueven la “forma D” del microtúbulo, favoreciendo así la despolimerización de los mismos por la disrupción consecuente en el contacto lateral entre protofilamentos.
- **Rizoxina (R):** Perteneciente a la familia de los macrólidos, de origen biosintético. Su sitio de unión es adyacente al “sitio E” en la β -tubulina. Este compuesto ha sido asociado a dos mecanismos de acción dependiendo de su concentración. A una concentración baja se une al extremo del microtúbulo provocando un cambio conformacional que impide la agregación de heterodímeros. Por otro lado, a altas concentraciones interfiere con la unión de vinblastina.
- **Nocodazol (N):** Perteneciente a los derivados bencimidazólicos, estos estudios se han realizado de forma experimental y computacional (i.e. modelado por homología)²⁵,

fungiendo así como TDAs, éste sitio se encuentra contiguo al sitio de unión de la colchicina. Es uno de los sitios más importantes debido a que hay una diferencia a nivel de secuencia de aminoácidos entre isoformas.

Un análisis secuencial y estructural reciente reportó que los sitios de unión de los compuestos antes mencionados no presentan diferencias significativas entre isoformas de la β -tubulina. Esto último, imposibilita el diseño de compuestos selectivos hacia las isoformas β I y β III. Sin embargo, estudios anteriormente reportados indican que el sitio del nocodazol (**NZ**), presenta diferencias secuenciales que favorecen la unión hacia las isoformas antes β I y β III sin afectar a la isoforma β VI presente en células sanguíneas. La pérdida de la afinidad del NZ en la isoforma β VI se debe principalmente al cambio del residuo Ala198 por Glu198. Esta modificación impide que el núcleo de bencimidazol-2-carbamato del **NZ** interactúe a través de puentes de hidrógeno con el carboxilato del residuo de Glu198. Esta observación permitió explicar la causa de la baja hematotoxicidad del **NZ** observado en ensayos experimentales.²⁶ Es por esto que el sitio del **NZ**, a diferencia de los demás sitios de unión de los TDAs, habilita el diseño de compuestos que actúen sobre las isoformas β I y β III, pero no sobre β VI.

II.5 Quinazolininas

La quinazolina es una entidad estructural muy estudiada en química farmacéutica.²⁷ Esta estructura base (*scaffold*) consiste en un núcleo aromático bicíclico compuesto por un anillo de benceno fusionado a un anillo de pirimidina (**Figura 2.7**).²⁸ Este *scaffold* es considerado una estructura privilegiada debido a que se encuentra presente en distintos compuestos o fármacos con actividad biológica contra diferentes dianas terapéuticas. Algunas de las actividades farmacológicas reportadas para estos fármacos incluyen a la antimicrobiana²⁹, antiinflamatoria^{30,31}, anticonvulsiva³², antihipertensiva, antioxidante³³, antiparasitaria (i.e. malaria)^{34,35}, antiviral (i.e. HIV)³⁶ y antiproliferativa³⁷.

Los derivados de quinazolina han sido identificados como una nueva clase de agentes quimioterapéuticos con actividad y eficacia significativa contra tumores sólidos. Varios de los derivados de quinazolina han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso clínico como fármacos para el tratamiento del cáncer. Entre éstos se encuentran: el gefinitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tykerb®), vandetanib (Caprelsa®) y afanitib (Gilotrib®).³⁸ Por mencionar algunos ejemplos, el gefinitinib fue aprobado en 2003 para el tratamiento contra metástasis local o avanzada en un tipo de cáncer de pulmón. Por su parte, erlotinib fue aprobado en 2005 para su administración conjunta con el gemcitabin para el tratamiento de metástasis en cáncer de páncreas, actuando como inhibidor reversible de receptores de tirosin cinasas (**Figura 2.7**).³⁹

II.5.1. Principales blancos de quinazolininas como agentes anticancerígenos

II.5.1.1. Inhibidores de cinasas

Las cinasas son un conjunto de enzimas encargadas de la regulación de eventos celulares tales como el ciclo división, proliferación celular, entre otras. Cuando una de estas

enzimas se encuentra mutadas o desregulada transforma a células con fenotipo normal a células cancerosas, por lo que juegan un papel importante en la formación de tumores.³⁹⁻⁴¹

Las cinasas que tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer son: a) receptor de tirosin cinasas (v.gr. receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) , receptor asociado al factor de crecimiento (GFRs)) y b) serin/treonin cinasas intracelulares o extracelulares (v.gr. TKL, STE, CK1, ERK1/2, etc.).⁴¹

II.5.1.2. Inhibidores de proteínas asociadas a histonas

Las proteínas asociadas a histonas se clasifican principalmente en tres por la función que realizan en *writers*, *readers* and *erasers*. Las primeras son enzimas que adicionan grupos funcionales a residuos en el amino terminal de la histona (p.ej. G9a y GLP). Los segundos son dominios específicos los cuales tienen afinidad por sólo un tipo de marca, permitiendo el reclutamiento de complejos proteicos involucrados en la remodelación de la arquitectura de la cromatina (p.ej. BRDTs). Las últimas son proteínas que se encargan de remover las marcas preestablecidas por los “*writers*”, produciendo cambios en el código de las histonas para establecer nuevos patrones de activación o represión (p.ej. HDACs, LSD1/KDM1, entre otros).

Estás son dianas epigenéticas las cuales regulan la expresión, represión y silenciamiento de genes (i.e. genes supresores de tumor y oncogenes). La desregulación en algunos mecanismos que involucran a estas enzimas resulta en la iniciación y progresión de ciertas enfermedades (i.e. cáncer, inflamatorias, neurológicas, cardiovasculares, entre otras).^{14,42,43}

Muchos de los análogos y/o derivados de quinazolina han entrado a las distintas fases clínicas, por ejemplo: **CUDC-101** funge como inhibidor dual tanto de cinasas como de histona deacetilasas (HDACs), el cual se encuentra en fase I para su uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular y adenocarcinoma de mama triple negativo (MDA-MB-468).(Figura 2.7).^{44,45}

Asimismo, hay distintos compuestos bioactivos que inhiben a lisin metiltransferasas (ej. G9a y GLP) del grupo de *writers*, de los cuales **BIX-01294** y **UNC0642** son derivados de quinazolina.^{46,47} Por otra parte, de las enzimas pertenecientes a los dominios de *readers* BRDTs se tiene al derivado de quinazolina **RVX-208**, el cual se encuentra en fases clínicas para enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Por su parte, **PFI-1** y **RVX-297** son moléculas bioactivas para este mismo grupo de blancos epigenéticos que ha demostrado tener actividad antiproliferativa.⁴⁸⁻⁵⁰ Finalmente, en *erasers* los *targets* más estudiados son HDACs y LSD1/KDM1, los compuestos más representativos que actúan como inhibidores son a nivel estructural son quinazolonas. Algunos derivados y/o análogos de quinazolinas inhiben a dos dianas simultáneamente como por ejemplo: *erasers* y *readers* o *erasers* y cinasas algunos de estos compuestos se observan en la Figura 2.7 (i.e. **MS02** y **BIX-01298**).⁵¹⁻⁵³

II.5.1.3. Inhibidores de topoisomerasa I

Las topoisomerasas son enzimas involucradas en la modificación del DNA en distintos procesos celulares como replicación, transcripción y reparación. Los inhibidores de la topoisomerasa I (TOP1) han sido considerados como agentes anticancerígenos para el tratamiento de tumores sólidos y del tipo hematológico.⁵⁴

El grupo de investigación de Taliani reportó una serie de pirazolo[1,5-a]quinazolinas, dentro de los que se encuentran los compuestos **ST24**, **ST26** y **ST29**. El análisis SAR realizado en ese estudio indicó que la actividad era dependiente de la sustitución de la alquil amina en C-5, el cual favorece la inhibición de TOP1.⁵⁵

II.5.1.4. Inductores de la apoptosis

Análogos de quinazolina como las quinazolinonas se han destacado por su actividad antiproliferativa en terapias contra adenocarcinoma de mama. En el 2015, Zahedifard y colaboradores reportaron dos quinazolinonas, **MZA** y **MZB**, que inducían apoptosis en células tumorales (**Figura 2.7**), liberando al citocromo c y activando a caspasa 9. El tipo de apoptosis generada por estos compuestos fue por una vía extrínseca, la cual involucra a caspasa 8, la inhibición y translocación de NF- κ B del citoplasma a núcleo.⁵⁵

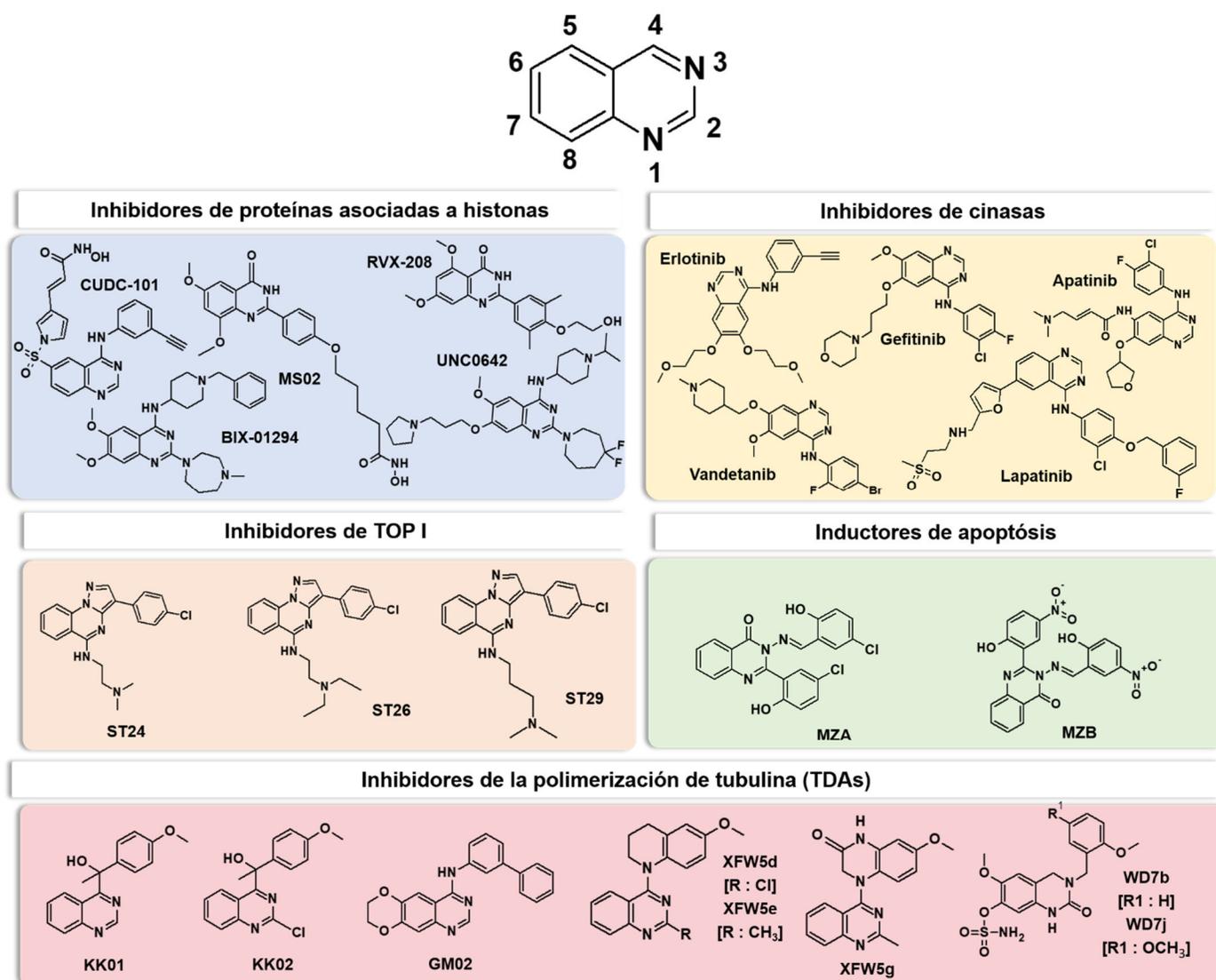


Figura 2.7. Derivados y análogos de quinazolina asociados como inhibidores de múltiples dianas como agentes anticancerígenos.

II.5.1.5. Inhibidores de la polimerización de tubulina

Como se mencionó anteriormente, la tubulina es considerada una diana importante para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Estudios previos realizados por Chilín y Kuroiwa reportan a los derivados de quinazolina **KK01**, **KK02** y **GM02** como agentes inhibidores de la polimerización.⁵⁶ En ese estudio, los autores mencionan que los compuestos actúan como inhibidores al unirse de forma selectiva al sitio de la colchicina. Por su parte, el grupo de investigación de Wang reportó la síntesis de quinoxalinas **XFW5d**, **XFW5e** y **XFW5g**. De estos compuestos, **XFW5g** resultó con una CI_{50} de actividad antiproliferativa del rango nanomolar, así como una CI_{50} para la inhibición en la polimerización de tubulina del orden de micromolar. Al igual que los compuestos de Chilín y Kuroiwa, la porción de unión de estos compuestos a la tubulina se localizó en el sitio de la colchicina.⁵⁷

En 2018, el grupo de investigación de Potter informó sobre la síntesis de derivados de quinazolinona, depositando en el *protein data bank* (PDB) las estructuras co-cristalizadas con los compuestos más potentes (**WD7b** y **WD7j**). Las diferencias estructurales y en actividad antiproliferativa estudiadas fueron en C-3 de la quinazolin-2-ona se probaron distintos sustituyentes sobre el anillo de bencilo, de los cuales la di sustitución con grupos 2',5'-dimetoxilos resultó ser el compuesto más activo (**WD7j** alrededor de 50 nM) a diferencia del compuesto mono sustituido (**WD7b** alrededor de 300 nM), la preservación de este patrón tomó con base en el patrón de sustitución de derivados de la colchicina. De forma contraria se observó que en términos de afinidad hacia el sitio de COL estos tuvieron un valor de 2.5 μ M. Las interacciones observadas en el complejo co-cristalizado fueron interacciones hidrofóbicas y algunos puentes de hidrógeno con cadena principal así como el puenteo con un agua estructural entre los carbonilos en el amino N4 de la quinazolina.

De forma complementaria, se reportaron estudios *in vivo* de la administración de **WD7b** en ratones con mieloma múltiple, sugiriendo que este compuesto puede ser un fármaco potencial TDA al poder ser administrado por vía oral y tener un amplio espectro de actividad antiproliferativa.⁵⁸

A pesar de la información estructural que existe acerca de derivados de quinazolina como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos sobre el sitio de COL, es importante recordar la imposibilidad que existe de diseñar compuestos selectivos hacia este sitio debido a la alta conservación de residuos entre isoformas de β -tubulina de humano. Por lo anterior, resulta imperativo diseñar nuevos derivados de quinazolina que ocupen el sitio del NZ, que, como se mencionó anteriormente, permite el diseño dirigido hacia las isoformas de mayor interés de esta diana.

Por lo anterior, el presente trabajo consistió en proponer nuevos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina tomando en cuenta el sitio del NZ así como el de la COL, preservando así los grupos funcionales de mayor relevancia para interactuar con ambas cavidades. Prosiguiendo así con la síntesis de once derivados como potenciales agentes desestabilizadores de la polimerización de tubulina. Por lo anterior, se realizaron ensayos antiproliferativos en líneas celulares tumorales y benignas, de igual forma se realizaron estudios de inmunofluorescencia y *Western Blot* para observar el efecto en la polimerización de los microtúbulos. Esto se describirá con mayor detalle en los siguientes capítulos.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades con etiología compleja y heterogénea de la cual se reporta anualmente un incremento alarmante en su incidencia a nivel mundial. A pesar del gran número de investigaciones para el tratamiento de este conjunto de padecimientos, es necesaria una terapia dirigida con la finalidad de reducir la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos.

Dentro de las terapias dirigidas, uno de los blancos que se ha estudiado ampliamente son los monómeros que conforman a los microtúbulos como los es la β -tubulina. Es importante mencionar que las diferencias en expresividad entre isoformas en tejidos con fenotipo tumoral (ej. pulmón, ovario, próstata, mamá, colon, etc.) y tejidos sanos ha sido crucial para proponer tratamientos dirigidos. Las isoformas de mayor interés para el tratamiento del cáncer han sido βI y βIII . Distintos grupos de investigación han reportado una amplia diversidad estructural de compuestos que actúan como desestabilizadores y estabilizadores de esta diana con el fin de irrumpir en la división de células malignas. De igual forma, en la literatura se han reportado varios derivados de quinazolina como potenciales agentes con actividad antiproliferativa, los cuales tiene actividad desestabilizadora al unirse al sitio de la colchicina en la β -tubulina. Asimismo, es de importancia considerar para el diseño de estos el sitio del NZ, ya que este es el único sitio poco conservado entre isoformas de β -tubulina favoreciendo el diseño de una terapia selectiva. Problemas de hematotoxicidad se presentan con frecuencia en TDAs debido a que estos suelen interaccionar con la isoforma βVI .

En el presente trabajo, se proponen nuevos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina como potenciales TDAs. El diseño de dichos compuestos busca que éstos ocupen los sitios de unión de la COL y del NZ, de este último se busca que interaccionen de forma disciernan entre isoformas que se expresan en líneas celulares tumorales y la isoforma βVI que se expresa de manera exclusiva en células hematopoyéticas ó PBMCs.

IV. HIPÓTESIS

Al ser los derivados de quinazolina compuestos con actividad antiproliferativa, e inhibidores de la polimerización, los cuales ocupan principalmente los sitios de unión del **NZ** y **COL**, éstos podrán actuar como compuestos selectivos en células tumorales de acuerdo al perfil de sobreexpresión de las isoformas de β -tubulina en células tumorales y la expresión de la isoforma βVI presente en PBMCs

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Sintetizar un conjunto de nuevos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para evaluar su potencial antiproliferativo *in vitro* en distintas líneas celulares tumorales y analizar su efecto sobre la polimerización de los microtúbulos .

V.2. Objetivos particulares

- Proponer los nuevos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina realizando y analizando los resultados obtenidos de los estudios de acoplamiento molecular.
- Sintetizar y caracterizar los compuestos **FSHV1** a **FSHV11**, por técnicas espectroscópicas y espectrométricas
- Determinar el porcentaje de actividad antiproliferativa de los compuestos en distintas líneas celulares de cáncer: PC-3 (adenocarcinoma de próstata), HCT-15 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama triple positivo), MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama triple negativo) y SK-LU-1 (adenocarcinoma de pulmón).}
- Detectar el porcentaje de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de humano y la actividad citotóxica (CC_{50}) en línea de riñón de mono (COS-7) de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina.
- Determinar el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los compuestos más activos en dos líneas celulares con fenotipo tumoral: MDA-MB231 y SK-LU-1.
- Analizar los cambios inducidos por los derivados más activos del conjunto de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en la distribución de β -tubulina en células en SK-LU-1 usando la técnica de inmunofluorescencia.
- Determinar cambios en la tubulina polimerizada/soluble en células SK-LU-1 tratadas con los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina más activos mediante Western blotting.

VI. Diseño de derivados de quinazolina

En el presente capítulo se describe el diseño de nuevos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina como potenciales agentes inhibidores de la polimerización de la tubulina. El diseño de estos derivados se realizó con base en la información cristalográfica del nocodazol (NZ) y la colchicina (COL) en el monómero de β -tubulina. Una vez generadas las propuestas, se procedió a realizar el acoplamiento molecular de los compuestos para corroborar el perfil de interacción con dicho blanco terapéutico.

VI.1. Metodología

VI.1.1. Preparación de ligandos

Las estructuras de los compuestos fueron construidas con la herramienta 2D Sketcher del programa Maestro 9.6 de Schrödinger. La geometría se optimizó con MMFF94⁵⁹⁻⁶¹ en el módulo *Obminimize* del programa *Openbabel*⁶². Posterior a esto, se utilizó el programa MGLTools 1.5.4 para detectar automáticamente los centros de torsión, enlaces rotables y asignar las cargas parciales a los átomos con el método de Gateiger-Marsilli⁶³, fusionándose además a los hidrógenos no polares al carbono adyacente. Las estructuras preparadas fueron guardadas en el formato PDBQT.

VI.1.2. Preparación de las proteínas

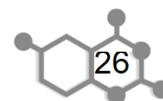
Se emplearon las estructuras de PDB 3HKD, 3N2G, 3N2K, 4YJ2, 5C8Y, 5CA1, 5XHC, 5XI5, 5XI7, 5YL4, 6FKJ y 6FKL para el monómero de β -tubulina, mientras que para α -tubulina se tomó la estructura de 5YL2. Los heterodímeros de α y β -tubulina fueron optimizados con el campo de fuerza CHARMM36⁶⁴ implementado en el programa GROMACS v5.1.4.⁶⁵ Posteriormente, se empleó la interfaz gráfica de MGLTools 1.5.4 para la asignación de cargas parciales con el método de Gasteiger-Marsilli⁶³ y fusionar los hidrógenos no polares, almacenando las estructuras finales en formato PDBQT.

VI.1.3. Acoplamiento molecular

Se empleó el programa AutoDock v4.2⁶⁶ para realizar el estudio de acoplamiento molecular de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en el sitio de unión del NZ y de la COL. Para esto, se centró la caja de búsqueda ("*grid*") en la cavidad correspondiente a ambos sitios considerando una dimensión de 80 x 80 x 80 puntos con un espaciado entre estos de 0.375 Å, utilizando el módulo AutoGrid v4.2 del programa AutoDock Tools. Finalmente, se realizó el cálculo de acoplamiento molecular con el módulo AutoDock v4.2 utilizando el algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 conformeros, 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 50 corridas.

VI.2. Resultados y discusión

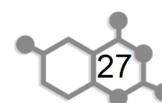
Los análogos de quinazolina han sido estudiados de forma extensiva por distintos grupos de investigación, los cuales se han relacionado con la presencia de esta estructura y la inhibición de dianas características en el inicio y progresión de enfermedades metabólicas, degenerativas y distintos tipos de cáncer.^{27,29,38,67-70}



En nuestro grupo de investigación se han propuesto y sintetizado un diverso número de derivados y análogos de la quinazolina con actividad inhibitoria de las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR), pteridin reductasa (PTR);⁷¹⁻⁷³ algunos otros presentaron actividad antioxidante al inhibir a la enzima xantina oxidasa (XO).⁷⁴⁻⁷⁶ Estudios recientes han explorado la actividad citotóxica en distintas líneas tumorales, así como su potencial actividad no mutagénica sobre líneas celulares primarias (benignas).⁷⁷

Debido al creciente número de casos, ha sido de nuestro interés continuar con el estudio del cáncer. En principio es importante, comprender que la desregulación del proceso de mitosis en células con fenotipo tumoral es clave para la progresión del tumor. Parte importante, de este proceso es la maquinaria involucrada en la segregación del material genético, dentro de los que se encuentra principalmente a los microtúbulos. Como se mencionó en el Capítulo II, estudios previamente reportados asocian a las quinazolininas como estructuras base importantes asociadas a la desestabilización de la polimerización. Esto último se comprobó por medio de estudios cristalográficos realizados por Potter y colaboradores⁵⁸, los cuales indican que estos compuestos se unen al sitio de unión de COL en β -tubulina, actuando así como inhibidores de la polimerización. Sin embargo, es importante recordar que el sitio de COL se encuentra altamente conservado entre las diferentes isoformas de β -tubulina de humano, por lo que se dificulta un diseño dirigido en este sitio para la regulación en el proceso de mitosis en células malignas. Por lo que resulta importante no sólo tomar en cuenta el sitio de COL, sino un sitio que no éste conservado como lo es del NZ, tanto en células sanas como en células tumorales para el diseño de nuevos derivados o análogos de quinazolina. Como anteriormente se mencionó hay varias isoformas que se sobreexpresan en cáncer, las de principal interés en nuestro grupo de investigación han sido β I y β III, así como la isoforma β VI sólo se expresa en polimorfonucleares, por lo que la selectividad es crucial entre estas para evitar problemas de hematotoxicidad.

Para el diseño, se llevó a cabo de forma inicial una búsqueda de compuestos co-cristalizados en el sitio de unión del NZ en la β -tubulina que presentaran alta similitud estructural al núcleo de quinazolina. El compuesto G2N es un derivado de dihidropirazina, co-cristalizado en la β -tubulina de *Ovis aries* (PDB 3N2G)⁷⁸, siendo uno de los compuestos que presentó mayor similitud estructural con los derivados sintetizados en nuestro grupo de investigación (i.e. quinazolin-2,4,6-triamina). Al realizar la comparación entre ambos núcleos, fue posible identificar 5 regiones estructurales características (ver **Figura. 6.1A**) presentes en ambos compuestos y que son de vital importancia para la interacción con los residuos presentes en los sitios de NZ y COL. Los grupos aceptores/donadores de puente de hidrógeno en las tres primeras 3 regiones (R1, R2 y R3) se encuentran presentes tanto en G2N como en el derivado de quinazolin-2,4,6-triamina. Las regiones R1 y R3 funcionan como aceptores de puente de hidrógeno (HA) al interactuar con los residuos de Glu198 y Tyr200, respectivamente. Por su parte, la región R2 actúa como un potencial donador de puente de hidrógeno (HD) para su interacción con Glu198.



Es importante mencionar que para el estudio comparativo entre las estructuras de G2N y el núcleo de quinazolina se consideró al nitrógeno en posición 1 (N1, región R4) en el estado protonado. Esto se determinó con el servidor en línea *Chemicalize*, el cual predijo un 50% de probabilidad de encontrar la especie protonada en N1 de la quinazolin-2,4,6-triamina a un pH cercano al fisiológico (pH = 7.0, ver **Figura 6.2**). Además, se sabe que al momento de que el ligando ingresa a una cavidad existe un incremento en el valor del pKa del grupo tituable, aumentando así la probabilidad de encontrar a N1 en su estado protonado. A diferencia de las otras regiones estructurales, es evidente que la región 4 (R4) difiere en posición entre ambas estructuras químicas. Sin embargo, existen estructuras cristalográficas de complejos tubulina-compuesto que confirman que el grupo donador de puente de hidrógeno puede encontrarse en esta nueva posición y mantener su interacción con la cadena principal de la Val239, dentro de los que se encuentra el compuesto de referencia NZ.⁷⁹

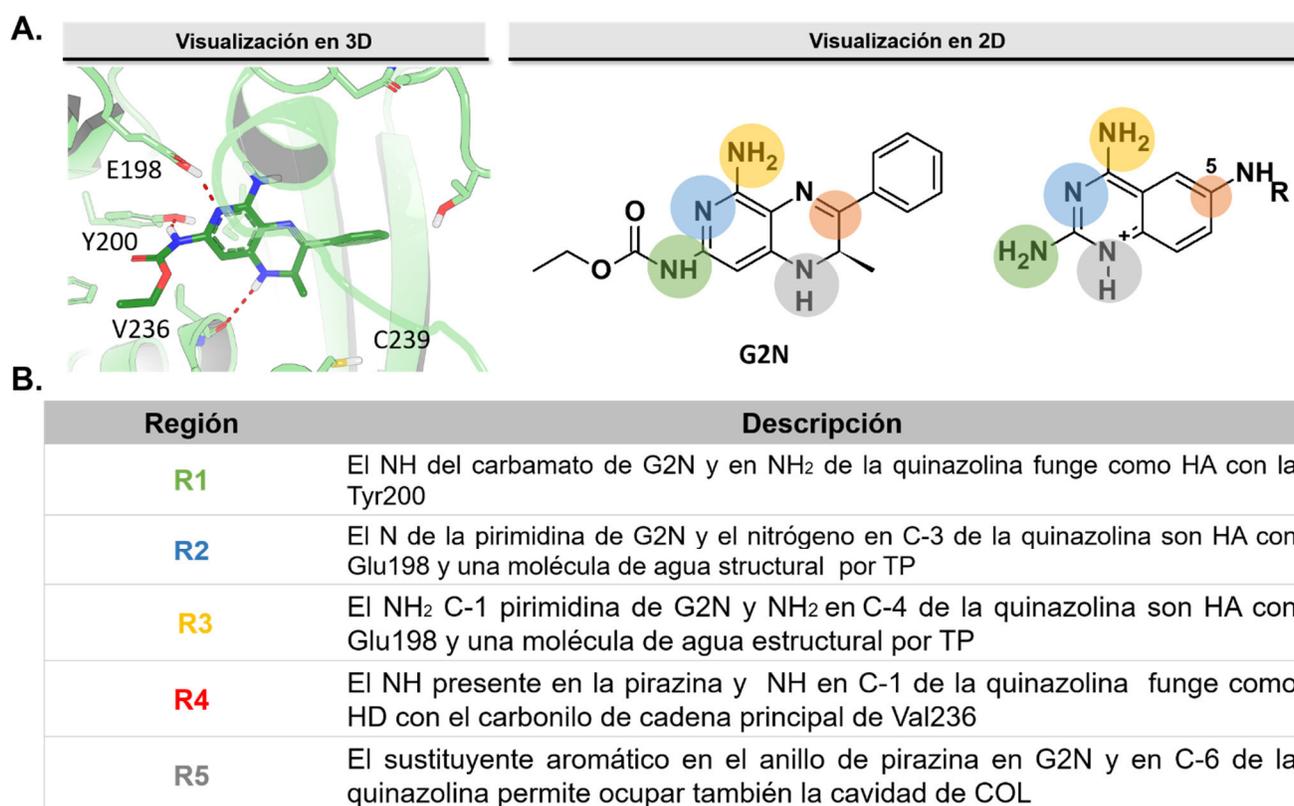


Figura 6.1. Similitud entre G2N y los derivados de quinazolina propuestos. **A.** Se muestra la estructura tridimensional de G2N y los residuos con los que interactúa en el sitio de unión del NZ. **B.** Visualización de 2D de G2N y de los derivados de quinazolin, enmarcando en círculos de colores los grupos que interactúan con los residuos en el sitio de unión. Hidrógeno aceptor de puente de hidrógeno (HA), Hidrógeno donador de puente de hidrógeno (HD) Transferencia de protón (TP). La numeración de las regiones no corresponde con la nomenclatura de los heterociclos base.

Por otra parte, se propuso la modificación del sustituyente aromático presente en la región R5 de G2N mediante la generación de un conector de tipo acetamida, el cual permite

conservar el mismo número de átomos presentes en el grupo fenilo, así como cierta rigidez estructural (véase **Figura 6.3A**). La inclusión del grupo metileno busca aumentar la flexibilidad del conector para facilitar el posicionamiento de un grupo aromático en el sitio de COL (ver **Figura 6.1B**). Para este sustituyente en la región R5 se propusieron derivados a partir de estructuras cristalizadas en el sitio de unión de COL, los cuales se han caracterizado en términos estructurales por ser de naturaleza aromática biciclo o diarilos sustituidos (Ver **Figura 6.3B.**), entre los cuales también se encuentran derivados y análogos de quinazolina.⁵⁸ Es por lo anterior que se propuso sustituir esta región con grupos voluminosos de tipo naftil, quinolil y fenil, los cuales además poseen grupos donadores y atractores de puente de hidrógeno.

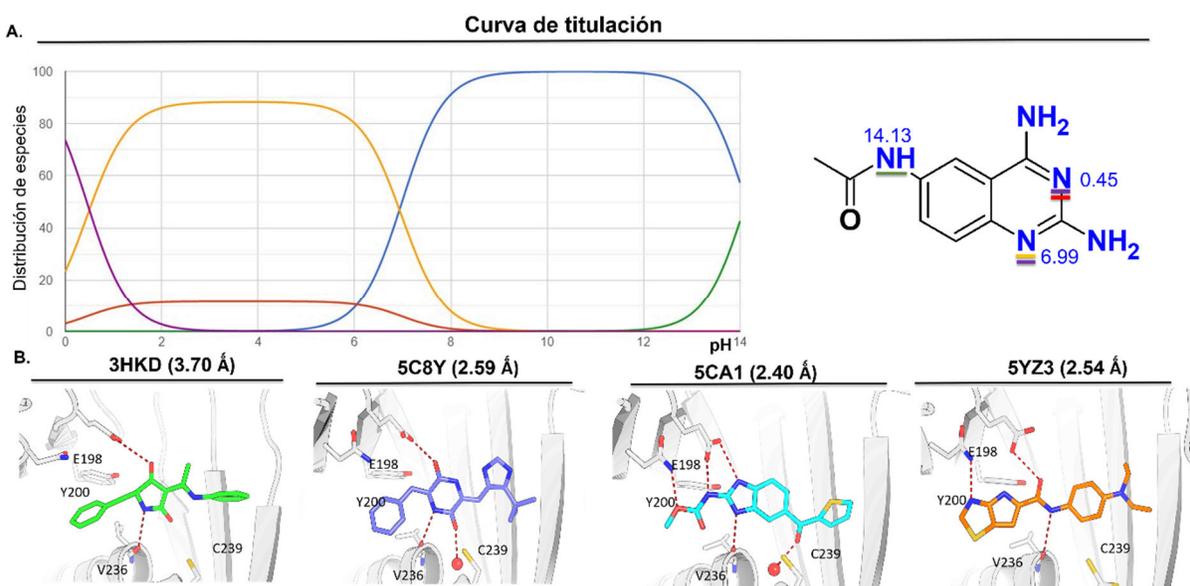


Figura 6.2. Preservación de las interacciones entre inhibidores de la de la despolimerización de tubulina en el sitio de unión del NZ y los derivados de quinazolina **A.** Gráfico del predominio de especies predicho con Chemicalize dependiendo del pH basado solo en el *core* principal de quinazolina, en el cual se ilustra dependiendo de los grupos protonables es el color de la curva y eso se denota en la estructura. **B.** Estructuras cristalizadas de distintos derivados inhibidores de despolimerización de tubulina en el que se muestran las principales interacciones con los residuos del sitio de unión de NZ.

En diversos trabajos se han estudiado moléculas que contienen al núcleo de quinolina, el cual además de ser un isómero del indol, es catalogado como una estructura privilegiada.^{80,81} Estos grupos funcionales se han relacionado con una actividad antitumoral a través de diversos mecanismos de acción, por ejemplo: la inhibición de la polimerización de la tubulina, entre otros.^{81–83} Otro núcleo aromático que resulta interesante, estudiar es el naftilo, del cual estudios anteriormente reportados indican que el mecanismo de acción pudiese ser por medio de la desestabilización de los microtúbulos.⁸⁴ En cuanto al grupo fenilo, se espera observar la variación en el efecto electrónico o estérico de los sustituyentes dentro de la cavidad, en comparación con los biciclo. Lo cual nos pudiese sugerir alguna relación entre estas dos modificaciones con la actividad antitumoral y su actividad como TDAs resultante.

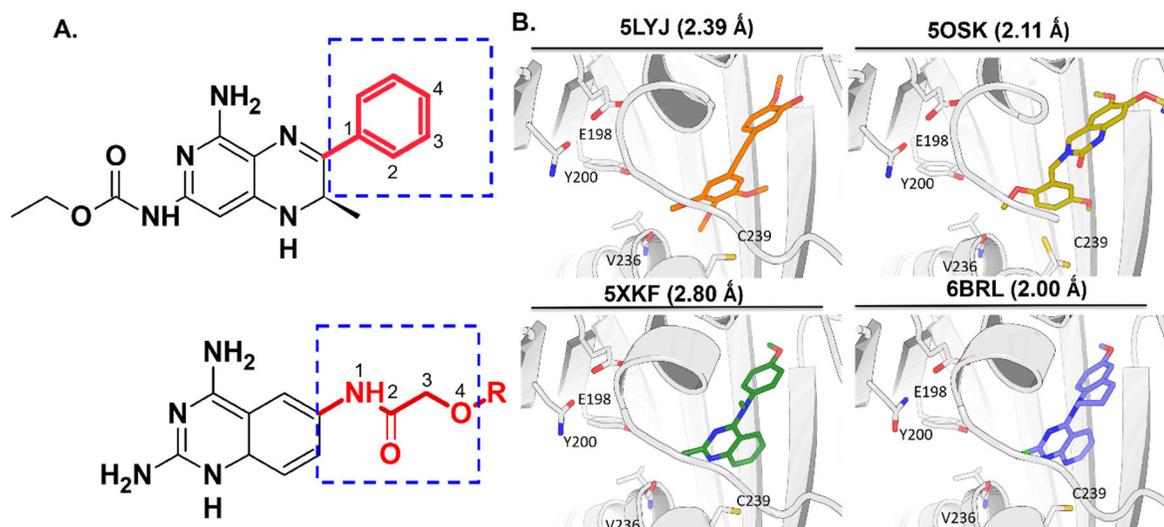


Figura 6.3. Tamaño del *conector* e inhibidores cristalizados en el sitio de colchicina. **A.** Justificación del tamaño del *conector* con respecto a la estructura de G2N (estructura superior) y la propuesta de los derivados de quinazolina. **B.** Distintos inhibidores cristalizados en el sitio de unión de COL.

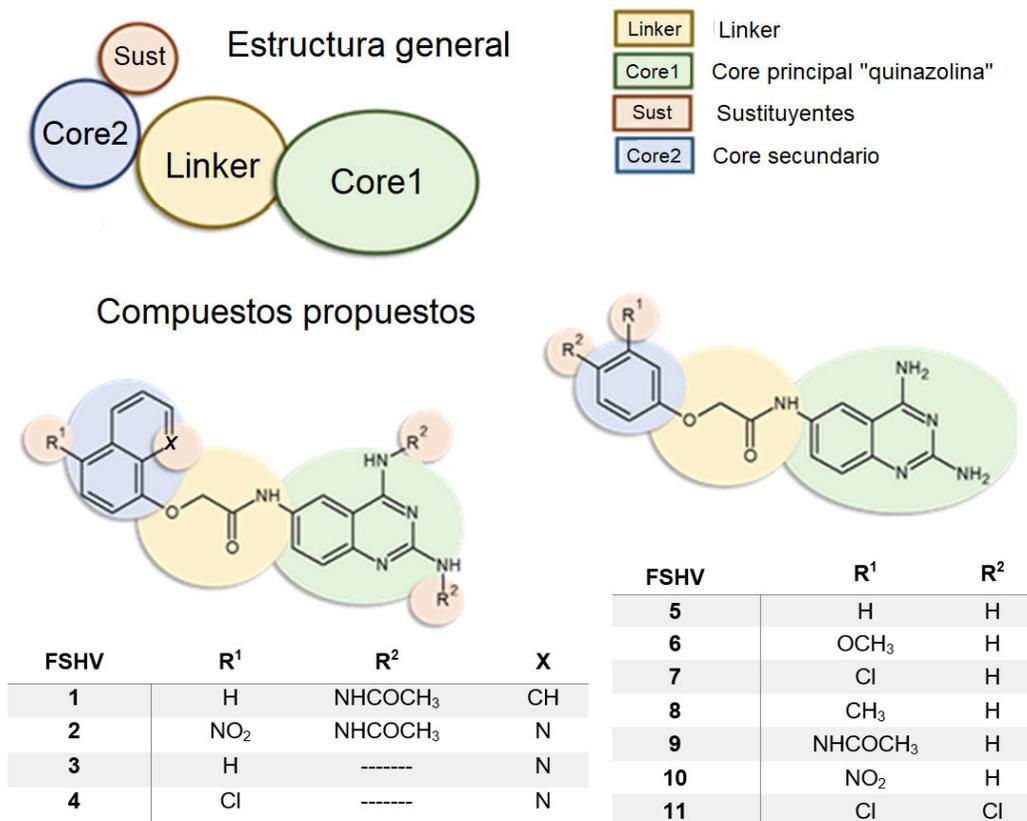


Figura 6.4. Propuesta general de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina (FSHV1-FSHV11).

VI.2.3 Estudios de acoplamiento molecular

Como anteriormente se había planteado, para el diseño de estos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina se debe considerar al sitio del NZ para hacer compuestos dirigidos, que funjan como agentes inhibidores de la polimerización de β -tubulina. Por lo que se tomó como base datos cristalográficos depositados en el PDB identificando así, el sitio del NZ el tamaño de la cavidad y conformación de las cadenas laterales de los residuos más adecuada, en el heterodímero de β -tubulina, con la finalidad de encontrar el mejor modo de unión de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina. Asimismo, se consideraron la diferencia a nivel secuencial entre isoformas de β -tubulina basándonos en un estudio computacional anteriormente reportado^{85,86}, en el cual se identificó la causa asociada a la resistencia de los derivados bencimidazólicos en la isoforma β III. Esto último se asocia a la presencia de Ser239 en la isoforma β III en lugar de Cys239 la se encuentra en β I. Así como que el hidroxilo en la Ser239 al ser menos voluminoso y más polar podría ser desfavorecer la unión de estos derivados bencimidazólicos.⁸⁶ Los derivados no interaccionen con la isoforma β VI la cual sólo se expresa en células hematopoyéticas, debida a la mutación de Ala198 por Glu198, éste último residuo se encuentra presente en la mayoría de las isoformas de β -tubulina, por lo que esperaríamos que al no tener esta interacción de puente salino con el Glu198 la cual se ha asociado al efecto de inhibición de la polimerización, no tendrán efecto sobre leucocitos sanos.

Parte complementaria del presente trabajo, consistió en la realización de estudios de acoplamiento molecular con Auto Dock v4.2 tomando como base doce estructuras cristalográficas de tubulina de mamífero determinadas a distinta resolución. Estos resultados se compararon con agentes desestabilizantes de la polimerización conocidos como lo son el NZ y G2N. De lo anterior se analizó el valor de puntuación (energía de unión libre ΔG), el índice de eficiencia del ligando (IEL) y el tamaño de clúster, comparando el efecto de la acetilación de los aminos C-2 y C-4 en la quinazolina (i.e. **FSHV1** y **FSHV2**).

La evaluación por medio de acoplamiento molecular de los derivados quinazolin-2,4,6-triamina (ver Anexo IV. Tablas) con acetilos en C-2 y C-4 de la quinazolina. (i.e. **FSHV1** y **FSHV2**) permitió identificar que éstos presentan un incremento en el valor de score y disminución en el número de clústers en todas las proteínas evaluadas. De forma complementaria en el parámetro de índice de eficiencia de ligando (IEL) se obtuvo un promedio de todos los valores obtenidos (ver Anexo Tabla) en cada PDB con todos los derivados, resultando que el valor de IEL obtenido fue mayor en 7 de 12 estructuras cristalográficas en los derivados desacetilados. Por todo lo anterior, podemos decir que los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina con el acetilo en C-2 y C-4 al perder la interacción de puente salino con el Glu198 disminuye la probabilidad de que éstos pudiesen fungir como inhibidores de la polimerización de β -tubulina en el sitio del NZ. En resumen el aumento del valor de puntuación y disminución de clústers y IEL en los derivados acetilados en C-2 y C-4 de la quinazolina, corrobora la importancia de la interacción con Glu198.

Con base en los resultados de energía libre de unión y tamaño de población o *clústers* de los derivados desacetilados y TDAs conocidos, fue posible encontrar el modelo más adecuado que es el complejo tubulina co-cristalizado con NZ (PDB: 5CA1). Esto debido al tamaño adecuado de la cavidad y la conformación de las cadenas laterales presentes en ésta.

Tabla 6.1 Energías de unión y clústers resultantes de los compuestos FSHV1-11 en distintas proteínas

Ligando	3HKD		3N2G		3N2K		4YJ2		5C8Y		5CA1	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-10.51	47	-10.39	46	-10.19	26	-10.69	40	-9.35	35	-10.77	42
	-9.28*	7	-12.94	27	-9.38	11	-9.52	11	-10.49	14	-12.15	25
FSHV2	-10.27	40	-9.52	25	-10.31	34	-10.32	31	-8.99	23	-10.17	32
	-9.13*	10	-11.41	15	-9.19	20	-9.25	11	-9.21	12	-10.12	14
FSHV3	-10.32	31	-10.36	44	-10.35	40	-10.34	38	-9.06	28	-10.45	46
FSHV4	-10.31	46	-9.33	29	-9.99	38	-10.46	36	-9.46	37	-10.70	39
FSHV5	-8.80	27	-8.49	20	-8.93	24	-8.97	42	-7.78	41	-8.97	46
FSHV6	-9.24	41	-8.76	40	-9.25	45	-9.71	42	-8.33	40	-9.47	48
FSHV7	-9.21	47	-8.83	27	-9.36	43	-9.56	42	-8.48	40	-9.64	49
FSHV8	-9.19	36	-8.77	22	-9.29	36	-9.40	46	-8.33	44	-9.46	49
FSHV9	-10.57	32	-10.07	25	-10.6	31	-10.33	23	-9.00	29	-10.55	25
FSHV10	-9.11	31	-8.79	37	-9.48	34	-9.45	43	-8.01	36	-9.18	46
FSHV11	-9.88	45	-9.35	43	-9.89	48	-9.71	34	-8.84	38	-10.21	49
G2N	-8.35	42	-8.47	34	-8.25	25	-8.65	29	-7.4	20	-7.45	24
NZO	-8.66	28	-8.40	29	-9.04	39	-9.25	50	-9.14	49	-10.21	50

* Corresponde a los resultados obtenidos de los derivados acetilados.

Tabla 6.1. (Cont.) Energías de unión y clústers resultantes de los compuestos FSHV1-11 en distintas proteínas

Ligando	5XHC		5XI5		5XI7		5YL4		6FKJ		6FKL	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-9.61	26	-10.01	39	-9.42	24	-10.41	44	-10.32	32	-10.12	23
	-8.82*	8	-9.41	9	-8.71	14	1.64	3	-8.93	14	-11.90	20
FSHV2	-9.21	22	-9.47	27	-8.78	17	-9.96	45	-9.67	24	-9.45	12
	-9.47*	10	-8.95	10	-8.66	13	2.08	1	-9.21	13	-11.35	17
FSHV3	-8.94	23	-9.72	33	-8.81	28	-10.19	44	-10.05	38	-9.73	35
FSHV4	-9.51	24	-10.11	34	-9.49	28	-10.60	45	-10.38	35	-10.07	29
FSHV5	-8.20	25	-8.94	46	-8.99	40	-8.80	33	-8.79	45	-8.48	30
FSHV6	-8.44	40	-8.99	46	-8.47	24	-9.37	47	-8.99	44	-8.72	36
FSHV7	-8.91	35	-9.13	44	-9.21	24	-9.45	47	-9.38	41	-9.04	33
FSHV8	-8.87	30	-8.99	48	-9.21	39	-9.37	47	-9.22	45	-8.75	41
FSHV9	-10.02	29	-10.28	35	-9.85	33	-10.78	34	-10.51	16	-8.90	11
FSHV10	-8.11	35	-8.61	27	-8.20	21	-8.79	33	-8.87	36	-8.57	24
FSHV11	-9.18	35	-9.67	45	-9.13	42	-9.78	37	-9.54	28	-9.20	19
G2N	-7.02	18	-8.76	18	-8.09	16	-7.40	19	-8.66	23	-8.75	40
NZO	-9.04	26	-9.59	50	-8.74	50	-9.53	31	-9.19	49	-9.12	50

* Corresponde a los resultados obtenidos de los derivados acetilados.

Las figuras se obtuvieron tomando el mejor modelo anteriormente mencionado (i.e. 5CA1). En la **Figura.6.5A** se muestra al derivado **FSHV1** desacetilado por los resultados anteriormente reportados, de igual forma se sabe que en la administración *in vivo* de compuestos acetilados al momento de ingresar a la célula las desacetilasas presentes en el

cuerpo rompen este enlace. De forma complementaria, se realizó una superposición de todos los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina (véase **Figura.5.4A**), observándose que todos éstos se disponen de forma similar, ocupando los sitios de unión del NZ y la COL.

En la **Figura 5.4B** se observa que las interacciones se preservan tanto en los inhibidores conocidos como TDAs (i.e. NZ y COL) como en los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina. Asimismo, las interacciones de puente de hidrógeno con la cadena principal de la Val236 y el N1 de la quinazolina, y entre el amino en C-2 de la quinazolina y la Tyr200. Así, la interacción de puente de hidrógeno puente salino entre el NH₂ del C-4, el N3 y el Glu198 respectivamente, la cual se sabe es crucial en este sitio de unión. Finalmente, para el sitio de unión de la COL se observa la interacción hidrofóbica sustituyente (i.e. naftil, quinolil o fenil) posicionado en C-6, así como en los derivados de colchicina (ver **Figura 5.4B**). Es importante mencionar que la interacción con la Cys239 no se observa en los compuestos FSHV, por lo que no habría alguna pérdida en la afinidad entre las isoformas β I y β III debido al cambio a nivel de secuencia en los residuos (i.e. Cys239/Ser239), a diferencia de los derivados del NZ o bencimidazólicos los cuales generan resistencia hacia la isoforma β III.

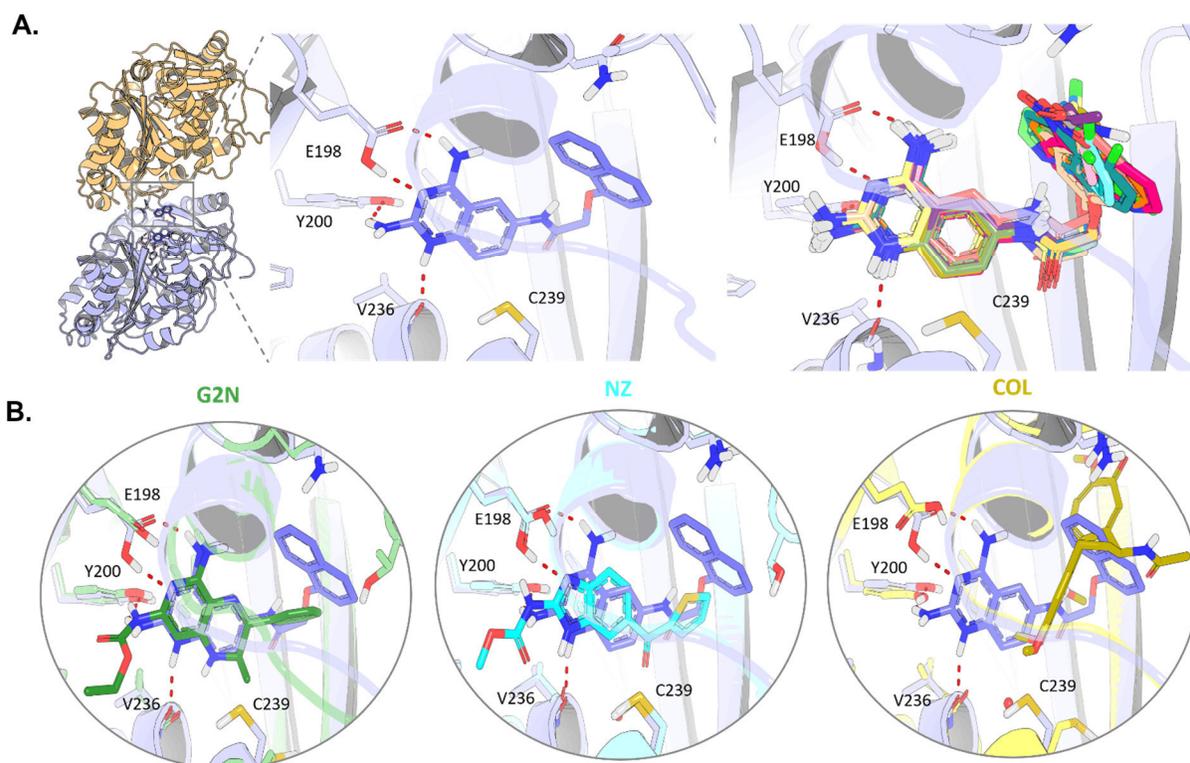


Figura 6.5. Unión de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en los sitios de unión de COL y NZ. **A.** En la parte superior izquierda, se observa el compuesto FSHV1 el cual interactúa con los residuos presentes en ambas cavidades (i.e. COL y NZ), En la parte superior izquierda se observa la superposición de los derivados FSHV los cuales se disponen de forma similar entre ellos. **B.** Comparación entre TDAs conocidos (G2N verde, NZ cian y COL amarillo oscuro) y FSHV1, las interacciones se preservan en todos los compuestos.

VI.2.1 Predicción de propiedades ADMET

Después de observar que los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina podrían fungir como TDAs, se procedió a predecir que éstos no fuesen tóxicos, para ello se utilizó el servidor FAF-Drugs4, con el cual se predijo las siguientes propiedades estructurales (i.e. descriptores moleculares): peso molecular (MW), donadores de puente de hidrógeno (HBD), aceptores de puente de hidrógeno (HBA), enlaces rotables (RB), área polar superficial (tPSA), logaritmo del coeficiente de partición (LogP). A pesar de esto, los valores son sólo predicciones por lo que es importante corroborarlo de forma experimental. En la **Figura 6.6** se muestran los valores obtenidos para cada derivado de quinazolin-2,4,6-triamina.

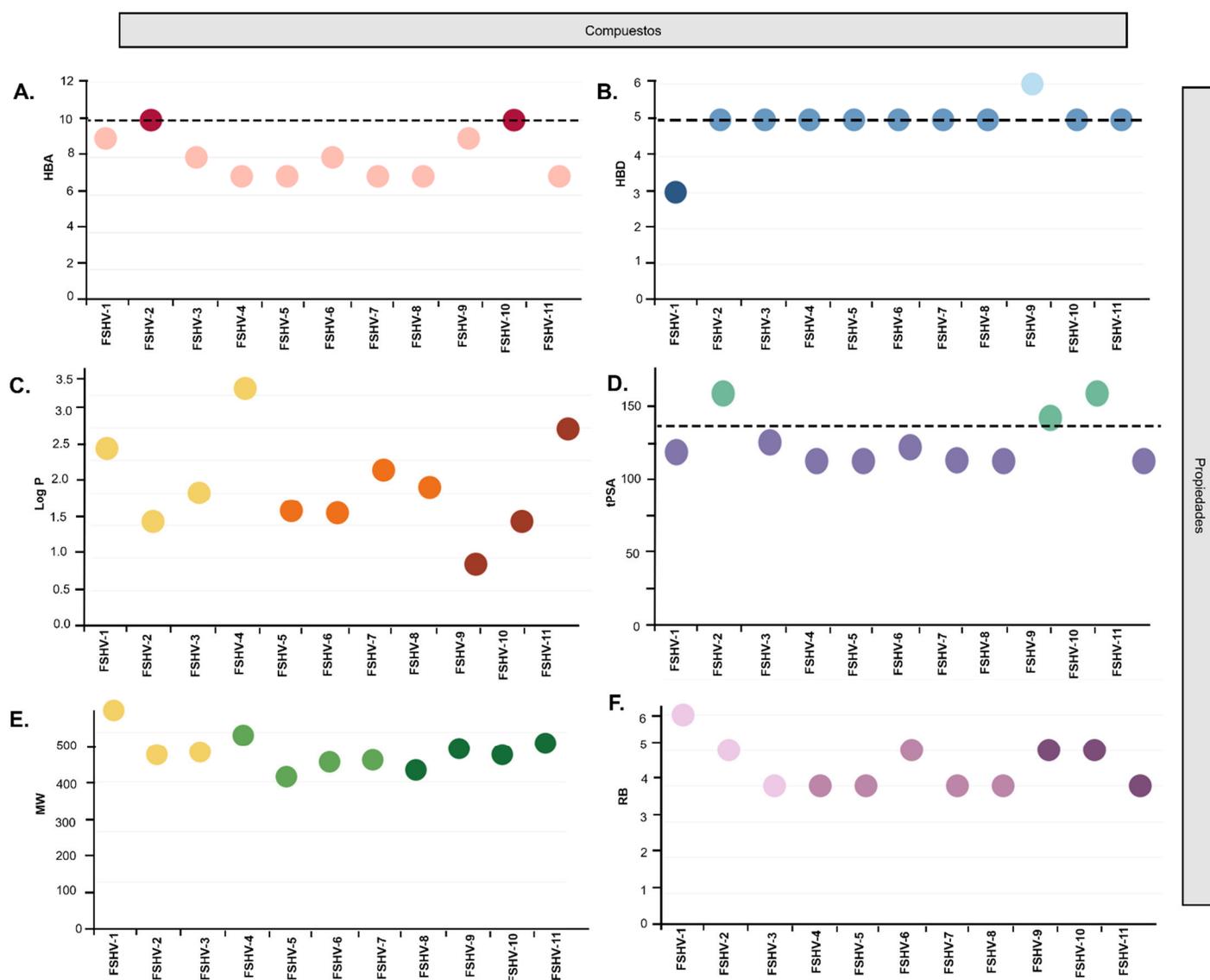


Figura 6.6. Descriptores fisicoquímicos del set de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina. **A.** Grupos aceptores de puentes de hidrógeno; **B.** Grupos donadores de puente de hidrógeno; **C.** Logaritmo del coeficiente de partición; **D.** Superficie polar del espacio topológico; **E.** Peso molecular y **F.** Número de enlaces rotables.

Asimismo, las propiedades fisicoquímicas predichas contribuyeron para predecir si estos compuestos pudiesen tener una biodisponibilidad oral adecuada. Para ello se consideraron ciertos criterios de aceptación establecidos por: las reglas de Lipinski ($MW \leq 500$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 5$ y $\text{LogP} \leq 5$), Egan ($0 \leq \text{tPSA} \leq 132$, $-1 \leq \text{LogP} \leq 6$) y Verber ($RB \leq 10$, $\text{tPSA} \leq 140$). El cumplimiento de todas estas reglas permite suponer que hay una alta probabilidad de que los compuestos en estudio se encuentran biodisponibles. Caso contrario sería si dos o más de estas propiedades se encuentran fuera del rango establecido, lo cual es indicativo de una posible baja biodisponibilidad después de la administración de estos derivados. Como se puede observar en la **Figura.6.6** es muy probable que la mayoría de los compuestos propuestos presenten buena biodisponibilidad oral, puesto que en términos generales éstos cumplen con las reglas antes mencionadas.

En la predicción de la toxicidad de las moléculas se emplearon las reglas de GSK 4/400 [$\text{Log P}/MW$] y Pfizer 3/75 [LogP/tPSA], en los que se toma en consideración a los dos descriptores fisicoquímicos de manera conjunta para cada derivado de quinazolin-2,4,6-triamina. En la **Figura 6.7**. se muestran los gráficos de distribución en el cual se muestra una delimitación por distintas zonas de distintas tonalidades las cuales indican el grado de aceptación de un compuesto: verde (aceptado), amarillo (preventivo) y rojo (rechazado). Debido a que ningún compuesto se encuentra en la cuadrante de tonalidad roja, esto nos sugiere que los compuesto FSHV podrían tener bajo riesgo de toxicidad. Aunque es preciso confirmar experimentalmente estas predicciones.

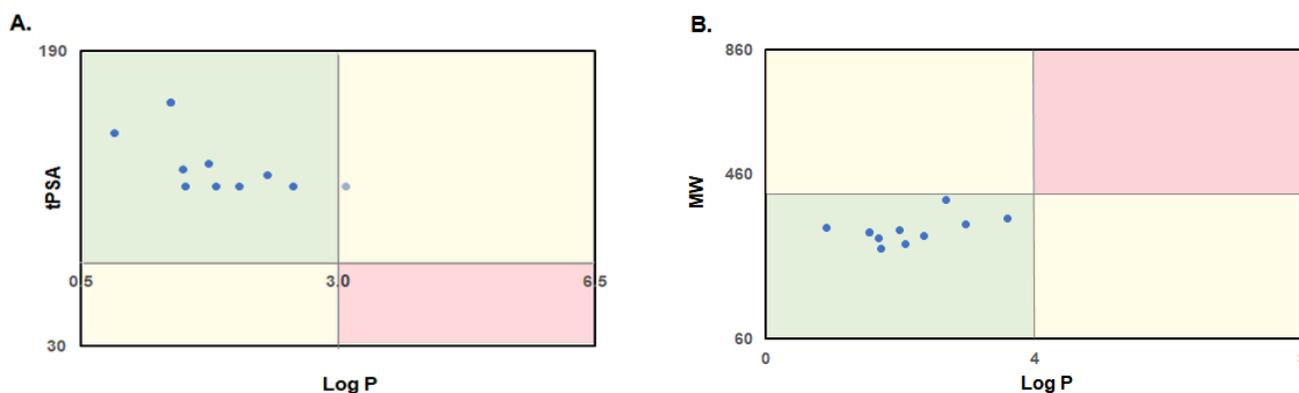


Figura 6.7 Representación gráfica de las reglas de **A.** Pfizer 3/75 y **B.** GSK 4/400.

VII. Síntesis de compuestos

A partir de las moléculas propuestas en el capítulo anterior, se plantearon las rutas sintéticas correspondientes para la obtención de once derivados de quinazolina (**FSHV1–FSHV11**). En las siguientes secciones se aborda de forma general la metodología de síntesis empleada para su obtención. En el Anexo II.1 se describen detalladamente los procedimientos seguidos para cada uno de los intermediarios y productos finales.

VII.1. Síntesis de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina

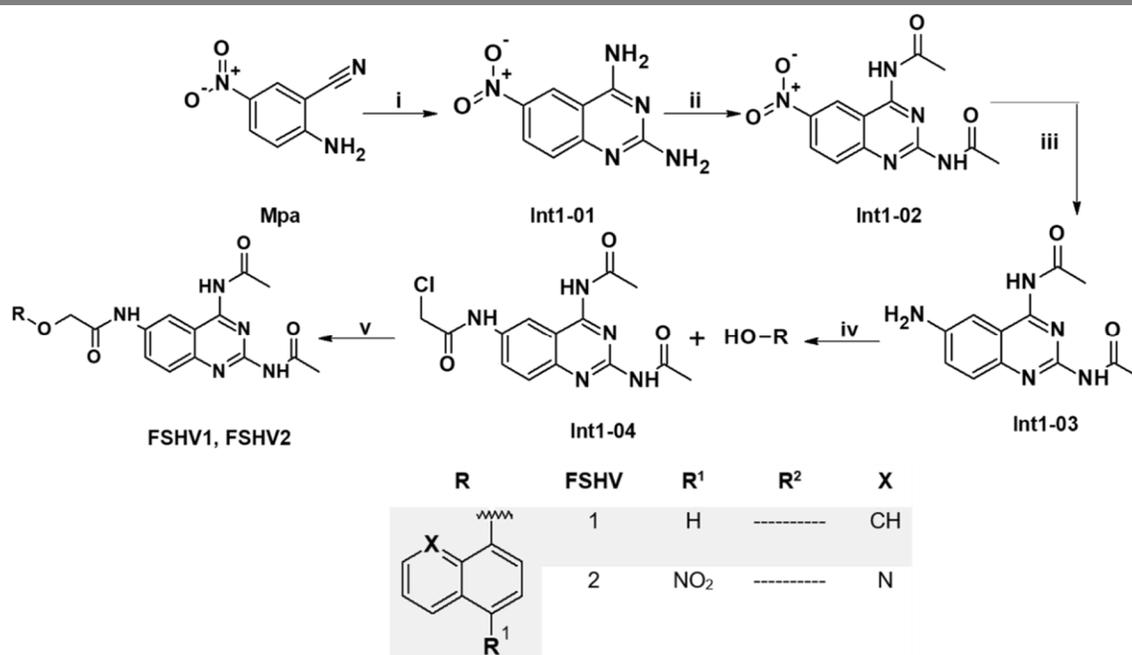
Para la obtención de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina se llevaron a cabo dos rutas sintéticas, las cuales se muestran en los **Esquemas 7.1** y **7.2**.

VII.1.1. Obtención de los compuesto **FSHV1** y **FSHV2**

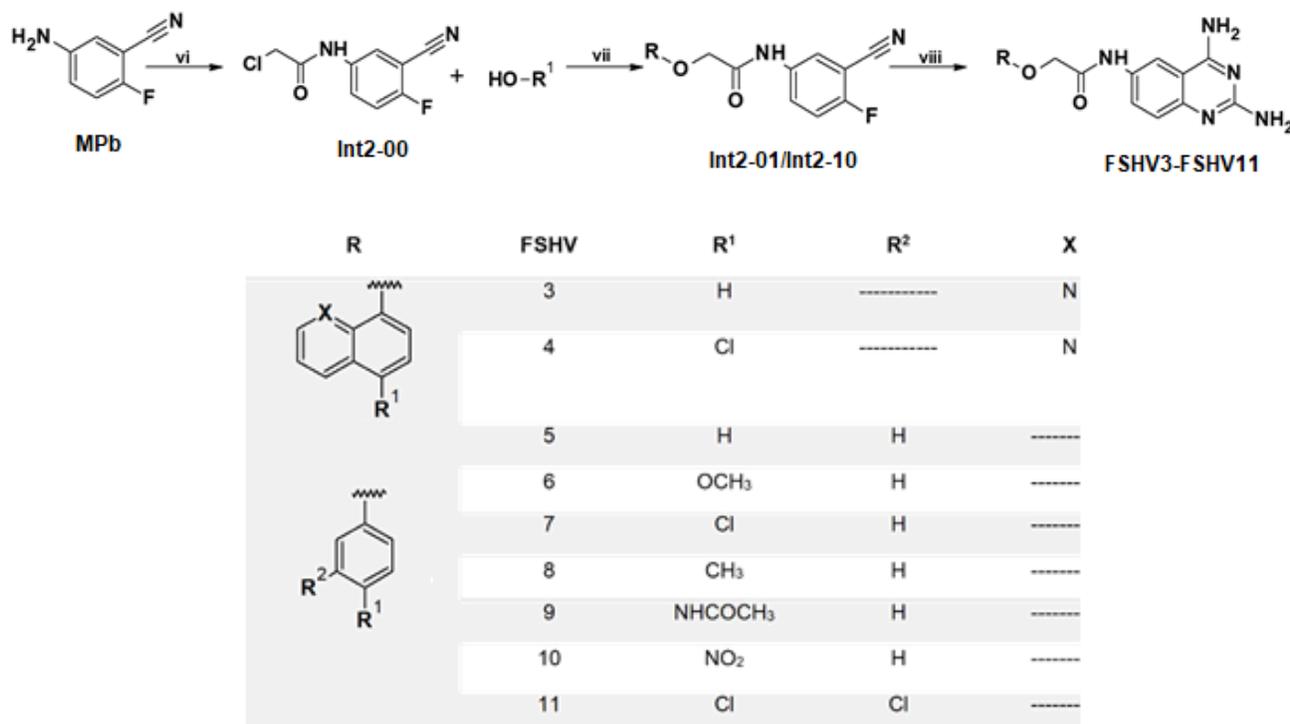
FSHV1 y **FSHV2** se sintetizaron siguiendo la ruta sintética que se muestra en el **Esquema 7.1**. Se partió del 5-nitro-2-aminobenzonitrilo (**MPa**), comercialmente disponible, el cual se hizo reaccionar con guanidina, en medio básico, para llevar a cabo una ciclocondensación *in situ*. De esta forma, se obtuvo el 6-nitroquinazolin-2,4-diamina (**Int1-01**). Posterior a esto, se llevó a cabo la acetilación, con anhídrido acético, para la formación de *N,N'*-(6-nitroquinazolin-2,4-dil)diacetamida (**Int1-02**). El compuesto anteriormente mencionado, se redujo catalíticamente con Pd/C para dar el *N,N'*-(6-aminoquinazolin-2,4-dil)diacetamida). La obtención de *N*-[2,4-bis(acetilamino)quinazolin-6-il]-2-cloroacetamida (**Int1-04**), se logró al reaccionar **Int1-03** con cloruro de cloroacetilo. Finalmente, **Int1-04**, mediante una reacción de sustitución con los derivados de naftilo, dio lugar a **FSHV1** y **FSHV2**. Para el aislamiento de éstos últimos se utilizó una columna cromatográfica de silica gel abierta, utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol.

VII.1.2. Obtención de los compuestos **FSHV3** a **FSHV11**

Para la síntesis de este *set* de quinazolininas se siguió la ruta planteada en el **Esquema 7.2**. El 5-amino-2-fluorobenzonitrilo (**MPb**) se hizo reaccionar con cloruro de cloroacetilo para la formación del 2-cloro-*N*-(3-ciano-4 fluorofenil)acetamida (**Int2-00**). Posteriormente, se realizó la reacción de sustitución con los derivados de fenoles (**Int2-04–Int2-11**) y 8-hidroxiquinolinas (**Int2-01–Int2-03**). Finalmente, mediante el uso de guanidina se formaron los derivados de quinazolina correspondientes (**FSHV3–FSHV11**). Es importante mencionar que éste último paso de ciclocondensación se realizó por dos métodos: convencional y asistido por microondas. La mezcla de reacción obtenida se purificó por medio de columna de silica gel abierta con una fase móvil de cloroformo/metanol en mezclas de polaridad creciente.



Esquema 7.1. Secuencia de síntesis para la obtención de **FSHV1** y **FSHV2**. Reactivos y condiciones: **i.** $(\text{C}(\text{NH}_2)_3)_2\text{CO}_3$, KOH, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$, 100°C ; **ii.** $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ 90°C ; **iii.** 10% Pd/ C, MeOH; **iv.** NaHCO_3 , ClCH_2COCl , CH_3COCH_3 a 0°C ; **v.** $\text{K}_2(\text{CO}_3)$, DMF a 85°C .



Esquema 7.2. Secuencia de síntesis para la obtención de **FSHV3–FSHV11**. Reactivos y condiciones: **vi.** NaHCO_3 , ClCH_2COCl , CH_3COCH_3 a 0°C ; **vii.** $\text{K}_2(\text{CO}_3)$, DMF a 80°C ; **viii.** $(\text{C}(\text{NH}_2)_3)_2\text{CO}_3$, DIPEA, DMF o DMA a $95\text{--}120^\circ\text{C}$.

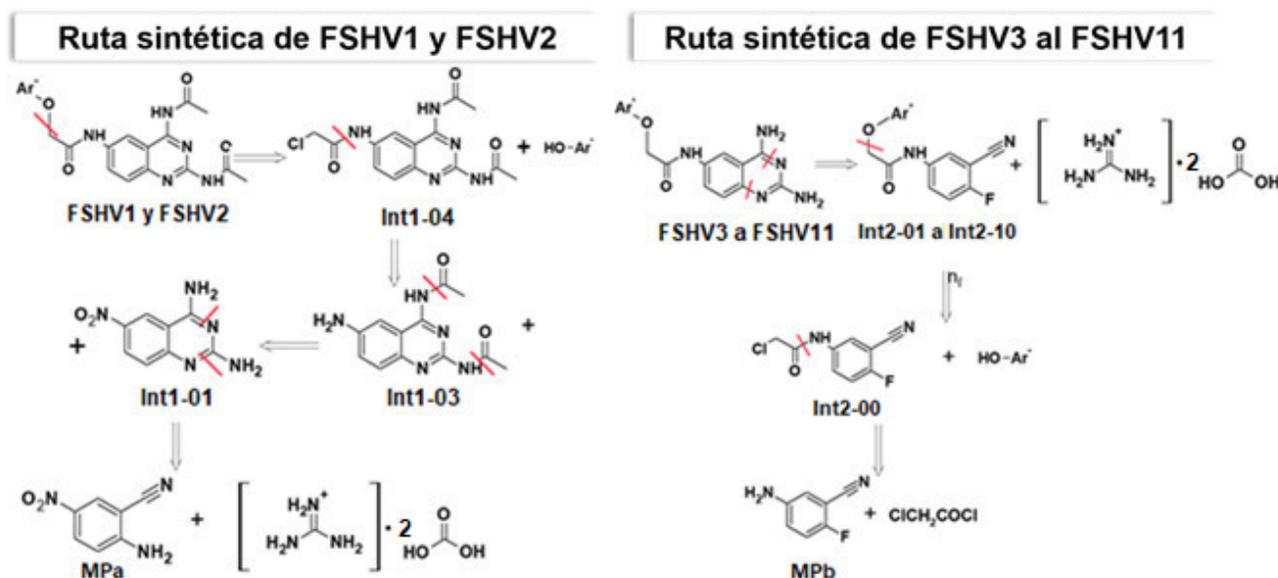
VII.2. Resultados y Discusión

VII.2.1 Análisis retrosintético

Para realizar la síntesis del conjunto de derivados de quinazolina **FSHV1-FSHV11** se realizó el análisis retrosintético que se muestra en el **Esquema 7.3**.

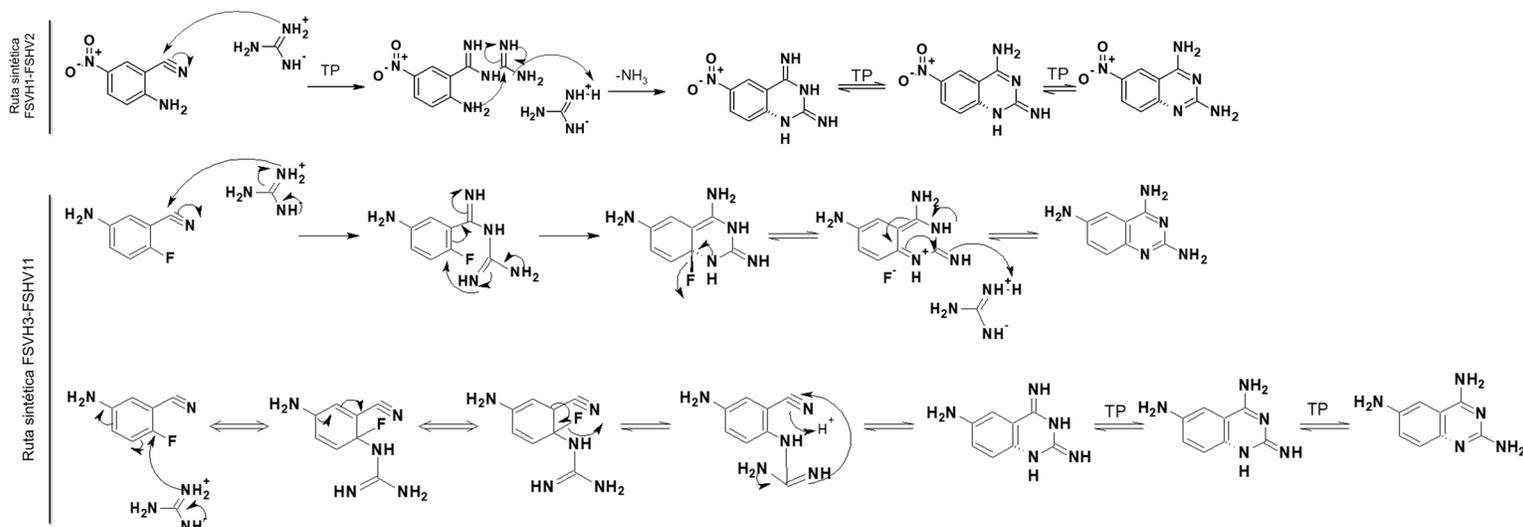
Como se mencionó anteriormente se plantearon dos rutas para obtener los once derivados de quinazolin-2,4,6-triamina. La primera consistió en la ciclocondensación de carbonato de guanidina, hidróxido de potasio y nitroantranonitrilo (**MPa**) para obtención del intermediario 2,4-diamin-6-nitroquinazolina (**Int1-01**). Posteriormente, se hizo una reducción catalítica del **Int1-01** y una sustitución acil-nucleofílica (S_NAc) con anhídrido acético para la obtención de *N, N'*-(6-aminoquinazolin-2,4-dil)diacetamida (**Int1-03**). Para la formación del *conector*, se hizo reaccionar al **Int1-03** con cloruro de cloroacetilo para la obtención de **Int1-04**. Por último, mediante una sustitución nucleofílica con **Int1-04** y el anión preformado de los distintos grupos como naftol y 5-nitroquinolin-8-ol, se formaron los compuestos **FSHV1** y **FSHV2**.

La segunda ruta difiere de la primera en la secuencia de las reacciones intermedias. En este caso, se forma el 2-cloro-*N*-(3-ciano-4-fluorofenil)acetamida (**Int2-00**) partiendo de 2-fluoro-5-aminobenzonitrilo (**MPb**) y cloruro de cloroacetilo. De ahí se realiza la sustitución nucleofílica con los derivados de 8-hidroxiquinolina, y los fenoles sustituidos, para obtener los intermediarios **Int2-01** al **Int2-10**. Por último, se realizó la reacción de ciclocondensación con el carbonato de guanidina, diisopropiletilamina y los intermediarios correspondientes.



Esquema 7.3. Análisis retrosintético para la obtención de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina.

3.4.2. Propuestas del mecanismo de ciclocondensación de ambas rutas planteadas.



Esquema 7.4. Propuesta de mecanismo de reacción de la ciclocondensación de ambas rutas.

La propuesta del mecanismo de ciclocondensación con potasa consiste en que la guanidina pasa de un estado catiónico a uno neutro, a partir de la cual se realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del nitrilo generándose así el intermediario reactivo. De ahí que el grupo amino en C-2 del 5-nitroantonitrilo ataca al grupo imina del intermediario proveniente de la guanidina liberándose así amoníaco (**Esquema 7.4**). En principio, el favorecimiento se debe por la aromatización de este ciclo forma intermediario de menor energía y estable.

En el mecanismo propuesto para la ciclocondensación para la obtención de los productos FSHV3-FSHV11 por medio de DIPEA en los primeros pasos, al igual que en la propuesta anterior, hay la liberación de la guanidina, de ahí se propusieron dos posibles mecanismos uno de ellos consiste adición de la guanidina al nitrilo para la formación del intermediario reactivo. De ahí se procede a una ciclación intramolecular la cual podría y por medio de una sustitución aromática nucleofílica (S_NAr) saliendo así el flúor para la formación del anillo. Finalmente, el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la quinazolina (**Esquema 7.4**), se favorece debido a la estabilidad de esta especie aromática correspondiente así como el efecto anquimérico, el par libre nitrógeno (N3) de la quinazolina forma un intermediario de menor energía que corresponde a la quinazolina. La otra propuesta del mecanismo de reacción consiste en que primero se da la S_NAr de la imina del grupo de guanidina desplazando al flúor y posteriormente se da la adición al nitrilo para su posterior cierre para la formación del anillo. La aromatización se favorece por la estabilidad de este intermediario. Siendo la primera propuesta la más factible debido a que la ciclación intramolecular podría favorecer la S_NAr y no viceversa, aunque es preciso verificarlo de forma experimental.

VII.2.2 Síntesis de intermediarios para la obtención de FSHV1 y FSHV2.

La mayor parte de los intermediarios se obtuvieron como sólidos puros con puntos de fusión definidos a partir de la primera ruta planteada anteriormente. En su mayoría se

caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En la **Tabla 7.1** se muestran los rendimientos y constantes físicas de estos intermediarios.

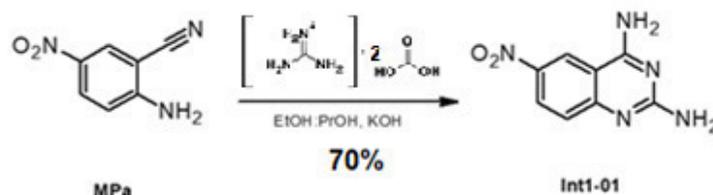
Tabla 7.1. Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios **Int1-01**– **Int1-04**

Nombre del intermediario	Rendimiento (%)	R _f	Punto de fusión (°C)	Tonalidad del compuesto
Int1-01	70	0.40 (I)	359.6 - 361.2	naranja
Int1-02	95	0.75 (II)	278.3 - 280.1	amarillo claro
Int1-03	94	0.35 (II)	238.6 - 239.4	amarillo
Int1-04	ND	ND	ND	naranja claro

Sistema de elución (SE) I: 2-butanol/ácido acético/agua 80:20:5; SE II: cloroformo/metanol; ND: No determinado.

VII.2.2.1 Síntesis de **Int1-01**

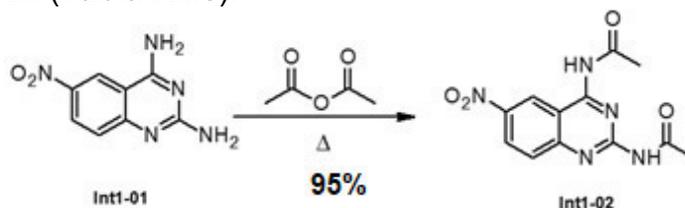
Este primer paso de la ruta de síntesis es común para la obtención de **FSHV1** y **FSHV2**. Se realiza en las condiciones de reacción detalladas en el Anexo II. Se parte de 5-nitroantranonitrilo, o 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (**MPa**), y carbonato de guanidina en condiciones básicas con una mezcla de etanol/isopropanol (1:2) (Anexo II, **Tabla AII.4**).



Esquema 7.5. Ciclocondensación del 5-nitroantranonitrilo.

VII.2.2.2 Síntesis de **Int1-02**

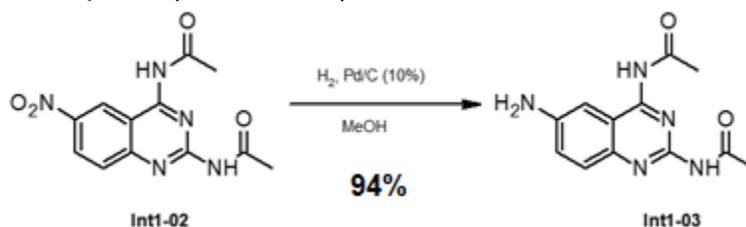
El paso consecuente consiste en la sustitución acil-nucleofílica con un exceso de anhídrido acético para la acetilación de ambos aminos libres en C-2 y C-4 de la quinazolina, para la obtención de **Int1-02**. Para la corroboración de la estructura se emplearon distintas técnicas espectroscópicas (**Tabla AII.5**).



Esquema 7.6. S_NAc con anhídrido acético.

VII.2.2.3 Síntesis de **Int1-03**

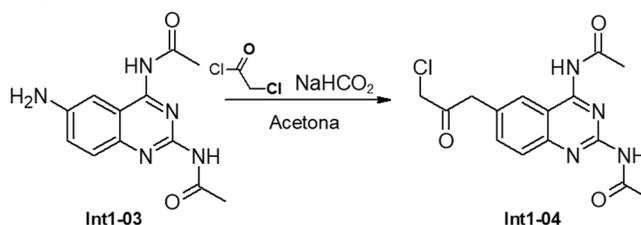
El tercer paso para la obtención del intermediario común **Int1-03**, consistió en una reducción catalítica con Pd/C utilizando como disolvente metanol esto se realizó a 23°C. Con ello se redujo el grupo nitro al grupo amino. Para la elucidación estructural se utilizaron distintas metodologías espectroscópicas (**Tabla AII.6**).



Esquema 7.7. Reducción catalítica para la formación de **Int1-03**.

VII.2.2.4 Síntesis de **Int1-04**

Finalmente, la formación del *conector* se realizó mediante una reacción acil-nucleofílica para la obtención de **Int1-04**, adicionando el cloruro de cloroacetilo, en frío y bajo condiciones básicas. Debido a la obtención de cuatro productos correspondiente debido a la labilidad de los acetilos en C-2 y C-4, se procedió a meter la mezcla a reaccionar para su posterior purificación con sílica gel.



Esquema 7.8. Sustitución nucleofílica con cloruro de cloroacetilo.

VII.2.3 Síntesis de intermediarios **Int2-00/ Int2-11**.

Los intermediarios presentados en esta subsección corresponden a la ruta de obtención de los productos **FSHV3** al **FSHV11**. Éstos se obtuvieron como sólidos puros con puntos de fusión definidos; y se elucidaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. En la **Tabla 7.2** se muestran los rendimientos y constantes físicas de los intermediarios.

Tabla 7.2. Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios **Int2-00–Int2-10**

Nombre del intermediario	Rendimiento (%)	R _f	Punto de fusión (°C)	Tonalidad de compuesto
Int2-00	98	0.70 (II)	132.7-133.1	café claro
Int2-01	87	0.59 (III)	130.1-132.4	café
Int2-02	80	0.61 (III)	163.8-165.9°	café claro
Int2-03	93	0.23 (III)	335.6-336.3	naranja oscuro
Int2-04	79	0.86 (III)	174.3-176.1	café

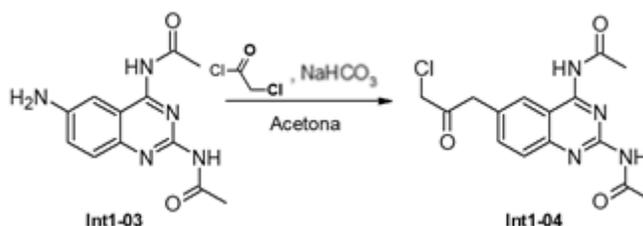
Tabla 7.2. (Cont.) Rendimientos y constantes físicas de los intermediarios **Int2-00** al **Int2-10**

Nombre del intermediario	Rendimiento (%)	R _f	Punto de fusión (°C)	Tonalidad de compuesto
Int2-05	53	0.34 (III)	167.2-168.1	naranja
Int2-06	48	0.57 (III)	186.4-188.5	café claro
Int2-07	51	0.48 (III)	142.3-143.6	café
Int2-08	60	0.81 (III)	198.6-200.1	café claro
Int2-09	46	0.84 (III)	143.9-145.2	café claro
Int2-10	44	0.78 (III)	141.2-143.6	café

Sistema II: cloroformo/metanol 80:20; sistema III: hexano/acetato de etilo 50:50; ND: No determinado

VII.2.3.1 Síntesis de **Int2-00**

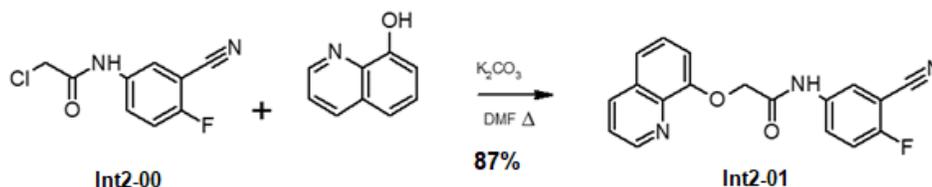
Este es el primer intermediario en común para la síntesis de **Int2-01** al **Int2-10**. Esta reacción consiste en una sustitución acil-nucleofílica con cloruro de cloroacetilo a bajas temperaturas, en medio básico, utilizando como disolvente acetona, para la formación del producto **Int2-00**.



Esquema 7.9. Sustitución acil nucleofílica con cloruro de cloroacetilo.

VII.2.3.2 Síntesis de **Int2-01**

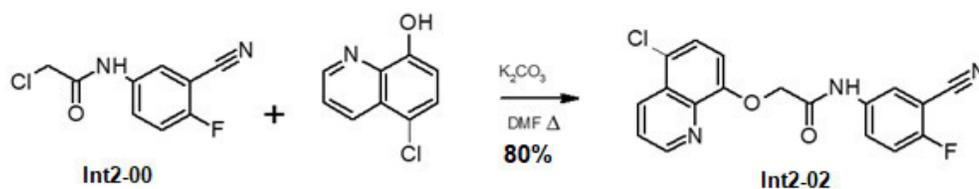
La reacción se basa en una sustitución nucleofílica, que como primer paso es la formación del anión (O⁻) del derivado de quinolina en condiciones básicas para la posterior reacción de sustitución sobre el halogenuro de alquilo.



Esquema 7.10. Obtención de **Int2-01**.

VII.2.3.3 Síntesis de **Int2-02**

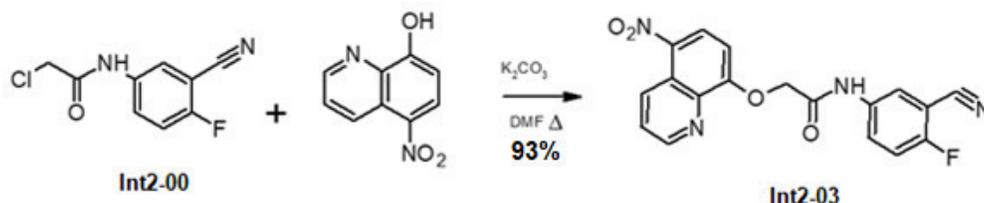
La reacción estriba en una sustitución nucleofílica, que como primer paso consiste en la deprotonación generando así el anión (O^-) del derivado de quinolina, esto se ve favorecido en condiciones básicas (carbonato de potasio) para la posterior reacción de sustitución sobre el halogenuro y obtener **Int2-02**.



Esquema 7.11. Obtención de **Int2-02**.

VII.2.3.4 Síntesis de **Int2-03**

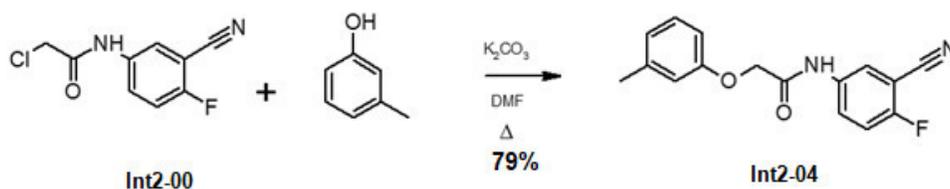
La reacción consta en una sustitución nucleofílica, que como primer paso es la formación del anión (O^-) del derivado de quinolina por lo que se requieren condiciones básicas y un disolvente polar aprótico como lo es la DMF para favorecer la sustitución sobre el halogenuro y obtención del intermediario.



Esquema 7.12. Obtención de **Int2-03**.

VII.2.3.5 Síntesis de **Int2-04**

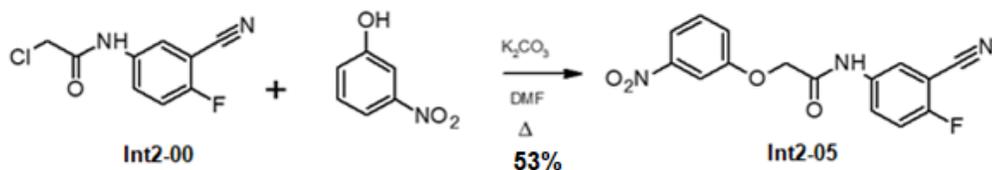
La reacción se fundamenta en una sustitución nucleofílica, que como primer paso consiste en la deprotonación generando el anión fenolato del *meta* cresol, para la posterior sustitución sobre el halogenuro de alquilo y obtener **Int2-04**.



Esquema 7.13. Obtención de **Int2-04**.

VII.2.3.6 Síntesis de **Int2-05**

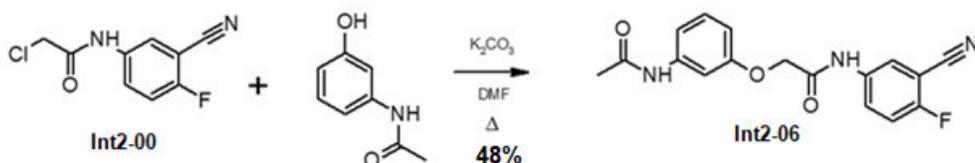
La reacción se basa en una sustitución nucleofílica, que como primer paso es la formación del anión (O^-) del derivado de fenol por lo que se requieren condiciones básicas, para la posterior sustitución de halogenuro de alquilo para la obtención de **Int2-05**.



Esquema 7.14. Obtención de Int2-05.

VII.2.3.7 Síntesis de Int2-06

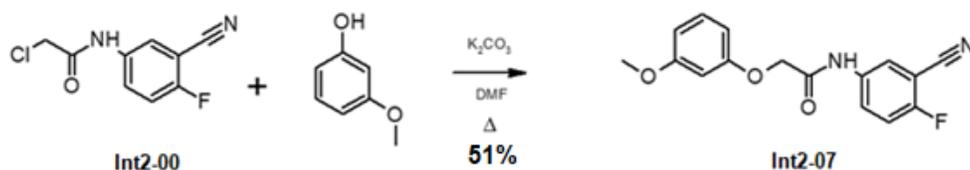
La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones anteriormente reportadas (subsección VII.2.3.5), para así obtener el **Int2-06**.



Esquema 7.15. Obtención de Int2-06.

VII.2.3.8 Síntesis de Int2-07

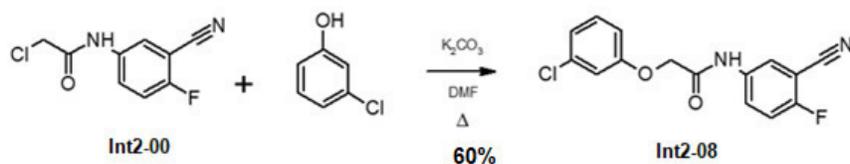
La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones anteriormente reportadas (subsección VII.2.3.5), para así obtener el **Int2-07**.



Esquema 7.16. Obtención de Int2-07.

VII.2.3.9 Síntesis de Int2-08

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones anteriormente reportadas (subsección VII.2.3.3), para así obtener el **Int2-08**.



Esquema 7.17. Obtención de Int2-08.

VII.2.3.10 Síntesis de Int2-09

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones anteriormente reportadas (subsección VII.2.3.6), para así obtener el **Int2-09**.

refieren a los grupos C=N, C-N y N-H presentes en el anillo de pirimidina. De forma particular en cada uno de los derivados dependiendo del sustituyente presente se observaron bandas adicionales, así como que los valores de bandas de absorción suelen ser distintos dependiendo del ambiente químico dependiendo de si los sustituyentes eran GEA o GED.

En el espectro de RMN-¹³C las señales observadas corresponden a los 24, 19 a 16 carbonos presentes dependiendo del derivado de quinazolina en cuestión. Es importante mencionar que algunas señales de carbonos cuaternarios no fueron muy intensas, debido a que éstos se caracterizan por tener largos tiempos de relajación, se identificaron las señales correspondientes a él carbonilo del conector así como el carbono del metileno. Los carbonos aromáticos presentes en el anillo de quinazolina y el anillo del naftol, el derivado de 8-hidroxiquinolina o derivado de fenol en cuestión, las diferencias observadas en cada una fueron principalmente en términos de desplazamientos debido al ambiente químico en particular de cada sustituyente presente. Otra diferencia que es importante fue que en los derivados FSHV1 Y FSHV2 se observaron las señales correspondientes a los grupos acetilos alrededor 188.65 y 189.88 ppm la señal del carbonilo de amida y alrededor de 27.89 y 48.28 los grupos metilos presente en las amidas en C-4 y C-2.

En el espectro de RMN-¹H se identificaron señales como: a los singuletes que se encontraban alrededor 910.45-7.98 ppm, que integraba para tres protones, correspondientes a H2, H5, y H14 de los grupos amino, esto también variaba de acuerdo al ambiente presente en cada uno de los derivados. Asimismo, un singulete ubicado alrededor de 4.75-3.33 ppm, que integraba para dos el metileno presente en el conector. En la parte correspondiente al anillo bencenoide de la quinazolina, se detectó al protón en posición 5 de la quinazolina con una constante de acoplamiento con valor de $J_{meta-para} = 4.8-0.9$ Hz; en algunos derivados no se observó como un doblete y no un doble de dobles y por tanto este tipo de acoplamiento debido a la frecuencia del equipo. El H en posición 7 de la quinazolina se observó como un doble de dobles con una $J_{otao-meta} = 7.2-2.4$ Hz. Por otra parte, el H en posición 8 de la quinazolina presentaban una constante de acoplamiento de tipo *otao-para*, alrededor de 8.4-2.1 Hz, el valor tan contrastante es debido a que en algunos derivados FSHV no se observaba el acoplamiento en posición *otao* y otros sólo en *para*. Para los derivados con sustituyentes tipo naftol y derivados de 8-hidroxiquinolina presentaban señales tipo doble de dobles o multipletes según sea el caso, en el primer caso se observaban constantes de acoplamiento $J_{otao-para}$ y $J_{otao-meta}$ con valores de desplazamientos muy distintos debido a la presencia de sustituyentes de tipo GEA o GED que resultan en que éstos se encuentren a campo alto o bajo. Así, para los derivados fenólicos presentaban señales como dobles de dobles con constantes de acoplamiento distintos incluso se observaron casos en que había H¹ equivalentes. En el caso particular de los compuestos FSHV1 y FSHV2 también se observó dos singuletes que integraba para 3 H¹ que correspondían a los metilos presentes en las amidas en posición dos y cuatro de la quinazolina.

Tabla 7.3. Rendimientos y constantes físicas de productos **FSHV1-11**

Nombre del intermediario	Rendimiento (%)	R _f	Punto de fusión (°C)	Color
FSHV1	38	0.90 (III)	97.8-99.1	rojo

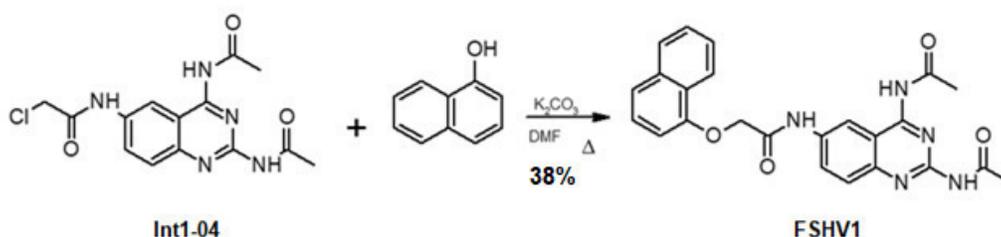
Tabla 7.3. (Cont.) Rendimientos y constantes físicas de los productos FSHV1-FSHV11

FSHV2	39	0.80 (III)	> 300*	naranja
FSHV3	41	0.91 (II)	173.8-174.5	café claro
FSHV4	33	0.77 (II)	165.0-166.8	amarillo claro
FSHV5	23	0.37 (II)	153.7-155.3	café claro
FSHV6	28	0.82 (II)	301.9-302.9	café
FSHV7	35	0.35 (II)	239.8-240.7	café
FSHV8	43	0.72 (II)	134.7-136.3	café claro
FSHV-9	31	0.43 (II)	139.3-140.8	café claro
FSHV10	40	0.62 (II)	178.2-179.9	naranja claro
FSHV11	38	0.85 (II)	122.3-124.8	café claro

Sistema de elución (SE) II: cloroformo/metanol 80:20; SE III: hexano/acetato de etilo 50:50; * punto de descomposición

VII.2.4.1 Síntesis del compuesto FSHV1

La reacción es una sustitución nucleofílica bimolecular que, como primer paso consiste en la deprotonación generando el anión (1-naftolato) por las condiciones básicas. Como disolvente se utilizó uno de naturaleza polar aprótico DMF para la posterior sustitución sobre el halogenuro (**Int1-04**). Este último se encontraba en mezcla con los posibles productos en reacción que corresponden al monoacetilado en C-4 o C-2 o el diacetilado. Anteriormente se informó de un proceso similar en otros compuestos sintetizados en nuestro grupo de investigación.^{73,87} Por lo que el naftalen-1-olato se adicionó en exceso para poder hacerlo reaccionar con el producto diacetilado el cual se encontraba en mayor proporción según lo observado en cromatografía en capa fina (CCF). Para el aislamiento y obtención de **FSHV1**, se realizó por medio de una columna con gel de sílice.



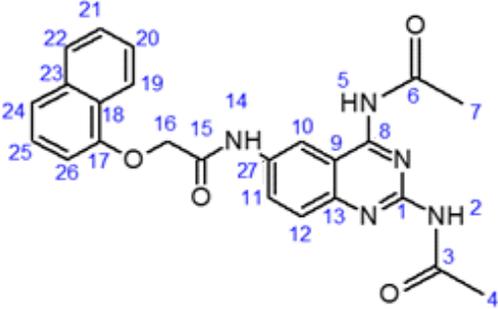
Esquema 7.20. Obtención de FSHV1.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia, el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de RMN-¹H corresponde el mismo; por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de RMN-¹³C. En el **Espectro 7.1** (Anexo II **Espectro 1.54 A**) se observa la correlación de los H4, H6, H7 y H19 al H26 con sus carbonos

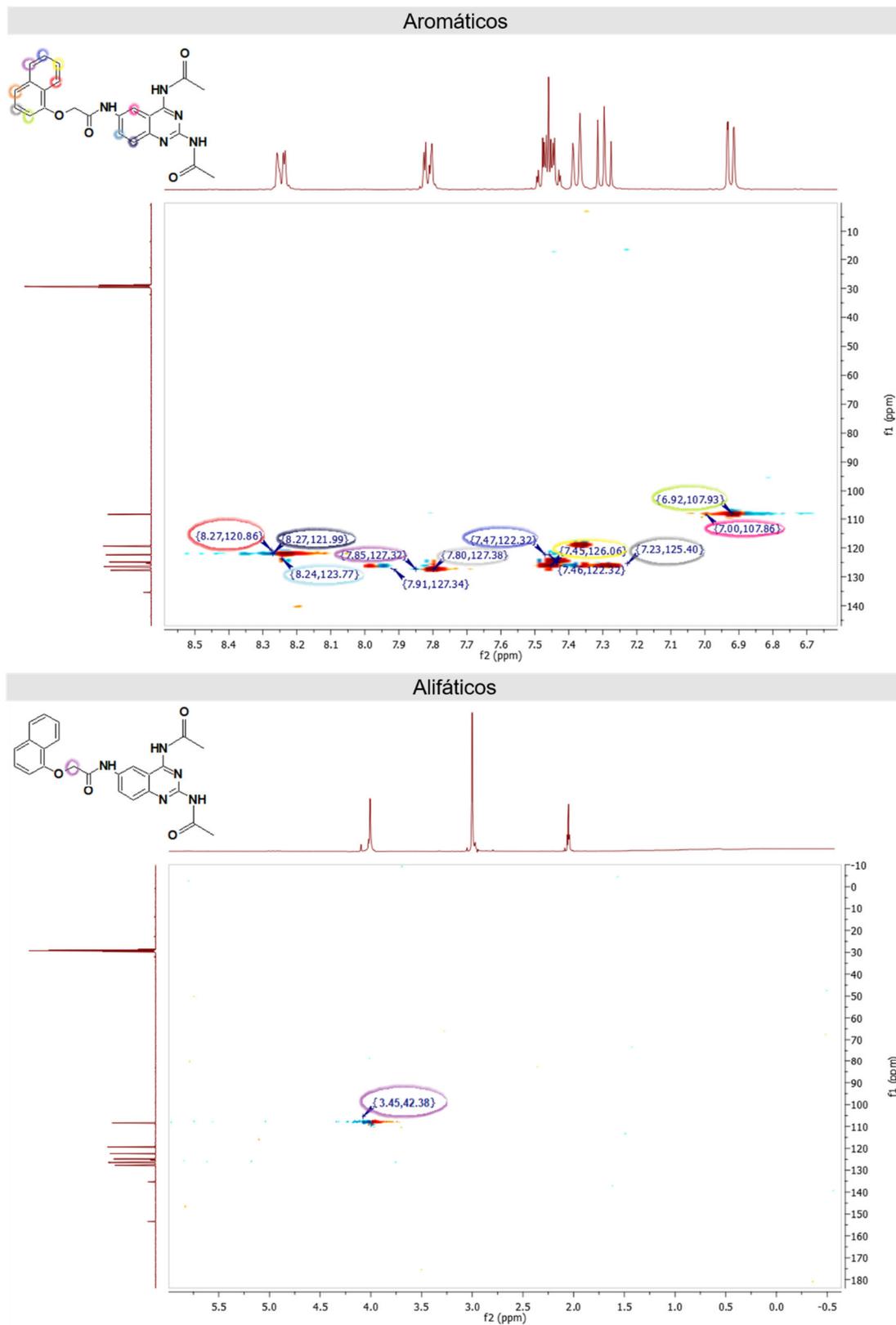
respectivos en el núcleo de quinazolina o en el núcleo de quinolina en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores. En este espectro no se observa la interacción en la parte alifática de los metilos que se encuentran en los acetilos, esto pudiera ser debido a que se encuentran cerca de grupos electroatrayentes. Por otra parte, en el de HMBC, se observaron señales presentes de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y el naftilo, los cuales se denotaron enmarcándolos en círculos de distintas tonalidades; y en la región alifática, los protones presentes en CH₃ del carbonilo de la amida, se marcaron con un círculo color morado (**Espectro 7.2** o Anexo **Espectro 1.54 B**).

En el espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas. De esta manera se asignaron los hidrógenos, que son vecinos entre sí, del anillo bencénico, de la quinazolina y del naftilo (**Espectro 7.3**, o Anexo II **Espectro 1.53**). Las correlaciones {8.27, 7.78}, {8.25, 6.98} y {8.27, 8.25} ppm corresponden al H4, H6 y el H7 del anillo bencénico de la quinazolina (encerrados en un círculo morado y rojo). De manera complementaria, las correlaciones {7.45, 7.81}, {7.82, 8.23}, {8.28, 7.42} y {6.92, 7.75} corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H19, H20, H21,22, H24, H25 y H26 del sustituyente que, en este caso particular, corresponde a un naftilo denotados en círculos de tonalidades naranja, verde, rosa.

Tabla 7.4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV1**

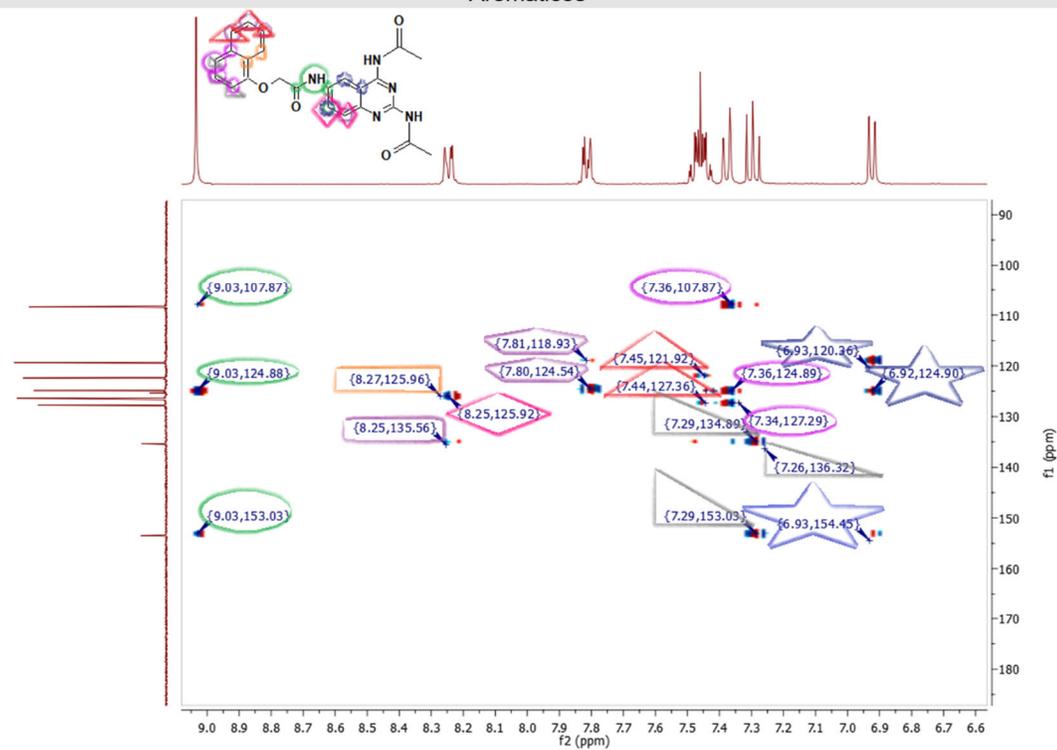
Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV1</p>	<p>Espectro 1.49, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3284 (Ar-NHC=OR), 3048 (C-H_{arom}), 3072 (CH₃)1596, 1456 (C=C_{arom}), 1360, 1267 (NHR_{arom}), 1304, 1014 (R₂C=O_{arom}).</p> <p>Espectro 1.50, RMN ¹H (300 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 9.48 [(H-2), s, 3H], 3.45 [(H-7), s, 5H], 1.74 [(H-4), s, 3H], 9.48 [(H-5), s, 3H], 6.93 [(H-10) d, J = 2.4 Hz, 1H], 8.25 [(H-11) dd, J = 7.3, 2.4 Hz, 1H], 8.27 [(H-12) dd, J = 6.8, 0.9 Hz, 1H], 9.48 [(H-14), s, 3H], 3.45 [(H-16), s, 5H], 7.85 – 7.78-7.80 [(H-19) m, 1H], 7.45 [(H-20) dd, J = 7.5, 2.2 Hz, 1H], 7.47 [(H-21) dd, J = 7.4, 2.2 Hz, 1H], 7.82 [(H-22) dd, J = 6.8, 2.6 Hz, 1H], 7.46 [(H-24) dt, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 7.25 [(H-25) dd, J = 9.9, 1.3 Hz, 1H], 6.92 [(H-26) dd, J = 7.4, 1.4 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.51, RMN ¹³C (300 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 189.88 (C-6), 175.14 (C-3), 163.81 (C-8), 153.77 (C-13), 145.84 (C-17), 145.55 (C-1), 135.08 (C-23), 132.60 (C-27), 127.67 (C-11), 129.58 (C-12), 129.14 (C-22), 128.62 (C-20), 128.37 (C-21), 127.76 (C-24), 127.67 (C-19), 125.5 (C-18), 122.32 (C-25), 118.72 (C-26), 118.71 (C-9), 113.94 (C-10), 42.38 (C-16), 30.49 (C-4), 27.89 (C-7).</p> <p>Espectro 1.52, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 444.1192 (teórico 144.1666 error: 2.0806)</p>

A.

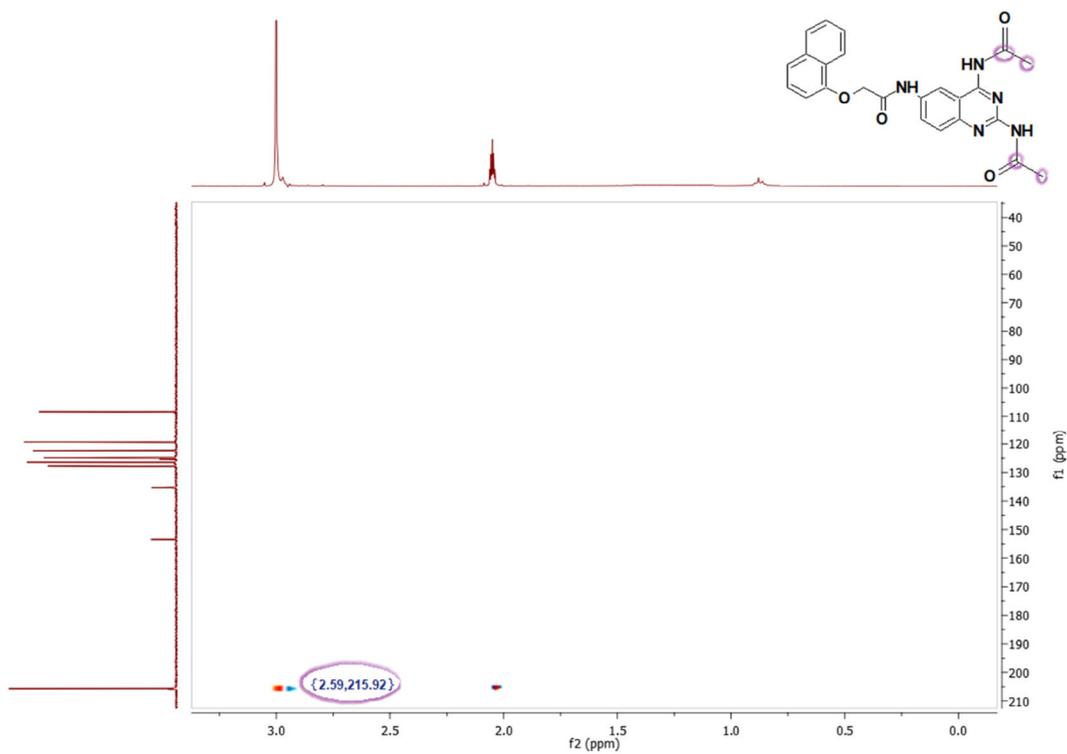


Espectro 7.1. RMN en 2D heteronucleares de FSHV1. Espectro HSQC

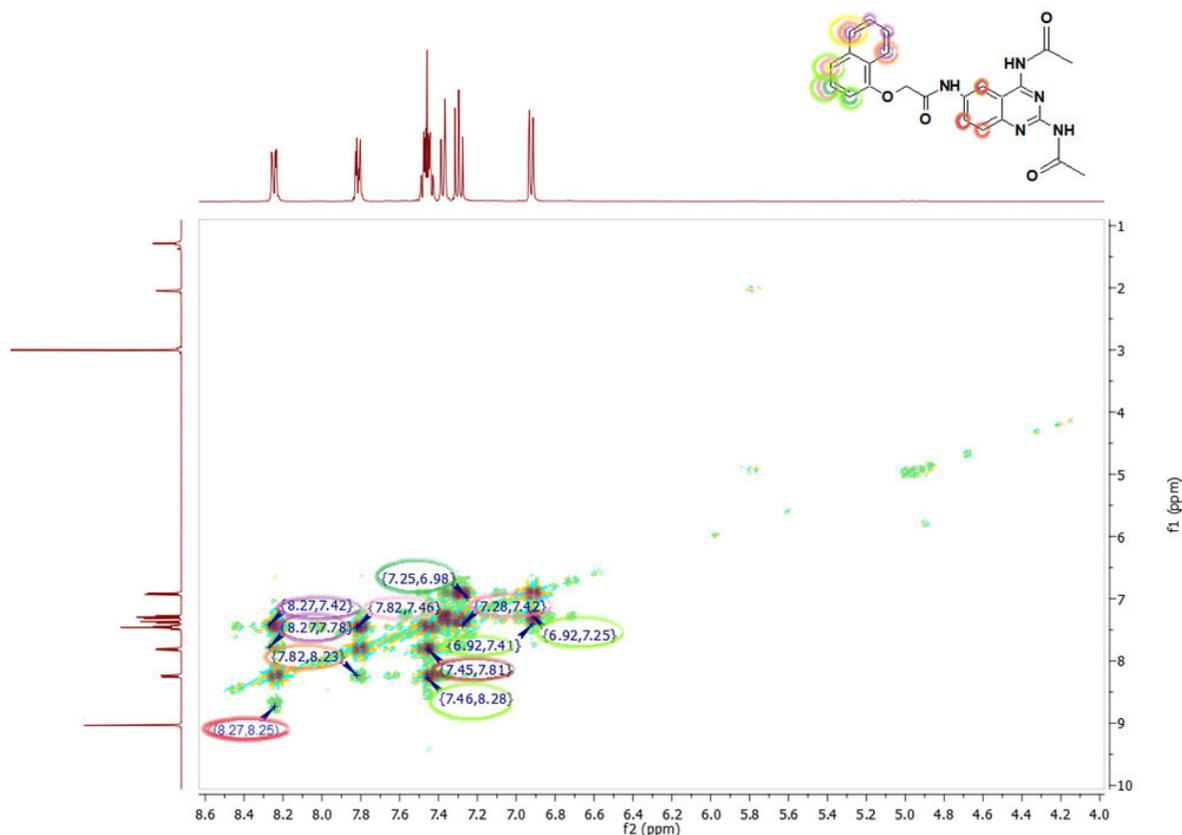
B. Aromáticos



Alifáticos



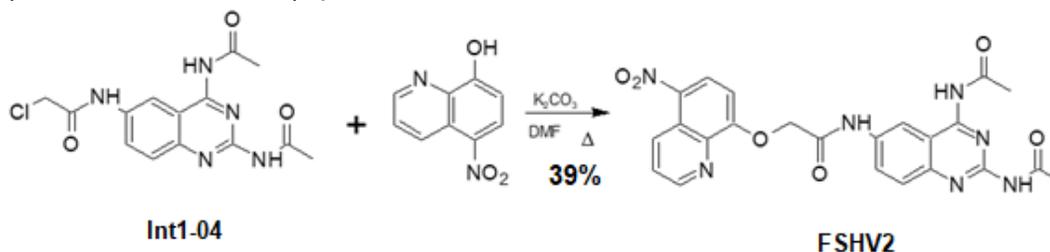
Espectro 7.2. RMN en 2D heteronucleares de FSHV1 B. Espectro HMBC



Espectro 7.3. RMN en 2D homonuclear COSY de **FSHV1**.

VII.2.4.2 Síntesis del compuesto **FSHV2**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.1), para así obtener el **FSHV2**.



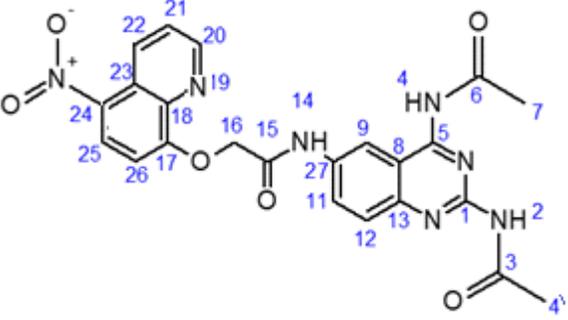
Esquema 7.21. Obtención de **FSHV2**.

En el espectro de masa (**Espectro 1.58**) se observa m/z correspondiente a la masa monoisotópica del derivado; algo característico en este tipo de derivados (8-hidroxiquinolinas sustituidas) son las pérdidas de NO, CO, ó NO₂ según lo reportado en otros estudios.⁸⁸ Las intensidades de estos picos se observan alrededor de 159.0641 [M-NO]⁺ y en 132.0546 [M-NO-CO]⁺.

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos del anillo de benceno de la quinazolinona y del 5-nitroquinolin-8-ol. Esto se puede visualizar en

el anexo **Espectro 1.59**. Las correlaciones {8.77, 7.66} y {7.77, 7.66} ppm permitieron asignar a H4, H6 y el H7, del anillo bencénico de la quinazolina y se denotan en color amarillo (Anexo II **Espectro 1.95**). De manera complementaria, las correlaciones {7.45, 7.68}, {7.78, 7.45}, {7.44, 7.63} y {7.78, 8.95} corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H19, H20, H21,22, H24, H25 y H26 del 5-nitroquinolin-8-ol, denotados en círculos tonalidades verde y rojo.

Tabla 7.5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV2**

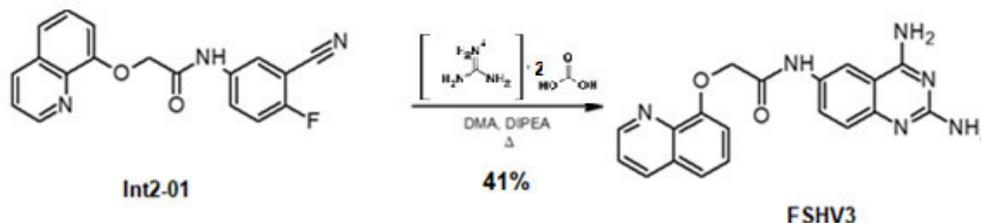
Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV2</p>	<p>Espectro 1.55, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3361 (Ar-NHC=OR), 2957,2859(CH₃), 1599, 1412 (C=C_{arom}), 1270 (NHR_{arom}), 1507, 1382 (arom R-N=O),1068 (R₂C=O).</p> <p>Espectro 1.56, RMN ¹H (300 MHz TMS, dmso-d₆, δ en ppm): 8.96 [(H-2), s, 3H], 8.96 [(H-4), s, 3H], 3.33 [(H-7), s, 5H], 1.21 [(H-4'), s, 3H], 7.66 [(H-9) d, J = 3.4 Hz, 1H], 7.83 [(H-11) dd, J = 7.4, 1.5 Hz, 1H], 7.73-7.75 [(H-12) m, 1H], 8.96 [(H-14), s, 3H], 3.33 [(H-16), s, 5H], 7.68 [(H-20) dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 1H], 7.42-7.43 [(H-21) m, 1H], 7.77 [(H-22) dd, J = 7.4, 1.5 Hz, 1H], 7.57 [(H-25) d, J = 5.5 Hz, 1H], 7.46 [(H-26) d, J = 5.2 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.57, RMN ¹³C (300 MHz TMS, dmso-d₆, δ en ppm): 188.65 (C-3), 168.44 (C-6, C-15), 158.79 (C-17), 158.29 (C-5), 152.64 (C-1), 155.45 (C-13), 148.62 (C-20), 139.18 (C-18), 131.83 (C-27),130.78 (C-22), 126.31 (C-11, C-25), 126.24(C-12) 74.81 (C-16), 122.17 (C-23), 121.36 (C-21), 113.76 (C-9),109.89 (C-26), 103.53 (C-8). 48.28 (C-4', C-7).</p> <p>Espectro 1.58, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 490.3600 (teórica: 490.1469 error: 0.0004)</p>

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC (Anexo II **Espectro 1.60 A**). En este espectro se observa la correlación de los protones aromáticos con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina, o en el núcleo de quinolina, en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores. Por otra parte, en el de HMBC se observaron señales presentes de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y el 5-nitroquinolin-8-ol, los cuales se denotaron enmarcándolos en círculos de distintas tonalidades. En la región alifática, los protones presentes en CH₃ del carbonilo de la amida, se denotaron con un círculo color cian (Anexo II **Espectro 1.60 B**).

VII.2.4.3 Síntesis del compuesto **FSHV3**

La reacción de una ciclocondensación a partir del **Int2-02**, con carbonato de guanidina la cual en presencia de una base ayuda a la liberar la guanidina para favorecer la reacción. La

reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina. En la placa se observaron dos manchas; una correspondía a la materia prima no ciclada y la otra al producto. Al término, se procedió a separar la mezcla a través de columna cromatográfica para obtener **FSHV3**.



Esquema 7.22. Obtención de **FSHV3**.

Tabla 7.6. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV3**

Compuestos	Método analítico y señales
<p style="text-align: center;">FSHV3</p>	<p>Espectro 1.61, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3477, 3377 (Ar-NH-C=OR), 3137, 3046 (C-H_{arom}), 1263, 1216 (R-O-R_{arom}), 1605, 1438 (C=C_{arom}).</p> <p>Espectro 1.62, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 7.96 [(H-2) s, 2H], 8.97 [(H-4) s, 2H], 7.62 [(H-6) d, J = 1.4 Hz, 1H], 7.95 [(H-7) dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 1H], 8.39 [(H-8) dd, J = 7.77, 1.7 Hz, 1H], 10.90 [(H-10) s, 1H], 4.99 [(H-12) s, 2H], 8.96 [(H-15) dd, J = 4.2, 1.7 Hz, 1H], 7.50-7.51 [(H-16) m, 1H], 7.97 [(H-17) ddd, J = 9.2, 4.8, 2.8 Hz, 1H], 7.63 [(H-19) dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H], 7.58-7.59 [(H-20) m, 1H], 7.33 [(H-21) dd, J = 8.33, 1.1 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.63, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 166.00 (C-3), 168.62 (C-11), 158.02 (C-1, C-13), 148.17 (C-15), 138.90 (C-14), 136.47 (C-17), 136.34 (C-8), 133.38 (C-22), 128.66 (C-18), 127.86 (C-20), 126.23 (C-7), 121.79 (C-16), 120.42 (C-19), 111.35 (C-6), 109.37 (C-21), 109.27 (C-5), 68.18 (C-12).</p> <p>Espectro 1.64, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 361.2459 (teórico 361.1407 error:0.0003)</p>

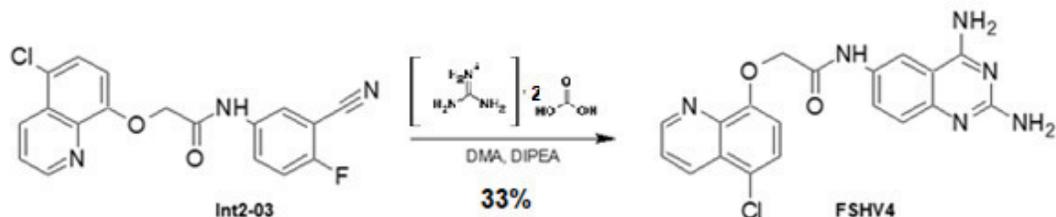
El espectro homonuclear COSY (**Espectro 1.65**) se observaron las señales de los hidrógenos vecinos {7.62, 7.95} y {8.39, 7.95} ppm, correspondiente al H4, H6 y el H7. La presencia de estas señales nos corrobora la asignación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina. Del mismo modo, las señales {8.96, 7.51}, {8.96, 7.95}, {7.95, 7.59} y {7.59, 7.33} corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H15, H16, H17, H19, H20 y H21 del sustituyente que, en caso particular, corresponde a un 8-hidroxiquinolina denotados en círculos de color rojo y verde.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia, el espectro de HSQC (Anexo **Espectro 1.66 A**), muestra la correlación de los H4, H6, H7 y H15 al H21 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o el núcleo de quinolina en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en este espectro. Por lo que

respecta a la parte alifática, se observó la interacción del H12 del metileno con su carbono. En total son 10 señales en las cuales se observó interacción. Por otra parte, en el de HMBC se observaron 13 señales (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y la 8-hidroxiquinolina en la parte aromática; en la región alifática del *conector*, se observó el metileno en H12 que correlacionaba con el carbono del carbonilo (Anexo **Espectro 66 B**).

VII.2.4.4 Síntesis del compuesto FSHV4

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.3), para así obtener el **FSHV4**.



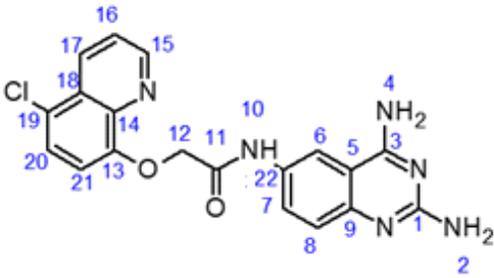
Esquema 7.23. Obtención de **FSHV4**.

En el espectro homonuclear COSY (**Espectro 1.71**) se pudieron observar las correlaciones {7.77, 7.47} y {7.81, 857} ppm, correspondientes al H4, H6 y el H7; la presencia de estas señales nos corrobora su asignación en el anillo bencénico de la quinazolina. De forma similar, las correlaciones {8.95, 7.76}, {8.96, 8.55}, {8.48, 7.65}, {87.60, 7.12}, y {7.55, 8.55} corresponden a los hidrógenos vecinos en H15, H16, H17, H19, H20 y H21 en el 5-cloroquinolin-8-ol y se indicaron en círculos de tonalidades amarillo, verde y morado.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia, el espectro de HSQC (Anexo **Espectro 1.72 A**), mostró la correlación de los H4, H6, H7 y H15 al H21 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina, o en el núcleo de 5-cloroquinolin-8-ol, mostrando las correlaciones {8.97, 149.00}, {8.51, 133.00}, {7.83, 128.67}, {7.09, 116.40}, {7.57, 109.46}, y {7.58, 117.31}. Por lo que respecta a la parte alifática, se observó la interacción del H12 del metileno con su carbono {3.36, 72.61}; en total son 10 señales en las cuales se preserva la interacción. Asimismo, en el HMBC (Anexo **Espectro 1.72 B**) se observaron 11 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 5-cloroquinolin-8-ol en la parte aromática; en la región alifática del *conector*, se observó el metileno en H12 que correlacionaba con el carbono del carbonilo {3.36, 177.99}.

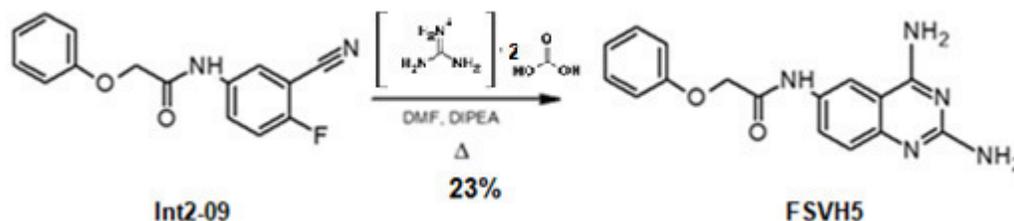
En el espectro de masas (**Espectro 1.70**) se presentó algo característico de este derivado donde se mostró la isotopía del cloro con una abundancia alta. La masa monoisotópica correspondió al pico base del espectro.

Tabla 7.7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de FSHV4

Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV4</p>	<p>Espectro 1.67, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3352 (Ar-NH-C=OR), 3067, 1673 (C-H_{arom}), 1227, 1038 (R-NH₂), 1605, 1457 (C=C_{arom}) 1259, 1227 (R-O-R_{arom}).</p> <p>Espectro 1.68, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 8.50 [(H-2) s, 2H], 8.97 [(H-4) s, 2H], 7.58 [(H-6) d, J = 4.8 Hz, 1H], 7.85 [(H-7) dd, J = 8.5, 2.8 Hz, 1H], 7.81 [(H-8) d, J = 8.4 Hz, 1H], 9.05 [(H-10) s, 1H], 3.33 [(H-12) s, 2H], 8.96 [(H-15) dd, J = 4.2, 1.6 Hz, 1H], 7.47 [(H-16) t, J = 9.1 Hz, 1H], 8.51 [(H-17) dd, J = 4.5, 1.6 Hz, 1H], 7.58 [(H-20) d, J = 7.8 Hz, 1H], 7.08 [(H-21) d, J = 8.3 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.69, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 177.86 (C-11), 160.80 (C-3), 159.09 (C-1), 158.97 (C-13), 148.62 (C-9), 140.42 (C-14), 148.83 (C-15), 132.60 (C-17), 132.55 (C-22). 129.15 (C-20), 126.35 (C-19), 126.00 (C-7), 125.062 (C-8), 124.18 (C-18), 123.31 (C-16), 111.19 (C-21), 109.17 (C-5), 111.57 (C-6), 79.67 (C-12).</p> <p>Espectro 1.70, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 395.1703 (teórico 395.1017 error: 0.0002)</p>

VII.2.4.5 Síntesis del compuesto FSHV5

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.3), para así obtener el **FSHV5**.

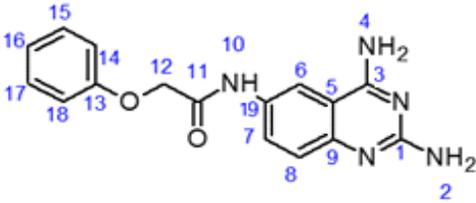


En el espectro homonuclear COSY (**Espectro 1.77**) se presentaron las correlaciones {8.16, 7.36}, {7.94, 7.31} y {7.32, 7.94} ppm correspondientes al H4, H6 y el H7 del anillo bencénico de la quinazolina. De igual forma, las correlaciones {7.33, 7.07} y {7.03, 6.93}, correspondieron a los hidrógenos vecinos de H15, H16, H17, H19, H20 y H21 del sustituyente. En este caso en particular también se logró observar la interacción del hidrógeno del amino con el protón del metileno asociados a la región del *conector*.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En el espectro de HSQC (Anexo **Espectro 1.78 A**) se indicó la correlación de los H4, H6, H7 y H15 al H21 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o en el fenol; las posiciones fueron connotadas con círculos de distintos colores en este espectro, por ejemplo: {8.17, 125.04}, {7.95, 127.71}, {7.29, 130.18}, {6.98, 115.10}, {6.97, 121.83} y {6.98, 115.10}. Por lo que

respecta a la parte alifática, se observó la interacción del H12 del metileno con su carbono {4.69, 67.37}.

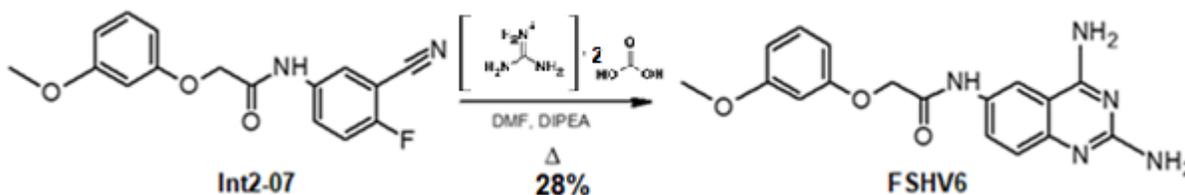
Tabla 7.8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV5**

Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV5</p>	<p>Espectro 1.73, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3121 (Ar-NH-C=OR), 3362 (Ar-NH₂), 3121. 3059 (C-H arom). 1265, 1219 (R-O-R arom), 1597, 1459 (C=C arom).</p> <p>Espectro 1.74, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms^o-d₆, δ en ppm): 8.17 [(H4) s, 2H], 7.98 [(H2) s, 2H], 7.32 [(H6) d, J = 1.4 Hz, 1H], 7.95[(H7) dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 8.16 [(H8) d, J = 7.7 Hz, 1H], 10.45 [(H10) s, 1H], 4.72 [(H12) s, 2H], 7.01 [(H14) d, J = 7.8 Hz, 1H], 7.33-7.34 [(H15) m, 1H], 7.00 [(H16) m, 1H], 7.36-7.37 [(H17) m, 1H], 7.03-7.05 [(H18) m, 1H].</p> <p>Espectro 1.75, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms^o-d₆, δ en ppm): 157.65 (C-1), 159.67 (C-3, C-13), 113.93 (C-5), 112.38 (C-6), 124.64 (C-7), 126.77 (C-8), 148.55 (C-9), 169.42 (C-11), 67.11 (C-12), 114.73 (C-14,C-18), 129.58 (C-15, C-17), 121.37 (C-16), 135.49 (C-19).</p> <p>Espectro 1.76, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 310.1202 (teórico 310.1298 error: 0.00003)</p>

En total fueron 7 señales en las cuales se preserva la interacción. Por su parte, el HMBC manifestó 14 señales (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y fenol en la parte aromática. En la región alifática del *conector*, se observó el metileno en H12 que correlacionaba con el carbono del carbonilo y con el C-19 (Anexo **Espectro 1.78 B**).

VII.2.4.6 Síntesis del compuesto **FSHV6**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.4), para así obtener el **FSHV6**.



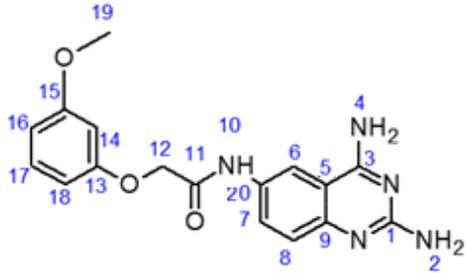
Esquema 7.25. Obtención de **FSHV6**.

En el espectro de masas se observó la masa monoisotópica [M+H]⁺ del **FSHV6**. Asimismo, se observó una pérdida -31 correspondiente al radical metoxilo (**Espectro 1.82**).

En el espectro homonuclear COSY (**Espectro 1.83**) se pueden observar las correlaciones {8.07, 7.58}, {7.63, 8.06} y {7.58, 7.47} ppm correspondientes al H4, H6 y el H7 del anillo bencénico de la quinazolina. De forma similar, las correlaciones {6.57, 7.18} y {6.56,

6.59}, corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H16, H17 y H18 del sustituyente y se enmarcan con círculos de distintos colores.

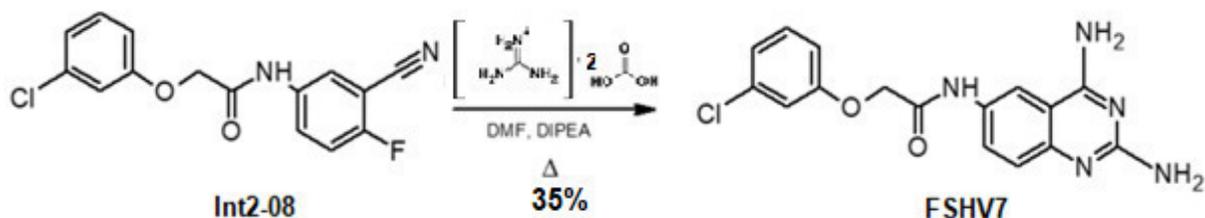
Tabla 7.9. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV6**

Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV6</p>	<p>Espectro 1.79, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3346 (Ar-NH₂), 3174 (Ar-NH-C=OR), 3174. 3101 (C-H arom), 1640, 1454 (C=C arom), 1287, 1196, 1086 (R-O-R arom).</p> <p>Espectro 1.80, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 8.09 [(H-4) s, 2H], 7.57 [(H-2) s, 2H], 8.08 [(H-6) d, J = 2.2 Hz, 1H], 7.58 [(H-7), dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H], 7.46 [(H-8), d, J = 8.7 Hz, 1H], 4.67 [(H-12) s, 2H], 9.97 [(H-10) s, 1H], 6.58-6.59 [(H-14) m, 1H], 6.56 [(H-16), dt, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 7.19 [(H-17), t, J = 7.5 Hz, 1H], 6.61 [(H-18), dt, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 3.74 [(H-19) s, 3H].</p> <p>Espectro 1.81, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 166.33 (C-11), 162.22 (C-15), 160.24 (C-3), 160.04 (C-13), 159.00 (C-1), 149.49 (C-9), 109.82 (C-5), 115.45 (C-6), 130.79 (C-20), 129.86 (C-17), 124.26 (C-7), 127.77 (C-8), 106.89 (C-16), 106.74 (C-18), 101.18 (C-14), 67.20 (C-12), 55.53 (C-19).</p> <p>Espectro 1.82, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 340.1274 (teórico 340.1404 error: 0.00004)</p>

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. El espectro de HSQC (Anexo **Espectro 1.84 A**), denotó la correlación de los H4, H6, H7 y H14 al H19 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3-metoxifenol. Las posiciones fueron connotadas con círculos de distintos colores: {6.60, 101.62}, {6.56, 106.11}, {7.20, 126.68} y {6.59, 101.60}. Con relación a la parte alifática se observó la interacción del H12 del metileno con su carbono {4.65, 67.50} y el H19 del metoxilo {3.72, 55.43}. En total fueron 9 señales en las cuales se preserva la interacción. El HMBC nos permitió detectar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 9 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3-metoxifenol en la parte aromática; en la región alifática del *conector*, se presentó el metileno en H12 que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11 y el sustituyente metoxilo, así como la correlación de H19 con el C-15 (Anexo **Espectro 1.84 B**).

VII.2.4.7 Síntesis del compuesto **FSHV7**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.5), para así obtener el **FSHV7**.



Esquema 7.26. Obtención de FSHV7.

En el espectro de masas algo característico de este derivado se observa la isotopía del cloro con una abundancia alta al igual que se observa la masa monoisotópica el cual corresponde en este caso al pico base del espectro (ver **Espectro 1.88**).

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ^1H , siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina y del 3-metoxifenol respectivamente. Esto se puede observar en el anexo **Espectro 1.89**. Las correlaciones {8.11, 7.59}, {7.58, 7.21} y {7.59, 8.11} ppm permitieron asignar al H4, H6 y el H7 del anillo bencénico de la quinazolina. De manera complementaria, las señales {7.35, 7.06} y {7.06, 7.03}, corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H16, H17 y H18 del sustituyente enmarcados en círculos de tonalidad amarilla y verde.

Tabla 7.9. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de FSHV7

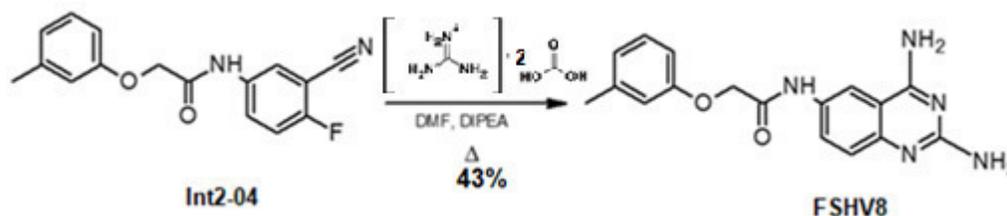
Compuestos	Método analítico y señales
<p style="text-align: center;">FSHV7</p>	<p>Espectro 1.85, IR FTIR por reflectancia ATR (cm^{-1}): 3386, 3359 (Ar-NH-C=OR), 3467 (Ar-NH₂), 3127 (C-H arom), 1597, 1474 (C=C arom), 1288, 1157 (R-O-R arom).</p> <p>Espectro 1.86, RMN ^1H (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 7.37 [(H-2) s, 2H], 8.11 [(H-4) s, 2H], 7.20 [(H-6) d, $J = 2.2$ Hz, 1H], 7.58 [(H-7) dd, $J = 8.9, 2.2$ Hz, 1H], 8.11 [(H-8) d, $J = 8.8$ Hz, 1H], 10.05 [(H-10) s, 1H], 4.75 [(H-12) s, 2H], 7.13 [(H-14) t, $J = 2.2$ Hz, 1H], 7.04-7.06 [(H-16) m, 1H], 7.35 [(H-17) t, $J = 8.2$ Hz, 1H], 7.02-7.03 [(H-18) m, 1H].</p> <p>Espectro 1.87, RMN ^{13}C (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 176.55 (C-11), 160.02 (C-3), 158.92 (C-1), 158.72 (C-13), 148.93 (C-9), 133.68 (C-15), 130.35 (C-19), 130.34 (C-18), 125.32 (C-8), 124.16 (C-17), 124.06 (C-7), 121.19 (C-16), 115.37 (C-14), 112.85 (C-6), 109.83 (C-5), 60.28 (C-12).</p> <p>Espectro 1.88, EM (APCI+, m/z): [M+H]⁺ 344.0791 (teórico 344.0908 error: 0.00003)</p>

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ^1H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite

la asignación de las señales en el espectro de ^{13}C (ver Anexo **Espectro 1.90 A**), en el cual se observa la correlación de los H4, H6, H7 y H14 al H18 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3-clorofenol en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en éste espectro como por ejemplo: {7.11, 115.45}, {6.56, 106.11}, {7.20, 126.68} y {6.59, 101.60} lo que respecta a la parte alifática se observa la interacción del H12 del metileno con su carbono {4.75, 67.51}, en total son 8 señales en las cuales se preserva la interacción. De forma complementaria el HMBC nos permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 11 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3-clorofenol en la parte aromática y en la región alifática del *conector* se observó el metileno en H12 que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11 y con C-13 (ver **Espectro 1.90 B**).

VII.2.4.8 Síntesis del compuesto **FSHV8**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.5), para así obtener el **FSHV8**.



Esquema 7.27. Obtención de **FSHV8**.

Tabla 7.10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV8**

Compuestos	Método analítico y señales
<p>FSHV8</p>	<p>Espectro 1.91, IR FTIR por reflectancia ATR (cm^{-1}): 3104 (Ar-NH-C=OR), 3345 (Ar-NH₂), 3064 (C-H arom), 3063 (CH₃).1594,1463 (C=C arom), 1293, 1216 (R-O-R arom),</p> <p>Espectro 1.92, RMN ^1H (400 MHz TMS, <i>dms</i><i>o</i>-<i>d</i>₆, δ en ppm): 7.17 [(H-2) s, 2H], 7.74 [(H-4) s, 2H], 7.50 [(H-6) d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H], 7.73 [(H-7) dd, <i>J</i> = 9.1, 2.6 Hz, 1H], 7.53 [(H-8) d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H], 10.44 [(H-10) s, 1H], 4.70 [(H-12) s, 2H], 6.70-6.73 [(H-14) m, 1H], 6.80-6.82 [(H-16) m, 1H], 7.19 [(H-17) t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H], 6.83-6.84 [(H-18) m, 1H], 2.28 [(H-19) s, 3H].</p> <p>Espectro 1.93, RMN ^{13}C (400 MHz TMS, <i>dms</i><i>o</i>-<i>d</i>₆, δ en ppm): 167.29 (C-11), 161.17 (C-2), 160.07 (C-13), 158.09 (C-1), 151.98 (C-9), 139.48 (C-15), 131.24 (C-20), 129.79 (C-17), 125.69 (C-8), 125.37 (C-7), 122.45 (C-16), 103.64 (C-5), 117.61 (C-14), 114.26 (C-18), 112.17 (C-6), 67.47 (C-12), 21.53 (C-19).</p> <p>Espectro 1.94, EM (APCI+, <i>m/z</i>): [M+H⁺] 324.1348 (teórico:324.1455 error: 0.00003)</p>

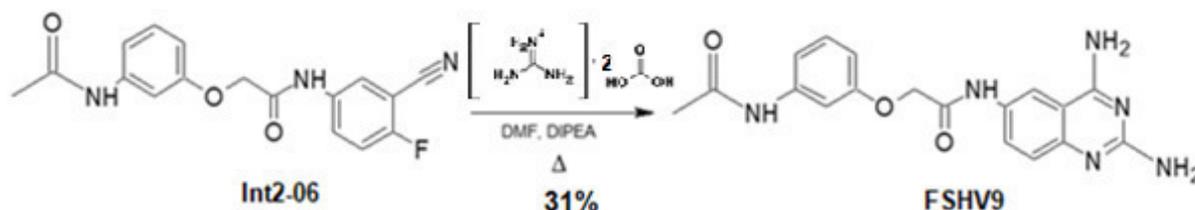
En el espectro de masas de **FSHV8** se observa la pérdida del radical metilo ($[M+H-CH_3]$: -15) presente como sustituyente en el anillo aromático, característico de este derivado. La masa monoisotópica corresponde a la masa teórica.

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de 1H , siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina y del 3-metoxifenol respectivamente. Esto se puede observar en el anexo **Espectro 1.95**. Las correlaciones {7.50, 7.71}, {7.53, 7.49}, {7.74, 7.53} y {7.74, 7.53} ppm corresponden a H6, H7 y el H8 la presencia de estas señales nos corrobora el anillo bencénico de la quinazolina. De manera complementaria las señales {7.19, 6.84}, {7.53, 7.49} y {6.79, 6.56} corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H16, H17 y H18 del sustituyente enmarcados en círculos de tonalidad verde y rojo.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de 1H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de ^{13}C (Anexo **Espectro 1.96 A**), en el cual se observa la correlación de los H6, H7, H8 y H14 al H18 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3-metoxifenol en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en éste espectro como por ejemplo: {7.74, 125.48}, {7.50, 114.09} y {7.56, 126.43} para la quinazolina, y para el 3-metoxifenol {6.83, 117.67}, {6.76, 113.70}, {7.18, 129.72} y {6.82, 122.45} lo que respecta a la parte alifática se observa la interacción del H12 del metileno con su carbono {4.71, 66.38}, en total son 8 señales en las cuales lo cual corresponde con la cantidad de carbonos químicamente diferentes presentes en la molécula. De forma complementaria el HMBC nos permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 16 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3-metoxifenol en la parte aromática y en la región alifática del *conector* se observó el metileno (H12) que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11 y C-13 (Anexo **Espectro 1.96 B**).

VII.2.4.9 Síntesis del compuesto **FSHV9**

De igual forma el mecanismo de reacción fue similar al planteado en subsecciones previas. Para el monitoreo de la reacción con CCF. para lo cual se observaron dos manchas donde una correspondía a la materia prima no ciclada y la otra correspondía al producto, por lo que se prosiguió a purificarlo por medio de placa preparativa para así la obtención de **FSHV-9**.



Esquema 7.28. Obtención de **FSHV9**.

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ^1H , siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina y del 3-acetamidofenol respectivamente. Esto se puede observar en el anexo **Espectro 1.101** {8.17, 7.60}, {8.16, 7.81}, {7.58, 7.76} y {7.58, 7.98} ppm correspondiente al H6, H7 y el H8 la presencia de estas señales nos corroboran que los protones en el anillo bencénico de la quinazolina. De manera complementaria las señales {7.42, 7.20}, {7.43, 7.20} y {7.51, 8.07} corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H16, H17 y H18 del sustituyente enmarcados en círculos de tonalidad morada y azul al igual que el protón H22 de la acetamida interactúa con H14 {10.05, 7.43} ppm.

Tabla 7.11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de FSHV9

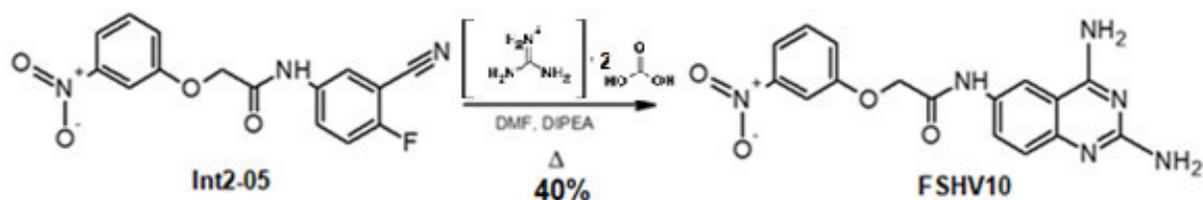
Compuestos	Método analítico y señales
<p style="text-align: center;">FSHV9</p>	<p>Espectro 1.97, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3310 (Ar-NH-C=OR), 3208 (Ar-NH₂), 2957 (C-H arom). 1612, 1453 (C=C arom), 1261, 1179 (R-O-R arom).</p> <p>Espectro 1.98, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 7.67 [(H-2) s, 2H], 8.19 [(H-4) s, 2H], 7.59 [(H-6) d, J = 1.4 Hz, 1H], 7.70 [(H-7) dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 8.18 [(H-8), d, J = 7.5 Hz, 1H], 4.67 [(H-12), s, 2H], 7.42 [(H-14), t, J = 3.9 Hz, 1H], 7.12 [(H-16) dt, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H], 7.19 [(H-17) t, J = 7.6 Hz, 1H], 7.14-7.16 [(H-18) m, 1H], 2.04 [(H-20) s, 3H].</p> <p>Espectro 1.99, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 168.46 (C-11), 167.02 (C-19), 158.16 (C-13), 154.76 (C-9), 158.82 (C-2), 158.00 (C-1), 140.46 (C-15), 131.28 (C-21). 129.45 (C-17), 128.16 (C-8), 122.63 (C-7), 112.06 (C-6), 112.04 (C-16), 109.69 (C-18), 108.88 (C-5), 108.84 (C-14), 67.06 (C-12), 24.036 (C-20).</p> <p>Espectro 1.100, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 367.1356 (teórico 367.1531 error:0.00005)</p>

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ^1H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de ^{13}C (Anexo **Espectro 1.102 A**), en el cual se observa la correlación de los H6, H7, H8 y H14 al H18 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3-acetamidofenol en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en éste espectro como por ejemplo: {7.58, 113.55}, {7.71, 122.31} y {8.16, 127.84} lo que respecta a la parte alifática se observa la interacción del H12 del metileno con su carbono {4.67, 67.28} ppm, en total son 8 señales la cual corresponde con los carbonos químicamente equivalentes presentes en la molécula. De forma complementaria el HMBC nos permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 11 señales presentes

(enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3-acetamidofenol en la parte aromática y en la región alifática del *conector* se observó el metileno y a la amina (H12 y H10) que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11, así como el metilo de la acetamida (sustituyente del fenol) presenta interacción con el C-20 del carbonilo (ver Anexo **Espectro 1.102 B**).

VII.2.4.10 Síntesis del compuesto **FSHV10**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.3), para así obtener el **FSHV10**, se purificó por placa preparativa para la obtención del producto puro.



Esquema 7.29. Obtención de **FSHV10**.

En el espectro de masa se observa m/z correspondiente a la masa monoisotópica del derivado, se observó la pérdida de NO o NO₂, generando así una especie más radical catiónica más estable.

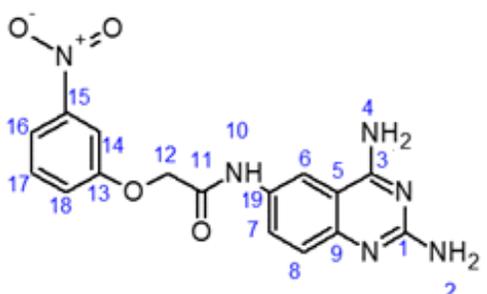
El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ¹H, siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina y del 3-nitrofenol respectivamente. Esto se puede observar en el anexo **Espectro 1.107**. Las correlaciones {7.76, 7.58}, {7.76, 8.06}, y {7.60, 7.53} ppm corresponden al H6, H7 y el H8 del anillo bencénico de la quinazolina. De manera complementaria las señales {7.77, 7.48}, {7.45, 7.48} y {7.64, 7.49} ppm corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H16, H17 y H18 del sustituyente enmarcados en círculos de tonalidad naranja y rojo.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ¹H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de ¹³C (Anexo **Espectro 1.108 A**), en el cual se observa la correlación de los H6, H7, H8 y H14 al H18 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3-nitrofenol en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en éste espectro algunos ejemplos son: {7.48, 113.02}, {7.58, 124.49} y {8.06, 124.22} ppm, lo que respecta a la parte alifática se observa {3.34, 73.84} del H12 del metileno con su carbono, en total son 8 señales la cual corresponde con los carbonos químicamente equivalentes presentes en la molécula.

De forma complementaria el HMBC nos permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 16 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas

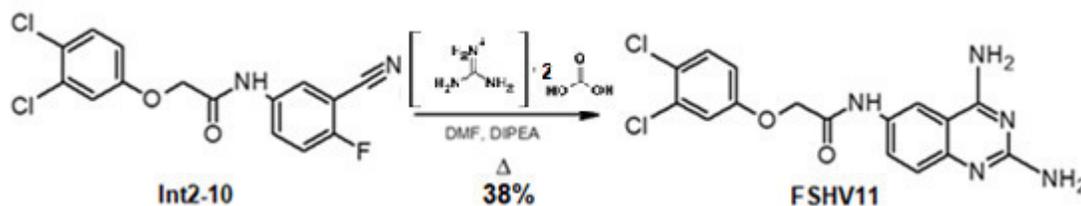
tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3-nitrofenol en la parte aromática. En la región alifática del *conector* se observó el metileno y a la amina (H12 y H10) que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11, de forma adicional H10 interactúa con el C-19 (Anexo **Espectro 1.108 B**).

Tabla 7.12. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV10**

Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV10</p>	<p>Espectro 1.103, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3205 (Ar-NH-C=OR), 3365 (Ar-NH₂), 3094 (C-H arom), 1617, 1447 (C=C arom), 1518, 1341 (arom R-N=O), 1258, 1225 (R-O-R arom).</p> <p>Espectro 1.104, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.66 [(H-2) s, 2H], 7.78 [(H-4) s, 2H], 7.49 [(H-6) d, J = 1.8 Hz, 1H], 7.59 [(H-7) dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 1H], 8.06 [(H-8) d, J = 7.5 Hz, 1H], 7.77 [(H-14) d, J = 4.1 Hz, 1H], 8.97 [(H-10) s, 1H], 3.34 [(H-12) s, 2H], 7.63-7.65 [(H-16) m, 1H], 7.49 [(H-17) t, J = 8.6 Hz, 1H], 7.45-7.46 [(H-18) m, 1H].</p> <p>Espectro 1.105, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 182.22 (C-11), 158.79 (C-1, C-13), 155.54 (C-9), 148.76 (C-15), 148.48 (C-3), 130.69 (C-17/125), 131.18 (C-19), 61 (C-7), 125.72 (C-8), 121.99 (C-18), 117.54 (C-16), 114.39 (C-14), 113.99 (C-6), 109.80 (C-5), 74.45 (C-12).</p> <p>Espectro 1.106, EM (APCI+, m/z): [M+H⁺] 355.2793 (teórico 355.1149 error: 0.0005)</p>

VII.2.4.11 Síntesis del compuesto **FSHV11**

La reacción tiene el mismo fundamento que las reacciones reportadas en subsecciones anteriores (subsección VII.2.4.3), se prosiguió a purificarlo a través de columna cromatográfica para así la obtención de **FSHV11**.



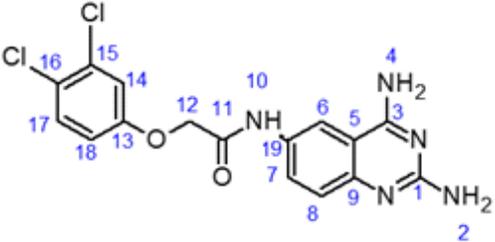
Esquema 7.30. Obtención de **FSHV11**.

En el espectro de masa se observa m/z correspondiente a la masa monoisotópica correspondiente a [M+H-Cl]⁺ se observó en abundancia baja al igual que el error obtenido en FSHV11 debido a la similitud entre el valor [M+H]⁺ teórico y el experimental.

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ¹H, siendo los hidrógenos del

anillo de benceno de la quinazolina y del 3-nitrofenol respectivamente. Esto se puede observar en el anexo **Espectro 1.113**. Las correlaciones {7.65, 7.21}, {7.88, 7.21}, y {7.88, 7.69} ppm permitió la asignación de H6, H7 y el H8 en el anillo bencénico de la quinazolina. De manera complementaria las señales {7.15, 6.99}, {7.15, 7.04}, {7.20, 6.98}, {7.19, 7.67} y {76.96, 7.14} ppm corresponden a los hidrógenos vecinos presentes en H14, H17 y H18 del 3,4-diclorofenol enmarcados en círculos de tonalidad amarilla, verde y naranja.

Tabla 7.13. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **FSHV11**

Compuestos	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">FSHV11</p>	<p>Espectro 1.109, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3173 (Ar-NH-C=OR), 3323 (Ar-NH₂), 1473 (C=C arom), 2955, 2917 (C-H arom), 1269, 1224 (R-O-R arom).</p> <p>Espectro 1.110, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 8.60 [(H-4) s, 2H], 8.26 [(H-2) s, 2H], 7.21 [(H-6) d, J = 2.7 Hz, 1H], 7.69 [(H-7) dd, J = 9.8, 2.7 Hz, 1H], 7.87 [(H-8) d, J = 9.8 Hz, 1H], 8.80 [(H-10) s, 1H], 3.35 [(H-12) s, 2H], 7.05 [(H-14) d, J = 2.7 Hz, 1H], 7.14 [(H-17) d, J = 8.8 Hz, 1H], 6.98 [(H-18) dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.111, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 170.07 (C-11), 158.12 (C-13), 158.44 (C-3), 148.56 (C-9), 138.44 (C-1), 132.90 (C-19), 131.72 (C-15), 130.95 (C-17), 128.64 (C-8), 125.29 (C-16), 125.45 (C-7), 119.69 (C-14), 112.56 (C-6), 110.08 (C-5), 114.27 (C-18), 67.42 (C-12).</p> <p>Espectro 1.112, EM (APCI+, m/z): (teórico: 378.0519 error:) 378.0523 (teórico: 378.0519 error: 0.000001)</p>

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros heteronucleares se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ¹H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de ¹³C (Anexo **Espectro 1.114 A**), en el cual se observa la correlación de los H6, H7, H8 y H14 al H18 con sus carbonos respectivos en el núcleo de quinazolina o de 3,4-diclorofenol en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores en éste espectro algunos ejemplos son: {7.69, 127.15}, {7.87, 127.56}, {7.05, 119.68}, {6.93, 117.15} y {7.13, 131.67} ppm, lo que respecta a la parte alifática se observa {1.55, 67.43} del H12 del metileno con su carbono, en total son señales la cual corresponde con los carbonos químicamente equivalentes presentes en la molécula. De forma complementaria el HMBC nos permite observar las correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se cuentan a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia, para ello en el espectro se observaron 12 señales presentes (enmarcadas con círculos de distintas tonalidades) de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina y 3,4-diclorofenol en la parte aromática. En la región alifática del *conector* se observó el metileno y a la amina (H12) que correlacionaba con el carbono del carbonilo C-11 (Anexo **Espectro 1.114 B**)

VIII. Ensayos biológicos

En este capítulo se presenta la metodología correspondiente a la evaluación biológica de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina. De manera inicial, se muestra el procedimiento para determinar la actividad citotóxica de los derivados sintetizados frente a cinco líneas tumorales, una primaria de mono (no cancerosa) y en células mononucleares obtenidas de sangre periférica de humano (PBMCs), en estas pruebas se utilizó al **gefitinib**, **NZ**, **COL** y **cis-platino** como controles positivos. Posteriormente, se describe lo concerniente a la obtención de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en dos líneas celulares cancerosas, utilizando al **NZ** como referencia. Con la intención de explorar el posible mecanismo de acción, se realizaron dos ensayos para saber si estos compuestos actúan como inhibidores de la polimerización de tubulina; un ensayo cualitativo (inmunofluorescencia indirecta) y uno cuantitativo (*Western blot*), utilizando como controles positivos al **NZ** y **COL** así como control negativo al **TX**. En este apartado se muestran los métodos experimentales de manera resumida; más detalles sobre éstos se describen en el Anexo III.

VIII.1. Actividad biológica *in vitro*

VIII.1.1. Evaluación de actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los compuestos **FSHV1-FSHV11** y **gefitinib**, como control positivo, se determinó con un screening primario usando las líneas celulares de adenocarcinoma de próstata (PC-3), colorrectal (HCT-15), de mama triple positivo (MCF-7), de mama triple negativo (MDA-MB231) y pulmón (SK-LU-1). Adicionalmente, se determinó el mismo comportamiento en células no cancerosas utilizando una línea de riñón de mono (COS 7) y células mononucleares de sangre periférica sana (PBMCs) de humano. La viabilidad de todas las líneas celulares adherentes, anteriormente mencionadas, se determinó mediante el método colorimétrico de sulforrodamina B (SRB); y para las PMBCs, que no son adherentes, por medio del colorante XTT. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Instituto de Química UNAM, bajo la supervisión de la M. en C. Teresa Ramírez Apan, y otra parte de ellos, en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química, UNAM, con el apoyo de la c. Dra. Erica Burgueño Bucio, y el Ing. Bioq. Luis, bajo la supervisión de la Dra. Ana Rosa Muñoz Duarte.

Para este ensayo se usaron placas de 96 pozos en donde, en cada uno de ellos, se cultivaron 20,000 células de cada una de las líneas celulares tumorales. Para favorecer la adherencia celular las placas se colocaron en 24 h y a 37°C bajo atmósfera de CO₂ al 5%. Los compuestos se solubilizaron en DMSO para tener una concentración de 20 mM; de esta solución, se toman las alícuotas correspondientes para diluirlas con medio de cultivo hasta las concentraciones a evaluar. En un primer ensayo las células se incubaron con los compuestos a 25 µM por 48h a 37°C bajo atmósfera de CO₂ al 5%. Al concluir el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ* con 50 µL de una solución acuosa fría de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, dejándose en contacto por 1h. El sobrenadante se desechó y se realizaron 5 lavados con agua destilada. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente (rt ~ 23°C). Las de células fijadas se tiñeron con 100 µL de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) por 0.5 h a 23°C. El exceso de SRB se retiró con lavados de una solución acuosa de ácido acético

al 1%, dejándose secar las placas a rt. Para la lectura de las placas, a éstas se les adicionaron 100 μ L de amortiguador Tris pH:10.5, dejándose agitar por 10 min para favorecer la disolución del complejo colorido; realizándose la lectura en un lector de microplacas DAIGGER (BioTek®) a 515 nm. Con los datos obtenidos se calculó la viabilidad comparada con el control sin tratamiento, determinándose así el porcentaje de antiproliferación. El análisis de datos se realizó con el programa Gen 5 Reader Control.

Para la evaluación del efecto de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina sobre las PBMCs se usó el método colorimétrico de XTT. En la determinación de la viabilidad de las PBMCs, se utilizaron cuatro concentraciones diferentes para cada compuesto así como de los controles positivos como la **COL** y **cis-platino** (i.e. 0, 0.01, 0.1, 1 y 10 μ g/ μ L). De forma particular para el caso del control positivo como lo es el **NZ**, las concentraciones evaluadas fueron: 0, 0.004, 0.04, 0.4, 4 y 40 μ g/ μ L. Para ello se sembraron en una placa de 96 pozos 100,000 células por pozo en medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Una vez en el pozo se adicionaron 10 μ L de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina más activos resultantes del primer ensayo (**FSHV4**, **FSHV7**, **FSHV8**) y se incubaron por 48 h a 37°C con 5% de CO₂. Terminado este periodo, se adicionaron 50 μ L de la solución de XTT/PMS a 0.3 mg/mL incubándose por un periodo de 24 h. Concluido el periodo, se cuantificó por densitometría óptica en un lector de microplacas modelo DAIGGER marca BioTek® a 490 nm.

Con los datos obtenidos se calculó la concentración de viabilidad 50 (CV₅₀), las evaluaciones se realizaron por triplicado de manera independiente y el análisis de los datos con el programa Gen 5 Reader Control.

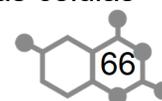
VIII.1.2. Cálculo de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

La CI₅₀ de los compuestos **FSVH-4**, **FSHV-7** y **FSHV-8** se obtuvo en dos líneas celulares tumorales: adenocarcinoma de mama triple negativo (MDA-MB231) y pulmonar (SK-LU-1).

Para este ensayo se sembraron, por triplicado en placas de 96 pozos, ~29,000 células con 100 μ L de medio DMEM/ F12K. Para favorecer la adherencia celular se dejaron por periodos de 24 h en incubación a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Para definir el rango de concentraciones a evaluar, se tomaron los resultados obtenidos en el *screening* primario. Posteriormente, se expusieron las líneas celulares a los compuestos correspondientes por un lapso de 72 h, utilizando el mismo método colorimétrico de SRB descrito en subsecciones anteriores (véase subsección **VIII.1.1**). Para el cálculo de la CI₅₀ de los derivados de quinazolina se determinó partiendo de las concentraciones menores a 25 μ M con variaciones aritméticas para la determinación de la concentración inhibitoria media de cada uno de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina.

VIII.1.3. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Para este ensayo se sembraron 400,000 células SK-LU-1 sobre cubreobjetos de vidrio colocados en una caja de Petri de 3 cm durante 24 h. Una vez que las células se encuentran adheridas y con una confluencia cercana al 100%, se expusieron a los tratamientos con concentraciones superiores a su CI₅₀ de los compuestos **FSHV4** (5 μ M), **FSHV4** (2.5 μ M), **FSHV7** (12.5 μ M), **FSHV8** (25 μ M), **NZ** (0.16 μ M) **COL** (0.30 μ M), y **TX** (0.08 μ M). Las células



se procesaron de acuerdo a lo previamente descrito.⁸⁹ Así transcurrido el periodo de exposición las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por al menos 1 h a 4°C. Al finalizar este periodo, se retiró el PFA y se realizaron tres lavados con 2 mL de PBS 1X. Se prosiguió a permeabilizar a las células adicionándose 1.5 mL 0.5% SDS-tritón, durante 10 min. Posterior a esto, se realizaron tres lavados con PBS 1X. El bloqueo de las células se realizó con una disolución de albumina sérica bovina (BSA) al 3% por 1h a 37°C.

Posteriormente las células se incubaron con los anticuerpos; el anticuerpo primario anti β -tubulina T0198 (Aldrich ®) (1:1000) y posteriormente el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (1:500) (Millipore ®) en conjunto con DAPI (1:1000) (Aldrich ®) para teñir el material genético. Los anticuerpos se incubaron por 1 h a 37°C, realizándose cuatro lavados con 2 mL de PBS 1X entre cada incubación.

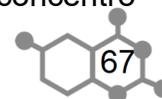
Los portaobjetos se cubrieron con 10 μ L de una solución de gelvatol. Para la visualización y captura de las imágenes a 20x y a 60x se empleó un microscopio confocal invertido (Nikon Ti Eclipse ®). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa NIS Elements v.5.0 ® con el apoyo del Dr. Vadim Pérez Koldenkova, en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada.

VIII.1.4. Análisis del efecto de los derivados de quinazolina sobre la tubulina soluble y polimerizada de células SK-LU-1 mediante Western blot.

La finalidad de este ensayo consistió en ver el efecto de los compuestos **FSHV4** (5 μ M), **FSHV7** (12.5 μ M), **FSHV8** (25 μ M), **NZ** (0.16 μ M) y **TX** (0.08 μ M) sobre la polimerización de β -tubulina. Para esto se determinó la tubulina soluble y polimerizada presentes en los extractos totales de las células SK-LU-1 tratadas, siguiendo la metodología descrita anteriormente.⁹⁰ Es importante mencionar que el **NZ** funge como control positivo y el **TX** como control negativo. Para mayores detalles ver *Anexo III*.

En primera instancia se sembraron ~1,650,000 células por cada caja de Petri de 6 cm en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB. Transcurrido el tiempo necesario para que llegaran a la confluencia cercana al 100%, se procedieron a administrar los compuestos a una concentración superior a su CI_{50} en el caso de **FSHV7**, **FSHV8**, **NZ**, **COL** y en el caso del **TX** y **FSHV4** se administraron concentraciones cercanas a su CI_{50} . Los compuestos se colocaron en incubación a 37°C con un 5% de CO_2 y bajo atmósfera humidificada por 24h.⁹¹ Posteriormente, se realizó el despegado de células con PBS-EDTA y se procedió a la extracción de ambas fracciones.

Para obtener las fracciones de proteína soluble, las células fueron permeabilizadas con 1000 μ L de amortiguador de lisis (sus componentes fueron descritos en el *Anexo III*) éstos se incubaron durante 3 min a 30°C. Al finalizar el periodo de incubación, se centrifugó a 800 rpm por 5 min y el sobrenadante fue removido de forma suave de acuerdo a cada tratamiento. Al botón celular remanente se le adicionó 1000 μ L de amortiguador Laemmli el cual se colocó en incubación por 3 min a 95°C inmediatamente después se centrifugó a 1200 rpm por 5 min recuperándose la fracción insoluble la cual corresponde a la fracción de tubulina polimerizada. El volumen recuperado se vertió en bolsas de diálisis con poro de exclusión de 10kDa para posteriormente dializarlas por 12 h y el extracto de tubulina polimerizada se concentró



cubriendo la bola de diálisis con sacarosa. De ahí ambas fracciones se cuantificaron con el kit de cuantificación de proteínas 2D Quant (GE Healthcare ®).⁹⁰

Se realizó la preparación de los geles SDS-PAGE al 12% para separar a las proteínas (30 µg de proteínas de cada fracción/pozo) y transferirlas a una membrana de celulosa (véase *Anexo III*). A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de albúmina al 3% durante aproximadamente 12 h a 4°C con agitación constante. Finalizando esto se realizó la detección de β-tubulina en las fracciones soluble y polimerizada empleando una dilución 1:500 del Ac monoclonal primario anti β-tubulina T0198 (Aldrich ®) durante 1h a 37°C. Realizando 3 lavados con PBS por 5 min cada uno. Posteriormente, la membrana, se incubó el Ac. secundario anti-ratón acoplado a HRP (Millipore ®) a una dilución 1:1000 durante 1.5 h a 37°C y se realizaron tres lavados de la misma forma. Posteriormente, se sumergió en la solución de revelado de la membrana se sumergieron en 6 mL de medio la membrana se incubó con solución cromogénica (véase *Anexo III* para ver la preparación de esta solución) hasta que se revelaran las bandas correspondientes. La reacción se paró con agua destilada y las membranas se colocaron a secar a 23°C. La cuantificación de la intensidad de las bandas presentes por densitometría en pixeles se llevó a cabo con el programa QuantityOne V.4.6 (Bio-Rad ®). Los resultados se expresaron de acuerdo a la intensidad presente en cada banda así como en porcentaje tomando 100% a la banda correspondiente al control sin tratamiento.

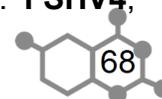
VIII.2. Resultados y discusión

VIII.2.1 Determinación de la actividad antiproliferativa

Para la evaluación del porcentaje antiproliferativo del set de compuestos se utilizaron distintas líneas tumorales como por ejemplo: de adenocarcinoma de colón, prostático, pulmonar, mama debido a la sobreexpresión de isoformas βI y βIII de β tubulina identificadas principalmente en estirpes tumorales y por tanto de interés farmacológico. El primer *screening* de todos los derivados se realizó a una sola concentración de 25 µM por el método de SRB (ver **Tabla 8.1**). Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje antiproliferativo fue alto los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina, de igual forma esto se observa en la línea de riñón de mono (COS-7). Como compuesto de referencia se utilizó al **gefitinib**, a pesar de que no preservan el mismo mecanismo de acción, son similares en términos estructurales, teniendo el núcleo de la quinazolina presente en todos los compuestos.

La diferencia en actividad entre líneas tumorales podría deberse principalmente a la diferencia en sobreexpresión de las distintas isoformas en células tumorales, estos estudios se han realizado de forma particular en ambas líneas de adenocarcinoma de mama⁹² y de pulmón⁹³ siendo las isoformas βI y βIII las que con mayor frecuencia se encuentran sobre expresadas. Aunque es preciso en mencionar que en humanos la secuencia se preserva de los distintos sitios presente en el ambos monómeros α/β de las distintas isoformas, a excepción en el sitio del NZ de las isoformas βI, βVI y βIII, en términos generales en donde mayor variación se ha identificado es en la región del carboxilo terminal.⁹⁴

De igual forma los resultados obtenidos en el primer *screening* se presentan en forma de *heat map* (**Figura 8.1**) en el cual se observa que entre más oscura sea la tonalidad, implica que éste es más activo y viceversa. Los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina: **FSHV4**,



FSHV6, FSHV7, FSHV8, FSHV10 y FSHV11 son más activos en las líneas tumorales de PC-3, MDA-MB-231, SK-LU-1 con respecto al **gefitinib**, por lo que éstos resultan ser compuestos interesantes para continuar su evaluación en estudios posteriores.

Tabla 8.1 Porcentaje antiproliferativo de los derivados de quinazolina evaluados a 25 μM .

Compuestos	Concentración (μM)	% Antiproliferativo					
		PC-3	HCT-15	MCF-7	MDA-MB231	SK-LU-1	COS-7
FSHV1	25	53.5 \pm 1.6	22.9 \pm 2.0	ND	49.2 \pm 3.0	26.5 \pm 1.4	18.8 \pm 2.4
FSHV2	25	100	40.1 \pm 4.9	100	89.1 \pm 5.1	100	100
FSHV3	25	12.6 \pm 1.5	30.2 \pm 3.5	31.5 \pm 4.9	27.4 \pm 2.7	14.6 \pm 1.4	ND
FSHV4	25	100	100	100	100	100	100
FSHV5	25	38.9 \pm 2.7	25.8 \pm 4.2	16.1 \pm 2.0	10.3 \pm 1.8	ND	15.7 \pm 1.8
FSHV6	25	72.1 \pm 1.9	70.5 \pm 3.5	80.9 \pm 3.0	80.7 \pm 1.9	76.5 \pm 2.1	43.5 \pm 3.9
FSHV7	25	100	100	100	100	100	100
FSHV8	25	70.6 \pm 1.6	85.0 \pm 2.6	81.9 \pm 2.4	91.4 \pm 2.3	81.2 \pm 2.7	75.4 \pm 1.7
FSHV9	25	25.9 \pm 3.2	23.8 \pm 2.5	10.4 \pm 2.3	7.3 \pm 0.8	ND	13.2 \pm 0.9
FSHV10	25	72.4 \pm 1.9	78.9 \pm 2.2	26.5 \pm 3.0	65.3 \pm 2.2	60.6 \pm 1.6	45.6 \pm 2.4
FSHV11	25	65.4 \pm 3.5	82.9 \pm 2.7	81.7 \pm 3.0	40.4 \pm 4.5	65.9 \pm 3.0	67.3 \pm 2.3
Gefitinib	25	56.9 \pm 1.5	68.5 \pm 6.8	48.6 \pm 1.8	48.0 \pm 2.0	ND	64.3 \pm 3.2

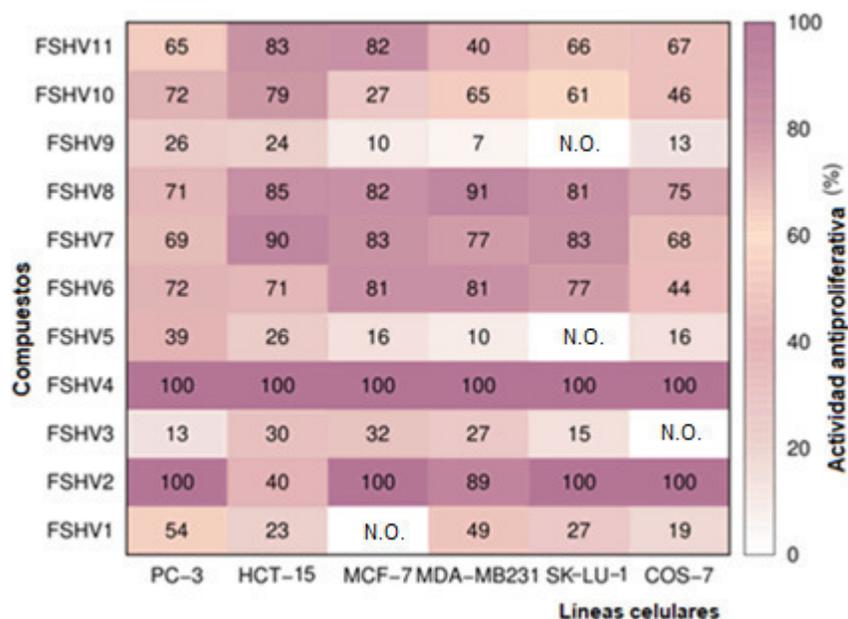


Figura 8.1. Heat map del porcentaje de actividad antiproliferativa de los compuestos **FSHV1-11** *ND: no determinado.

Los resultados de evaluación en la línea de riñón de mono (COS-7) fueron desfavorables para la mayor parte de los derivados de quinazolin-2,4,6-tiamina dado que afectaron a esta línea, sin embargo al no ser una línea de humano, era necesario realizar esta prueba sobre una línea celular de humano. De los compuestos más activos el derivado que tuvo menor actividad contra COS-7 fue **FSHV10**, comparado incluso con el **gefitinib**.

Posteriormente, se procedió a realizar un segundo ensayo disminuyendo la concentración de los compuestos más activos a 25 μM ; estas concentraciones se bajaron de

forma distinta dependiendo del porcentaje obtenido en el primer *screening* algunas de estas variaciones en términos de concentraciones fueron en escala logarítmica o aritmética reportando la última concentración a la que se evaluaron los derivados de quinazolina. En esta segunda evaluación se observa una relación dependiente en la actividad antiproliferativa y la concentración evaluada en el caso de **FSHV2** y **FSHV7**, tanto líneas celulares tumorales como benignas. De manera particular, el compuesto **FSHV4** se caracterizó por una actividad en estirpes tumorales y benignas, algo interesante fue que a una concentración de 0.5 μM no presentó actividad en la línea no tumoral, COS-7.

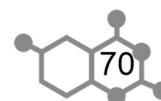
Los compuestos menos potentes (**Figura 8.1.**) de la serie fueron: **FSHV1**, **FSHV3**, **FSHV5** y **FSHV9**, los cuales se caracterizaban por presentar un patrón de sustitución en C-6 quinazolina como: quinolina, naftilo, fenilo y 3-acetamidofenilo, respectivamente. Resulta interesante mencionar, que tres de los cuatro derivados no presentan ningún sustituyente de tipo electroatrayente o electrodonador presente en el biciclo o en el anillo, que pudiera estar relacionado con el efecto de la actividad evaluada.

Tabla 8.2 Porcentaje antiproliferativo evaluado a una concentración menor de los derivados a las 48 h.

Compuestos	Concentración (μM)	% Antiproliferativo					
		PC-3	HCT-15	MCF-7	MDA-MB231	SK-LU-1	COS-7
FSHV-2	25	100	40.1 \pm 4.9	100	89.1 \pm 5.1	100	100
	0.5	11.9 \pm 2.0	4.74 \pm 1.3	13.2 \pm 1.2	37.1 \pm 3.4	45.12 \pm 6.3	15.4 \pm 6.7
FSHV-4	25	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100	100
	0.5	ND	3.1 \pm 0.6	24.3 \pm 5.0	23.6 \pm 3.9	39.8 \pm 2.5	ND
FSHV-7	25	100	100	100	100	100	100
	12.5	68.5 \pm 1.0	89.7 \pm 1.5	82.9 \pm 2.2	77.0 \pm 1.5	82.8 \pm 1.0	67.7 \pm 1.4

La determinación del porcentaje de viabilidad 50 (%CV₅₀) en PBMCs de humano (Tabla 8.3) nos indica que a mayor valor numérico de este parámetro hay una menor susceptibilidad de las células a afectarse. El método colorimétrico de XTT determina la capacidad metabólica que hay en la mitocondria de las células. Es importante recordar que esta evaluación se realizó con la finalidad de que los compuestos diseñados no inhibieran a la isoforma βVI , la cual se expresa en PMBCs, **NZ**, **COL**, **Cis-platino** y a **FSHV10** fueron los que menor daño causaron a nivel del metabolismo en la mitocondria de PBMCs. En contraste, los resultados obtenidos con los compuestos **FSHV4** **FSHV7** y **FSHV8** se presentó un mayor daño a nivel mitocondrial a una menor concentración. Es importante considerar el peso molecular de todos estos derivados incluyendo los controles oscilan en un rango de 300-400 g/mol, por lo tanto se puede decir que esta propiedad no influye de manera significativa en los resultados obtenidos. Cabe mencionar que no fue posible realizar estudios posteriores de **FSHV2** porque no se contaba con la cantidad suficiente para sus evaluaciones.

Tabla 8.3 Porcentaje de viabilidad celular en leucocitos.



Tratamiento	% CV _{S50} PMBCs (μM)
FSHV4	227.06
FSHV7	200.10
FSHV8	254.95
FSHV10	447.06
COL	567.98
NZ	405.13
Cis-platino	327.58

A pesar de que los derivados que mayor daño causaron en PMBCs tuvieron mayor actividad sobre células tumorales, ninguno de ellos manifestó afectar a las PMBC a las concentraciones en que afectaron a las líneas tumorales. Por lo que podemos decir que los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina no inhiben de manera significativa a la isoforma βVI de β-tubulina en los rangos de concentración de 0.1 a 10 μg/μL (Anexo III **Tabla AIII.1**).

VIII.2.2 Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀)

La determinación de la concentración de **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8** se asocia a la potencia resultante de la actividad antiproliferativa en líneas tumorales, este se realizó con el método de SRB a 48 h (**Tabla 8.4**).

Tabla 8.4 Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los compuestos más activos y del **NZ**.

Compuestos	MDA-MB-231 (μM)	SK-LU-1 (μM)
FSHV4*	4.77±0.220	4.99±0.150
FSHV7*	10.75±1.400	8.22±0.100
FSHV8*	10.70±1.400	8.60±0.700
NZ*	0.20±0.400	<0.1

* Todos los compuestos se disolvieron con 0.01% de DMSO

Los resultados observados en el presente estudio permitieron definir que, en ambas líneas celulares, **FSHV4** resultó ser aproximadamente dos veces más potente en comparación con **FSHV7** y **FSHV8**. Sin embargo, ninguno de los compuestos anteriores se equipará en términos de potencia con respecto al compuesto de referencia, **NZ**. Es importante mencionar que el **NZ** es una molécula insoluble en agua, aún en condiciones de co-solvenencia con DMSO no se logra solubilizar por completo, por lo que se le atribuye un coeficiente de variación alto para la determinación de su CI₅₀.

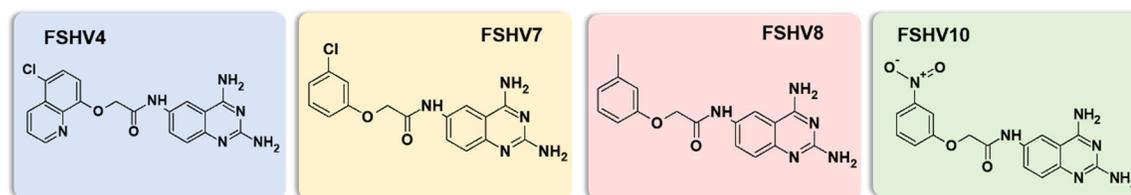


Figura 8.2. Estructura de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina más activos.

VIII.2.3 Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Los ensayos que se reportan en estas dos últimas subsecciones VII.2.3 y VIII.2.4, se realizaron en el Hospital de Pediatría CM Siglo XXI bajo la asesoría de la Dra. Lilián Yépez Mulia y el Dr. Félix Matadamas Martínez.

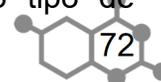
La evaluación del efecto de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en la alteración de la dinámica de los microtúbulos se realizó con los ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando la línea SK-LU-1. Para esto, se marcó a β -tubulina para estudiar los cambios en su distribución en células SK-LU-1 inducidos por los compuestos **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8** durante 24 h.

Para el estudio, los controles positivos utilizados fueron el **NZ** y la **COL**. El primero se utilizó a una concentración de 0.16 μ M y el segundo a 0.30 μ M; estas concentraciones se eligieron con base a distintos estudios realizados previamente por distintos grupos de investigación.⁹¹ De forma contraria se utilizó como control negativo al **TX** como un TSAs conocido, a una concentración de 0.08 μ M. En la **Figura 8.2** se presentan los resultados obtenidos con los tres compuestos evaluados, donde se observa en cada caso el reconocimiento de β -tubulina por el anticuerpo específico anti- β -tubulina-FITC (verde), la tinción del ADN nuclear con DAPI (azul) y la colocación de ambas marcas (merge). Y finalmente se presentan las observaciones en campo claro.

En la **Figura 8.2** se observa que los derivados evaluados así como el **NZ** y **COL** interfieren en la distribución de β -tubulina. En las células tratadas con **NZ** es evidente una alteración en el ensamblaje de los microtúbulos además de la pérdida de la morfología característica de las células control, observándose redondeamiento de las células así como disminución del citosol. En células control se observan células en interfase con una red densa de microtúbulos, así como el huso mitótico en células en división.

En las células tratadas con **COL** (**Figura 8.2**), son evidentes cambios de la morfología de la célula así como la presencia de meganúcleos y condensación de la cromatina. En campo claro se observó el redondeo de estas células una vez expuestas. Las características observadas en las células tratadas concuerda con lo reportado anteriormente por el grupo de investigación de Wang y las características de la catástrofe mitótica inducida por TDAs.⁹⁵ En contraste, en las células expuestas a un agente estabilizador de microtúbulos como lo es el **TX**, se observa un incremento en el tamaño de núcleo así como asteres asimétricos los cuales se describen como regiones en las que se encuentran condensados los microtúbulos y los cromosomas. Previos estudios sugieren que la **COL** y **TX** generan en el momento en que se inhibe la formación adecuada del huso mitótico arrojando al ciclo celular en G2/M o durante la mitosis.⁹⁶

Los compuestos **FSHV4** y **FSHV7** inducen cambios en la morfología de las células observándose células multinucleadas, así como meganúcleos o disminución del tamaño del citosol nos sugieren que el posible mecanismo de acción se deba a que éstos interfieren en la dinámica de los microtúbulos. Dichos cambios nos indican un comportamiento de agentes que se asocian al igual que los TDAs al proceso de catástrofe mitótica que conlleva a estas características anteriormente mencionadas (**Figura 8.3**). Algo característico observado en la concentración más alta evaluada de **FSHV4** (5 μ M) es la presencia de cierto tipo de



acumulaciones de β -tubulina en las extremidades la célula y otras muy cercanas al núcleo (Anexo III **Figura AIII.8**). Los cambios inducidos por los compuestos **FSHV4** y **FSHV7** indican catástrofe mitótica característica de agentes TDAs. En otros estudios realizados con otros tipos de compuestos en una línea de adenocarcinoma de pulmón (A549) se han descrito ases de microtúbulos densos.⁹⁷ Otras características importantes a considerar en este proceso de catástrofe mitótica son la condensación prematura de cromosomas, síntesis incompleta de DNA, arresto celular desencadenando así como la apoptosis celular.²¹

A diferencia de los dos compuestos anteriores, **FSHV8** sólo indujo alargamiento de la célula. En algunos campos se observaron células redondeadas y una reducción en el tamaño del citosol (estas imágenes no se muestran en el presente trabajo), por lo que el mecanismo de acción este compuesto pudiese ser diferente al de los otros dos. La administración de **FSHV8** también provocó alargamiento en la morfología celular así como una tensión sobre los microtúbulos, este fenómeno fue anteriormente descrito para agentes que estabilizan la polimerización de tubulina, en una línea de adenocarcinoma hepático HEPG2.⁹⁸ Por lo anterior, se requiere demostrar, con experimentos adicionales, si **FSHV8** actúa como potencial agente TDAs o TSA.

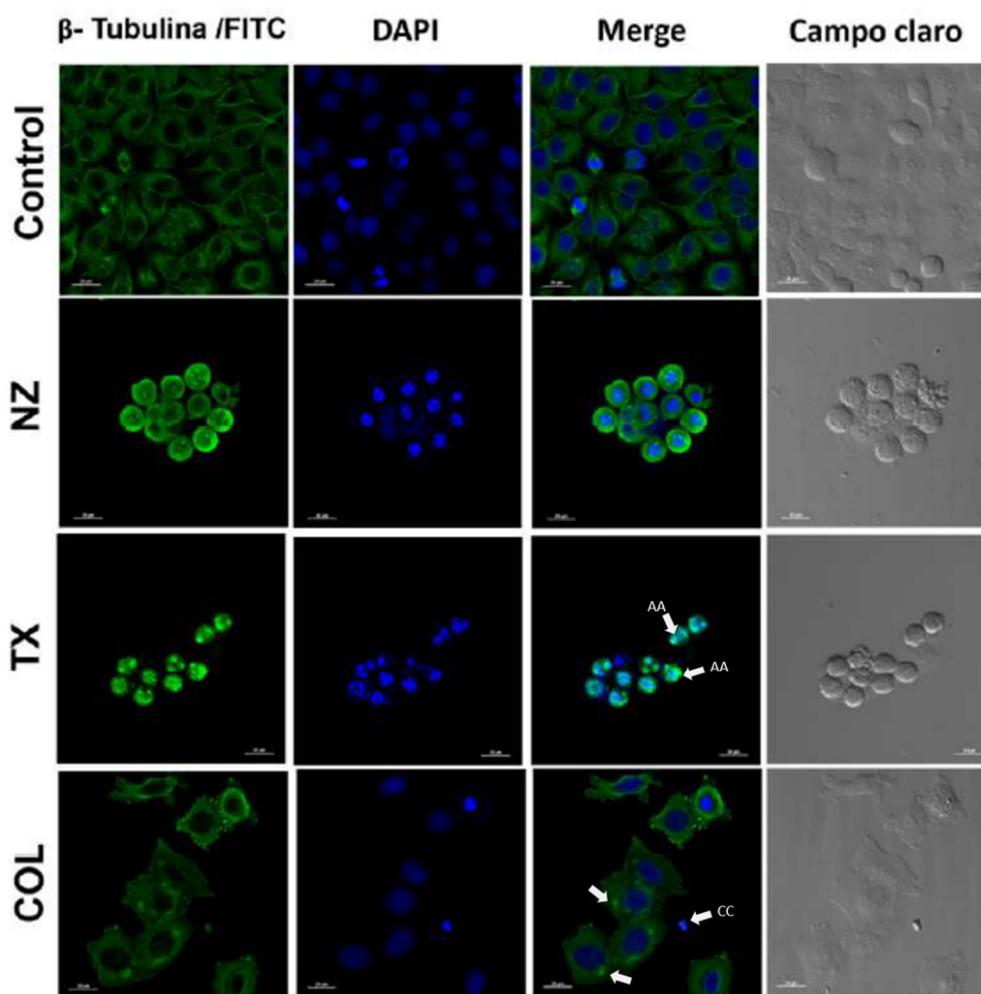


Figura 8.3. Efecto de los TDAs y TSAs en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 a 20 μ m AA: ásteres asimétricos CC: condensación de cromosomas.

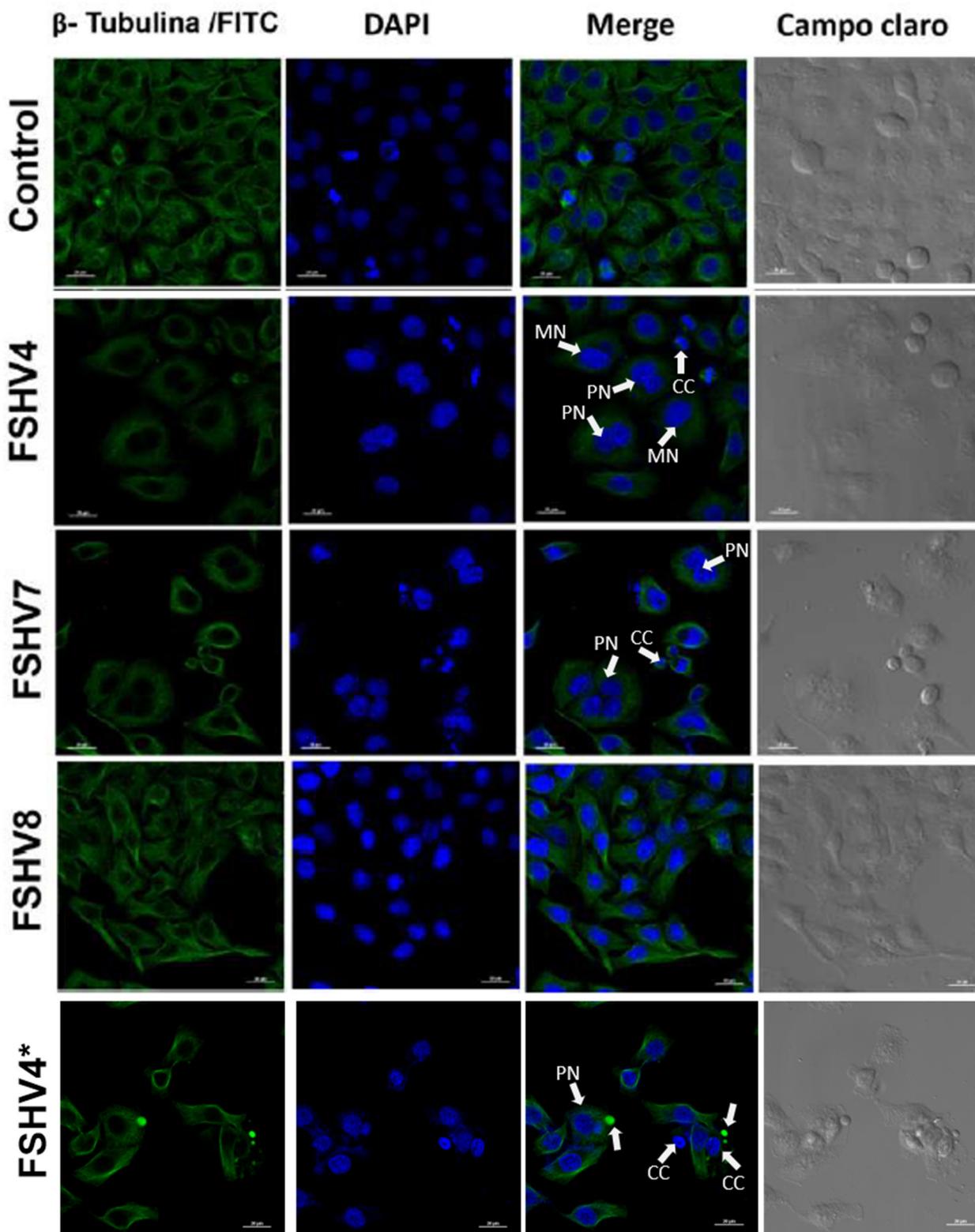


Figura 8.4. Efecto de los derivados **FSHVs** en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 a 20 μ m FSHV4* refiere a la concentración más alta evaluada (5 μ M) CC: condensación de cromosomas, PN: polinucleadas, MN: mega núcleos .

Tabla 8.5 Observaciones y condiciones empleadas en el análisis de distribución de β -tubulina.

Tratamiento	Ctrl (DMSO)	Taxol (TX)	Nocodazol (NZ)	Colchicina (COL)	FSHV4	FSHV7	FSHV8
Concentración	0.01%	0.08 μM^*	0.16 μM^*	0.30 μM	5 μM /2.5 μM^*	12.5 μM^*	25 μM^*
Tiempo de exposición	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
Observaciones campo claro	Monocapa de células adherentes, todas se observaron y con una morfología poligonal que caracterizan a esta línea celular.	Células redondeadas refringentes en todos los campos observados, perdiendo en si la morfología característica.	Células redondas y algunas otras retuvieron la morfología poligonal.	Se observó un cambio de la morfología típica de esta línea celular, así como cuerpos circulares.	Se observó un cambio de la morfología típica de esta línea celular, así como cuerpos circulares.	La mayoría de las células observadas en todos los campos hubo cambio en la morfología del citoplasma.	La mayoría de las células alargadas, en otros campos se observaron células redondeadas.
Observaciones IFI	Algunas células se encontraban en división (i.e. metafase), algunas otras se observaban en interfase con una red densa y normal de microtúbulos	Redondeo todas las células las cuales presentaban reducción del tamaño del citoplasma, se observan los microtúbulos distorsionados, y asteres ^{5,6,9} asimétricos.	Redondeo de células las cuales reducen en el tamaño del citoplasma perdida en la estructura de los microtúbulos en algunas se llega a observar acumulación de β -tubulina en algunas regiones. ²	Se observan cambios en la estructura de microtúbulos y la morfología celular y tamaño del citoplasma, se observa condensación de cromatina en algunas células.	A una concentración de 5 μM se observaron células redondeadas, disminución del tamaño del citoplasma, "haces de microtúbulos" de β -tubulina rodeando al núcleo y algunas otras en se observa en las extremidades del mismo ⁶ , así a 2.5 μM el núcleo ocupa mayor tamaño y polinúcleos.	Se observaron algunas células redondas, algunas otras se observaron multinucleadas. En algunos otros campos se observó la reducción del citoplasma. Y en otros campos se observan un alargamiento del citoplasma.	En la mayoría de las células se observan cambios en la morfología en otras se observa la reducción del tamaño del citoplasma. Y en otros campos se observan las células redondeadas.

*Todas las muestras fueron solubilizadas el mismo porcentaje de DMSO

VIII.2.4 Análisis cuantitativo por Western blot de la tubulina soluble y polimerizada.

Con la finalidad de analizar el efecto de **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8** en la polimerización de la tubulina en la línea celular tumoral SK-LU-1, se procedió a la obtención de la fracción soluble y polimerizada de tubulina en células tratadas. El desplazamiento de este equilibrio hacia una de estas dos formas se favorece por el tipo de TBAs por ejemplo, el **TX**, al ser un TSAs incrementa la cantidad de tubulina polimerizada, por el contrario el **NZ**, al ser un TDAs aumenta la cantidad de tubulina presente en su forma soluble.

Las células se trataron con los compuestos **FSHV4**, **FSHV7**, **FSHV8**, **NZ** y **TX** durante 24 h a distintas concentraciones. La fracción de tubulina de tubulina polimerizada y soluble de las células tratadas se purificó de acuerdo con lo mencionado en la subsección VIII.1.4. Las fracciones obtenidas se separaron en un gel de acrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana de celulosa. La membrana se incubó con el anticuerpo anti- β -tubulina. En la Figura **8.3A** se observan diferentes intensidades en la banda de tubulina soluble obtenida de los diferentes tratamientos, siendo la banda menos intensa la del compuesto **FSHV8**. Con respecto a la tubulina polimerizada (Figura **8.3B**), es evidente la presencia de bandas con mayor intensidad para TX y el compuesto **FSHV8**.

Para cuantificar la tubulina soluble y la polimerizada en las fracciones obtenidas con los diferentes compuestos se realizó un análisis densitométrico, obteniéndose la intensidad de las bandas en pixeles (Figura **8.3C**).

En la Figura **8.3D** y **8.3E** se presenta el porcentaje de tubulina soluble y polimerizada, respectivamente para cada uno de los compuestos. El análisis densitométrico demostró que en la tubulina soluble obtenida de células tratadas con **NZ** hubo un incremento del 2.95% en la tubulina soluble, con respecto al control. Este resultado está de acuerdo con lo esperado, considerando que el **NZ** es un agente TDA. En cuanto al efecto de **FSHV4** y **FSHV7** se observó al igual que con el **NZ** un incremento en la tubulina soluble del 18.51% y 3.31% respectivamente, con respecto al control. Con respecto al **TX** la tubulina soluble, disminuyó 13.5%, con respecto al control, lo que está de acuerdo por ser un TSA. Con el compuesto **FSHV8** se observó una disminución en la del 22.57% de tubulina soluble, siendo todavía más grande la disminución a la observada con **TX**.

Con respecto a la tubulina polimerizada, con el **TX** se observó un incremento en la intensidad (24.91%) de la banda correspondiente, con respecto al control, de acuerdo a lo esperado ya que el TX es un agente estabilizador de la polimerización. Este mismo efecto se observó en **FSHV8** siendo el aumento de 8% en la tubulina polimerizada, con respecto al control. Sin embargo, con **NZ** se observa un decremento del 3.2% en la tubulina polimerizada, con respecto al control. Lo cual es de esperarse ya que al ser éste un TDA incrementa la cantidad de tubulina soluble y disminuye la tubulina polimerizada. De forma similar, con los derivados **FSHV4** y **FSHV7** se obtuvo una reducción del 6 y 4%, respectivamente, en la tubulina polimerizada.

Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8** interfieren con la dinámica de los microtúbulos. **FSHV4** y **FSHV7** podrían tener efecto de inhibidores de la polimerización, sin embargo **FSHV8** pareciera tener un efecto estabilizador

de la polimerización. Para confirmar el efecto de los compuestos es preciso llevar a cabo otros experimentos, como por ejemplo, determinar mediante el uso de un kit la polimerización o despolimerización de los microtúbulos por los tres compuestos.

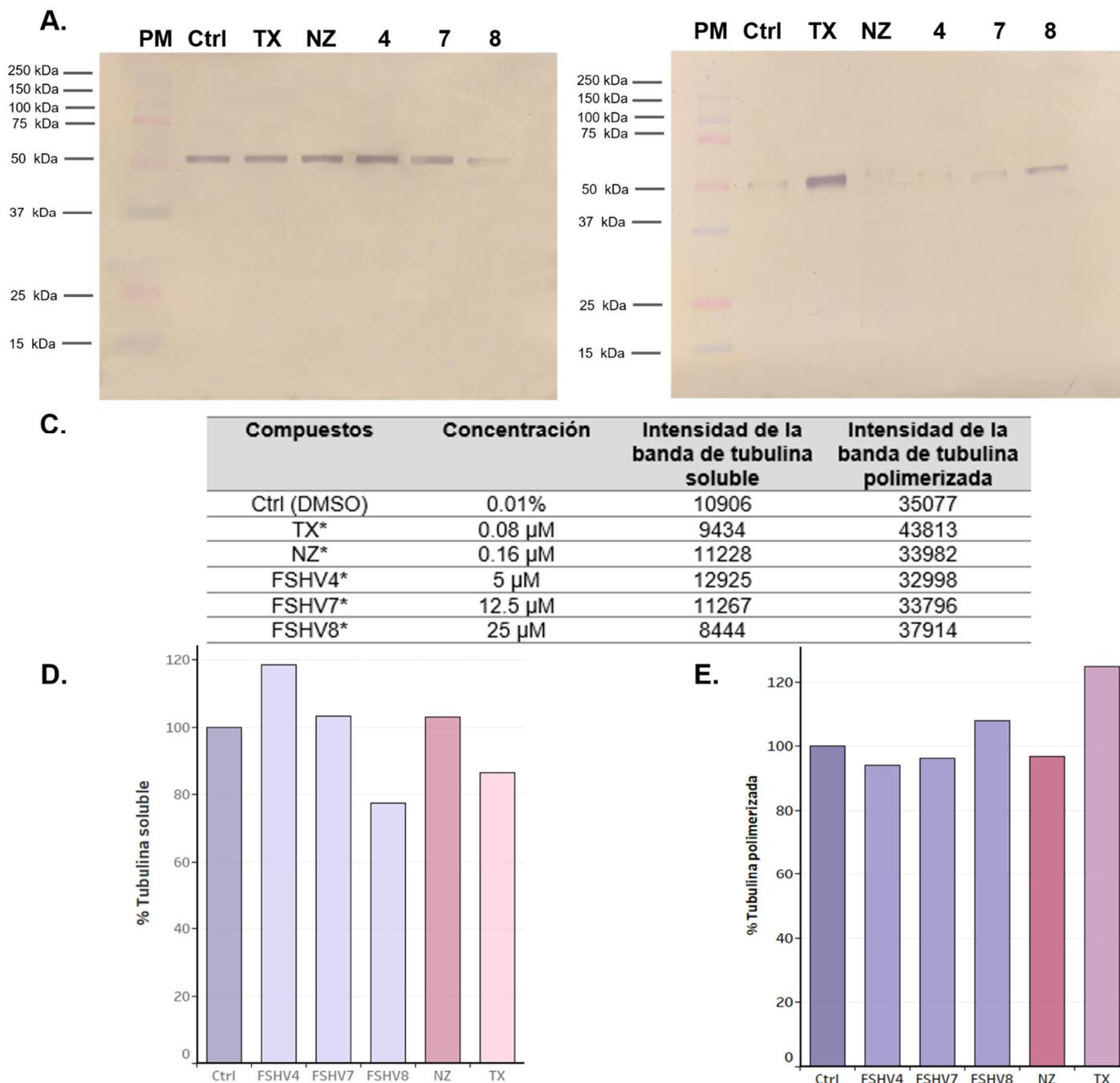
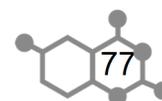
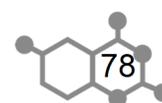


Figura 8.5. Efecto de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en la e tubulina soluble y polimerizada en la línea celular SKLU-1 **A.** Reconocimiento de tubulina en la fracción soluble de las células tratadas con los diferentes compuestos. **B.** Reconocimiento de tubulina (polimerizada) en la fracción insoluble de las células tratadas con los diferentes compuestos. **C.** Concentraciones utilizadas para **TX**, **NZ**, **FSHV4**, **FSHV7**, y **FSHV8**. . Análisis densitométrico de la intensidad de las bandas (píxeles) de tubulina soluble y polimerizada obtenidas de las células SK-LU1, tratadas con los diferentes compuestos. Mediante el programa Quantity One ®. Porcentaje de tubulina soluble (D) y polimerizada (E) obtenido con los diferentes compuestos.



IX. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se sintetizaron once derivados de quinazolin-2,4,6-triamina con rendimientos moderados, en donde la reacción limitante, para la mayoría de los compuestos, fue la ciclación para obtener el núcleo heterocíclico mencionado. Es necesario continuar con el estudio para la búsqueda de condiciones óptimas para aumentar el rendimiento de los procedimientos.
- De todos los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina (**FSHV1-FSHV11**) que se sintetizaron y evaluaron frente a cinco líneas celulares tumorales, el compuesto **FSHV4** fue el más activo de la serie, con valores de CI_{50} entre 4.77 y 4.99 μM , en las líneas MDA-MB-231 y SK-LU-1, respectivamente. Asimismo, este compuesto no presentó actividad citotóxica en células sanguíneas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humana, a una concentración menor a 25 μM .
- Los derivados **FSHV4** y **FSHV7** indujeron el fenómeno de catástrofe mitótica, caracterizada por condensación de la cromatina, células multinucleadas y meganúcleos. Sin embargo, el derivado **FSHV8** ocasionó un alargamiento celular con disminución en el tamaño del citosol.
- Los compuestos **FSHV4** y **FSHV7** tuvieron un efecto similar al **NZ**, actuando como inhibidores potenciales de la polimerización de tubulina, aumentando la tubulina soluble y disminuyendo la tubulina polimerizada en células SKLU-1., con lo que pueden ser considerados .
- El compuesto **FSHV8** tuvo un efecto similar al **TX**, induciendo un incremento en la e tubulina polimerizada y una disminución de tubulina soluble, por lo que su actividad es de un estabilizador de la polimerización de tubulina.



X. PERSPECTIVAS

- Evaluar los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina más activos con el kit de Cytoskeleton® (Cat #BK004P), lo cual podría sugerir si el mecanismo de acción de éstos pudiera ser como inhibidores de la polimerización de tubulina.
- Realizar estudios de isoelectroenfoque para determinar la selectividad de éstos nuevos derivados hacia las distintas isoformas presentes en la línea de adenocarcinoma de pulmón y de mama.
- Alteración en las principales modificaciones postraduccionales en ambos monómeros de tubulina, por medio de *immunoblot* debido al efecto de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina en las principales modificaciones postraduccionales en tubulina.
- Determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células tumorales tratadas con los compuestos **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8**, por medio de citometría de flujo, determinar es que fase del ciclo celular actúan los compuestos.
- Analizar si los compuestos **FSHV4**, **FSHV7** y **FRSHV8** inducen la apoptosis de las células tratadas.
- Obtener el complejo co-cristalizado de heterodímero α/β :FSHV del compuesto más activo resultante de las evaluaciones anteriormente descritas.

XI. REFERENCIAS

- (1) WHO. Mexico: WHO statistical profile.
- (2) Hernandez Luis, F.; Bravo Gomez, M. E.; Castañeda López, P. *Carcinogénesis Química*; 2014.
- (3) Hanahan Douglas; Robert, W. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 58–70.
- (4) INEGI. Estadística en México “Incidencia del cáncer.”
- (5) Día mundial del cáncer
http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_NaI.pdf/.
- (6) International Agency for the Research of Cancer https://www.iarc.fr/cards_page/world-cancer-report/.
- (7) IARC. World Cancer Report 2014 IARC.
- (8) GBD Compare <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/?fbclid=IwAR39tQscWkL1u2jPOLBIDf5DzuqPS95SUbPtYwL3wuW4HRywyqTpJoktaTI>.
- (9) OMS. World Health Organization - Cancer Country Profiles, 2014.
- (10) Esteller, M. Cancer Epigenomics: DNA Methylomes and Histone-Modification Maps. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8* (4), 286–298.
- (11) Massagué, J. Review TGF β in Cancer. *Cell* **2008**, No. 134, 215–230.
- (12) Mantovani, A. Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer. *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10*, 369–373.
- (13) Yi, S.; Lin, S.; Li, Y.; Zhao, W.; Mills, G. B.; Sahni, N. Functional Variomics and Network Perturbation: Connecting Genotype to Phenotype in Cancer. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *10* (4), 1–15.
- (14) Arrowsmith, C. H.; Bountra, C.; Fish, P. V.; Lee, K.; Schapira, M. Epigenetic Protein Families: A New Frontier for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (5), 384–400.
- (15) Vander, M. G. Understanding the Warburg Effect : The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80-.). **2009**, *324* (1029), 1029–1033.
- (16) Wong, R. S. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30* (1), 87.
- (17) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265.
- (18) Montero-Conde, C.; Leandro-García Luis J; Leskela, S.; Casco, A.; Robledo, M.; Rodri, C. Tumoral and Tissue-Specific Expression of the Major Human β Tubulin Isoforms. *Cytoskeleton* **2010**, *67*, 214–223.
- (19) Downing, K. H. Structural Basis for the Interaction of Tubulin with Proteins and Drugs That Affect Microtubule Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 89–111.
- (20) Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Romo-Mancillas, A.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A. Molecular Basis for Benzimidazole Resistance from a Novel β -Tubulin Binding Site Model. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *45*, 26–37.
- (21) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Brancale, A.; Ricci, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Convergent Synthesis and Biological Evaluation of as Microtubule Targeting Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, 5144–5153.
- (22) Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R.; Kroemer, G. Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition. *Oncogene* **2004**, *23* (16 REV. ISS. 2), 2825–2837.

- (23) Vitale, I.; Galluzzi, L.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitotic Catastrophe: A Mechanism for Avoiding Genomic Instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (6), 385–392.
- (24) Gascoigne, K. E.; Taylor, S. S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation Following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **2008**, *14* (2), 111–122.
- (25) Aguayo-Ortiz, R.; Cano-González, L.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Dominguez, L. Structure-Based Approaches for the Design of Benzimidazole-2-Carbamate Derivatives as Tubulin Polymerization Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, No. October 2016, 1–12.
- (26) Banno, S.; Fukumori, F.; Ichiishi, A.; Okada, K.; Uekusa, H.; Kimura, M.; Fujimura, M. Genotyping of Benzimidazole-Resistant and Dicarboximide-Resistant Mutations in Botrytis Cinerea Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays. *Phytopathology* **2008**, *98* (4), 397–404.
- (27) Shaguffa; Ahmad, I. An Insight into the Therapeutic Potential of Quinazoline Derivatives as Anticancer Agents. *Medchemcomm* **2017**, *8* (5), 871–885.
- (28) Avendaño, L. C. *Introducción a La Química Farmacéutica*; 2004.
- (29) Kuyper, L. F.; Baccanari, D. P.; Jones, M. L.; Hunter, R. N.; Tansik, R. L.; Joyner, S. S.; Boytos, C. M.; Rudolph, S. K.; Knick, V.; Wilson, H. R.; Caddell, J. M.; Friedman, H. S.; Comley, J. C. W.; Stables, J. N. High-Affinity Inhibitors of Dihydrofolate Reductase: Antimicrobial and Anticancer Activities of 7,8-Dialkyl-1,3-Diaminopyrrolo[3,2-f]Quinazolines with Small Molecular Size. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (4), 892–903.
- (30) Smits, R. A.; Adami, M.; Istyastono, E. P.; Zuiderveld, O. P.; Van Dam, C. M. E.; De Kanter, F. J. J.; Jongejan, A.; Coruzzi, G.; Leurs, R.; De Esch, I. J. P. Synthesis and QSAR of Quinazoline Sulfonamides As Highly Potent Human Histamine H4 Receptor Inverse Agonists. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (6), 2390–2400.
- (31) Alagarsamy, V.; Raja Solomon, V.; Sheorey, R. V.; Jayakumar, R. 3-(3-Ethylphenyl)-2-Substituted Hydrazino-3H-Quinazolin-4-One Derivatives: New Class of Analgesic and Anti-Inflammatory Agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73* (4), 471–479.
- (32) Georgey, H.; Abdel-Gawad, N.; Abbas, S. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some Quinazolin-4-(3H)-One Derivatives. *Molecules* **2008**, *13* (10), 2557–2569.
- (33) Zaranappa; Vagdevi, H. M.; Lokesh, M. R.; Gowdarshivannanavar, B. C. Synthesis and Antioxidant Activity of 3-Substituted Schiff Bases of Quinazoline-2,4-Diones. *Int. J. ChemTech Res.* **2012**, *4* (4), 1527–1533.
- (34) Fennell, B. J.; Naughton, J. A.; Barlow, J.; Brennan, G.; Fairweather, I.; Hoey, E.; McFerran, N.; Trudgett, A.; Bell, A. Microtubules as Antiparasitic Drug Targets. Pdf. **2008**, 501–518.
- (35) Verhaeghe, P.; Azas, N.; Gasquet, M.; Hutter, S.; Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P. Synthesis and Antiplasmodial Activity of New 4-Aryl-2-Trichloromethylquinazolines. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 396–401.
- (36) Krishnan, S. K.; Ganguly, S.; Veerasamy, R.; Jan, B. Synthesis, Antiviral and Cytotoxic Investigation of 2-Phenyl-3-Substituted Quinazolin-4(3H)-Ones. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2011**, *15* (6), 673–681.
- (37) Ahmed, M. F.; Youns, M. Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of 6,8-Dibromo-4(3H)Quinazolinone Derivatives as Anticancer Agents. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2013**, *346* (8), 610–617.
- (38) Pati, B.; Banerjee, S. Quinazolines: An Illustrated Review. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* **2013**, *3* (3), 136–151.
- (39) Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2010**, *141* (7), 1117–1134.

- (40) Gotink, K. J.; Verheul, H. M. W. Anti-Angiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors: What Is Their Mechanism of Action? *Angiogenesis* **2010**, *13* (1), 1–14.
- (41) Lee, J. C.; Adams, J. L. Inhibitors of Serine / Threonine Kinases. *Curr. Biol.* **1995**, *6*, 657–661.
- (42) Herrera-Vázquez, F. S.; Hernández-Luis, F.; Medina Franco, J. L. Quinazolines as Inhibitors of Chromatin-Associated Proteins in Histones. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28* (4), 395–416.
- (43) Hervouet, E.; Cartron, P.; Jouvenot, M.; Delage-, R.; Hervouet, E.; Cartron, P.; Jouvenot, M.; Delage-mourroux, R. Epigenetic Regulation of Estrogen Signaling in Breast Cancer Epigenetic Regulation of Estrogen Signaling in Breast Cancer. **2016**, 2294 (October).
- (44) Lai, C. J.; Bao, R.; Tao, X.; Wang, J.; Atoyan, R.; Qu, H.; Wang, D. G.; Yin, L.; Samson, M.; Forrester, J.; Zifcak, B.; Xu, G. X.; DellaRocca, S.; Zhai, H. X.; Cai, X.; Munger, W. E.; Keegan, M.; Pepicelli, C. V.; Qian, C. CUDC-101, a Multitargeted Inhibitor of Histone Deacetylase, Epidermal Growth Factor Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Exerts Potent Anticancer Activity. *Cancer Res* **2010**, *70* (9), 3647–3656.
- (45) Wang, J.; Pursell, N. W.; Samson, M. E. S.; Atoyan, R.; Ma, A. W.; Selmi, A.; Xu, W.; Cai, X.; Voi, M.; Savagner, P.; Lai, C.-J. Potential Advantages of CUDC-101, a Multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 Inhibitor, in Treating Drug Resistance and Preventing Cancer Cell Migration and Invasion. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12* (6), 925–936.
- (46) Huang, Y.; Jiang, X.; Yu, M.; Huang, R.; Yao, J.; Li, M.; Zheng, F.; Yang, X. Beneficial Effects of Diazepin-Quinazolin-Amine Derivative (BIX-01294) on Preimplantation Development and Molecular Characteristics of Cloned Mouse Embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29* (6), 1260–1269.
- (47) Liu, F.; Barsyte-Lovejoy, D.; Li, F.; Xiong, Y.; Korboukh, V.; Huang, X. P.; Allali-Hassani, A.; Janzen, W. P.; Roth, B. L.; Frye, S. V.; Arrowsmith, C. H.; Brown, P. J.; Vedadi, M.; Jin, J. Discovery of an in Vivo Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases G9a and GLP. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8931–8942.
- (48) Gosh, G.; Bhadra, R.; Raktim, G.; Banerjee, K.; Gupta, A. RVX 208: A Novel BET Protein Inhibitor, Role as an Inducer of Apo A-I/HDL and Beyond. *Cardiovasc. Ther.* **2017**, *35* (4), 340–418.
- (49) Hansen, H. RVX-297 Synthesis. U.S. patent 8,053,440 B2, 2011.
- (50) Fish, P. V.; Filippakopoulos, P.; Bish, G.; Brennan, P. E.; Bunnage, M. E.; Cook, A. S.; Federov, O.; Gerstenberger, B. S.; Jones, H.; Knapp, S.; Marsden, B.; Nocka, K.; Owen, D. R.; Philpott, M.; Picaud, S.; Primiano, M. J.; Ralph, M. J.; Sciammetta, N.; Trzuppek, J. D. Identification of a Chemical Probe for Bromo and Extra C-Terminal Bromodomain Inhibition through Optimization of a Fragment-Derived Hit. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9831–9837.
- (51) Dekker, F. J.; Van Den Bosch, T.; Martin, N. I. Small Molecule Inhibitors of Histone Acetyltransferases and Deacetylases Are Potential Drugs for Inflammatory Diseases. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (5), 654–660.
- (52) Peng, F. W.; Xuan, J.; Wu, T. T.; Xue, J. Y.; Ren, Z. W.; Liu, D. K.; Wang, X. Q.; Chen, X. H.; Zhang, J. W.; Xu, Y. G.; Shi, L. Design, Synthesis and Biological Evaluation of N-Phenylquinazolin-4-Amine Hybrids as Dual Inhibitors of VEGFR-2 and HDAC. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *109*, 1–12.
- (53) Speranzini, V.; Rotili, D.; Ciossani, G.; Pilotto, S.; Marrocco, B.; Forgione, M.; Lucidi, A.; Forneris, F.; Mehdipour, P.; Velankar, S.; Mai, A.; Mattevi, A. Polymyxins and Quinazolines Are LSD1/KDM1A Inhibitors with Unusual Structural Features. *Sci. Adv.*

- 2016**, 2 (9), e1601017.
- (54) Wang, J. C. Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3 (6), 430–440.
- (55) Taliani, S.; Pugliesi, I.; Barresi, E.; Salerno, S.; Marchand, C.; Agama, K.; Simorini, F.; La Motta, C.; Marini, A. M.; Di Leva, F. S.; Marinelli, L.; Cosconati, S.; Novellino, E.; Pommier, Y.; Di Santo, R.; Da Settimo, F. Phenylpyrazolo[1,5-a]Quinazolin-5(4 H)-One: A Suitable Scaffold for the Development of Noncamptothecin Topoisomerase i (Top1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (18), 7458–7462.
- (56) Marzaro, G.; Coluccia, A.; Ferrarese, A.; Brun, P.; Castagliuolo, I.; Conconi, M. T.; La Regina, G.; Bai, R.; Silvestri, R.; Hamel, E.; Chilin, A. Discovery of Biaryl aminoquinazolines as Novel Tubulin Polymerization Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (11), 4598–4605.
- (57) Wang, X. F.; Guan, F.; Ohkoshi, E.; Guo, W.; Wang, L.; Zhu, D. Q.; Wang, S. B.; Wang, L. T.; Hamel, E.; Yang, D.; Li, L.; Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Yuan, S.; Lee, K. H.; Xie, L. Optimization of 4-(N-Cycloamino)Phenylquinazolines as a Novel Class of Tubulin-Polymerization Inhibitors Targeting the Colchicine Site. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (4), 1390–1402.
- (58) Dohle, W.; Jourdan, F. L.; Prota, A. E.; Foster, P. A.; Mannion, P.; Hamel, E.; Thomas, M. P.; Kasprzyk, P. G.; Ferrandis, E.; Steinmetz, M. O.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L. Quinazolinone-Based Anticancer Agents: Synthesis, Antiproliferative SAR, Antitubulin Activity, and Tubulin Co-Crystal Structure. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1031–1044.
- (59) Molecular, M.; Field, F.; Halgren, T. a. Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. *J. Comput. Chem.* **2000**, 17 (1996), 520–552.
- (60) Halgren, T. A. Molecular Geometries and Vibrational Frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17 (5 & 6), 553–586.
- (61) Molecular, M.; Field, F.; Halgren, T. A. Extension of MMFF94 Using Experimental Data , Additional Computational Data , and Empirical Rules * Experimental Data Used In. *J. Comput. Chem.* **1996**, 641 (1996), 616–641.
- (62) Boyle, N. M. O.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox - 1758-2946-3-33.Pdf. **2011**, 1–14.
- (63) Gasteiger, J.; Marsilli, M. A New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19 (34), 3181–3184.
- (64) Huang, J.; Jr, A. D. M. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field : Validation Based on Comparison to NMR Data. *J. Comput. Chem.* **2013**, 34 (25), 2135–2145.
- (65) GROMACS development team. GROMACS Documentation. In *GROMACS Documentation*; 2019; pp 2–607.
- (66) Koca, J.; Jirouskova, Z.; Svobodova Varekova, R.; Vanek, J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30 (7), 1174–1178.
- (67) Nerkar, A. G.; Saxena, A. K.; Ghone, S. A.; Thaker, A. K. In Silico Screening , Synthesis and In Vitro Evaluation of Some Quinazolinone and Pyridine Derivatives as Dihydrofolate Reductase Inhibitors for Anticancer Activity. *E-Journal Chem.* **2009**, 6 (1), 97–102.
- (68) Hawser, S.; Lociuoro, S.; Islam, K. Dihydrofolate Reductase Inhibitors as Antibacterial Agents. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71 (7), 941–948.
- (69) Shamitko-klingsmith, N.; Boyd, J. W.; Legleiter, J. Microtubule Modification Influences Cellular Response to Amyloid- β Exposure. **2016**, 3 (April), 261–285.
- (70) Yardley, V.; Gamarro, F.; Croft, S. L. Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of the 8-Aminoquinoline Tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (12),

- 5356–5358.
- (71) Nare, B.; Hardy, L. W.; Beverley, S. M. The Roles of Pteridine Reductase 1 and Dihydrofolate Reductase- Thymidylate Synthase in Pteridine Metabolism in the Protozoan Parasite *Leishmania Major*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (21), 13883–13891.
- (72) Robello, C.; Navarro, P.; Castanys, S.; Gamarro, F. A Pteridine Reductase Gene *Ptr1* Contiguous to a P-Glycoprotein Confers Resistance to Antifolates in *Trypanosoma Cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *90* (2), 525–535.
- (73) Mendoza-Martínez, C. “Síntesis, Evaluación Biológica y Estudios in Silico de Moléculas Diseñadas Como Híbridos Contra *Trypanosoma Cruzi*,” Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- (74) Limón-Pacheco, J.; Gonsebatt, M. E. The Role of Antioxidants and Antioxidant-Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2009**, *674* (1–2), 137–147.
- (75) Niles, J. C.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Peroxynitrite-Induced Oxidation and Nitration Products of Guanine and 8-Oxoguanine: Structures and Mechanisms of Product Formation, 2006, Vol. 14.
- (76) López-Sánchez, M. A. “Síntesis de Derivados de Quinazolin-2,4,6-Triamina Para Evaluar Su Potencial Actividad Antioxidante,” Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- (77) Rosales-Zariñana, V. A. “Síntesis de Derivados de Quinazolina Con Potencial Actividad Citotóxica,” Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- (78) Barbier, P.; Dorle, A.; Devred, F.; Sanz, L.; Allegro, D.; Alfonso, C.; Knossow, M.; Peyrot, V.; Andreu, J. M.; Yvette, G.; Biolo, D. I. Stathmin and Interfacial Microtubule Inhibitors Recognize a Naturally Curved Conformation of Tubulin Dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (41), 31672–31681.
- (79) Chang, Y.; Ganesh, T.; Horton, J. R.; Spannhoff, A.; Liu, J.; Sun, A.; Zhang, X.; Bedford, M. T.; Shinkai, Y.; Snyder, J. P.; Cheng, X. Adding a Lysine Mimic in the Design of Potent Inhibitors of Histone Lysine Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400* (1), 1–7.
- (80) Vedadi, M.; Jin, J. Structure-Activity Relationship Studies of G9a-like Protein (GLP) Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25* (16), 4414–4423.
- (81) Afzal, O.; Kumar, S.; Haider, M. R. af.; Ali, M. R. ahma.; Kumar, R.; Jaggi, M.; Bawa, S. A Review on Anticancer Potential of Bioactive Heterocycle Quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 871–910.
- (82) Lee, H. Y.; Chang, J. Y.; Nien, C. Y.; Kuo, C. C.; Shih, K. H.; Wu, C. H.; Chang, C. Y.; Lai, W. Y.; Liou, J. P. 5-Amino-2-Aroylquinolines as Highly Potent Tubulin Polymerization Inhibitors. Part 2. The Impact of Bridging Groups at Position C-2. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 8517–8525.
- (83) Pérez-Melero, C.; Maya, A. B. S.; Del Rey, B.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. A New Family of Quinoline and Quinoxaline Analogues of Combretastatins. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (14), 3771–3774.
- (84) Salum, L. B.; Mascarello, A.; Canevarolo, R. R.; Altei, W. F.; Laranjeira, A. B. A.; Neuenfeldt, P. D.; Stumpf, T. R.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Vollmer, L. L.; Daghestani, H. N.; De Souza Melo, C. P.; Silveira, A. B.; Leal, P. C.; Frederico, M. J. S.; Do Nascimento, L. F.; Santos, A. R. S.; Andricopulo, A. D.; Day, B. W.; Yunes, R. A.; Vogt, A.; Yunes, J. A.; Nunes, R. J. N-(1'-Naphthyl)-3,4,5-Trimethoxybenzohydrazide as Microtubule Destabilizer: Synthesis, Cytotoxicity, Inhibition of Cell Migration and in Vivo Activity against Acute Lymphoblastic Leukemia. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 504–518.
- (85) Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Romo-Mancillas, A.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.

- Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A. Molecular Basis for Benzimidazole Resistance from a Novel β -Tubulin Binding Site Model. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *45*, 26–37.
- (86) Aguayo-Ortiz, R. Análisis Quimioinformático y Modelado Molecular de Derivados Del Bencimidazol Para La Selección Eficiente de Compuestos Giardicidas y Reposicionamiento En Otras Enfermedades, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- (87) Matus-Meza, A. S. “Síntesis de Derivados de La 2,3,6-Triaminoquinazolina Como Posibles Agentes Antiparasitarios,” Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- (88) Ermakov, A. I.; Voronin, V. G.; Sorokin, A. A.; Epshtein, N. I.; Muravskaya, I. D.; Chistyakov, V. V.; Zuev, A. P.; Geterotsiklicheskih, K. Mass Spectrometry of 8-Hydroxyquinoline Derivatives. *Plenum* **1984**, *84* (6), 786–791.
- (89) Matadamas-Martínez, F.; Castillo, R.; Hernández-campos, A.; Méndez-Cuesta, C.; Souza, W. De; Paula, A.; Noguera-torres, B.; Manuel, J.; Yépez-Mulia, L. Proteomic and Ultrastructural Analysis of the Effect of a New Nitazoxanide- N -Methyl-1 H -Benzimidazole Hybrid against Giardia Intestinalis. *YRVSC* **2016**, *105*, 171–179.
- (90) Kamal, A.; Shaik, A. B.; Polepalli, S.; Reddy, V. S.; Kumar, G. B.; Gupta, S.; Krishna, K. V. S. R.; Nagabhushana, A.; Mishra, R. K.; Jain, N. Pyrazole-Oxadiazole Conjugates: Synthesis, Antiproliferative Activity and Inhibition of Tubulin Polymerization. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7993–8007.
- (91) Guan, Q.; Han, C.; Zuo, D.; Zhai, M.; Li, Z.; Zhang, Q.; Zhai, Y.; Jiang, X.; Bao, K.; Wu, Y.; Zhang, W. Synthesis and Evaluation of Benzimidazole Carbamates Bearing Indole Moieties for Antiproliferative and Antitubulin Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 306–315.
- (92) Nami, B.; Wang, Z. Genetics and Expression Profile of the Tubulin Gene Superfamily in Breast Cancer Subtypes and Its Relation to Taxane Resistance. *Cancers (Basel)*. **2018**, *10* (8).
- (93) Christoph, D. C.; Kasper, S.; Gauler, T. C.; Loesch, C.; Engelhard, M.; Theegarten, D.; Poettgen, C.; Hepp, R.; Peglow, A.; Loewendick, H.; Welter, S.; Stamatis, G.; Hirsch, F. R.; Schuler, M.; Eberhardt, W. E. E.; Wohlschlaeger, J. Bv-Tubulin Expression Is Associated With Outcome Following Taxane-Based Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Br. J. Cancer* **2012**, *107* (5), 823–830.
- (94) Janke, C.; Bulinski, J. C. Post-Translational Regulation of the Microtubule Cytoskeleton: Mechanisms and Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (12), 773–786.
- (95) Wang, R. C.; Chen, X.; Parissenti, A. M.; Joy, A. A.; Tuszyński, J.; Brindley, D. N.; Wang, Z. Sensitivity of Docetaxel-Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells to Microtubule-Destabilizing Agents Including Vinca Alkaloids and Colchicine-Site Binding Agents. *PLoS One* **2017**, *12* (8), 1–22.
- (96) Leizerman, I.; Avunie-Masala, R.; Elkabets, M.; Fich, A.; Gheber, L. Differential Effects of Monastrol in Two Human Cell Lines. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (16), 2060–2070.
- (97) Sáez-Calvo, G.; Sharma, A.; Balaguer, F. de A.; Barasoain, I.; Rodríguez-Salarichs, J.; Olieric, N.; Muñoz-Hernández, H.; Barbís, M. Á.; Wendeborn, S.; Peñalva, M. A.; Matesanz, R.; Canales, Á.; Protá, A. E.; Jiménez-Barbero, J.; Andreu, J. M.; Lamberth, C.; Steinmetz, M. O.; Díaz, J. F. Triazolopyrimidines Are Microtubule-Stabilizing Agents That Bind the Vinca Inhibitor Site of Tubulin. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (6), 737-750.e6.
- (98) Wang, Y.; Yu, Y.; Li, G. B.; Li, S. A.; Wu, C.; Gigant, B.; Qin, W.; Chen, H.; Wu, Y.; Chen, Q.; Yang, J. Mechanism of Microtubule Stabilization by Taccalonolide AJ. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–8.

ANEXO I

“Diseño de compuestos”

ANEXO I. "Diseño de compuestos"

1.1 Índice de eficiencia del ligando (IEL)

En la presente Tabla AI.1 se reportan los valores de índice de eficiencia del ligando para los derivados acetilados en C-2 y C-4 y los que no presentan este grupo, estos valores se obtuvieron a partir del cociente de valor de energía libre entre el número de átomos pesados presentes en la estructura de los derivados.

Tabla AI.1 Valor de IEL obtenido para los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina acetilados y desacetilados.

Ligando	3HKD		3N2G		3N2K		4YJ2		5C8Y		5CA1	
	Des.	Acet.										
FSHV1	-0.32	-0.28	-0.31	-0.39	-0.31	-0.28	-0.32	-0.29	-0.28	-0.32	-0.33	-0.37
FSHV2	-0.29	-0.25	-0.26	-0.32	-0.29	-0.26	-0.29	-0.26	-0.25	-0.26	-0.28	-0.28
FSHV3	-0.31	-0.25	-0.31	-0.39	-0.31	-0.26	-0.31	-0.29	-0.27	-0.26	-0.32	-0.36
FSHV4	-0.30	-0.27	-0.27	-0.34	-0.29	-0.28	-0.31	-0.29	-0.28	-0.27	-0.31	-0.36
FSHV5	-0.30	-0.32	-0.29	-0.39	-0.31	-0.31	-0.31	-0.30	-0.27	-0.30	-0.31	-0.38
FSHV6	-0.30	-0.28	-0.28	-0.38	-0.30	-0.30	-0.31	-0.30	-0.27	-0.29	-0.31	-0.36
FSHV7	-0.31	-0.31	-0.29	-0.38	-0.31	-0.31	-0.32	-0.30	-0.28	-0.26	-0.32	-0.33
FSHV8	-0.31	-0.30	-0.29	-0.38	-0.31	-0.30	-0.31	-0.29	-0.28	-0.25	-0.32	-0.38
FSHV9	-0.32	-0.29	-0.31	-0.35	-0.32	-0.28	-0.31	-0.29	-0.27	-0.26	-0.32	-0.30
FSHV10	-0.28	-0.31	-0.27	-0.35	-0.30	-0.31	-0.30	-0.28	-0.25	-0.25	-0.29	-0.32
FSHV11	-0.32	-0.28	-0.30	-0.35	-0.32	-0.36	-0.31	-0.29	-0.29	-0.27	-0.33	-0.36

Ligando	5XHC		5XI5		5XI7		5YL4		6FKJ		6FKL	
	Des.	Acet.										
FSHV1	-0.29	-0.29	-0.30	-0.26	-0.29	0.05	-0.32	-0.27	-0.31	-0.36	-0.31	-0.35
FSHV2	-0.26	-0.25	-0.26	-0.24	-0.24	0.06	-0.28	-0.26	-0.27	-0.32	-0.26	-0.30
FSHV3	-0.27	-0.29	-0.29	-0.26	-0.27	0.05	-0.31	-0.27	-0.30	-0.33	-0.29	-0.31
FSHV4	-0.28	-0.26	-0.30	-0.27	-0.28	0.05	-0.31	-0.25	-0.31	-0.35	-0.30	-0.32
FSHV5	-0.28	-0.29	-0.31	-0.28	-0.31	0.06	-0.30	-0.27	-0.30	-0.36	-0.29	-0.33
FSHV6	-0.27	-0.27	-0.29	-0.27	-0.27	0.06	-0.30	-0.27	-0.29	-0.36	-0.28	-0.32
FSHV7	-0.30	-0.32	-0.30	-0.29	-0.31	0.05	-0.32	-0.27	-0.31	-0.36	-0.30	-0.35
FSHV8	-0.30	-0.29	-0.30	-0.29	-0.31	0.05	-0.31	-0.27	-0.31	-0.36	-0.29	-0.33
FSHV9	-0.30	-0.29	-0.31	-0.30	-0.30	0.06	-0.33	-0.27	-0.32	-0.35	-0.27	-0.35
FSHV10	-0.25	-0.23	-0.27	-0.26	-0.26	0.07	-0.27	-0.30	-0.28	-0.33	-0.27	-0.30
FSHV11	-0.30	-0.30	-0.31	-0.31	-0.29	0.05	-0.32	-0.26	-0.31	-0.36	-0.30	-0.34

1.2 Valor de puntuación y número de clústers en los derivados desacetilados

En la Tabla AI.2 se describen los valores correspondientes a la energía libre de Gibbs o de puntuación, así como el número de clúster asociados a el modo de unión en común

correspondiente de los derivados de quinazolin-2,4,6-triamina, los cuales no presentan la acetilación en C-2 y C-4.

Tabla AI.2 Valores obtenidos en parámetro de puntuación y clústers en derivados de quinazolin-2,4,6-triamina.

Ligando	3HKD		3N2G		3N2K		4YJ2		5C8Y		5CA1	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-10.51	47	-10.39	46	-10.19	26	-10.69	40	-9.35	35	-10.77	42
FSHV2	-10.27	40	-9.52	25	-10.31	34	-10.32	31	-8.99	23	-10.17	32
FSHV3	-10.32	31	-10.36	44	-10.35	40	-10.34	38	-9.06	28	-10.45	46
FSHV4	-10.31	46	-9.33	29	-9.99	38	-10.46	36	-9.46	37	-10.70	39
FSHV5	-8.80	27	-8.49	20	-8.93	24	-8.97	42	-7.78	41	-8.97	46
FSHV6	-9.24	41	-8.76	40	-9.25	45	-9.71	42	-8.33	40	-9.47	48
FSHV7	-9.21	47	-8.83	27	-9.36	43	-9.56	42	-8.48	40	-9.64	49
FSHV8	-9.19	36	-8.77	22	-9.29	36	-9.40	46	-8.33	44	-9.46	49
FSHV9	-10.57	32	-10.07	25	-10.6	31	-10.33	23	-9.00	29	-10.55	25
FSHV10	-9.11	31	-8.79	37	-9.48	34	-9.45	43	-8.01	36	-9.18	46
FSHV11	-9.88	45	-9.35	43	-9.89	48	-9.71	34	-8.84	38	-10.21	49
G2N	-8.35	42	-8.47	34	-8.25	25	-8.65	29	-7.4	20	-7.45	24
NZO	-8.66	28	-8.40	29	-9.04	39	-9.25	50	-9.14	49	-10.21	50
LOC	-9.22	27	-9.28	29	-8.65	28	-8.12	26	-7.75	18	-8.97	50

Ligando	5XHC		5XI5		5XI7		5YL4		6FKJ		6FKL	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-9.61	26	-10.01	39	-9.42	24	-10.41	44	-10.32	32	-10.12	23
FSHV2	-9.21	22	-9.47	27	-8.78	17	-9.96	45	-9.67	24	-9.45	12
FSHV3	-8.94	23	-9.72	33	-8.81	28	-10.19	44	-10.05	38	-9.73	35
FSHV4	-9.51	24	-10.11	34	-9.49	28	-10.60	45	-10.38	35	-10.07	29
FSHV5	-8.20	25	-8.94	46	-8.99	40	-8.80	33	-8.79	45	-8.48	30
FSHV6	-8.44	40	-8.99	46	-8.47	24	-9.37	47	-8.99	44	-8.72	36
FSHV7	-8.91	35	-9.13	44	-9.21	24	-9.45	47	-9.38	41	-9.04	33
FSHV8	-8.87	30	-8.99	48	-9.21	39	-9.37	47	-9.22	45	-8.75	41
FSHV9	-10.02	29	-10.28	35	-9.85	33	-10.78	34	-10.51	16	-8.90	11
FSHV10	-8.11	35	-8.61	27	-8.20	21	-8.79	33	-8.87	36	-8.57	24
FSHV11	-9.18	35	-9.67	45	-9.13	42	-9.78	37	-9.54	28	-9.20	19
G2N	-7.02	18	-8.76	18	-8.09	16	-7.40	19	-8.66	23	-8.75	40
NZO	-9.04	26	-9.59	50	-8.74	50	-9.53	31	-9.19	49	-9.12	50
LOC	-8.74	26	-8.38	32	-8.55	22	-8.67	40	-8.58	45	-8.33	31

1.3 Valor de puntuación y número de clústers en los derivados acetilados

En la Tabla AI.3 se muestran los valores correspondientes a la energía libre de Gibbs, así como el número de clúster asociados a el modo de unión en común de los derivados acetilados.

Tabla AI.3 Valores obtenidos en parámetro de puntuación y clústers en derivados de quinazolin-2,4,6-triamina.

ANEXO I

Ligando	3HKD		3N2G		3N2K		4YJ2		5C8Y		5CA1	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-9.28	7	-12.94	27	-9.38	11	-9.52	11	-10.49	14	-12.15	25
FSHV2	-9.13	10	-11.41	15	-9.19	20	-9.25	11	-9.21	12	-10.12	14
FSHV3	-8.37	11	-12.86	24	-8.64	8	-9.67	10	-8.45	12	-11.91	17
FSHV4	-9.31	10	-11.65	19	-9.48	11	-9.75	20	-9.09	17	-12.23	12
FSHV5	-9.20	9	-11.28	32	-9.05	11	-8.80	10	-8.79	7	-10.90	16
FSHV6	-8.79	6	-11.76	23	-9.29	4	-9.36	12	-9.06	10	-11.14	12
FSHV7	-9.35	6	-11.39	26	-9.34	9	-9.14	12	-7.79	10	-9.80	8
FSHV8	-9.13	6	-11.34	37	-9.03	5	-8.84	8	-7.64	8	-11.28	15
FSHV9	-9.53	5	-11.61	12	-9.30	5	-9.60	7	-8.73	12	-9.85	10
FSHV10	-9.91	6	-11.21	19	-9.76	8	-9.05	12	-7.87	14	-10.13	7
FSHV11	-8.57	7	-10.76	17	-11.25	9	-9.06	12	-8.43	10	-11.17	8
G2N	-8.34	39	-8.49	24	-8.40	19	-8.66	33	-7.37	24	-7.01	16
NZO	-8.66	29	-8.40	29	-9.04	40	-9.25	49	-9.14	48	-10.21	49
LOC	-9.21	31	-8.33	25	-8.65	30	-8.12	32	-7.82	17	-8.98	50

Ligando	5XHC		5XI5		5XI7		5YL4		6FKJ		6FKL	
	ΔG (kcal/mol)	Clus.										
FSHV1	-8.82	8	-9.41	9	-8.71	14	1.64	3	-8.93	14	-11.90	20
FSHV2	-9.47	10	-8.95	10	-8.66	13	2.08	1	-9.21	13	-11.35	17
FSHV3	-8.78	10	-9.64	9	-8.48	13	1.63	3	-8.79	14	-10.91	23
FSHV4	-9.23	15	-8.92	9	-9.10	10	1.63	3	-8.55	17	-11.80	23
FSHV5	-8.47	7	-8.45	8	-8.19	7	1.63	2	-7.70	12	-10.37	27
FSHV6	-8.82	10	-8.46	10	-8.49	7	1.93	2	-8.33	8	-11.21	27
FSHV7	-8.94	10	-9.73	7	-8.81	7	1.64	3	-8.21	14	-10.89	28
FSHV8	-9.19	10	-8.74	9	-8.57	9	1.63	2	-7.97	8	-10.88	24
FSHV9	-9.88	7	-9.61	8	-9.79	7	1.93	2	-8.97	9	-11.63	12
FSHV10	-8.06	10	-7.50	8	-8.30	6	2.09	2	-9.48	9	-10.48	24
FSHV11	-9.20	7	-9.17	10	-9.51	7	1.64	2	-8.20	11	-11.28	28
G2N	-7.24	14	-7.66	14	-8.09	17	1.49	2	-8.08	22	-8.00	21
NZO	-9.03	29	-9.59	50	-8.74	49	1.04	3	-9.52	36	-9.19	50
LOC	-8.68	20	-8.37	22	-8.55	28	1.49	1	-8.67	42	-8.59	49

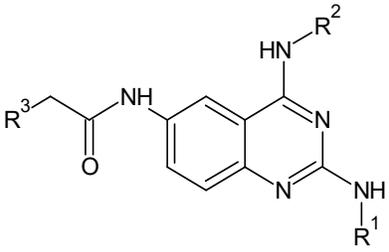
ANEXO II

“Síntesis de compuestos”

ANEXO II “Síntesis de compuestos”

II.1 Estructura de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina

Tabla AII.1 Estructura química de los derivados de quinazolina sintetizados. Las claves asignadas son particulares de este trabajo.



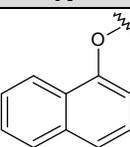
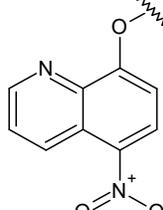
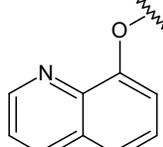
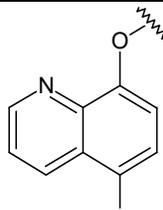
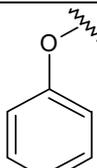
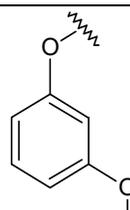
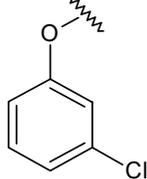
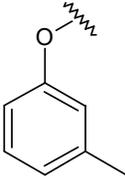
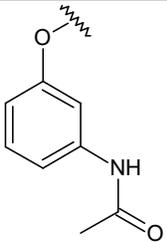
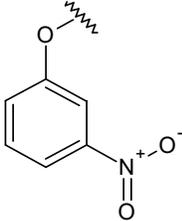
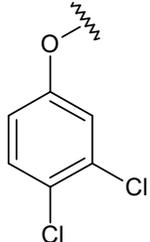
Clave	R ¹	R ²	R ³
FSHV1	 -NH-C(=O)-CH ₃	 -NH-C(=O)-CH ₃	
FSHV2	 -NH-C(=O)-CH ₃	 -NH-C(=O)-CH ₃	
FSHV3	H	H	
FSHV4	H	H	
FSHV5	H	H	
FSHV6	H	H	

Tabla AII.1 Estructura química de los derivados de quinazolina
(continuación)

Clave	R ¹	R ²	R ³
FSHV7	H	H	
FSHV8	H	H	
FSHV9	H	H	
FSHV10	H	H	
FSHV11	H	H	

II.2 Metodología experimental

II.2.1. Instrumentación

La síntesis de los compuestos se realizó en el laboratorio 121, Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM.

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

- Las reacciones planteadas en el presente trabajo se llevaron a cabo en las parrillas de agitación y calentamiento controlado IKA RET básica con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy.

- Para la evaporación del solvente a presión reducida se utilizó el rotaevaporador marca Büchi modelo RC-114 el cual se encuentra acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand PC160 con regulador CVC-2^{II} y refrigerante de espiral Brinkmann.

- Para llevar a cabo la síntesis de algunos derivados se utilizó microondas de la marca Anton Parr modelo Monowave 300 EXTRA Mas 24 adaptado a un sensor de infrarrojo (IR) .

- La determinación de puntos de fusión de los compuestos del presente trabajo de marca Electrothermal Equipar modelo 9300, para la determinación de estos puntos de fusión se utilizaron capilares de vidrio, éstos no se encuentran corregidos.

- La hidrogenación catalítica se ocupó un equipo de hidrogenación Marca PARR™ modelo 3916 EG adaptado a un tanque de hidrógeno proveído por la casa INFRA.

- Los espectros de infrarrojo fueron elaborados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM por la Q. Maricela Gutiérrez Franco en un espectrofotómetro de FTIR / FIR 400 de Perkin-Elmer. (Reflectancia atenuada de ATR).

- Los espectros de masas se obtuvieron mediante la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI) a alta resolución en el espectrofotómetro de masas modelo AxION-2 TOF MS de PERKIN ELMER® realizado por la Dra. Georgina Artemisa Duarte Lisci, utilizando disolventes grado LC-MS la introducción directa a través del módulo DSA (Direct Sample Analysis), realizado en la USAI.

- Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono se adquirieron en un espectrofotómetro de RMN de 9.4 T marca Varian Modelo VNMRS de 400 MHz y de 300 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me_4Si $\delta=0$) en $\text{DMSO}-d_6$ y los valores de J en Hz, adquiridos y obtenidos por

el c. en Dr. Salvador Cortés Mendoza alumno del Dr. José Guadalupe López Cortés en el Instituto de Química y la M. en C. Nayeli López Balbiaux en la USAII.

- El seguimiento de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se analizó mediante cromatografía de capa fina (CCF), mediante placas de vidrio recubiertas con gel de sílice y fluoresceína CF 254 de Merck™, usando los sistemas de elución indicados en la **Tabla AII.3**, finalmente éstas fueron reveladas con una lámpara de luz ultravioleta Spectroline® ENF-240C de onda corta (254 nm) y algunas otras fueron reveladas en cámaras de yodo. Los sistemas utilizados para la elución de los compuestos fueron:

Tabla AII.3. Sistemas de elución

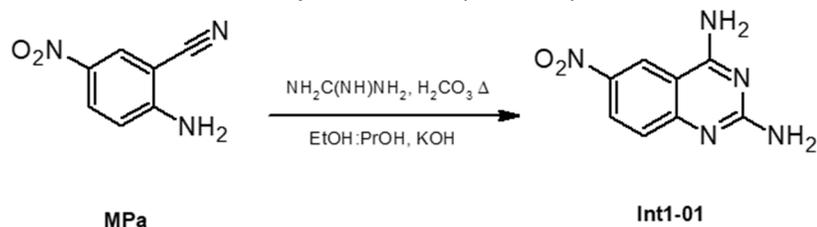
Sistema	Composición	Proporción
I	2-Butanol-Ácido acético-Agua	80:20:5
II	Cloroformo-Metanol	80:20
III	Hexano- Acetato de etilo	50:50

- Para la separación cromatográfica por la técnica de cromatografía en columna se utilizó una columna de vidrio empacada con gel de sílice 60 (Sigma Aldrich y Sorbtech), con un tamaño de partícula 0.04-0.063 mm y malla 230-400.

II.2.2 Reactivos, disolventes y metodología detallada.

La serie de los compuestos **FSHV1** a **FSHV11** se realizaron con disolventes y reactivos de las compañías Sigma Aldrich®, Merck®, y J.T.Baker®. Los fenoles *meta* sustituidos fueron donados por el laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM. A continuación, se presentan los procedimientos sintéticos detallados.

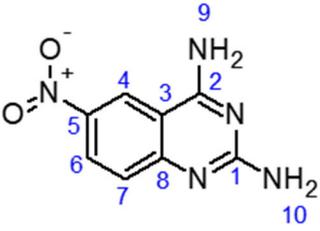
II.2.2.1 Síntesis de 2,4-diamin-6-nitroquinazolina (**Int1-01**)



En un matraz redondo de boca esmerilada 24/40 de 500 mL se colocaron 5 g. de 5-nitroantronic nitrilo (0.031 mol ó 1 Eq.) suspendidos en 60 mL de una mezcla 1 etanol: 2 propanol fungiendo como disolvente, de forma paralela se disuelve en un vaso de precipitados de ésta misma mezcla de disolvente 3.43134 g de KOH (0.037 mol ó 1.2 Eq.) dejándolo en agitación por 20 min. Transcurrido este tiempo la disolución de KOH y 3.65 g. de carbonato de guanidina (0.023 mol o 0.75 Eq.) se adicionan en conjunto a la mezcla de reacción inicialmente

planteada, la cual se adaptó a un sistema de reflujo con un baño de aceite y serpiente para mantener la reacción en reflujo por 6 h. Para el monitoreo de la reacción se realizó una cromatografía de capa fina (CCF.) lo anterior nos reveló la ausencia de materia prima. La mezcla de reacción se filtró en caliente y lavó repetidas veces con una mezcla de agua hasta que el pH fuera de 7, así mismo, se lavó con etanol hasta que la solución madre resultante de la filtración fuesen incoloras. Obteniéndose así un sólido color naranja 3.51 g (70%) del compuesto **Int1-01** con R_f 0.4 (Sistema I) y pf. 359.6 -361.2° C.

Tabla AII.4 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int1-01**

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">Int1-01</p>	<p>Espectro 1.1, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3461, 3436, 3097 (NH-R_{arom}), 3316 (Ar-H), 29815 (-CH₃), 1684, 1656 (C=O), 1581, 1556 (C=C_{arom}), 1521 (C=N), 1379 (C-H), 1326 (N=O_{arom}) 1289 (N-O)</p> <p>Espectro 1.2, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 9.06 [(H-4) (d, J= 2.5 Hz, 1H)], 8.21 [(H-6) dd, J = 9.3, 2.5 Hz, 1H], 7.22 [(H-7) d, J = 9.3 Hz, 1H], 6.90 [(H-9) s, 2H], 6.71 [(H-10) s, 2H]</p> <p>Espectro 1.3, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 157.25 (C-1), 163.00 (C-2), 108.892 (C-3), 122.047 (C-4), 139.250 (C-5, C-8), 124.888 (C-6), 126.694 (C-7).</p>

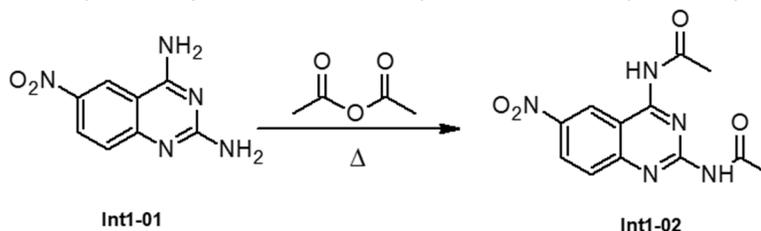
En el cual en el IR se observó la desaparición de la banda correspondiente al nitrilo en la región de 1521 cm⁻¹ y la aparición de las bandas correspondientes a NH-R_{arom} ligeramente ancha en 3461, 3436 y 3097 cm⁻¹ se observó la banda de C=C_{arom} alrededor 1581 y 1556 cm⁻¹. Finalmente se observó la banda alrededor 1326 y 1289 cm⁻¹ correspondiente a N=O_{arom} (véase Anexo II **Espectro 1.1**).

Para el espectro de RMN-¹³C las señales críticas para la identificación del compuesto fue el C-1 y el C-2 que indica el cierre del anillo de pirimidina (ver Anexo II **Espectro 1.3**). La espectroscopía por RMN-¹H mostró para el core de quinazolina las se identificaron las señales correspondientes H4 observándose como un doblete, J_{meta} = 2.5 Hz; para el H6 doble de dobles con una J_{orto} = 9.3 Hz y una J_{meta} = 2.5 Hz; el H7 se observa un como un doblete J_{orto} = 9.3 Hz y finalmente para los H9 y H10 como un singulete ancho (véase Anexo II **Espectro 1.2**).

El espectro COSY nos permite observar las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ¹H, siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina los únicos vecinos entre sí. Esto se puede observar en el anexo II **Espectro 1.4** {8.19, 7.23} y {9.06, 8.20} ppm correspondiente al H6 y el H7 la presencia de éstas dos señales nos corrobora que los protones en el anillo bencénico de la quinazolina son los únicos que pudiesen acoplarse a diferencia de los protones presentes en la pirimidina.

Para corroborar la asignación de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros heteronucleares (HSQC y HMBC). En el de HSQC se observó la correlación que existe entre los protones H4, H6 Y H7 con sus respectivos carbonos en las mismas posiciones dentro del anillo bencénico de la quinazolina (ver Anexo II **Espectro 1.5A**). Por otra parte, en el espectro de HMBC se observó correlaciones entre carbonos e hidrógenos que se encuentran a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia. En el Anexo II espectro **1.5B** se observan diferentes figuras en distintos colores haciendo referencia al protón que se encuentra en correlación con los carbonos a 2 o a tres enlaces, por ejemplo, el protón en 4 enmarcado en un cuadro anaranjado hace referencia al H4 el cual correlaciona con los carbonos C-5, C-6 y C-7.

II.2.2.2 Síntesis de *N, N'*-(6-nitroquinazolin-2,4-dil) diacetamida (**Int1-02**)



En un matraz de bola de boca esmerilada 24/40 de 250 mL se vertió 1.303 g (0.0064 mol) de 2,4-diaminonitroquinazolina (**Int1-01**) consecuentemente se adicionó 5 mL (2eq.) de anhídrido acético terminada la adición, se adaptó una serpentín y atm de N₂ para el calentamiento de ésta reacción a 100°C por 9 h, la cual se monitoreó por medio de CCF, terminado esto la reacción se vertió en una cantidad proporcional de agua y hielo para la formación de un precipitado color amarillo claro, realizando lavados continuos al sólido obtenido hasta pH: 7. Obteniéndose 1.2367 g del intermediario con un rendimiento del 95 % con un *R_f* 0.75 (Sistema II) y un punto de fusión de 278.3-280.1 °C.

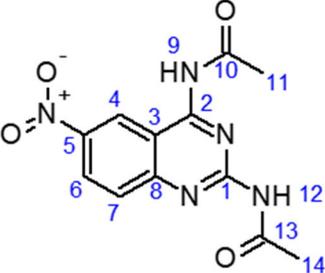
La espectroscopía de IR de Int1-02 se identificaron las bandas N-H asociado a las amidas en la región de 3326 y 3146 cm⁻¹, en esta misma región C-H_{aromático} se identificó una banda ancha de 1325 cm⁻¹, y la banda de tensión de C=C_{aromático} alrededor de 1340 cm⁻¹ (véase Anexo **Espectro 1.6**). Adicionalmente, en este intermediario se refirieron bandas de tensión características de C=O se observó alrededor de 1670 cm⁻¹. Las bandas de torsión asimétrica características de N=O_{aromático} se percibieron en 1340 y 1291cm⁻¹.

En el espectro de RMN-¹³C se identificaron 12 señales de todos los núcleos de esta naturaleza presentes en el intermediario, siendo característicos en este compuesto los dos carbonos de carbonilo (C-10 y C-13) en un desplazamiento ≥ 160 ppm, asimismo en el RMN-¹H se identificaron las señales correspondientes al anillo bencénico en donde H4 se identificó como un doblete con una *J_{meta}* = 2.4 Hz, asimismo otro doblete identificado fue correspondiente al H7 con una *J_{orto}* = 9.2 Hz. Por otra parte, el H6 se describió como un doble de dobles con constantes de acoplamiento *orto* y *meta* (*J* = 9.2, 2.4 Hz) respectivamente.

Los metilos del acetil se identificaron como dos singuletes alrededor de 2.53 y 2.31 ppm (ver Anexo II **Espectro 1.7** y **1.8**). Finalmente, los H9-12 de los grupos aminos de identificaron

ambos se diferencian debido a menor densidad electrónica en H12 por el efecto inductivo de los grupos vecinos alrededor de 11.20 ppm, a diferencia del H9 se encuentra menos desprotegido por tanto sale a campo alto (10.76 ppm).

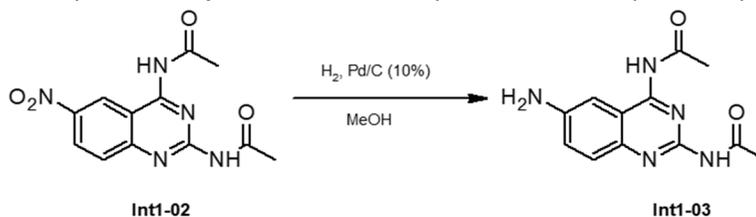
AII.5 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de Int1-02

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p data-bbox="423 743 521 772" style="text-align: center;">Int1-02</p>	<p data-bbox="808 405 1430 434">Espectro 1.6, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3326 y 3146 (N-H_{arom}), 3001 (Ar-H), 2984, 2940 (-CH₃), 1691, 1670 (C=O), 1591 (C=C_{arom}), 1516 (C=NH), 1325 (C-H), 1340 (N=O_{arom}) 1291 (N-O).</p> <p data-bbox="808 573 1430 772">Espectro 1.7, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 9.21 [(H-4) (d, J=2.4 Hz, 1H)], 8.28 [(H-6) dd, J= 9.2, 2.4 Hz, 1H], 7.80 [(H-7) d, J= 9.2 Hz, 1H], 11.22 [(H-9), s, 1H], 2.53 [(H-14), s, 3H], 10.70 [(H-12) s, 1H], 2.31 [(H-11) s, 3H], 11.20 [(H-12) s, 1H].</p> <p data-bbox="808 810 1430 976">Espectro 1.8, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 155.22 (C-1), 158.15 (C-2), 112.669 (C-3), 122.464 (C-4), 143.553 (C-5), 127.967 (C-6), 128.454 (C-7), 155.365 (C-8), 170.119 (C-10), 23.328 (C-11), 172.038 (C-13), 23.328 (C-14).</p>

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ¹H, siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina los únicos vecinos entre sí. Esto se puede observar en el anexo II **Espectro 1.9** {9.35, 8.50}, {8.43, 7.80}, {8.45, 9.37} y {7.73, 9.37} ppm correspondiente al H4, H6 y el H7 la presencia de éstas señales nos corroboran que los protones en el anillo bencénico de la quinazolina son los únicos que pudiesen acoplarse a diferencia de los protones presentes en la pirimidina de este biciclo.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros de HSQC y HMBC. En primera instancia el espectro de HSQC nos indica los carbonos de la molécula que tienen unido un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ¹H corresponde el mismo, por lo que esto nos permite la asignación de las señales en el espectro de ¹³C (ver Anexo **Espectro 1.10A**), en el cual se observa la correlación de los H4, H6 y H7 con sus carbonos respectivos en las mismas posiciones denotadas con círculos de distintos colores. En el de HMBC, se observaron señales presentes de la correlación de los protones en el anillo bencénico de la quinazolina los cuales se denotaron en enmarcándolos en distintas formas geométricas de distintas tonalidades y en la región alifática los protones presentes en CH₃ del carbonilo de la amida, los cuales denotan en un círculo naranja y un cuadrado color morado (ver Anexo II **Espectro 1.10B**).

II.2.2.3 Síntesis de *N,N'*-(6-aminoquinazolin-2,4-dil)diacetamida (Int1-03)



Se colocó en un frasco de hidrogenación Parr 1.00 g (0.0035 mol) de posteriormente se adicionó el 10% en peso del catalizador Pd/C en un vaso de precipitados de 15 mL realizándose la mezcla de ambos sólidos, posteriormente se adicionan 10 mL de metanol (cubriendo la mezcla); vertiendo la mezcla en el vaso de Parr lavando las paredes con metanol (volumen aproximado es 250 mL máximo). En el hidrogenador se carga 60 lb/ in² el tiempo aproximado de reacción es de 40-45 min. Para el tratamiento de la reacción ésta se filtra con embudo de vidrio poroso y las aguas del filtrado resultante color amarillo se concentra con el rotaevaporador a sequedad para la obtención de 0.84 g (94%) del intermediario **Int1-03** color amarillo claro con un R_f 0.35 (Sistema II) y un punto de fusión de 238.6-239.4 °C.

Tabla AII.6 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int1-03**

Intermediarios	Método analítico y señales
<p style="text-align: center;">Int1-03</p>	<p>Espectro 1.11, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3223 (N-H_{arom}), 3132 (Ar-H), 2983, 2929 (-CH₃), 1132, 1324 (R₂C=O), 1671, 1459 (C=C_{arom}), 1671 (C=NH), 3353 (NHC=OR).</p> <p>Espectro 1.12, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.03 [(H-4), d, J= 2.1 Hz, 1H], 7.29 [(H-6), dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H], 7.50 [(H-7), d, J = 8.8 Hz, 1H], 10.22 [(H-9), s, 1H], 2.20 [(H-11),s, 3H], 10.45 [(H-12), s, 1H], 2.34 [(H-14), s, 3H], 5.60 [(H-15), s, 2H].</p> <p>Espectro 1.13, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 149.99 (C-1), 155.98 (C-2), 105.20 (C-3), 102.29 (C-4), 145.26 (C-5), 116.73 (C-6), 125.93 (C-7), 146.55 (C-8), 169.11 (C-10), 170.64 (C-13), 24.40 (C-11-14).</p>

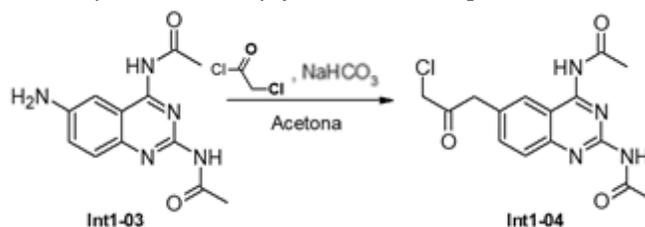
En el espectro de IR se identificaron las bandas en la región de 3223 cm⁻¹ correspondientes a la vibración asimétrica de la N-H de las amidas, en esta región también se observó una banda 3132 cm⁻¹ la cual es indicativa de la vibración del enlace C-H_{aromático}, de forma complementaria es la banda C=C en 1671 y 1459 cm⁻¹ hace referencia al *core* de la quinazolina. Otra región que nos permite la identificación de la presencia del anillo de pirimidina de la quinazolina es la banda ancha en 1671 cm⁻¹ la cual hace referencia al grupo C=N. Otras bandas cruciales fueron correspondientes a los acetilos con dos bandas 2983 y 2929 cm⁻¹ otra parte complementaria es la identificación del grupo carbonilo en 1132 y 1324 cm⁻¹.

En el espectro de RMN-¹³C las bandas que se identificaron fueron similares a las del intermediario anterior, debido a que sólo se modificó en C-6 el grupo amino, la única diferencia es la modificación de los valores de desplazamientos, cabe mencionar que la señal del C-3 no era tan intensa, por tanto, el valor reportado en la **Tabla AII.6** es un valor aproximado. De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales semejantes al **Int1-02** a diferencia de los valores de los desplazamientos debido a la presencia de un grupo electrodonador en C-6, el equipo con el que era de menor frecuencia por lo que el desdoblamiento de las señales no era tan claro por ejemplo en el doble de dobles de H6 se observaba como un doblete, por lo que los valores de las constantes de acoplamiento se obtuvieron basados en valores de los protones vecinos con semejante tipo de acoplamiento.

El espectro homonuclear COSY se observaron las señales de los hidrógenos vecinos en una molécula, lo cual resulta útil para confirmar a que sistema aromático corresponden las señales observadas corresponden a las señales observadas de ¹H, siendo los hidrógenos del anillo de benceno de la quinazolina los únicos vecinos entre sí que a diferencia del intermediario anterior en éste los desplazamientos se encuentra más hacia campo alto por la presencia del grupo amino. Esto se puede observar en el anexo II **Espectro 1.14** {8.43, 7.80}, {9.35, 8.50} y {7.71, 8.45} ppm correspondiente al H4, H6 y el H7 la presencia de estas señales nos corroboran que los protones en el anillo bencénico de la quinazolina son los únicos que pudiesen acoplarse a diferencia de los protones presentes en la pirimidina de este biciclo.

Para confirmar la asignación correcta de los núcleos registrados en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se adquirieron los espectros heteronucleares (HSQC y HMBC). En el espectro de HSQC permite observar a los carbonos presentes en el derivado de quinazolina unido a un átomo de hidrógeno y a que señal del espectro de ¹H corresponde el mismo, de esta manera se puede asignar a qué señal corresponde en el espectro de carbono, como se observa en el Anexo II **Espectro 1.15A** las tres señales correspondientes a los protones en el anillo bencénico las cuales se encuentran desplazadas a campo alto debido a la presencia del amino en posición C-5 con respecto a la numeración asignada a la estructura del intermediario correspondiente. En el espectro de HMBC se observaron las señales en la región de aromáticos y alifáticos en esta región, en primera instancia las señales en alifáticos observadas corresponden a los protones en el anillo bencénico al igual que los protones presentes en el amino en C-5 con el carbono en C-4 (ver anexo **Espectro 1.15B**)

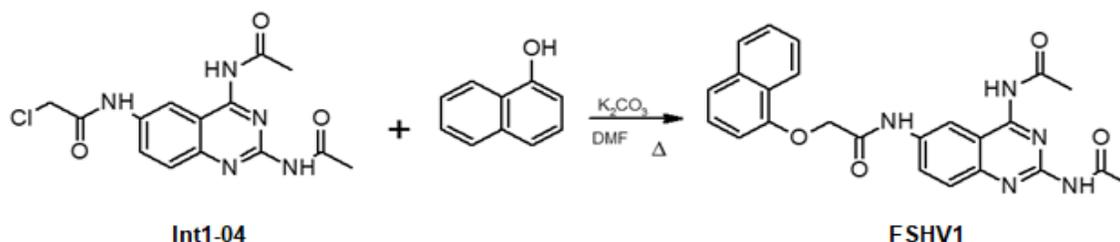
II.2.2.4 Síntesis de *N*-[2,4-bis(acetilamino)quinazolin-6-il]-2-cloroacetamida (**Int1-04**)



En un matraz de bola de boca esmerilada 24/40 de 100 mL, adaptado a un embudo de adición se disolvieron 0.200 g (0.00078 mol) de **Int1-03** en conjunto con 0.07128 g (0.000848

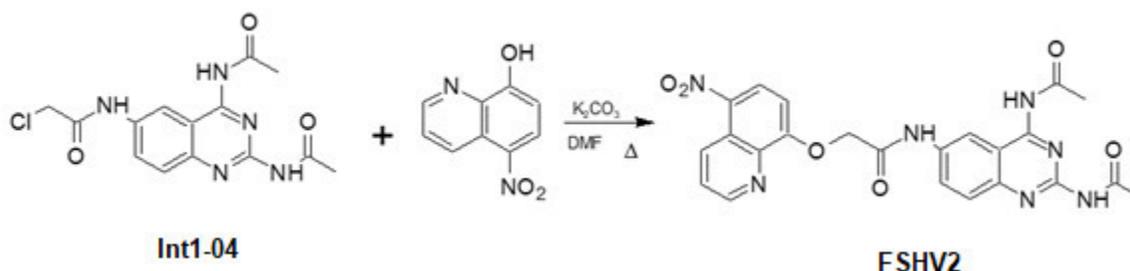
mol ó 1.1 Eq.) de bicarbonato de sodio disolviéndose con 5 mL de acetona manteniéndose en agitación vigorosa durante 10 min, se vertieron 0.06746 mL (0.000848 mol o 1.1 Eq.) de cloruro de cloroacético, adicionándolo por goteo a 0°C (se observa un cambio en la tonalidad inicial) terminada la adición se adapta un septo con atm de N₂, se deja en agitación por 30 min en el baño de hielo, finalmente se deja en agitación por 3h a temperatura ambiente (*rt.*) monitoreándose por medio de CCF. Para su tratamiento, se le adiciona a la mezcla de reacción diisopropiléter en exceso, induciendo la formación de un precipitado color naranja. Es importante mencionar que este intermediario no se aisló.

II.2.2.5 Síntesis de FSHV1



En un matraz de bola de 50 mL se vertió 0.918 g (1.1 Eq. ó 0.0063 mol) de naftol con 1.759 g (2 Eq ó 0.0127 mol) de carbonato de potasio (K₂CO₃) disolviendo la mezcla con 18 mL dimetilformamida (DMF) anhidra en agitación vigorosa a 40°C con un septum y atm de N₂. Pasados 30 min de calentamiento se añadieron 1.500 g (0.00578 mol) de **Int1-04** a esto se adaptó un serpentín para su calentamiento a 85°C por 8 h con un septum adaptado con atm de N₂. Esta reacción se plaqueó cada 2h de lo cual se pudo observar desde el inicio, la presencia de 4 manchas, de las cuales correspondían a materia prima, esto se dejó 6 h adicionales hasta que se observó el predominio de una sola mancha con respecto a las otras, debido a que la separación entre las manchas era muy pequeña se prosiguió a purificarlo por cromatografía sólido-líquido. La elución de esta columna se inició con puro cloroformo (CHCl₃) aumentando gradualmente la polaridad con metanol (MeOH) con un rendimiento de 0.575 g (38.33 %) del producto **FSHV1** con un *R_f* 0.90 (Sistema III) y un punto de fusión de 97.8-99.1 °C.

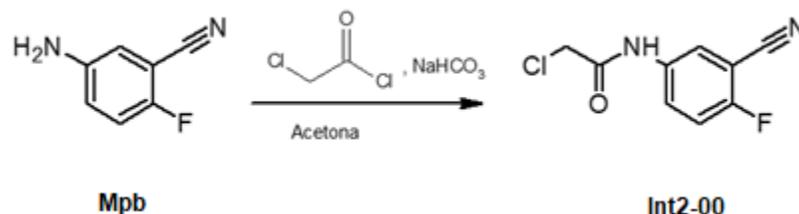
II.2.2.6 Síntesis de FSHV2



En un matraz con boca esmerilada 24/40 de 50 mL se vertieron 1.201 g (1.1 Eq. ó 0.0063 mol) de 5-nitro-8-quinolinol con 1.746 g (2 Eq ó 0.0126 mol) de carbonato de potasio (K₂CO₃) disolviendo la mezcla con 18 mL DMF anhidra en agitación vigorosa a 40°C con un septum y atm de N₂. Pasados 30 min de calentamiento se añadieron 1.500 g (0.00578 mol)

de **Int1-04** a esto se adaptó un serpentín para su calentamiento a 85°C por 8 h con un septum adaptado con atm de N₂. Esta reacción se plaqueó cada 2h de lo cual se pudo observar desde el inicio, la presencia de 4 manchas, de las cuales correspondían a materia prima, esto se dejó 6 h adicionales hasta que se observó la formación de una mancha predominante con respecto a las otras, debido a que la separación entre las manchas era muy pequeña se prosiguió a purificarlo por cromatografía sólido-líquido. La elución de esta columna se inició con puro cloroformo (CHCl₃) aumentando gradualmente la polaridad con metanol (MeOH) con un rendimiento de 0.598 g (39.86 %) del producto **FSHV2** con un *R_f* 0.8 (Sistema III) y un punto de fusión arriba de 300 °C.

II.2.2.7 Síntesis de 2-cloro-N-(3-ciano-4-fluorofenil) acetamida (**Int2-00**)

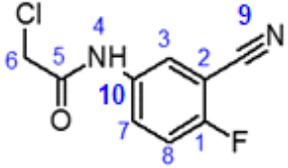


Se vertieron 0.800 g (0.0059 mol) de 2-fluoro-5-aminobenzonitrilo (**MPb**) en conjunto con 0.9874 g (2 Eq. 0.012 mol) de bicarbonato de sodio el cual se disolvió con 4 mL de acetona adaptado a un embudo de adición se vertieron 0.5152 mL (1.1 Eq. 0.0065 mol) de cloruro de cloroacético esta adición se realizó por goteo a 0°C, terminada la adición se adapta un septo con atm de N₂ y se deja en agitación por 30 en el baño de hielo. Por último, la reacción se deja en agitación por 2h a rt. Para el tratamiento de la reacción, a ésta se le adicionó agua en exceso dejándose reposar a rt. hasta la formación de un precipitado color café claro el cual se filtró al vacío para la obtención de 0.786 g (98.2%) del intermediario **Int2-00** con un *R_f* 0.7 (Sistema II) y un punto de fusión de 132.7-133.1 °C.

Se identificaron las bandas de tensión alrededor de 2240 cm⁻¹ las cuales indican la presencia de grupos C≡N. Otras bandas complementarias para la elucidación de Ar-NH y C-H de aromáticos en bandas anchas en 3271 y 3217 cm⁻¹ respectivamente. Bandas en la región aromática se encuentran alrededor de 1110, 1599 y 1493 cm⁻¹, la primera es indicativa de presencia de R₂C=O en donde uno de los sustituyentes es aromático, la últimas señalan la presencia de uniones C=C compuestos aromáticos (ver Anexo II **Espectro 1.16**).

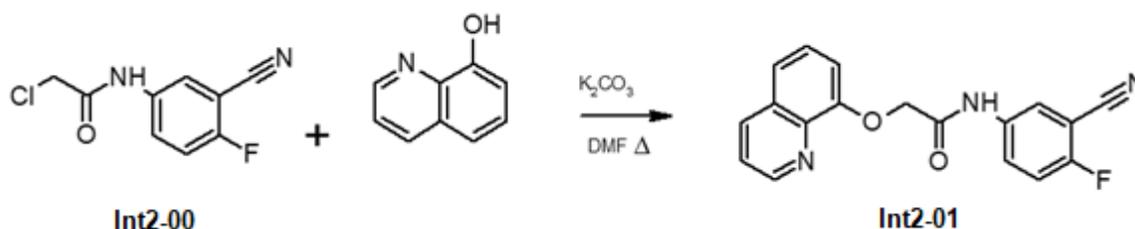
En el espectro de RMN-¹³C las bandas que se identificaron fueron correspondiente al carbono unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA. En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos, de igual forma es importante mencionar que carbonos cuaternarios se observaban como señales poco intensas, requiere mayor tiempo de relajación (véase Anexo II **Espectro 1.17**).

Tabla AII.7 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de Int2-00

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p data-bbox="422 525 519 556">Int2-00</p>	<p data-bbox="808 262 1429 367">Espectro 1.16, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3271, 3217 (Ar-NH), 2240 (C≡N), 1309, 1110 (R₂C=O_{arom}), 1599, 1493 (C=C_{arom}).</p> <p data-bbox="808 388 1429 535">Espectro 1.17, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.81 [(H-3) dd, J = 5.0, 1.5 Hz, 1H], 8.02 – 7.96 [(H-7) m, 1H], 7.47 [(H-8) t, J = 8.8 Hz, 1H], 10.63 [(H-4) s, 1H], 4.25 [(H-6) s, 2H].</p> <p data-bbox="808 556 1429 697">Espectro 1.18, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 159.69 (C-1), 99.98 (C-2), 126.68 (C-3), 165.17 (C-5), 43.31 (C-6), 126.76 (C-7), 117.29 (C-8), 117.09 (C-9), 135.55 (C-10).</p>

De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-00** a H3 como un doble de dobles con una constante de acoplamiento en *meta-para*, el H7 Y H8 no se logra distinguir los dobles de dobles anteriormente descrito para H3, por lo que éstos se observaron como un multiplete y un triplete ($J_{orto} = 8.8$ Hz) respectivamente, debido a la presencia del flúor. Finalmente se observaron los singuletes correspondiente al grupo amino y al metileno los cuales se diferenciaban a que el primero se encuentra más desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba.

II.2.2.8 Síntesis de N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(quinolin-8-iloxi)acetamida (**Int2-01**)

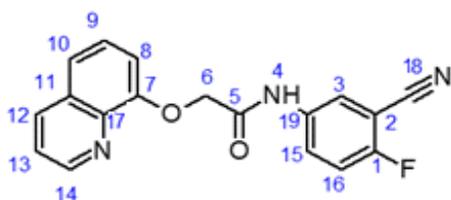


Se colocaron 0.8703g (1.2 Eq. 0.0059 mol) de 8-hidroxiquinolina se disolvió con 1 mL de DMF, posteriormente se adicionó 0.0993 g (1.5 Eq 0.0089 mol) de carbonato de potasio, adicionándose otros 5 mL de DMF a la mezcla de reacción, tapándose con un septo incorporando atm de N₂ se dejó en agitación vigorosa por 30 min a rt. Después de esto se le adicionó 1.00 g (0.0049 mol) de **Int2-00**, posteriormente se adaptó a un serpentín para el calentamiento de la reacción a 80°C por 5h, dejando la reacción en agitación por 2h a rt., monitoreándola por medio de CCF. El matraz se retira de agitación, adicionándole a la mezcla de reacción agua y hielo en una cantidad equivalente para la formación de 0.870 g (87%) del intermediario **Int2-01** con un R_f 0.59 (Sistema III) y un punto de fusión de 130.1-132.4 °C.

Tabla AII.8 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de Int2-01

Intermediarios

Método analítico y señales



Int2-01

Espectro 1.19, IR FTIR por reflectancia ATR (cm^{-1}): 3462, 3193 (Ar-NH-C=OR), 2234 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1319, 1051 ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}_{\text{arom}}$), 1619, 1436 ($\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$), 1262, 1221 ($\text{R}-\text{O}-\text{R}_{\text{arom}}$), 3110, 3072 ($\text{C}-\text{H}_{\text{arom}}$).

Espectro 1.20, RMN ^1H (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 7.95 [(H-3) dd, $J = 4.9, 1.4$ Hz, 1H], - 8.38-8.01 [(H-15) m, 1H], 8.01 – 7.98 [(H-16), m, 1H], 10.94 [(H-4) s, 1H], 4.99 [(H-6) s, 1H], 7.33 [(H-8), d, $J = 7.5$ Hz, 1H], 7.53 – 7.55 [(H-9) m, 1H], 7.51 [(H-10) dt, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H], 7.96 [(H-12) dd, $J = 3.1, 1.7$ Hz, 1H], 7.62 [(H-13), t, $J = 8.2$ Hz, 1H], 8.96 [(H-14) dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H].

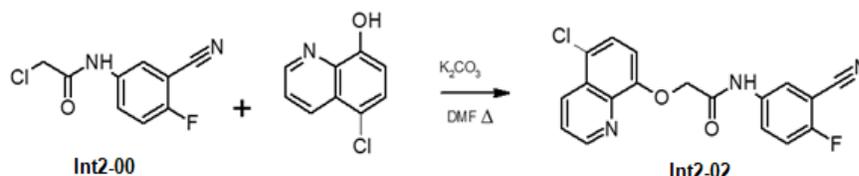
Espectro 1.21, RMN ^{13}C (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 160.08 (C-1), 100.54 (C-2), 127-27 (C-3), 167.93 (C-5), 70.00 (C-6), 157.49 (C-7), 113.15 (C-8), 123.81 (C-9), 121.87 (C-10), 129.53 (C-11), 135.91 (C-12), 136.66 (C-13), 149.87 (C-14), 129.63 (C-15), 117.74 (C-16), 140.30 (C-17), 117.54 (C-18), 135.91 (C-19).

La espectroscopía de IR de **Int2-01** nos permitió identificar las bandas en la región 2234 cm^{-1} indicativo de la presencia de $\text{C}\equiv\text{N}$ (ver Anexo II **Espectro 1.19**). Asimismo en la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas como por ejemplo: $\text{R}_2\text{C}=\text{O}_{\text{arom}}$ se observan dos bandas anchas en 1319 y 1051 cm^{-1} , la banda de tensión $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ y en la región $\text{C}-\text{H}_{\text{arom}}$ correspondiente a 1619 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} , y 3110 cm^{-1} , 3072 cm^{-1} por último las bandas 1262 y 1221 cm^{-1} indicaban la presencia de $\text{R}-\text{O}-\text{R}_{\text{arom}}$.

En la espectroscopía de RMN- ^{13}C las bandas que se identificaron fueron correspondientes a los 17 carbonos, el C-2 unido al grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA. En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (8-hidroxiquinolina) y el benceno polisustituido, de igual forma es importante mencionar que carbonos cuaternarios se observaban como señales poco intensas, requiere mayor tiempo de relajación. De igual forma en el espectro de RMN- ^1H se identificaron señales en el **Int2-01** a H3 como un doblete con una $J_{\text{meta-para}} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H7 Y H8 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un multipletes. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba (ver Anexo II **Espectro 1.20**). Finalmente, lo que respecta a la 8-hidroxiquinolina se

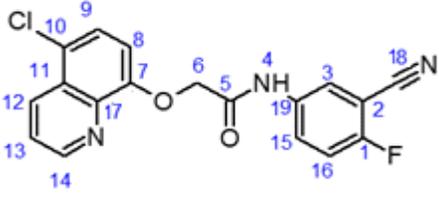
identificaron dos dobles de dobles correspondientes a H12 Y H14 ambos con una *J orto-meta* los cuales eran valores distintos debido al ambiente químico presente en los mismos, de igual forma se identificó un doblete (H8), un triplete dobleteado (H10) y un multiplete (H9) con distintas constantes de acoplamiento.

II.2.2.9 Síntesis de 2-[(5-cloroquinolin-8-il)oxi]-N-(3-ciano-4-fluorofenil)acetamida (Int2-02)



En un matraz redondo de una boca de 50 mL se adicionó 0.5364 g (1.27 eq. 0.0029 mol) de 5-cloroquinolin-8-ol el cual se disolvió con 3 mL de DMF, posteriormente se vertieron 0.6192 g (1.5 eq 0.0048 mol) de carbonato de potasio, adicionándose otros 8 mL de DMF a la mezcla, tapándose con un septo incorporando atm de N₂ se dejó en agitación vigorosa por 30 min a rt. Después de esto se le adiciona 0.500 g (0.0024 mol) de **Int2-00**, posteriormente se adaptó a un serpentín para el calentamiento de la reacción a 80°C por 6h, dejando la reacción en agitación por 2h a rt., monitoreándola por medio de CCF. El matraz se retira de agitación y se le adiciona HCl al 0.01N hasta que la mezcla de reacción llegue a un pH neutro, del cual resultó en un precipitado color café, filtrándose al vacío se obtuvo 0.400 g (80%) del intermediario **Int2-02** con un *R_f* 0.61 (Sistema III) y un punto de fusión de 163.8-165.9°C

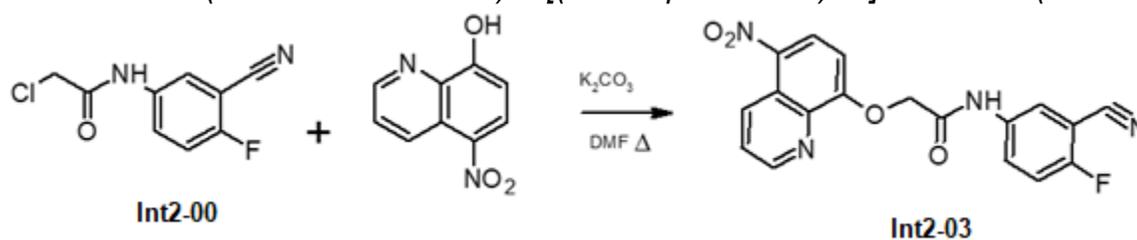
Tabla AII.9 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-02**

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">Int2-02</p>	<p>Espectro 1.22, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3462 (Ar-NH-C=OR), 3589 (Ar-NH), 2239 (C≡N), 1369, 1385 (R₂C=O_{arom}), 1682, 1612 (C=C_{arom}), 1226, 1168 (R-O-R_{arom}), 3045 (C-H_{arom}).</p> <p>Espectro 1.23, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 7.70 [(H-3), dd, <i>J</i> = 4.9, 1.4 Hz, 1H], 7.93 – 7.87 [(H-15) m, 1H], .30 [(H-16) t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H], 10.74 [(H-4) s, 1H], 4.98 [(H-6) s, 1H], 7.27 [(H-8), d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H], 7.29 – 7.31 [(H-9), m, 1H], 8.53 [(H-12), dd, <i>J</i> = 8.6, 1.5 Hz, 1H], 7.50 [(H-13) t, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H], 9.02 [(H-14) dd, <i>J</i> = 4.1, 1.5 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.24, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 168.59 (C-1), 95.03 (C-2), 126.72 (C-3), 167.27 (C-5), 69.07 (C-6), 153.77 (C-7), 112.02 (C-8), 127.25 (C-9), 126.72 (C-10), 123.82 (C-11), 132.92 (C-12), 123.71 (C-13), 150.60 (C-14), 127.37 (C-15), 117.70 (C-16), 116.56 (C-18), 135.88 (C-19).</p>

De igual forma que el espectro de IR anterior mencionado, en este se pudieron identificar bandas de tensión muy similares a las del compuesto pasado. Siendo la banda más característica de este intermediario la correspondiente al grupo C≡N.

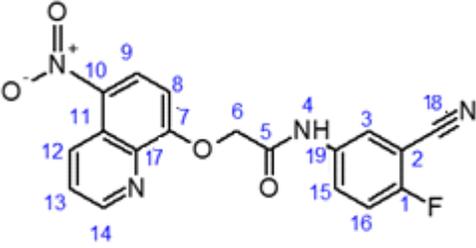
En el espectro de RMN-¹³C las bandas que se identificaron los 17 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA (ver Anexo II **Espectro 1.24**). En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (5-cloroquinolin-8-ol) y el benceno polisustituido, a diferencia de los intermediarios anteriormente planteados tienen distintos desplazamientos debido a la influencia del cloro en C-10. De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-02** a H3 como un doblete con una $J_{meta-para} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H7 y H8 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un multiplete (H15) y triplete (H16) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 5-nitroquinolin-8-ol se identificaron dos dobles de dobles correspondientes a H12 Y H14 ambos con una $J_{orto-meta}$ los cuales eran valores distintos debido al ambiente químico presente en los mismos, de igual forma se identificó un doblete (H8), un triplete (H13) y un multiplete (H9) con distintas constantes de acoplamiento.

II.2.2.10 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-[(5-nitroquinolin-8-il)oxi]acetamida (**Int2-02**)



En un matraz de boca esmerilada 14/20 de 25 mL se vertió 0.9087g (1.27 eq. 0.0048 mol)) de 5-nitroquinolin-8-ol el cual se disolvió con 3 mL de DMF, posteriormente se adicionó 0.9907 g (1.5 eq 0.0086 mol) de carbonato de potasio, adicionándose otros 8 mL de DMF a la mezcla, tapándose con un septo incorporando atm de N₂ se dejó en agitación vigorosa por 30 min a rt. Consecuentemente se le adicionaron 0.800 g (0.0037mol) de **Int2-00**, posteriormente se adaptó a un serpentín para su calentamiento a 80°C por 6h, dejando la reacción en agitación por 2h a rt., monitoreándola por medio de CCF. El matraz se retira de agitación y se le adiciona vierte en agua y hielo obteniéndose así un precipitado color naranja filtrándolo al vacío. De lo anterior se obtuvo 0.745 g (93.1%) del intermediario **Int2-02** con un R_f 0.23 (Sistema III) y un punto de fusión de 335.6-336.3°C.

Tabla AII.10 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de Int2-03

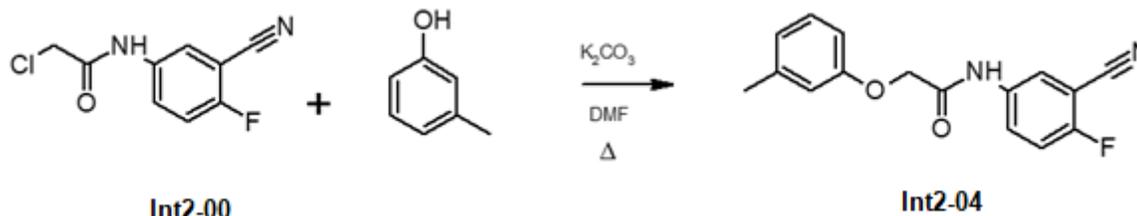
Intermediarios	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">Int2-03</p>	<p>Espectro 1.25, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3331 (Ar-NH-C=OR), 2234 (C≡N), 1300, 1004 (R₂C=O arom), 1597, 1439 (C=C arom), 1678 (R-C=O), 12820, 1223 (R-O-R arom), 3072, 3050 (C-H arom), 1529 (arom R-N=O).</p> <p>Espectro 1.26, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 7.67 [(H-3), dd, J = 4.9, 1.4 Hz, 1H], 7.96 -8.03[(H-15), m, 1H], 7.32 [(H-16) t, J = 7.8 Hz, 1H], 8.54 [(H4) s, 3H], 4.57 [(H-6), s, 1H], 7.02 [(H-8) d, J = 7.5 Hz, 1H], 8.36 [(H-9), d, J = 9.8 Hz, 1H], 8.77 [(H12) dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H], 7.62 [(H-13) t, J = 9.1 Hz, 1], 8.84 [(H-14) dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.27, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm):162.15 (C-1), 100.88 (C-2), 124.76 (C-3), 178.89 (C-5), 52.51 (C-6), 159.64 (C-7), 113.92 (C-8), 127.85 (C-9), 138.10 (C-10), 121.25 (C-11), 133.85 (C-12), 12.25 (C-13), 145.38 (C-14), 130.64 (C-15), 117.60 (C-16), 132.205 (C-17), 117.60 (C-18), 137.9 (C-19).</p>

Se identificaron las bandas de tensión alrededor 2234 cm⁻¹ indicativo de la presencia de C≡N junto con la banda en 1529 cm⁻¹ lo cual hace referencia al grupo arom R-N=O en conjunto son las más características de **Int2-03**. De forma complementaria en la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas como, por ejemplo: R₂C=O arom se observan dos bandas anchas en 1300 y 1004 cm⁻¹, la banda de tensión C=C arom y en la región C-H arom en regiones de 1597 cm⁻¹, 1439 cm⁻¹ y 3072 cm⁻¹, 3050 cm⁻¹, 1436 cm⁻¹ respectivamente. Por último, las bandas 12820 y 1223 cm⁻¹ indicaban la presencia de R-O-R arom (ver Anexo II **Espectro 1.25**).

La espectroscopía de RMN-¹³C las bandas que se identificaron los 17 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo atractor. En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (5-nitroquinolin-8-ol) y el benceno polisustituido. De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-03** a H3 como un doblete con una J *meta-para* = 4.9 y 1.4 Hz, los protones H7 Y H8 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un multiplete (H15) y triplete (H16) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 5-nitroquinolin-8-ol se identificaron dos dobles de dobles correspondientes a H12 Y H14 ambos con una J *orto-meta* los cuales eran valores distintos debido al ambiente químico presente en los mismos, así mismo los protones H8 y H9 se observan

como dobletes con J_{orto} con distintos desplazamientos debido a la presencia de un grupo GEA, y se identificó como un triplete a H13 (ver Anexo II **Espectro 1.26**).

II.2.2.11 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(3-metilfenoxi)acetamida (**Int2-04**)



Para la síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(3-metilfenoxi)acetamida (**Int2-04**) se realizó a partir del 2-cloro-*N*-(3-ciano-4-fluorofenil)acetamida (**Int2-00**). Para el cual en primera instancia se colocó en un matraz de una boca de 50 mL 0.543 mL (0.00517 mol ó 1.2 Eq.) de *m*-cresol y 1.0726 g (0.00542 mol ó 1.5 Eq.) de carbonato de potasio disueltos en DMF anhidra. La mezcla de reacción se acondicionó para su calentamiento con un serpentín y atmósfera de N_2 por 30 min a 40°C. A continuación, se adicionó 1 g (0.0070 mol) de (**Int2-00**) disuelto en la mínima cantidad de DMF anhidra, una vez concluida la adición se calentó a una mayor temperatura alrededor de 85°C por 6 h. El monitoreo de la reacción se realizó con CCF en el cual se mostró que ya no había residuales de materia prima, ésta se vertió en agua y hielo a partir del cual se obtuvo un precipitado el cual se recuperó por filtración rápida. Posteriormente se realizaron lavados de agua y metanol para la obtención de un sólido color café con un rendimiento de 79.3% (0.738 g) y un R_f 0.86 (Sistema III) y un punto de fusión de 174.3-176.1°C.

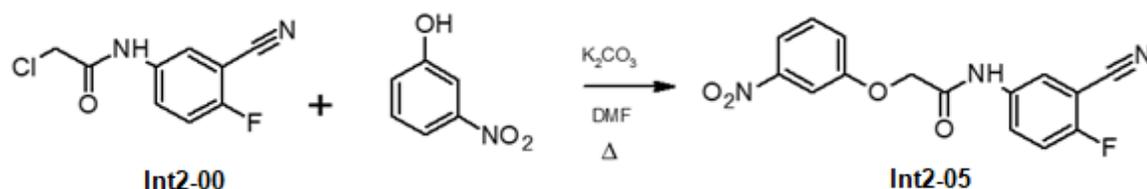
Tabla AII.11 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-04**

Intermediarios	Método analítico y señales
<p style="text-align: center;">Int2-04</p>	<p>Espectro 1.28, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3315, 3125 (Ar-NH-C=OR), 2242 (C≡N), 1317, 1155 (R₂C=O_{arom}), 1610, 1431 (C=C_{arom}), 3125 (C-H_{arom}), 1292, 1217 (R-O-R_{arom}), 3077 (CH₃).</p> <p>Espectro 1.29, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.96[(H-3), dd, $J = 4.9, 1.4$ Hz, 1H], 8.16 [(H-14) ddd, $J = 7.4, 4.9, 1.4$ Hz, 1], 7.32 [(H-15) t, $J = 7.8$ Hz, 1H], 10.44 [(H-4) s, 1H], 4.69 [(H-6) s, 2H], 6.80 – 6.81 [(H-13), m, 1H], 7.19 [(H-12), t, $J = 7.5$ Hz, 1H], 6.82-6.83 [(H-11), m, 1H], 6.84 [(H-8), t, $J = 1.4$ Hz, 1H], 2.28 [(H-10), s, 3H].</p> <p>Espectro 1.30, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 159.66 (C-1), 99.86 (C-2), 127.22 (C-3), 167.35 (C-5), 66.98 (C-6), 159.67 (C-7), 117.23 (C-8), 139.09 (C-9), 21.14 (C-10), 123.72 (C-11), 129.32 (C-12), 113.94 (C-13), 135.54 (C-14), 117.03 (C-15), 115.49 (C-16), 129.44 (C-17).</p>

En la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas como, por ejemplo: $R_2C=O_{\text{arom}}$ se observan dos bandas anchas en 1317 y 1155 cm^{-1} , la banda de tensión $C=C_{\text{arom}}$ y en la región $C-H_{\text{arom}}$ en regiones de 1610 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} y 3125 cm^{-1} respectivamente. Por último, las bandas 1292 y 1217 cm^{-1} indicaban la presencia de $R-O-R_{\text{arom}}$ (véase Anexo II **Espectro 1.28**). La banda característica de $C\equiv N$ en la región de 2242 cm^{-1} , el grupo $Ar-NH-C=OR$ en 3315 y 3125 cm^{-1} y la banda del CH_3 en la región de 3077 cm^{-1} indica la unión de este sustituyente a un grupo aromático.

En el espectro de RMN- ^{13}C las bandas que se identificaron los 16 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo $C\equiv N$ tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA. En la región de 110 - 170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (3-metilfenol) y el benceno polisustituido (ver Anexo II **Espectro 1.30**). De igual forma en el espectro de RMN- 1H se identificaron señales en el **Int2-04** a H3 como un doble de dobles con una $J_{\text{meta-para}} = 4.9$ y 1.4 Hz , los protones H14 Y H15 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un doblete tripleteado (H14) y triplete (H15) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 3-metilfenol se identificaron H11 y H13 se observaron como un multiplete, así como H8 y H12 se observaron como tripletes con distintas constantes de acoplamiento y un singulete al H10 en la región de los alifáticos.

II.2.2.12 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(3-nitrofenoxi)acetamida (**Int2-05**)

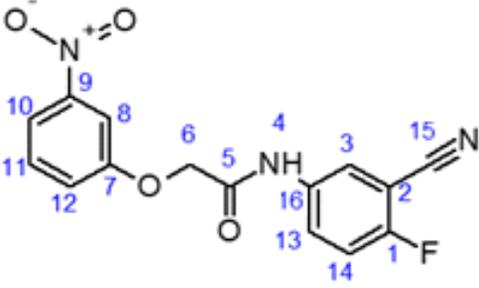


Para la síntesis del intermediario **Int2-05** se siguió la metodología **II.2.2.11**; se obtuvo un rendimiento de 53.1%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un $R_f 0.34$ (Sistema III) con un punto de fusión 167.2 - 168.1°C .

Se identificaron las bandas de tensión alrededor 2239 cm^{-1} indicativo de la presencia de $C\equiv N$, en la región de 1366 y 1150 cm^{-1} lo cual hace referencia al grupo $_{\text{arom}}R-N=O$, $Ar-NH-C=OR$ alrededor de 3258 y 3205 cm^{-1} y las bandas de tensión de $R-N=O_{\text{arom}}$ en 1537 y 1366 cm^{-1} son clave en la elucidación de **Int2-05**. De forma complementaria en la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas como, por ejemplo: $R_2C=O_{\text{arom}}$ se observan dos

bandas anchas en 1366 y 1150 cm^{-1} , las bandas de tensión $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ y en la región $\text{C}-\text{H}_{\text{arom}}$ en regiones de 1612 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} y 3121 cm^{-1} , 3053 cm^{-1} respectivamente (ver Anexo II **Espectro 1.31**). Por último, las bandas 1218 y 1256 cm^{-1} indicaban la presencia de $\text{R}-\text{O}-\text{R}_{\text{arom}}$.

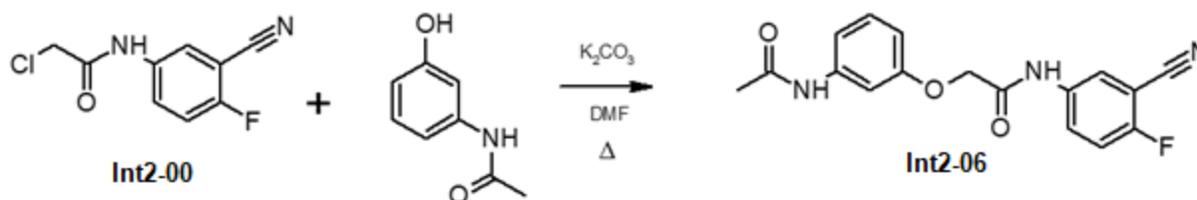
Tabla AII.12 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-05**

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">Int2-05</p>	<p>Espectro 1.31, IR FTIR por reflectancia ATR (cm^{-1}): 3258, 3205 ($\text{Ar}-\text{NH}-\text{C}=\text{OR}$), 2239 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1366, 1150 ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}_{\text{arom}}$), 1612, 1452 ($\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$), 1218, 1256 ($\text{R}-\text{O}-\text{R}_{\text{arom}}$), 3121, 3053 ($\text{C}-\text{H}_{\text{arom}}$), 1537, 1366 ($\text{arom R}-\text{N}=\text{O}$).</p> <p>Espectro 1.32, RMN ^1H (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 7.67 [(H-3), dd, $J = 5.0, 1.5\text{ Hz}$, 1H], 8.15-8.09 [(H-13), m, 1H], 7.21 [(H-14), t, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1H], 10.43 [(H-4), s, 1H], 4.71 [(H-6), s, 2H], 7.97 [(H-8), t, $J = 1.4\text{ Hz}$, 1H], 7.95 [(H-10), dt, $J = 7.5, 1.4\text{ Hz}$, 1H], 7.51 [(H-11), t, $J = 9.1\text{ Hz}$, 1H], 6.56 – 6.60 [(H-12), m, 1H].</p> <p>Espectro 1.33, RMN ^{13}C (400 MHz TMS, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm): 160.45 (C-1), 99.84 (C-2), 127.21 (C-3), 167.15 (C-5), 67.13 (C-6), 160.45 (C-7), 113.87 (C-8), 157.14 (C-9), 116.98 (C-10), 127.12 (C-11), 123.72 (C-12), 130.15 (C-13), 117.18 (C-14), 119.25 (C-15), 135.44 (C-16).</p>

La espectroscopía de RMN- ^{13}C las bandas que se identificaron los 15 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA. En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (3-nitrofenol) y el benceno polisustituido, cabe mencionar que C-8 y C-10 tienen un menor desplazamiento ya que la contribución es negativa en esta posición. De igual forma en el espectro de RMN- ^1H se identificaron señales en el **Int2-05** a H3 como un doble de dobles con una $J_{\text{meta-para}} = 5.0$ y 1.5 Hz , los protones H13 Y H14 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un multiplete (H13) y triplete (H14) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 3-nitrofenol H8 y H11 las señales fueron tripletes con distintas constantes de acoplamiento, las señales identificadas H10 y H12 para el

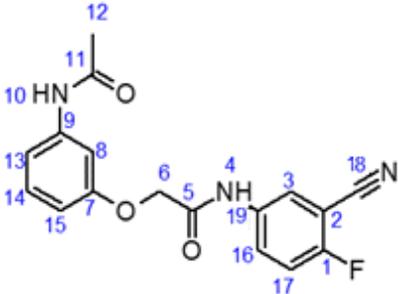
primero fue un triplete dobleteado y para el segundo correspondía a un multiplete debido al ambiente químico.

II.2.2.13 Síntesis de 2-[3-(acetilamino)fenoxi]-N-(3-ciano-4-fluorofenil)acetamida (**Int2-06**)



Para la síntesis del intermediario **Int2-06** se siguió la metodología anteriormente descrita; se obtuvo un rendimiento de 48.7%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.57 (Sistema III) con un punto de fusión de 186.4-188.5°C.

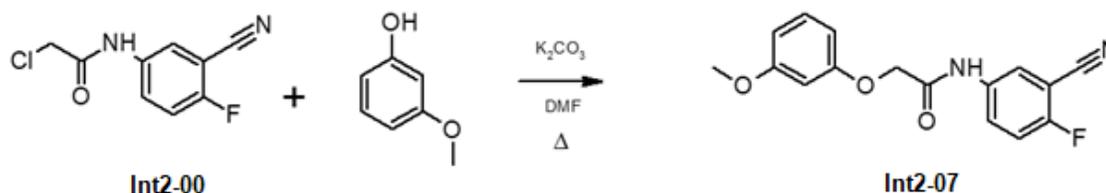
Tabla AII.13 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-06**

Intermediarios	Método analítico y señales
	Espectro 1.34, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3340 (Ar-NH-C=OR), 2236 (C≡N), 1366, 1106 (R ₂ C=O _{arom}), 1594, 1430 (C=C _{arom}), 1281, 1215 (R-O-R _{arom}), 3098, 3069 (C-H _{arom}).
	Espectro 1.35, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.68 [(H-3), dd, $J = 4.9, 1.4$ Hz, 1H], 7.92 [(H-16), ddd, $J = 7.4, 4.9, 1.4$ Hz, 1H], 7.18 [(H-17), t, $J = 8.1$ Hz, 1H], 9.92 [(H-4, H-10), s, 2H], 4.65 [(H-6), s, 1H], 6.63 [(H-15), dt, $J = 7.3, 1.5$ Hz, 1H], 7.49 [(H-14), t, $J = 7.4$ Hz, 1H], 7.42 [(H-13), dt, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H], 7.37 [(H-8), t, $J = 1.4$ Hz, 1H], 2.50 [(H-12), s, 3H].
Int2-06	Espectro 1.36, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 159.79 (C-1), 100.01 (C-2), 124.28 (C-3), 168.45 (C-5), 67.03 (C-6), 159.66 (C-7), 108.94 (C-15), 129.54 (C-14), 113.96 (C-13), 140.55 (C-9), 167.26 (C-11), 24.09 (C-12), 129.54 (C-16), 117.24 (C-17), 117.04 (C-18), 135.64 (C-19).

La espectroscopía de IR de **Int2-06** en la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas, como por ejemplo: R₂C=O_{arom} se observan dos bandas anchas en 1366 y 1106 cm⁻¹, la banda de tensión C=C_{arom} y en la región C-H_{arom} en regiones de 1594 cm⁻¹, 1430 cm⁻¹ y 3098 cm⁻¹, 3069 cm⁻¹ respectivamente. Por último, las bandas 1281 y 1215 cm⁻¹ indicaban la presencia de R-O-R_{arom}. Las bandas características de C≡N en la región de 2236 cm⁻¹ y de Ar-NH-C=OR en 3340 cm⁻¹.

La espectroscopía de RMN-¹³C las bandas que se identificaron los 17 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA. En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (3-acetamidofenol) y el benceno polisustituido, cabe mencionar que C-8 y C-10 tienen un menor desplazamiento ya que la contribución es negativa en esta posición (ver Anexo II **Espectro 1.36**). De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-06** a H3 como un doble de dobles con una $J_{meta-para} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H16 y H17 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un doblete tripleteado (H16) y triplete (H17) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 3-acetamidofenol las señales de los protones H8 y H14 se observaron como tripletes con distintas constantes de acoplamiento el primero con $J_{meta} = 1.4$ Hz y el segundo $J_{orto} = 7.4$ Hz, por otra parte, H13 y H15 se identificaron como un triplete dobleteado $J_{orto-meta} = 7.5$ y 1.5 Hz y finalmente dos singuletes de la amina y el metilo de la acetamida con distintos desplazamiento debido al ambiente químicos ambos desplazadas hacia campo bajo debido a que a la presencia de un grupo GEA.

II.2.2.14 Síntesis de N-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(3-metoxifenoxi)acetamida (**Int2-07**)

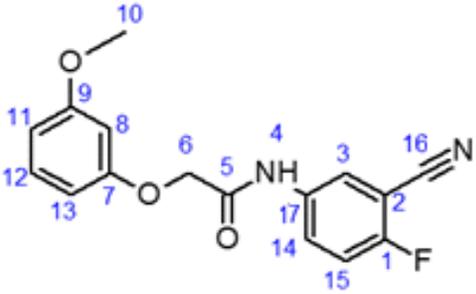


Para la síntesis del intermediario **Int2-07** se siguió la metodología **II.2.2.11**; se obtuvo un rendimiento de 51.2%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un $R_f 0.48$ (Sistema III) con un punto de fusión de 142.3-143.6°C.

Se observaron las bandas de tensión alrededor 2232 cm^{-1} indicativo de la presencia de C≡N, así como el grupo Ar-NH-C=OR alrededor de 3078 cm^{-1} (véase Anexo II **Espectro 1.37**). De forma complementaria en la parte de aromáticos se identificaron distintas bandas como, por ejemplo: $R_2C=O_{arom}$ se observan dos bandas anchas en 1362 y 1334 cm^{-1} , las bandas de tensión C=C_{arom} y en la región C-H_{arom} en regiones de 3025 y 1591 cm^{-1} respectivamente. Por último, las bandas 1264 y 1221 cm^{-1} indicaban la presencia de R-O-R_{arom}.

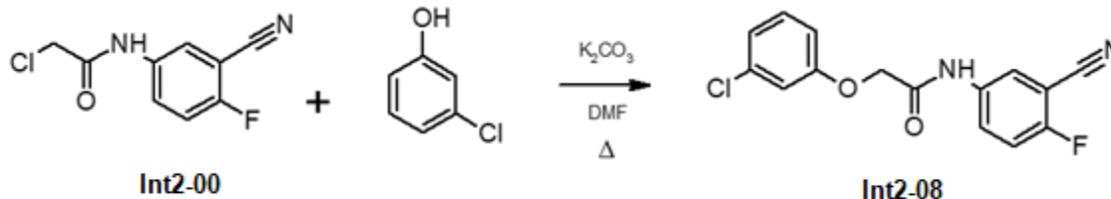
La espectroscopía de RMN-¹³C las bandas que se identificaron los 16 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA . En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (3-acetamidofenol) y el benceno polisustituido, cabe mencionar que C-8 y C-10 tienen un menor desplazamiento ya que la contribución es negativa en esta posición.

Tabla AII.14 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-07**

Intermediarios	Método analítico y señales
 <p style="text-align: center;">Int2-07</p>	<p>Espectro 1.37, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3078 (Ar-NH-C=OR), 3264 (Ar-NH), 2232 (C≡N), 1362, 1334 (R₂C=O_{arom}), 1605, 1591 (C=C_{arom}), 1264, 1221 (R-O-R_{arom}), 3058, 3025 (C-H_{arom}),</p> <p>Espectro 1.38, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.96 [(H-3), dd, J = 4.9, 1.4 Hz, 1H], 8.16 [(H-14), ddd, J = 7.4, 4.9, 1.4 Hz, 1H], 7.51 [(H-15), t, J = 9.0 Hz, 1H], 10.43 [(H-4), s, 1H], 4.71 [(H-6), s, 2H], 6.58 [(H-8), d, J = 1.5 Hz, 1H], 6.54 – 6.55 [(H-11), m, 1H], 6.59 – 6.60 [(H-13), m, 1H], 7.21 [(H-12), t, J = 8.2 Hz, 1H], 3.74 [(H-10), s, 3H].</p> <p>Espectro 1.39, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm):160.55 (C-1), 99.88 (C-2), 127.24 (C-3), 167.21 (C-5), 67.11 (C-6), 160.47 (C-7), 101.20 (C-8), 167.21 (C-9), 55.18 (C-10), 107.05 (C-13), 130.11 (C-12), 106.78 (C-13), 130.85 (C-14), 117.25 (C-15), 117.04 (C-16), 135.48 (C-17).</p>

De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-07** a H3 como un doble de dobles con una $J_{meta-para} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H14 y H15 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un doblete tripleteado (H14) y triplete (H15) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 3-metoxifenol las señales de los protones H11 y H13 se identificaron como multipletes, el H12 como un triplete con una $J_{orto} = 8.2$ Hz por otra parte, H8 se identificó como un doblete con una constante de acoplamiento en *meta* de 1.5 Hz y finalmente se identificó a H10 como un singulete en la región de los alifáticos unidos a oxígeno.

II.2.2.15 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-(3-clorofenoxi)acetamida (**Int2-08**)



Para la obtención del intermediario **Int2-08** se siguió la metodología especificada en las subsecciones anteriormente descritas; se obtuvo un rendimiento de 60.4%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.81 (Sistema III) con un punto de fusión de 198.6-200.1°C.

Tabla AII.15 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-08**

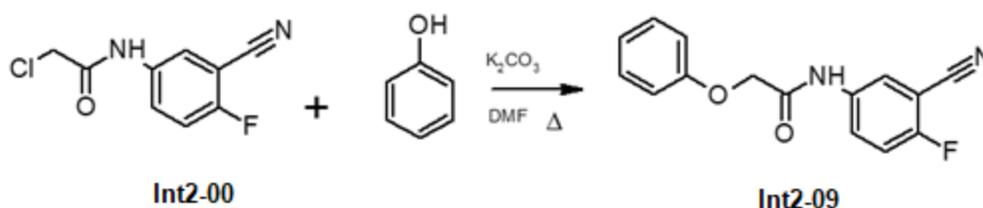
Intermediarios	Método analítico y señales
	<p>Espectro 1.40, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3363 (Ar-NH-C=OR), 2237 (C≡N), 1321, 1105 (R₂C=O_{arom}), 1612, 1441 (C=C_{arom}), 3094 (C-H_{arom}), 1275, 1218 (R-O-R_{arom}).</p>
<p style="text-align: center;">Int2-08</p>	<p>Espectro 1.41, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.67 [(H-3) dd, <i>J</i> = 4.9, 1.4 Hz, 1H], 8.03 – 7.97 [(H-13), m, 1H], 7.32 [(H-14), t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H], 9.77 [(H-4), s, 1H], 4.81 [(H-6), s, 2H], 7.01 [(H-8), t, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H], 6.98 [(H-10), dt, <i>J</i> = 7.5, 1.5 Hz, 1H], 7.22 [(H-11), t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H], 6.84 [(H-12), dt, <i>J</i> = 7.5, 1.4 Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.42, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 160.43 (C-1), 93.83 (C-2), 124.85 (C-3), 170.99 (C-5), 67.10 (C-6), 158.90 (C-7), 116.16 (C-8), 134.06 (C-9), 121.51 (C-10), 130.55 (C-11), 114.12 (C-12), 131.19 (C-13), 1317.77 (C-14), 117.42 (C-15), 137.11 (C-16).</p>

De igual forma que el espectro de IR anterior mencionado, en este se pudieron registrar bandas de tensión muy similares a las del compuesto pasado a excepción de la banda de tensión del CH₃ del grupo metoxilo. Siendo la banda más característica de este intermediario la correspondiente al grupo C≡N.

La espectroscopía de RMN-¹³C las bandas que se observaron los 15 tipos de carbonos presentes en el intermediario en principio el C-2 unido al grupo C≡N tiene un desplazamiento a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA (ver Anexo II **Espectro 1.42**). En la región de 110-170 se identificaron los carbonos aromáticos presentes

en el sustituyente (3-clorofenol) y el benceno polisustituido. De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-08** a H3 como un doble de dobles con una $J_{meta-para} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H13 y H14 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un doblete tripleteado (H13) y triplete (H14) por la presencia del flúor. Por otra parte, se observaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta a la 3-cloroxifenol las señales de los protones H8 y H11 son tripletes con una constante de acoplamiento en *orto* y *meta*, asimismo H10 y H12 se observaron como tripletes dobleteados con una $J_{orto-meta}$ semejantes.

II.2.2.16 Síntesis de *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-2-fenoxiacetamida (**Int2-09**)



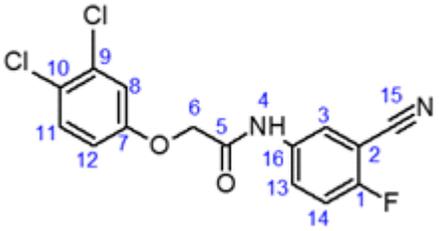
Para la síntesis del intermediario **Int2-09** se siguió la metodología **II.2.2.11**; se obtuvo un rendimiento de 46.8%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.84 (Sistema III) con un punto de fusión de 143.9-145.2°C.

Tabla AII.16 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-09**

Intermediarios	Método analítico y señales
	Espectro 1.43, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3362,3101 (Ar-NH-C=OR), 2233 (C≡N), 1113,1294 (R ₂ C=O _{arom}), 1593, 1438 (C=C _{arom}), 1256, 1217 (R-O-R _{arom}), 3101, 3079 (C-H _{arom}).
	Espectro 1.44, RMN ¹H (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 8.16 [(H-3), dd, $J = 5.5, 2.3$ Hz, 1H], 7.96 [(H-13), ddd, $J = 7.4, 4.9, 1.4$ Hz, 1H], 7.51 [(H-14), t, $J = 9.1$ Hz, 1H], 10.48 [(H-4), s, 1H], 4.72 [(H-6), s, 2H], 6.97 [(H-8, H-12), dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 2H], 7.32 [(H-9, H-11), t, $J = 7.8$ Hz, 2H], 6.01 – 6.04 [(H-10), m, 2H].
Int2-09	Espectro 1.45, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dmsó-d₆, δ en ppm): 159.63 (C-1), 99.83 (C-2), 127.11 (C-3), 167.42 (C-5), 67.02 (C-6), 157.65 (C-7), 114.62 (C-8, C-12), 129.53 (C-9, C-11), 121.33 (C-10), 129.53 (C-13), 117.17 (C-14), 116.97 (C-15), 135.47 (C-16).

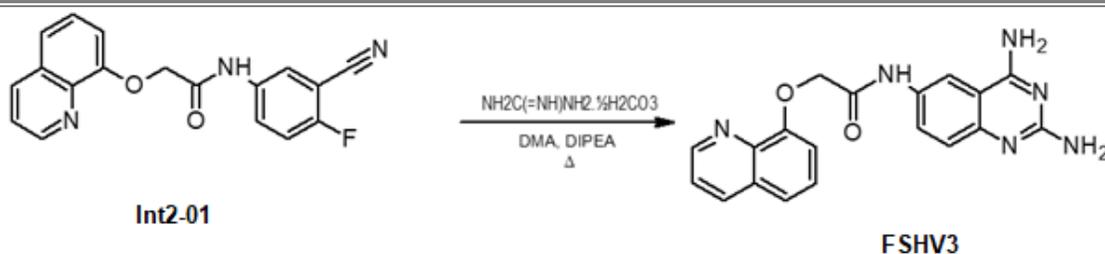
a campo alto debido a que la contribución de ese sustituyentes negativa al carbono que se encuentra unido directamente a él, de igual forma se identificó al carbono del carbonilo el cual se encuentra a campo bajo, y el metileno alfa al carbonilo se encuentra desplazado a mayores partes por millón debido a que es que éste se encuentra cercano a un grupo GEA . En la región de 110-170 se observaron los carbonos aromáticos presentes en el sustituyente (3,4-diclorofenol) y del benceno polisustituido. De igual forma en el espectro de RMN-¹H se identificaron señales en el **Int2-10** a H3 como un doble de dobles con una $J_{meta-para} = 4.9$ y 1.4 Hz, los protones H13 y H14 no se logran distinguir como dobles de dobles debido a la presencia del flúor, éstos se observaron como un doblete tripleteado (H13) y triplete (H14) por la presencia del flúor.

Tabla AII.17 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **Int2-10**

Intermediarios	Método analítico y señales
<div style="text-align: center;">  <p>Int2-10</p> </div>	<p>Espectro 1.46, IR FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3363,3120 (Ar-NH-C=OR), 2232 (C≡N), 1291, 1177 (R₂C=O_{arom}), 1589, 1459 (C=C_{arom}), 1265, 1177 (R-O-R_{arom}), 3120, 3060 (C-H_{arom}).</p> <p>Espectro 1.47, RMN ¹H (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 7.93 [(H-3), dd, $J = 4.9, 1.4$ Hz, 1H], 8.13 [(H-13), ddd, $J = 7.3, 5.0, 1.5$ Hz, 1H], 7.54 [(H-14), t, $J = 7.7$ Hz, 1H], 8.75 [(H-4), s, 1], 4.80 [(H-6), s, 2H], 7.32 [(H-8), d, $J = 1.4$ Hz, 1H], 7.50 [(H-11), d, $J = 7.5$ Hz, 1H], 7.04 [(H-12), dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H].</p> <p>Espectro 1.48, RMN ¹³C (400 MHz TMS, dms_o-d₆, δ en ppm): 159.63 (C-1), 99.93 (C-2), 127.19 (C-3), 166.58 (C-5), 67.31 (C-6), 157.12 (C-7), 116.94 (C-8), 131.53 (C-9), 123.71 (C-10), 130.97 (C-11), 113.85 (C-12), 127.11 (C-13), 117.19 (C-14), 116.98 (C-15), 135.54 (C-16).</p>

Por otra parte, se detallaron los singuletes correspondientes al grupo amino y al metileno los cuales se caracterizaban debido a que el H4 se encontraba desplazado a campo bajo (mayores ppm) con respecto del otro, así como el número de protones para los que este integraba. Finalmente, lo que respecta al 3,4-diclorofenol las señales H8 y H11 se identificaron como dobletes el primero con un $J_{meta} = 1.4$ Hz y el segundo como una $J_{orto} = 7.5$ Hz, por último, se identificó como un doble de dobles a H8 con una constante de acoplamiento *orto-meta* (ver Anexo II **Espectro 1.47**).

II.2.2.18 Síntesis de FSHV3



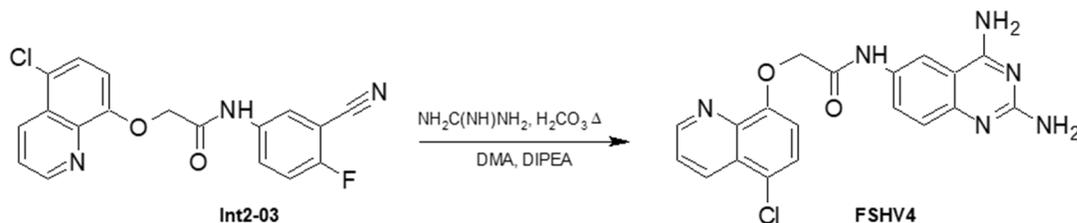
En un matraz de bola de 50 mL se adicionó 1.500 g (0.00469 mol) de **Int2-02** con 1.057 g de carbonato de guanidina (2.5 eq. ó 0.0117 mol) a esto en conjunto se le añadieron 15 mL de DMA anhidra con un magneto, por último, se añadió 1.012 mL de diisopropil etil amina (DIPEA) ó 50% en peso con respecto a **Int2-02**. Adaptándole un serpentín con septum para su calentamiento bajo atm de N₂. La temperatura a la cual comenzó a calentar fue alrededor de 130°C, aproximadamente se dejaba 18h en calentamiento. La reacción se plaqueó por CCF cada 2 h, a las 8 h transcurridas se observó en placa la formación de 3 productos del cual uno coincidía con **FSHV3** por lo que se dejó reaccionar 3 h adicionales del cual se observó que se conservaba el mismo patrón observado en la placa cromatográfica anteriormente mencionada. Ésta misma se probó por calentamiento asistido por microondas, para poder comparar la eficiencia de ambos métodos en términos de rendimiento y tiempo de reacción. Debido a que estas 3 manchas se encontraban muy cerca se prosiguió a la purificación por cromatografía sólido-líquido. Obteniendo un rendimiento de 0.615 g (41%) del producto **FSHV3** con un *R_f* 0.91 (Sistema II) y un punto de fusión de 173.8 °C -174.5 °C.

Tabla AII.18. Condiciones probadas en la metodología asistida por microondas.

Test M.M. ²	Int2-01 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	4.33	850	3	60	130	5	50	41.0
2	4.33	850	3	80	145	5	55	41.0
Test/ M.C. ³	Int2-01 (mmol)	Tiempo de calentamiento (min)		Temperatura (°C)		DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)	
3	4.69	1080		130°C		50	64.9	

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.²M.M.: Método asistido por microondas M.C.: Método convencional

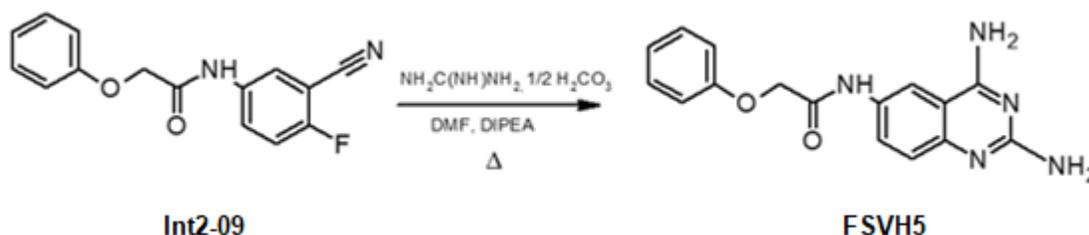
II.2.2.19. Síntesis de **FSHV4**



Se colocó 1.500 g (0.00412 mol) de **Int2-02** en un matraz bola de boca esmerilada 24/40 de 50 mL adicionándole 0.9278 g de carbonato de guanidina (2.5 eq. ó 0.0102 mol) a esto en conjunto se le añadieron 15 mL de DMA anhidra poniéndolo en agitación vigorosa, por último,

a la mezcla se le añadió 1.012 mL de DIPEA al cual se le adaptó un serpentín con septum para su calentamiento bajo atm de N₂. La temperatura a la cual comenzó a calentarse fue alrededor de 130°C, aproximadamente se dejaba 12-18h en calentamiento. La reacción se plaqueó por CCF cada 2 horas, a las 8 h transcurridas se observó en placa la formación de 3 productos del cual uno coincidía con **Int2-02** por lo que se dejó reaccionar 3 h adicionales del cual se observó que se conservaba el mismo patrón observado en la placa cromatográfica, debido a que estas 3 manchas se encontraban muy cerca se prosiguió a la purificación por cromatografía sólido-líquido. El rendimiento de 0.55 g (36.66%) del producto **FSHV4** con un *R_f* 0.77 (Sistema II) y un punto de fusión de 165.0°C-166.8°C.

II.2.2.20 Síntesis de **FSHV5**



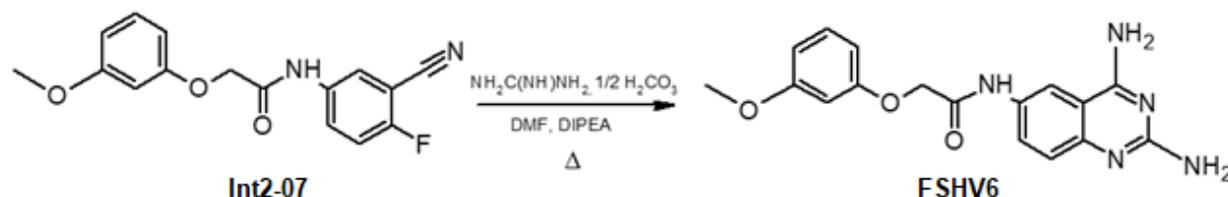
Para la síntesis del intermediario **FSHV10** se siguió la metodología **II.1.2.19.**; se obtuvo un rendimiento de 23.7%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un *R_f* 0.37 (Sistema II) con un punto de fusión de 153.7-155.3°C.

Tabla AII.19 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV1

Test	Int2-09 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	3.70	850	3	60	130	5	50	51.5
2	3.70	850	3	80	145	5	55	51.5

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

II.2.2.21 Síntesis de **FSHV6**



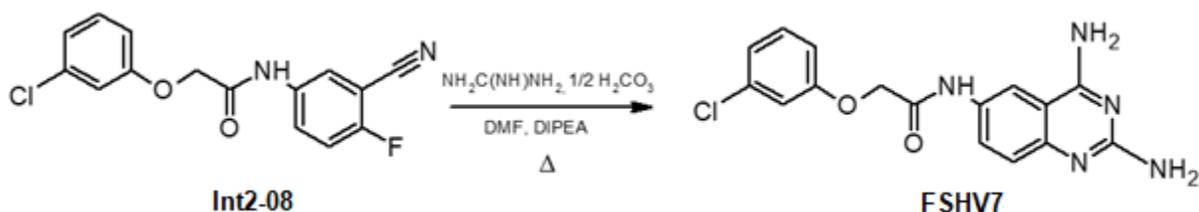
Para la síntesis del intermediario **FSHV6** se siguió la metodología descrita en subsecciones previas; se obtuvo un rendimiento de 28.7%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café que mostró solo una mancha en CCF con un *R_f* 0.82 (Sistema II) con un punto de fusión de 301.9-302.9°C.

Tabla AII.20 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV6

Test	Int2-07 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	3.33	850	3	60	130	5	50	55.6
2	3.33	850	3	80	145	5	55	55.6

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

II.2.2.22 Síntesis de FSHV8



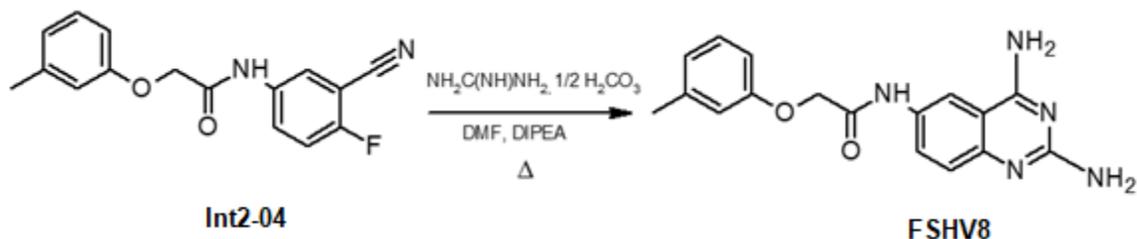
Para la síntesis del intermediario **FSHV7** se siguió la metodología anteriormente reportada.; se obtuvo un rendimiento de 35.7 %, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.35 (Sistema II) con un punto de descomposición 239.8°-240.7°C.

Tabla AII.21 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV7

Test	Int2-08 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	3.58	850	3	60	130	5	50	63.8
2	3.58	850	3	80	145	5	55	63.8

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

II.2.2.23 Síntesis de FSHV8



En un vial G30 de borosilicato para microondas, se vertió 1 g (0.0032 mol) del **Int2-04**, 0.7922g (0.0088 mol ó 2.5 Eq.) de carbonato de guanidina y 0.68 mL DIPEA (al 50% en peso con respecto a la materia prima) disuelta en DMF anhidra, cerrando el vial con un tapón especial, colocándose en el rotor del microondas el cual posteriormente se introduciría al reactor del microondas. Una vez dentro, se establecieron distintas condiciones establecidas en las siguientes tablas. Transcurrido este tiempo la CCF mostró la conversión parcial al

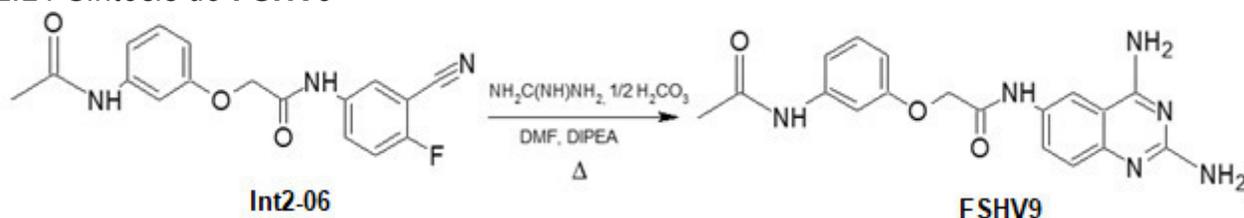
producto deseado, independientemente de las condiciones probadas. Por lo que prosiguió a verter la reacción en agua y hielo, observando la formación de un precipitado, al cual se prosiguió a filtrar al vacío. El sólido obtenido se purificó cromatografía en columna y/o en placa preparativa. Obteniéndose 0.4357 g (43.5%) de un sólido color crema el cual tenía un R_f 0.72 (Sistema II) y un punto de fusión de 134.7°C-136.3°C.

Tabla AII.22 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV8.

Test	Int2-04 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	8.8	850	3	20	95	5	50	20.5
2	8.8	850	3	20	115	5	50	36.1
3	8.8	850	3	20	125	5	50	43.7
4	8.8	850	3	20	130	5	50	61.9
5	8.8	850	3	20	140	5	55	61.9

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

II.2.2.24 Síntesis de FSHV9



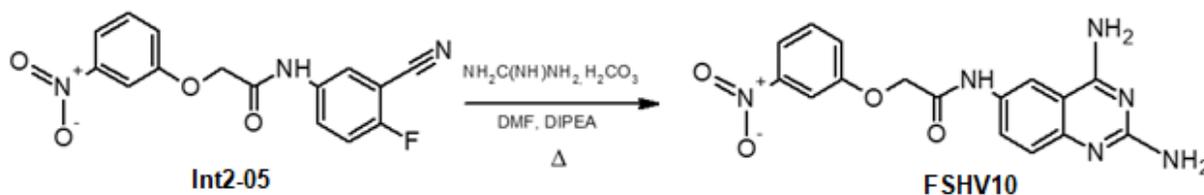
Para la síntesis del intermediario **FSHV9** se siguió la metodología **II.1.2.23.**; se obtuvo un rendimiento de 31.5%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.43 (Sistema II) con un punto de fusión de 139.3-140.8°C.

Tabla AII.23 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV9

Test	Int2-06 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	3.06	850	3	60	130	5	50	58.5
2	3.06	850	3	80	145	5	55	58.5

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar

II.2.2.25 Síntesis de FSHV10



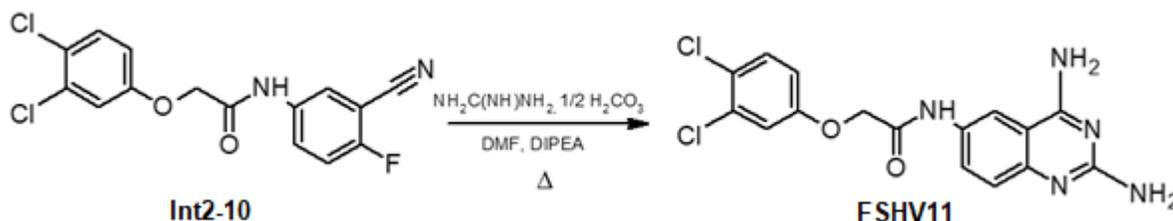
Para la síntesis del intermediario **FSHV10** se siguió la metodología **II.2.2.11.**; se obtuvo un rendimiento de 40.2%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color amarillo oscuro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.62 (Sistema II) con un punto de fusión de 178.2-179.9°C.

Tabla AII.24 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV10

Test	Int2-05 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	1.58	850	3	60	130	5	50	67.1
2	1.58	850	3	80	145	5	55	67.1

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

II.2.2.26. Síntesis de FSHV11



Para la síntesis del intermediario **FSHV11** se siguió la metodología descrita anteriormente; se obtuvo un rendimiento de 38.4%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido color café claro que mostró solo una mancha en CCF con un R_f 0.85 (Sistema II) con un punto de fusión de 122.3-124.8°C.

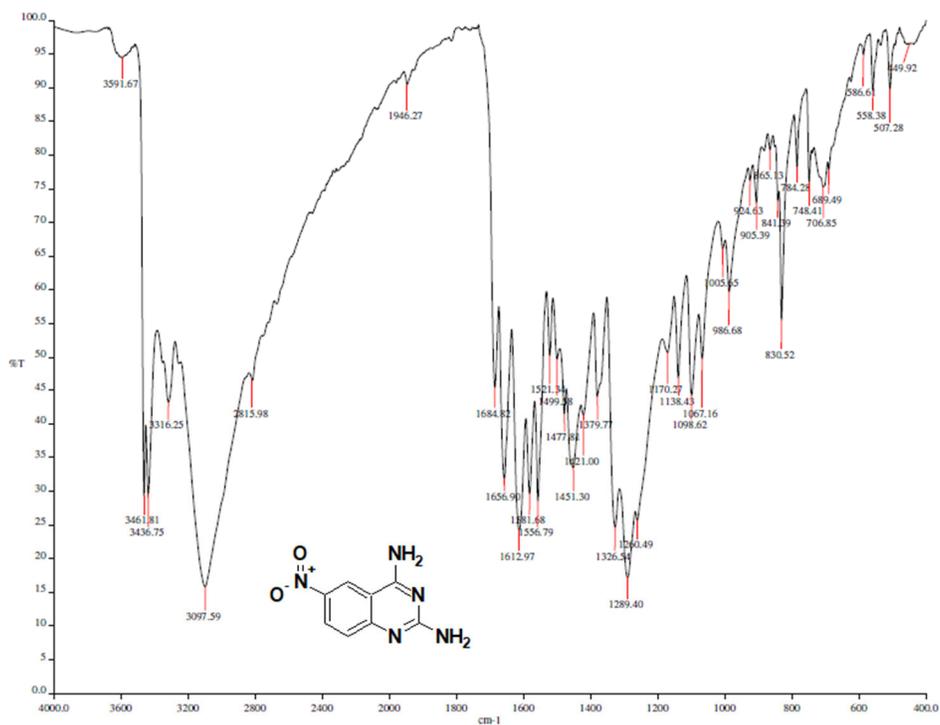
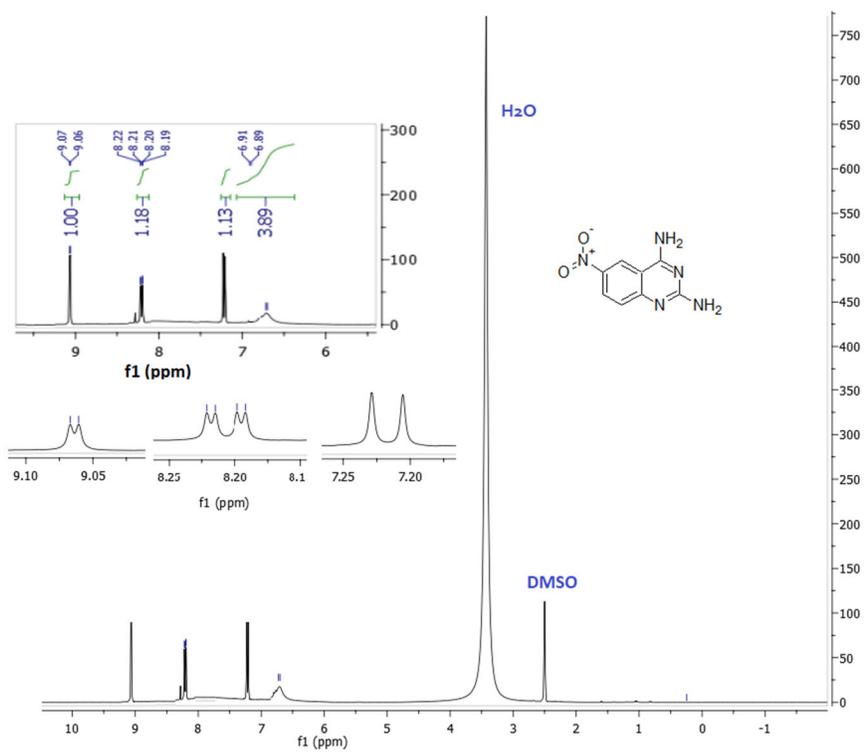
Tabla AII.25 Condiciones establecidas en la metodología asistida por microondas para la obtención FSHV11

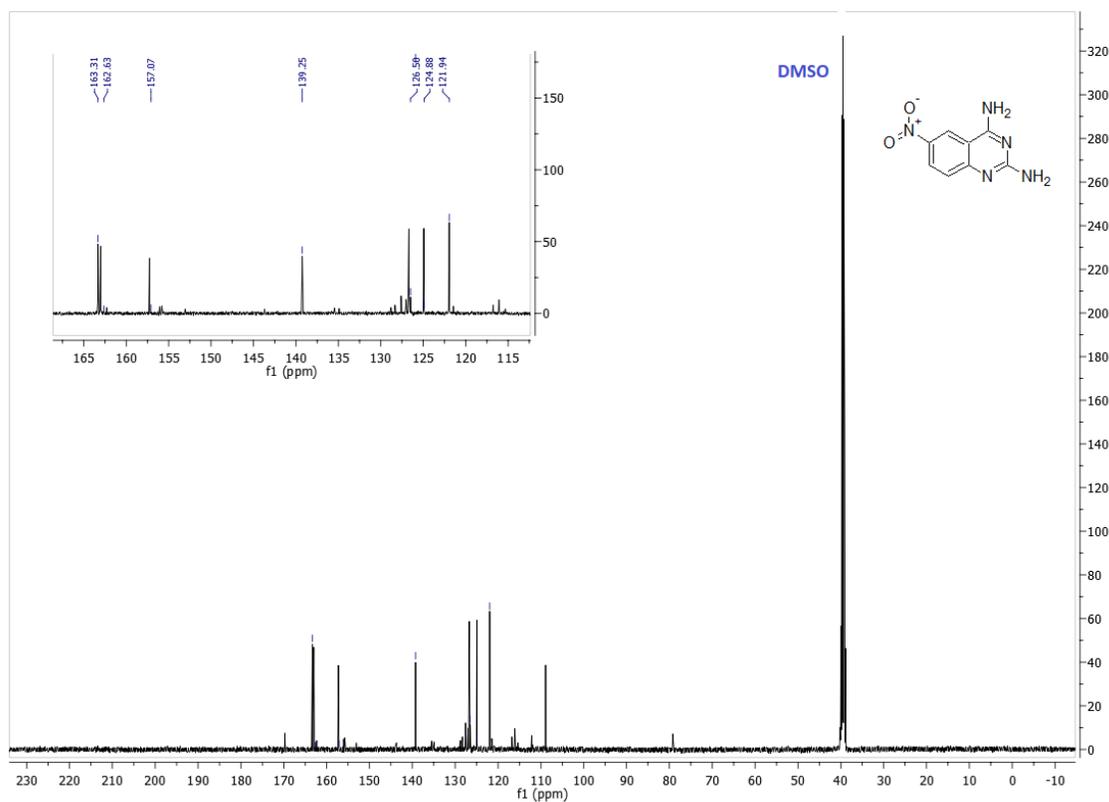
Test	Int2-10 (mmol)	Potencia (watts)	Rampa (min)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Enfriamiento (min)	DIPEA (%m/v)	Rendimiento crudo ¹ (%)
1	2.94	850	3	60	130	5	50	49.6
2	2.94	850	3	80	145	5	55	49.6

¹ El rendimiento que se reporta es de la mezcla de reacción a diferencia de lo que se reporta en el texto el cual es el que se obtiene después de purificar.

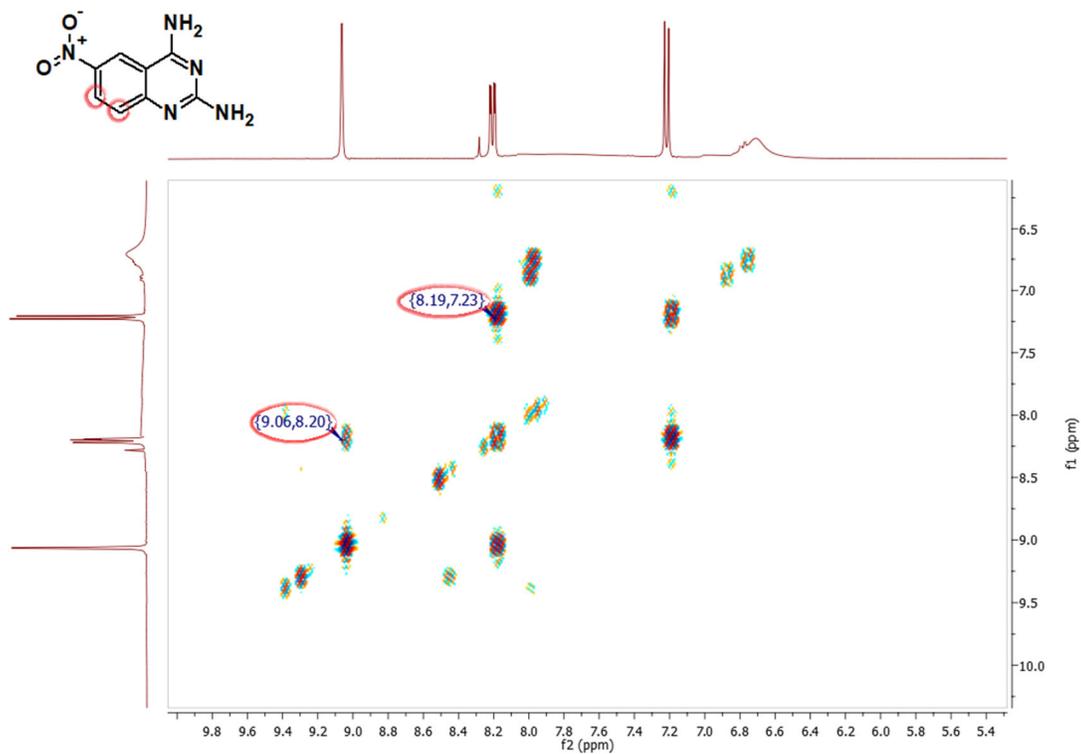
II.3 Espectros

II.3.1 Espectros de intermediarios

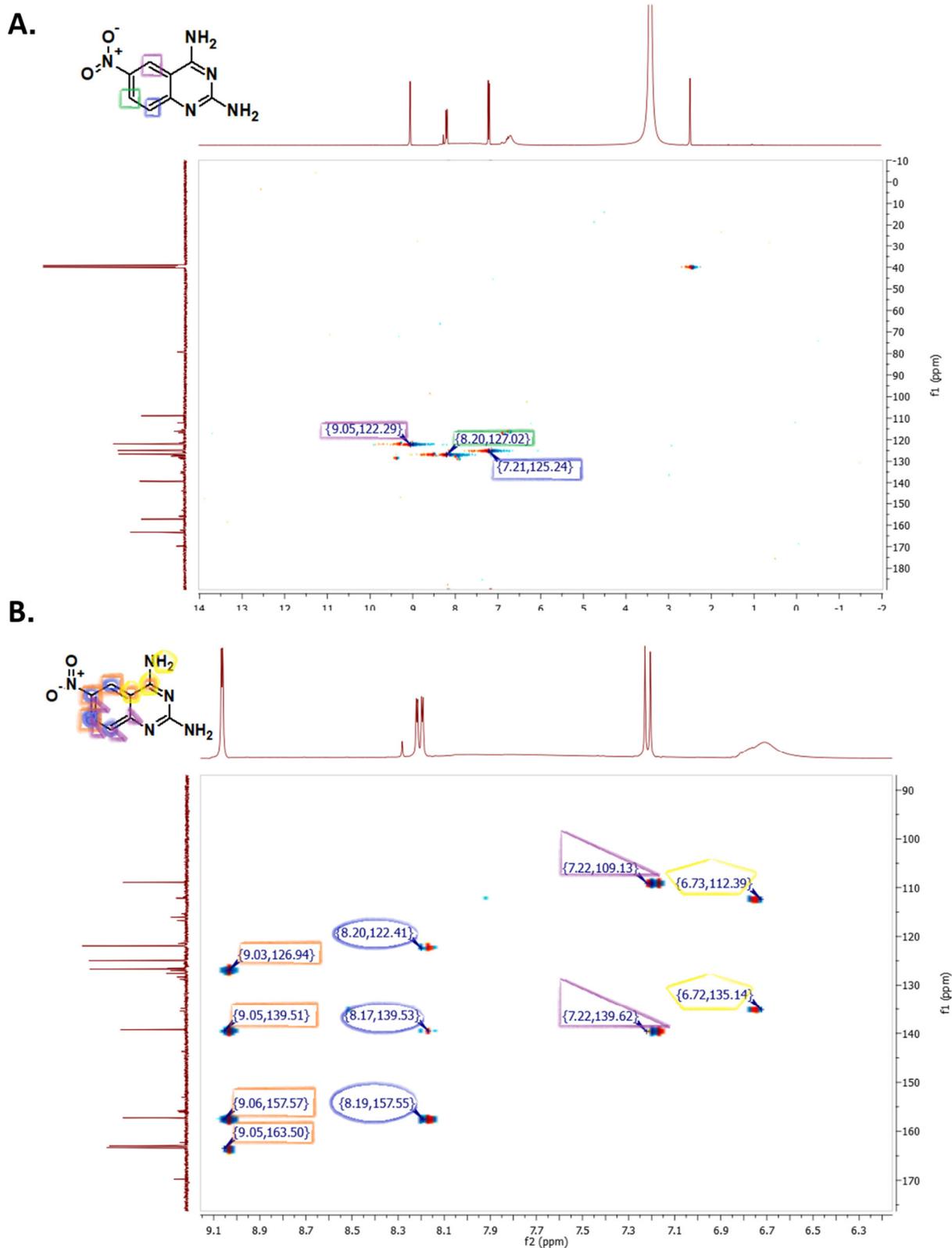
Espectro 1.1 IR cm⁻¹ de Int1-01Espectro 1.2 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int1-01

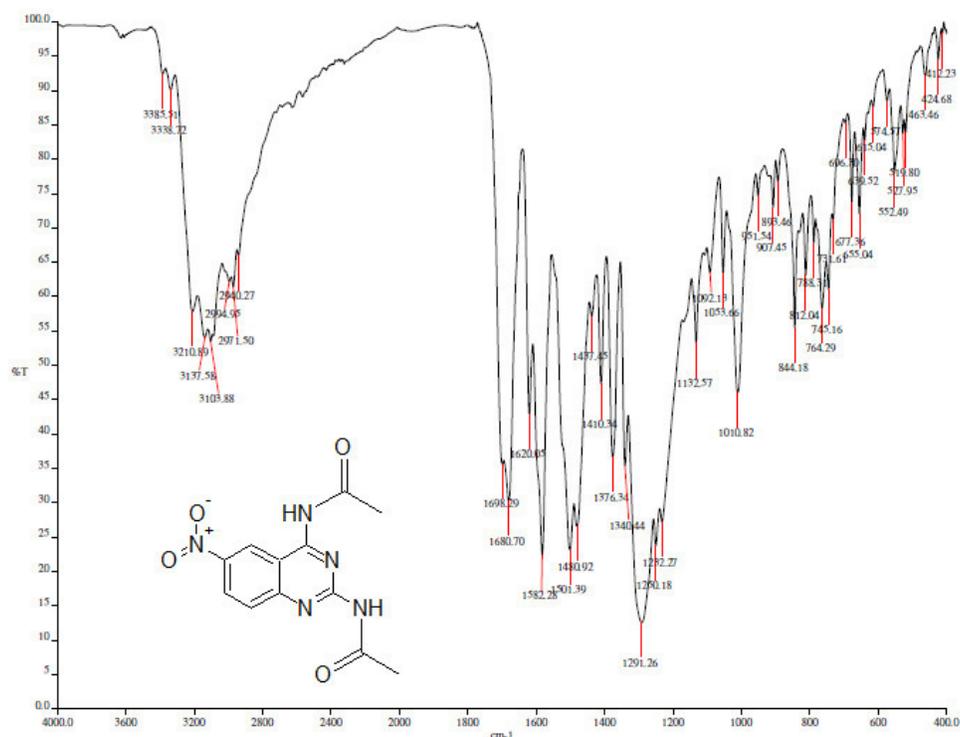
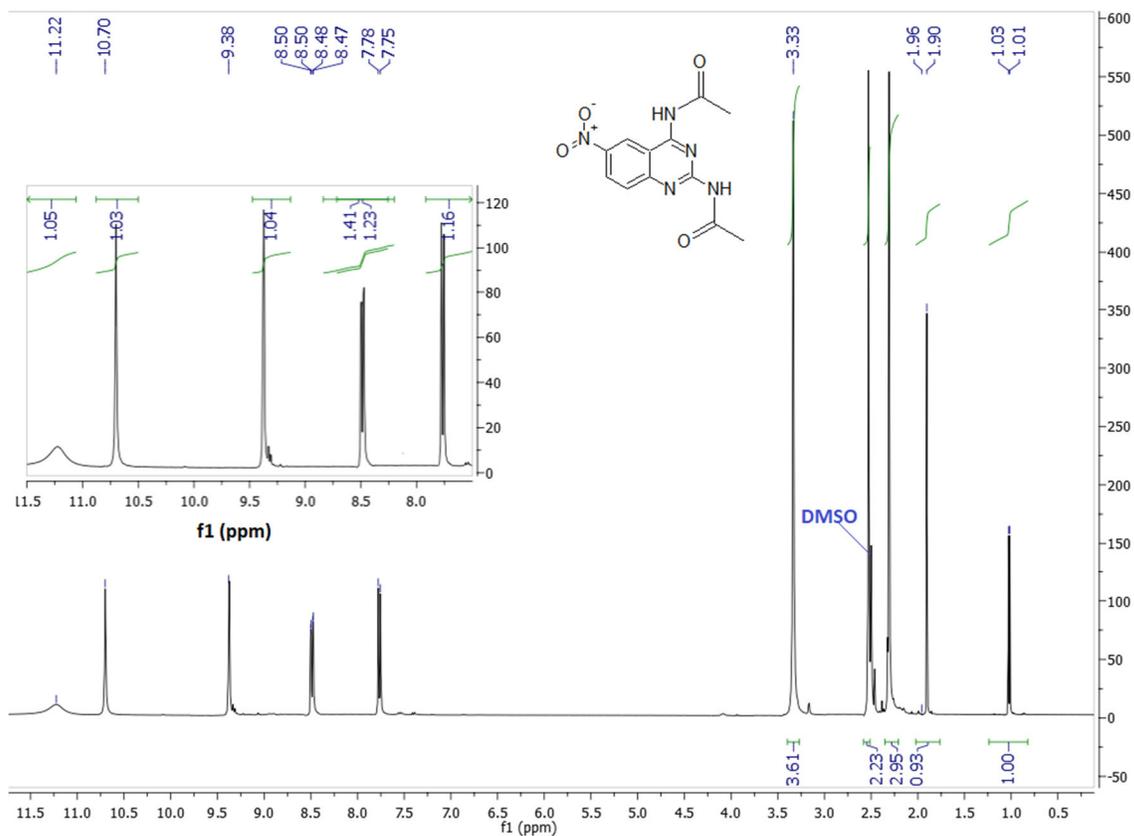


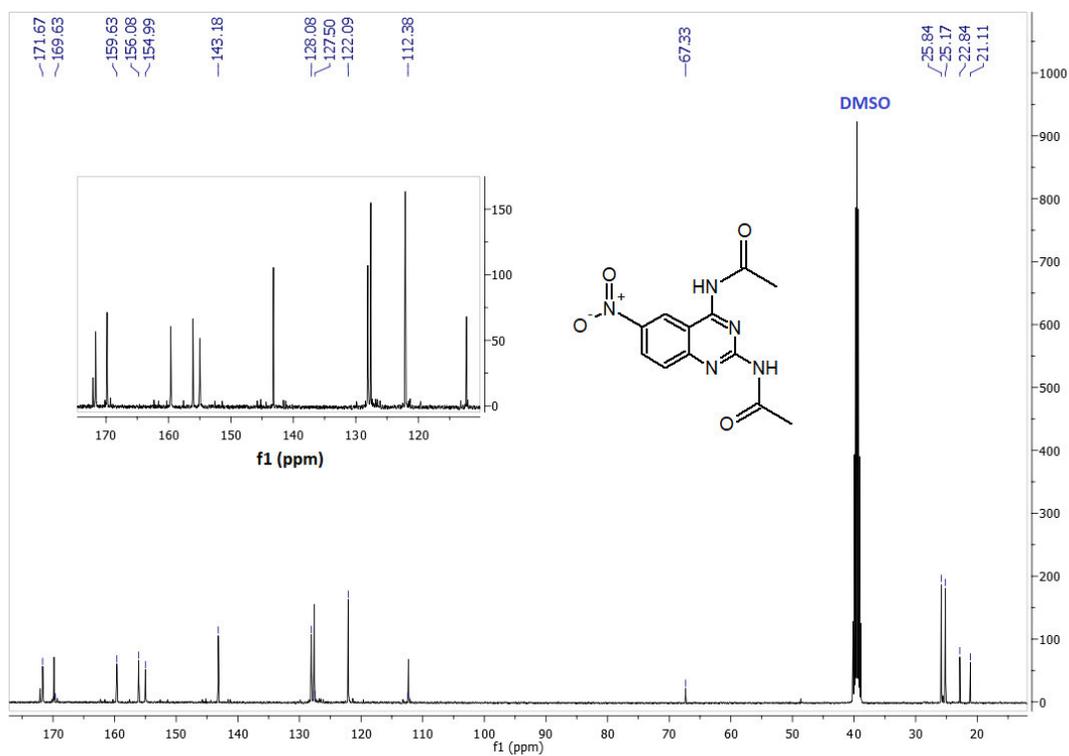
Espectro 1.3 RMN ^{13}C 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int1-01



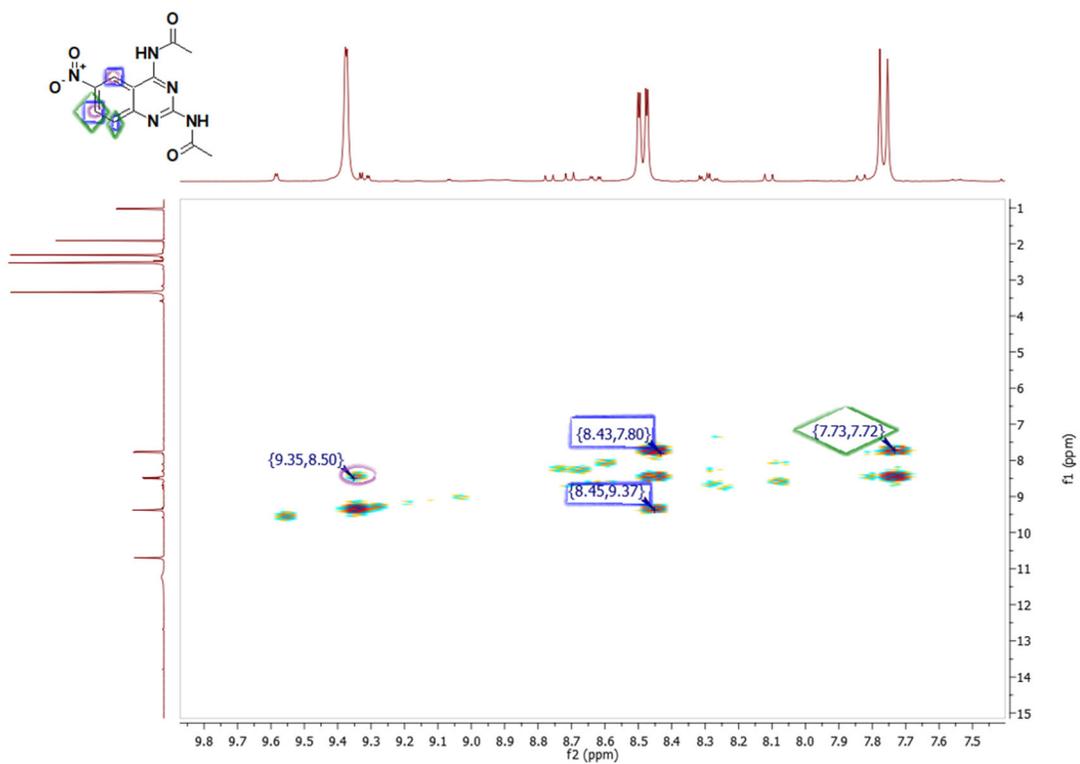
Espectro 1.4 RMN en 2D homonuclear COSY de Int1-01



Espectro 1.6 IR cm^{-1} de Int1-02Espectro 1.7 RMN ^1H 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int1-02

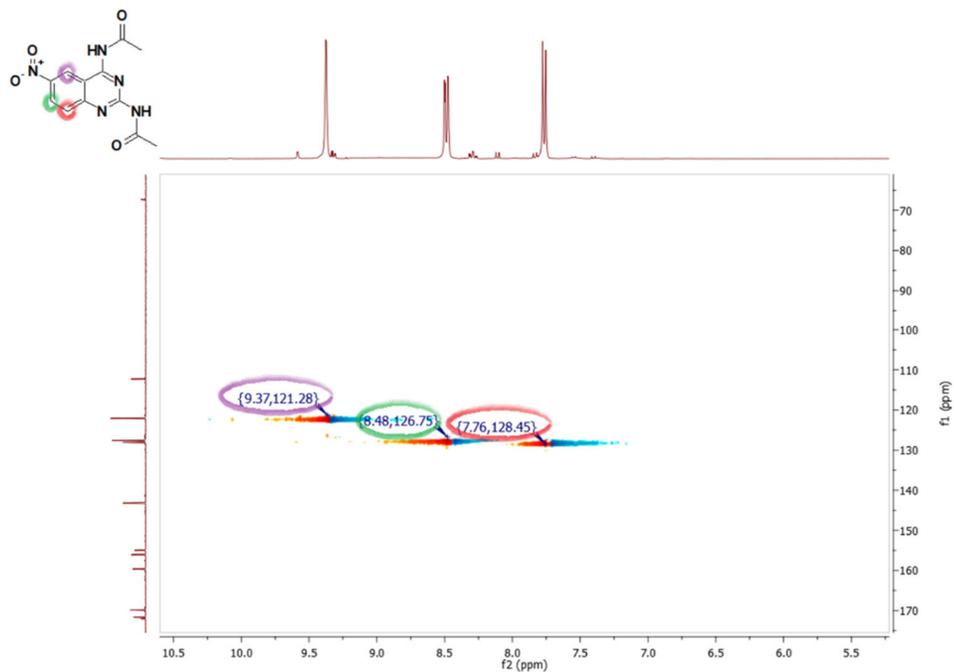


Espectro 1.8 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int1-02



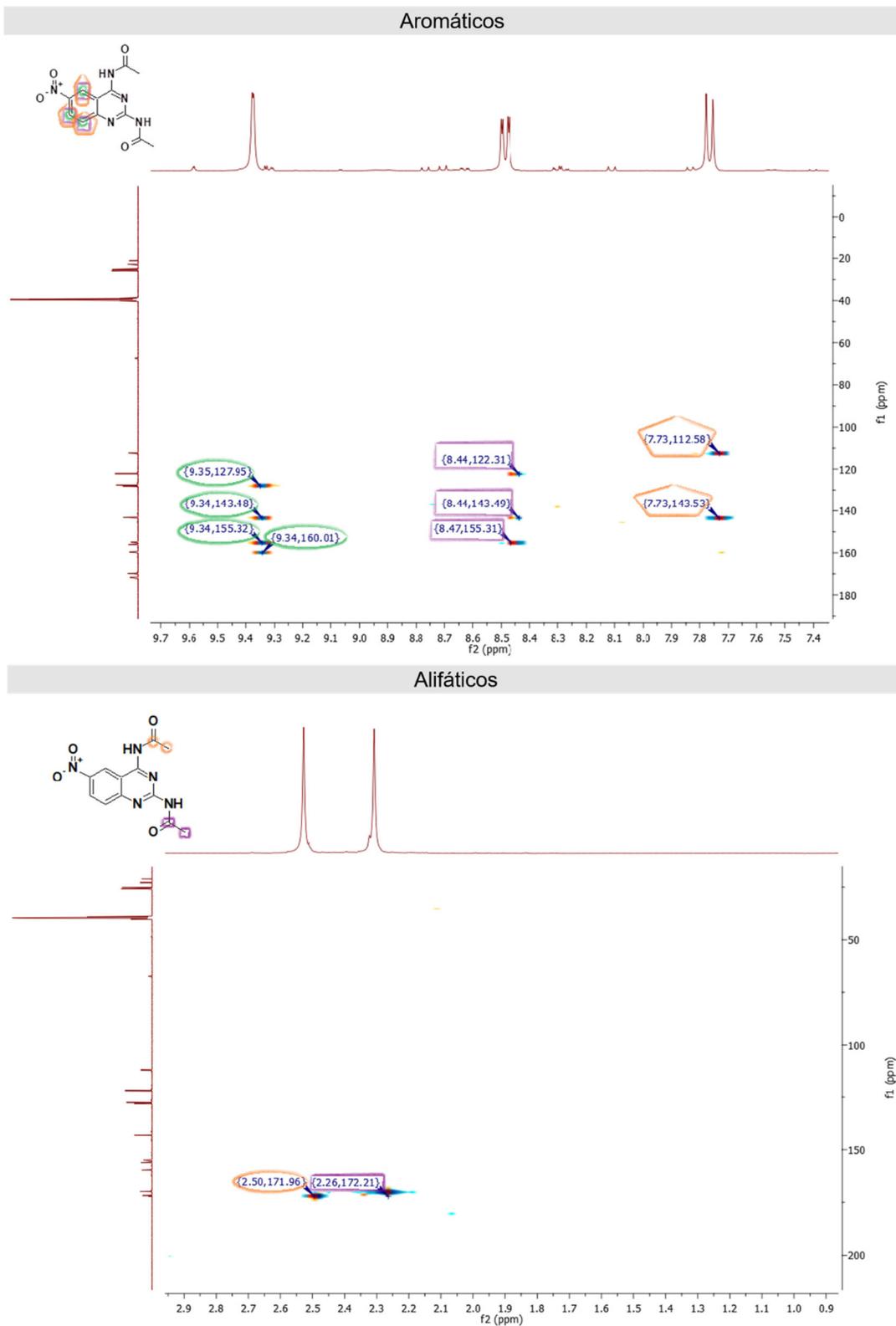
Espectro 1.9 RMN en 2D homonuclear COSY de Int1-02

A.

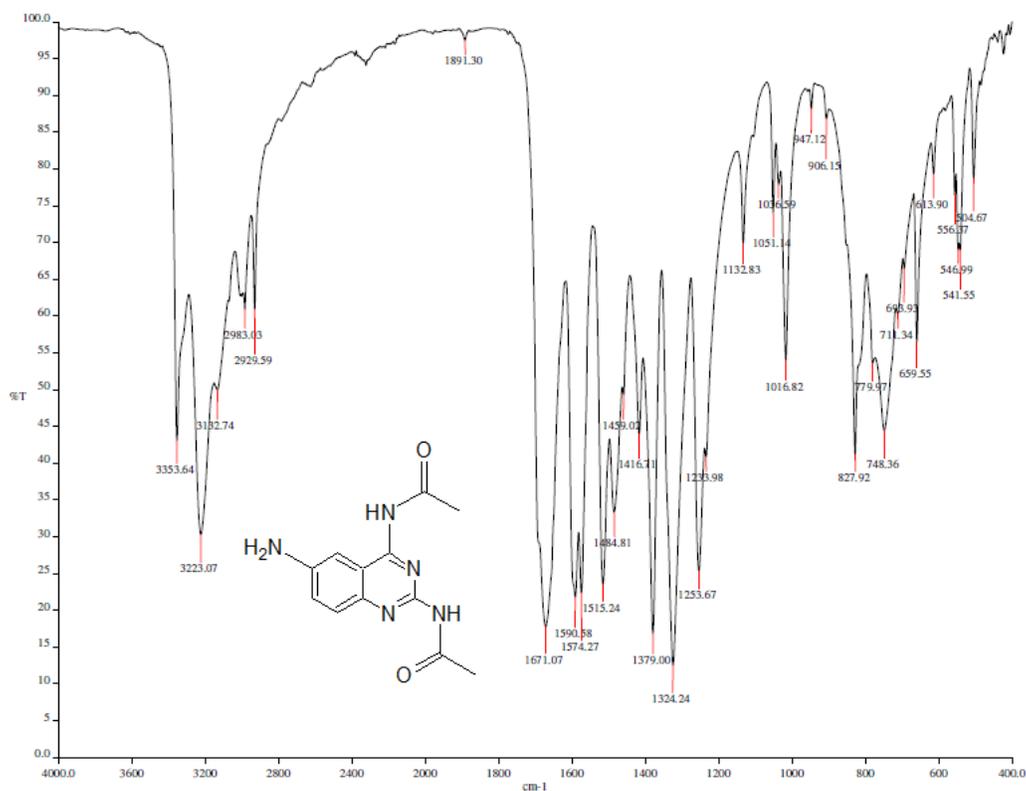
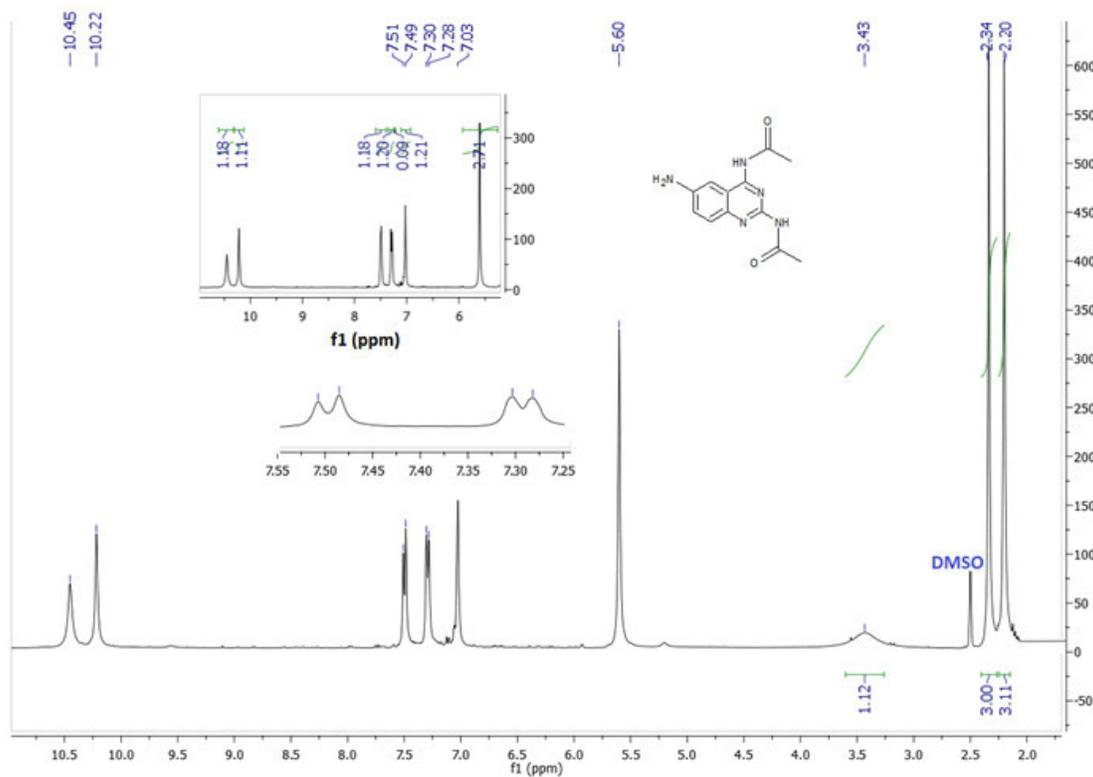


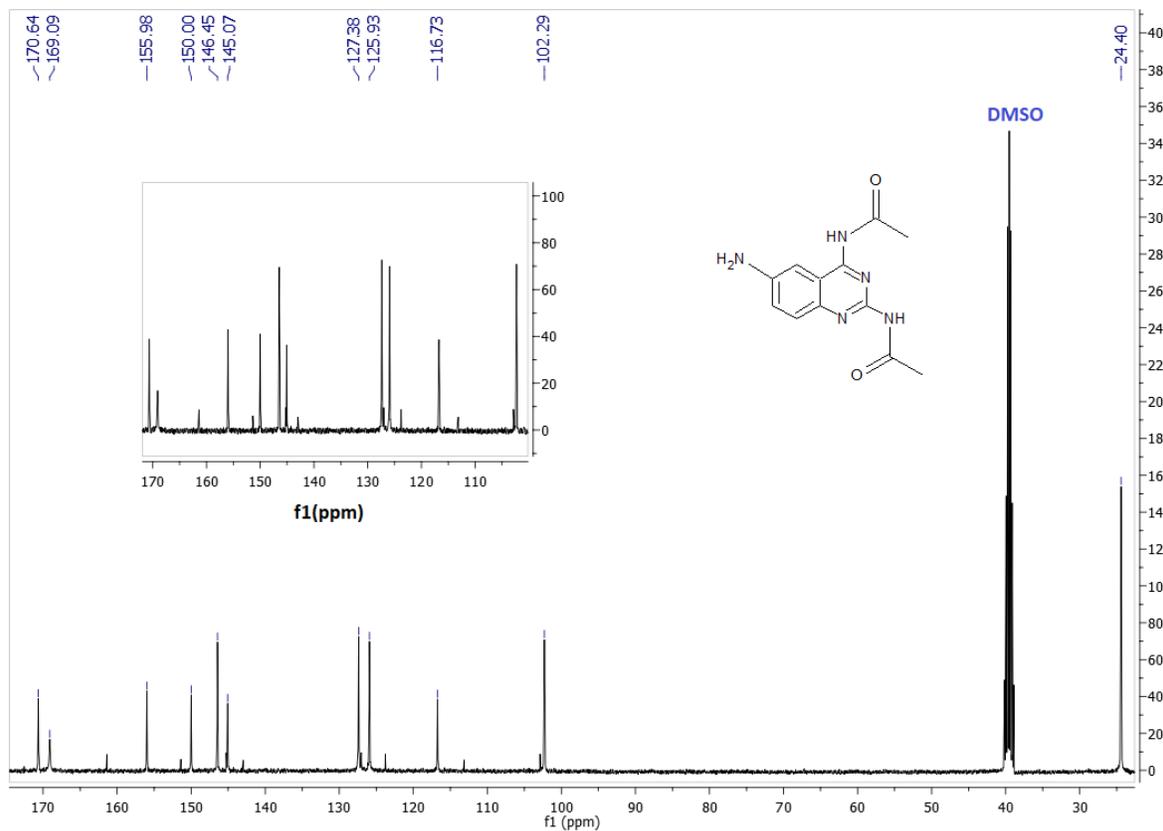
Espectro 1.10 RMN en 2D heteronucleares de Int1-02 A. Espectro HSQC

B.

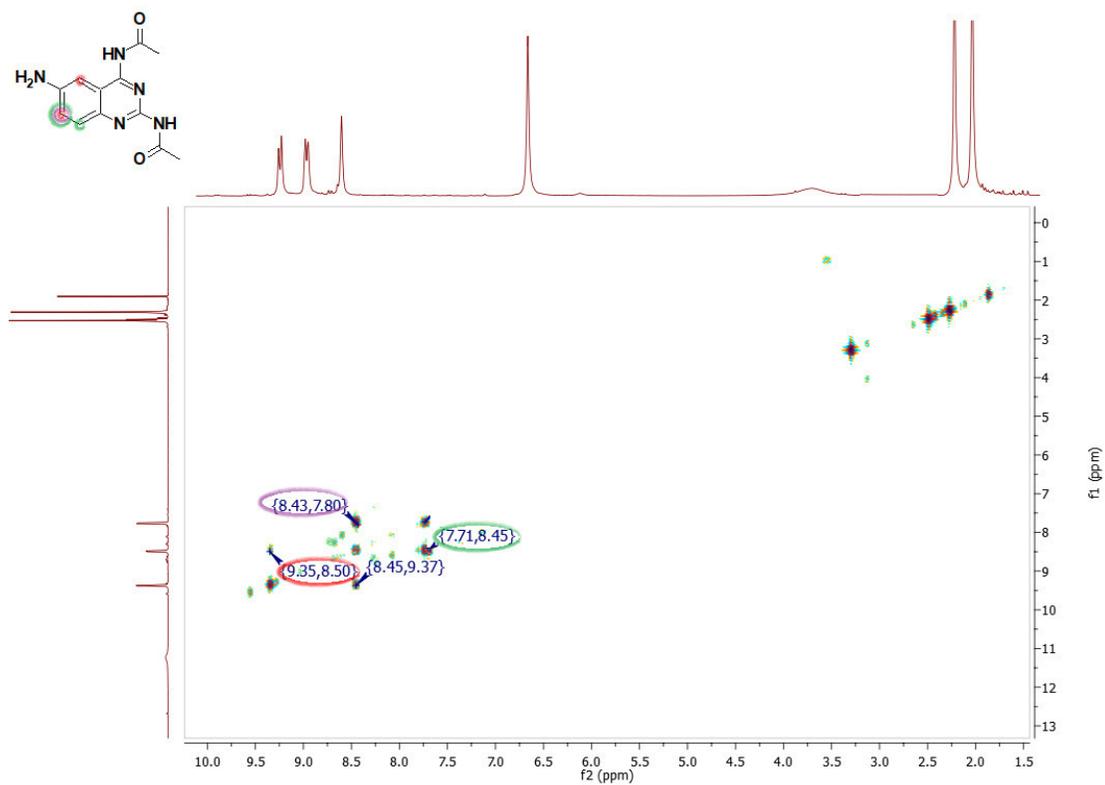


Espectro 1.10 RMN en 2D heteronucleares de Int1-02 B. Espectro HMBC especificando la región de aromáticos y alifáticos.

Espectro 1.11 IR cm⁻¹ de Int1-03Espectro 1.12 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int1-03

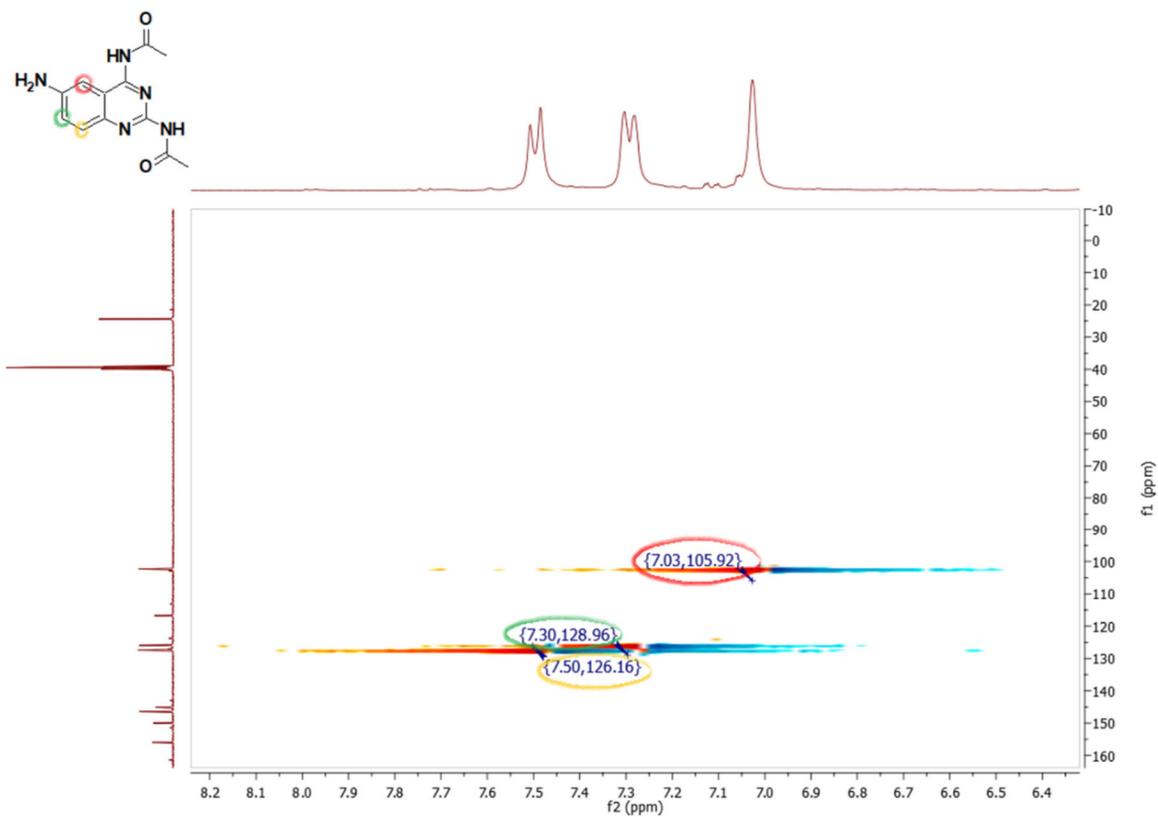


Espectro 1.13 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int1-03



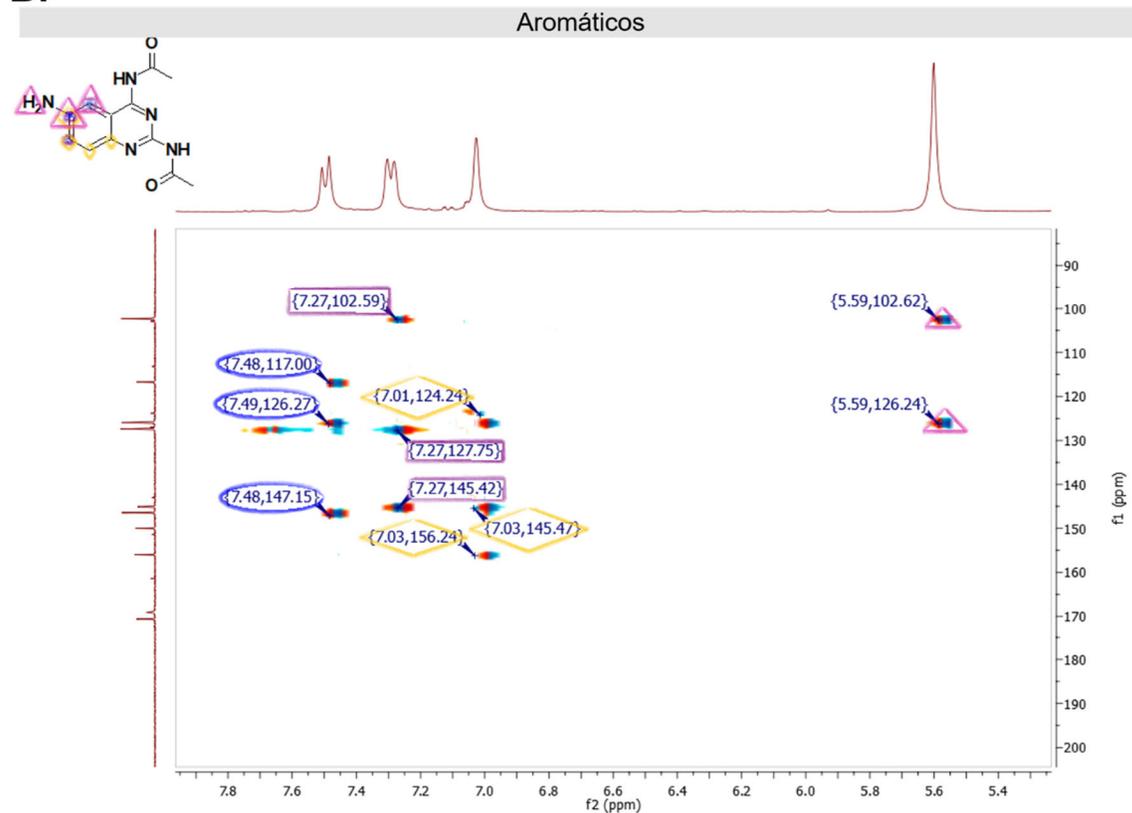
Espectro 1.14 RMN en 2D homonuclear COSY de Int1-03

A.

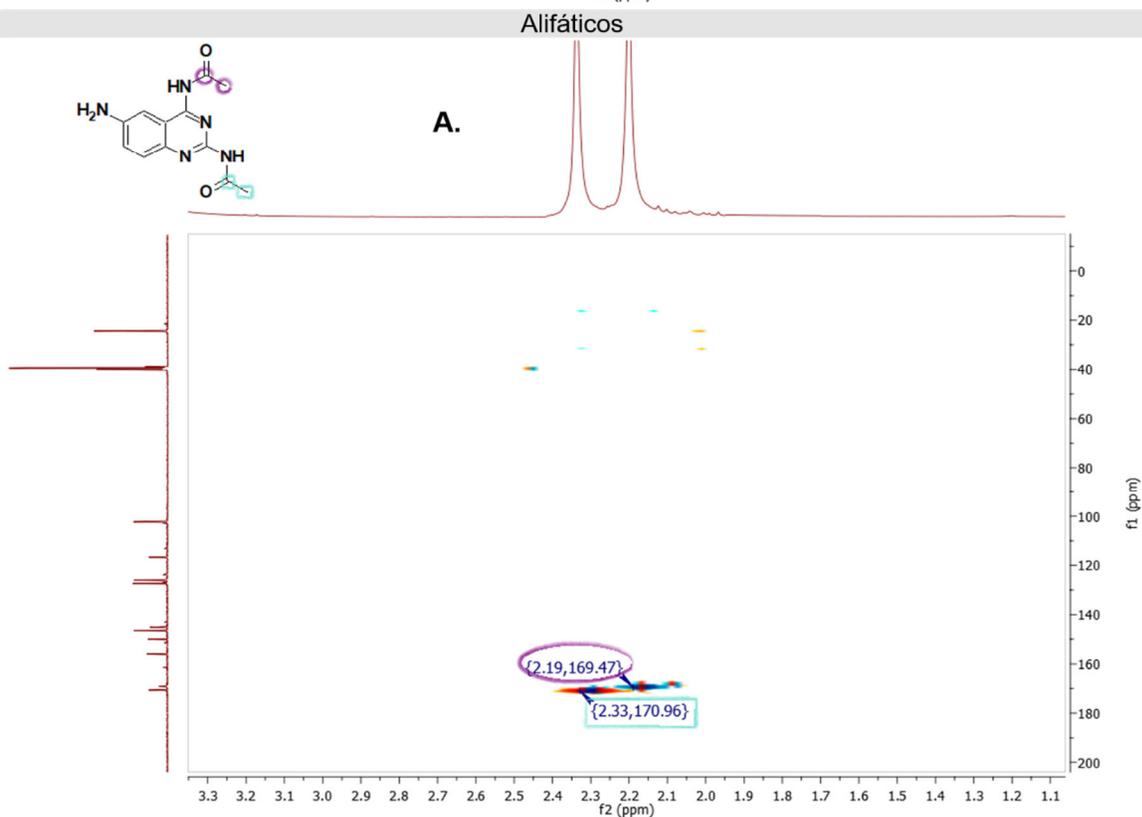


Espectro 1.15 RMN en 2D heteronucleares de **Int1-03** **A.** Espectro HSQC **B.** Espectro HMBC especificando la región de aromáticos y alifáticos.

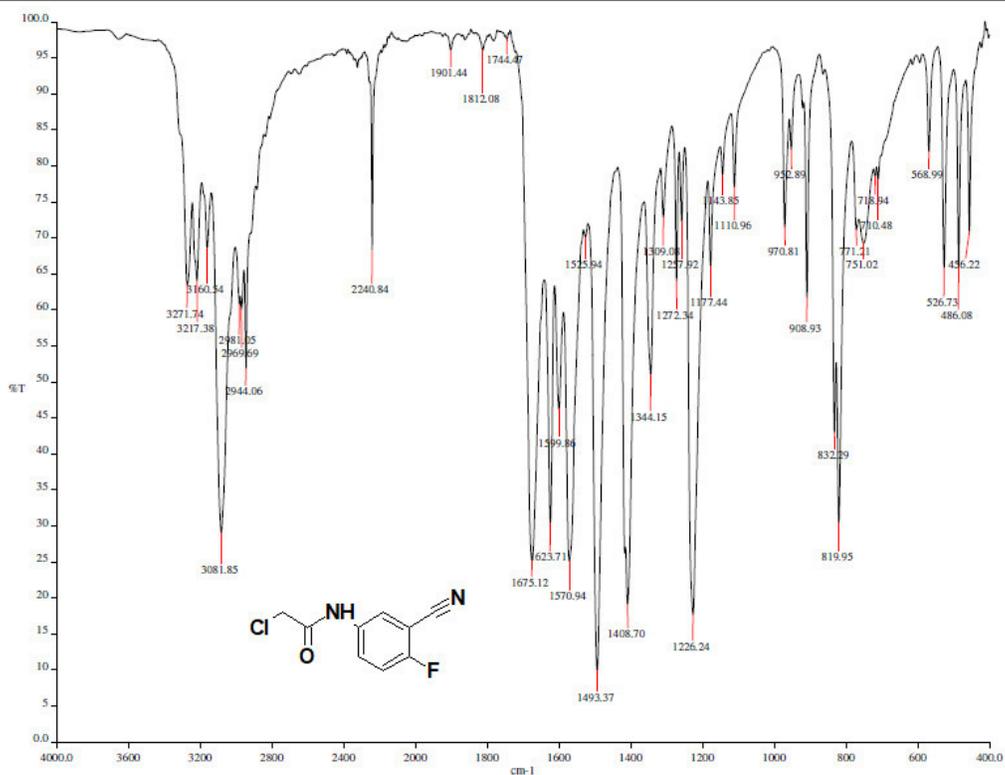
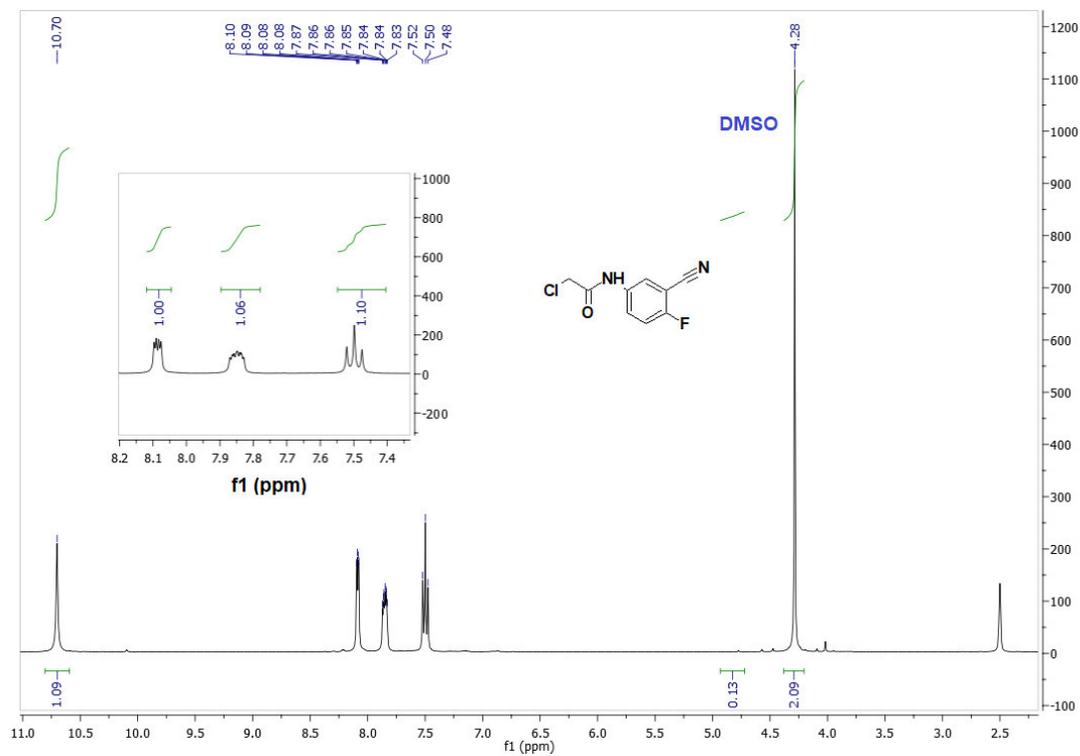
B.

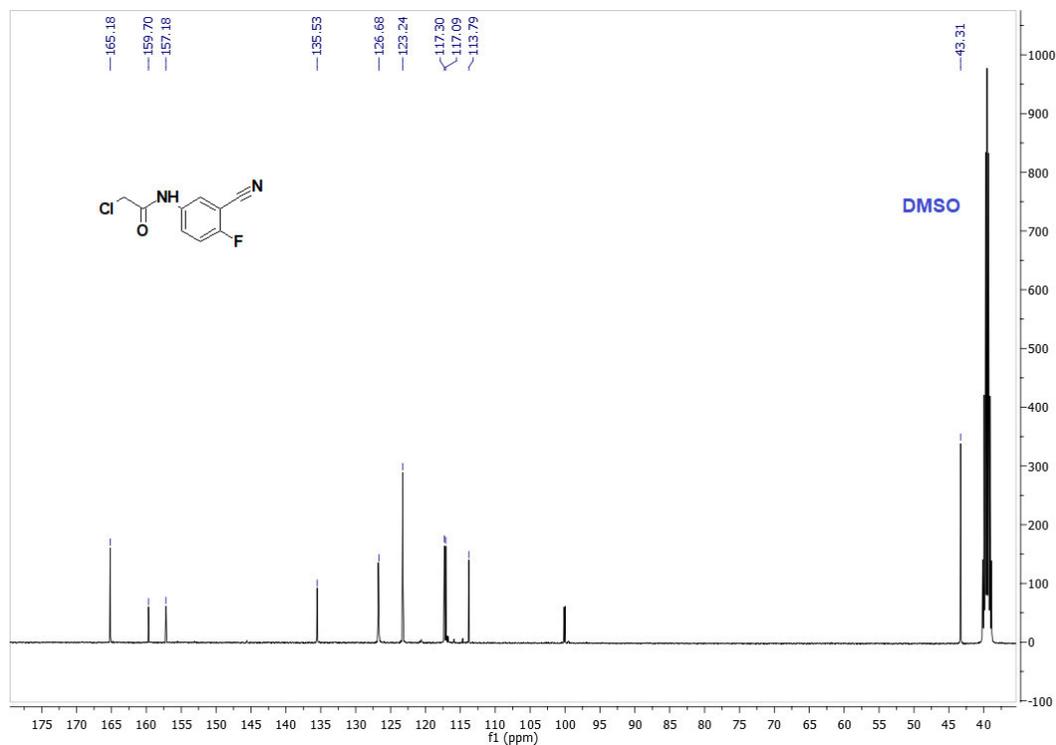


II.2

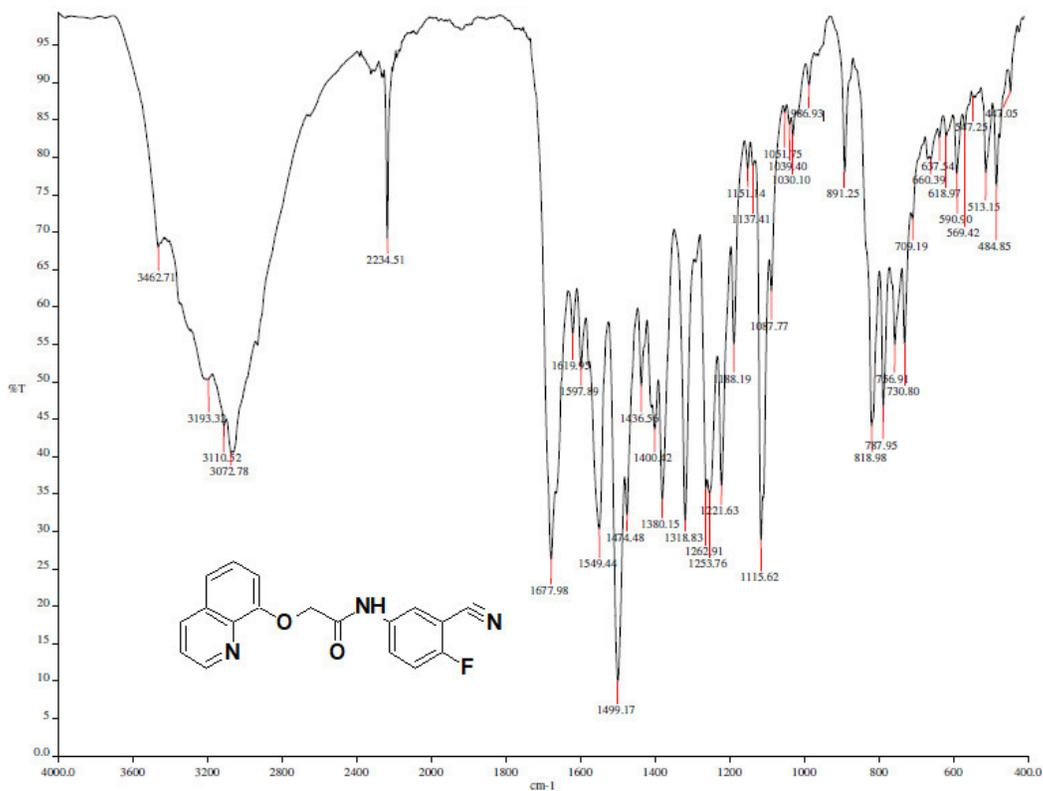


Espectro 1.15 RMN en 2D heteronucleares de **Int1-03** B. Espectro HMBC especificando la región de aromáticos y alifáticos.

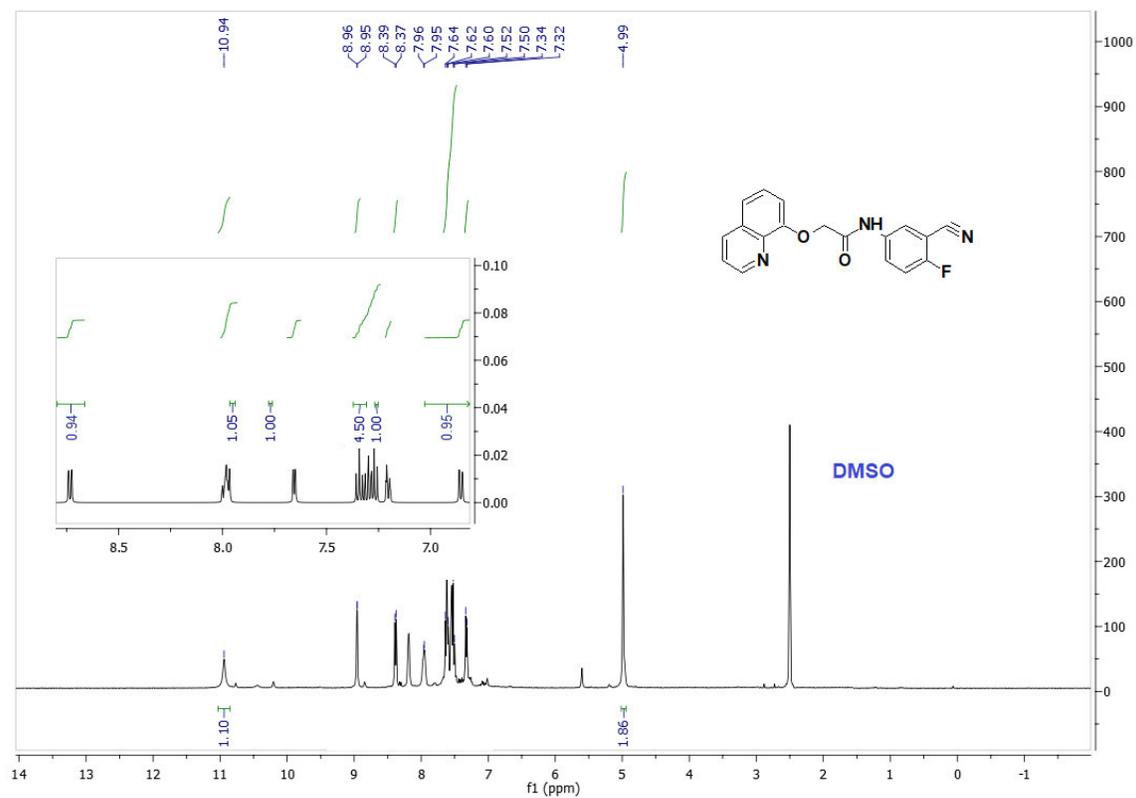
Espectro 1.16 IR cm⁻¹ de Int2-00Espectro 1.17 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-00



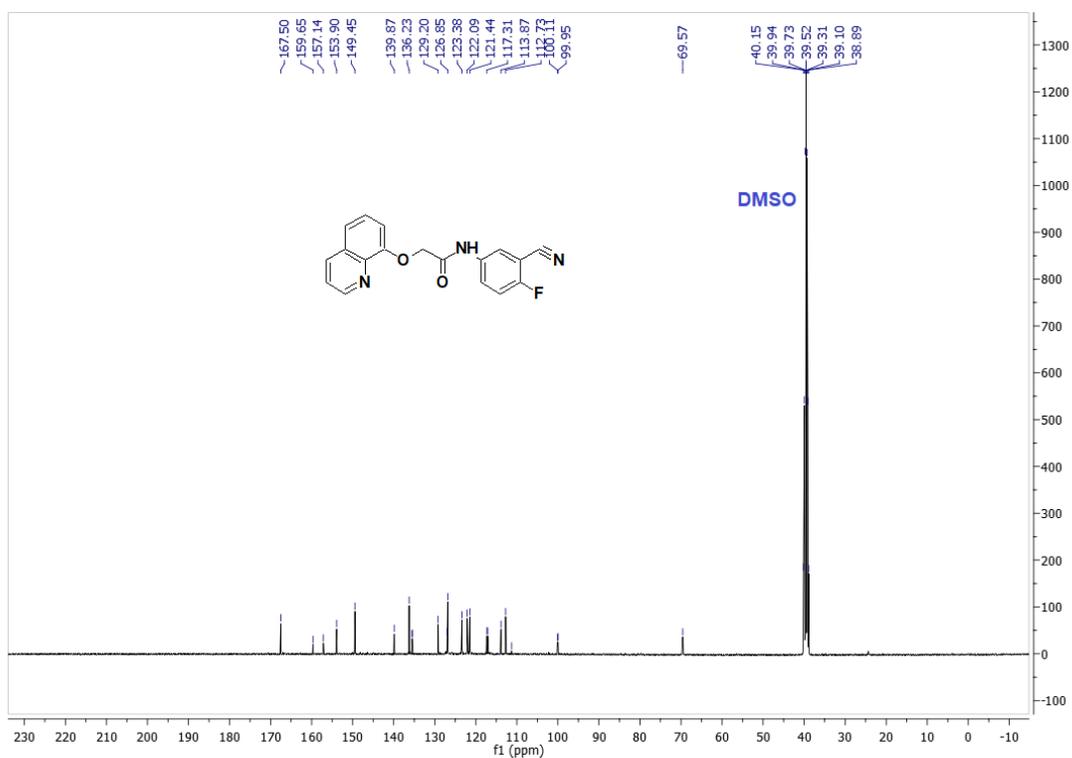
Espectro 1.18 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-00



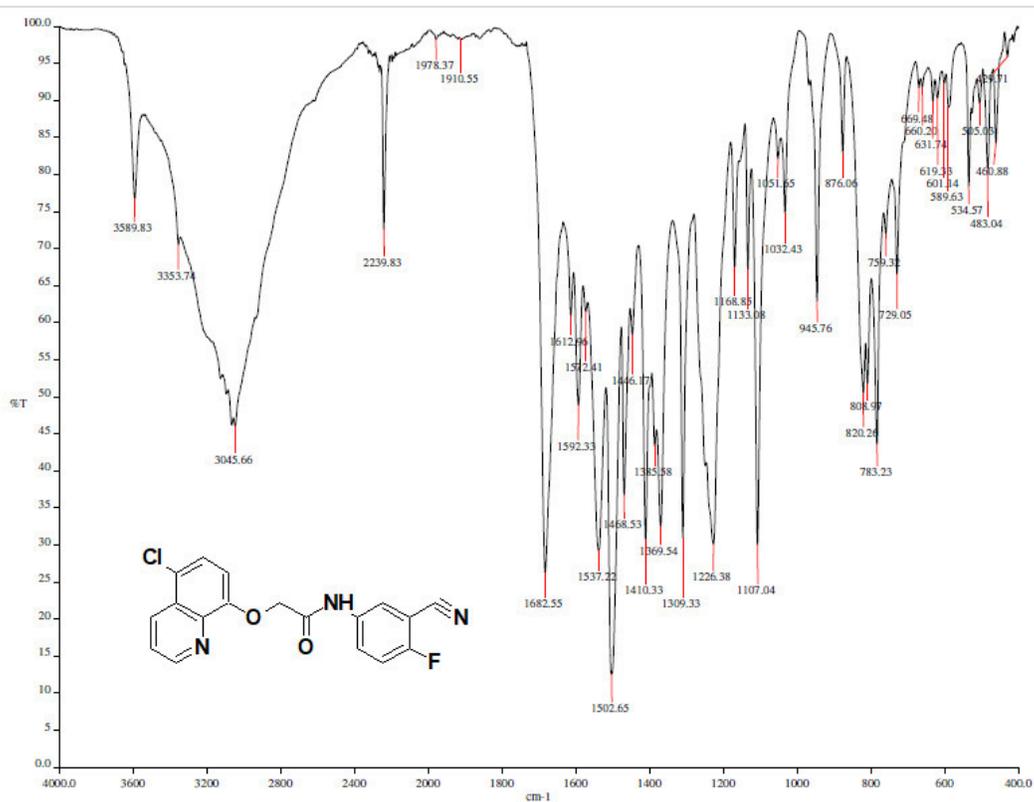
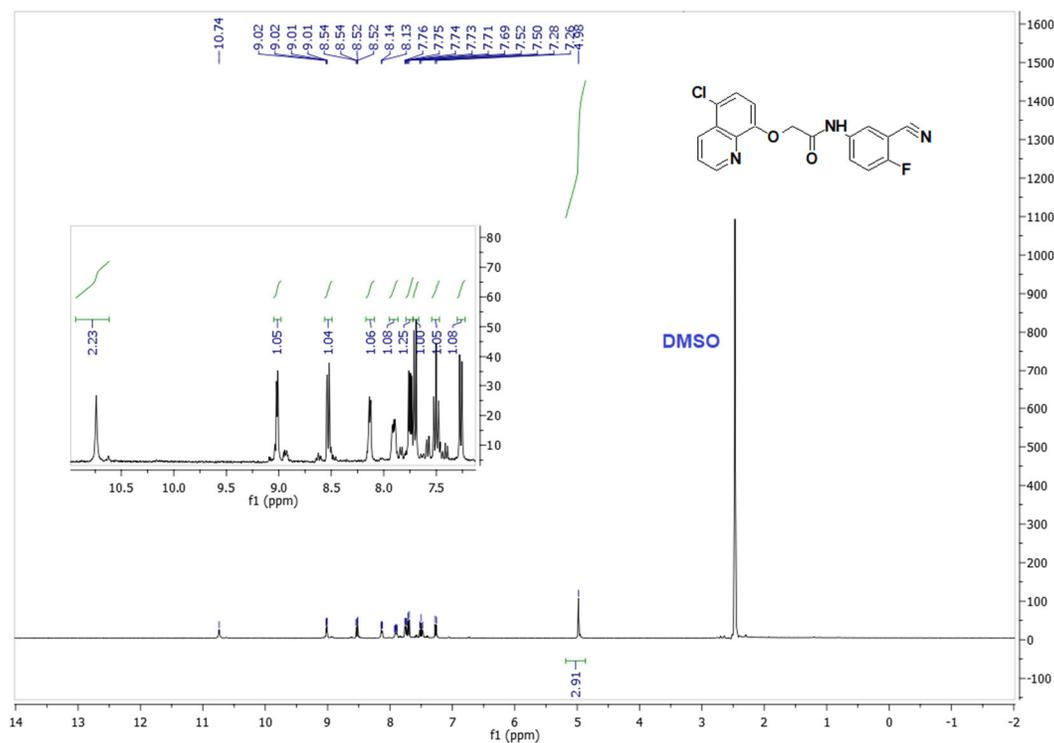
Espectro 1.19 IR cm $^{-1}$ de Int-01

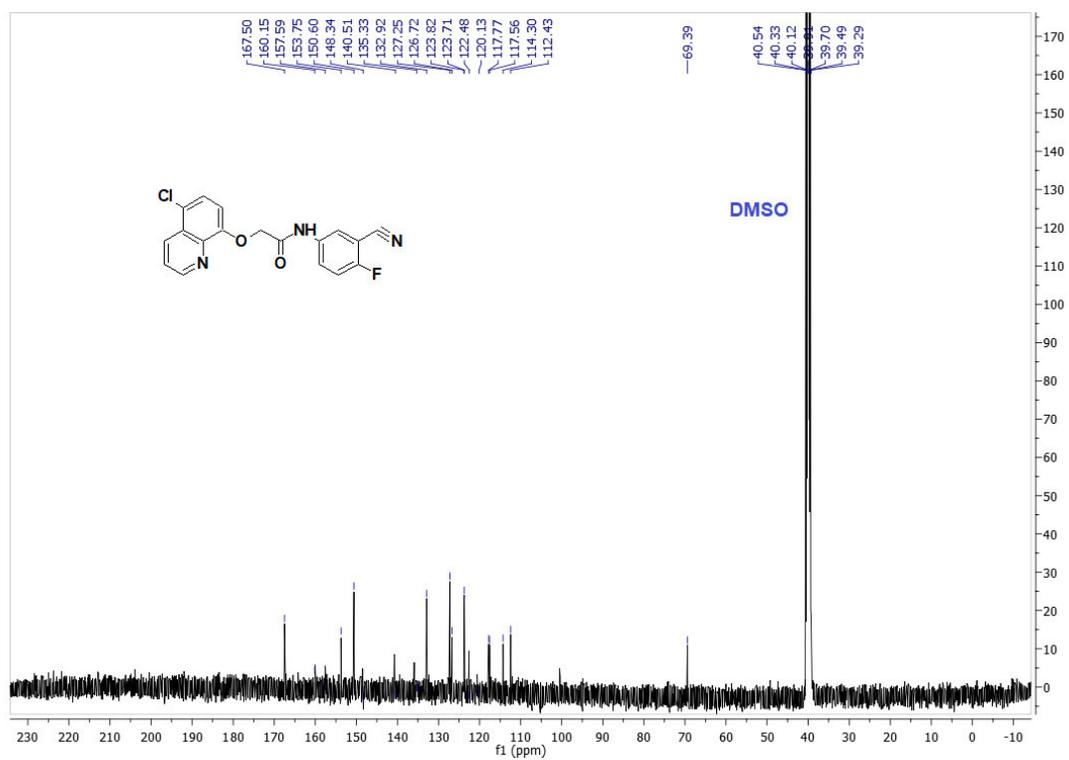
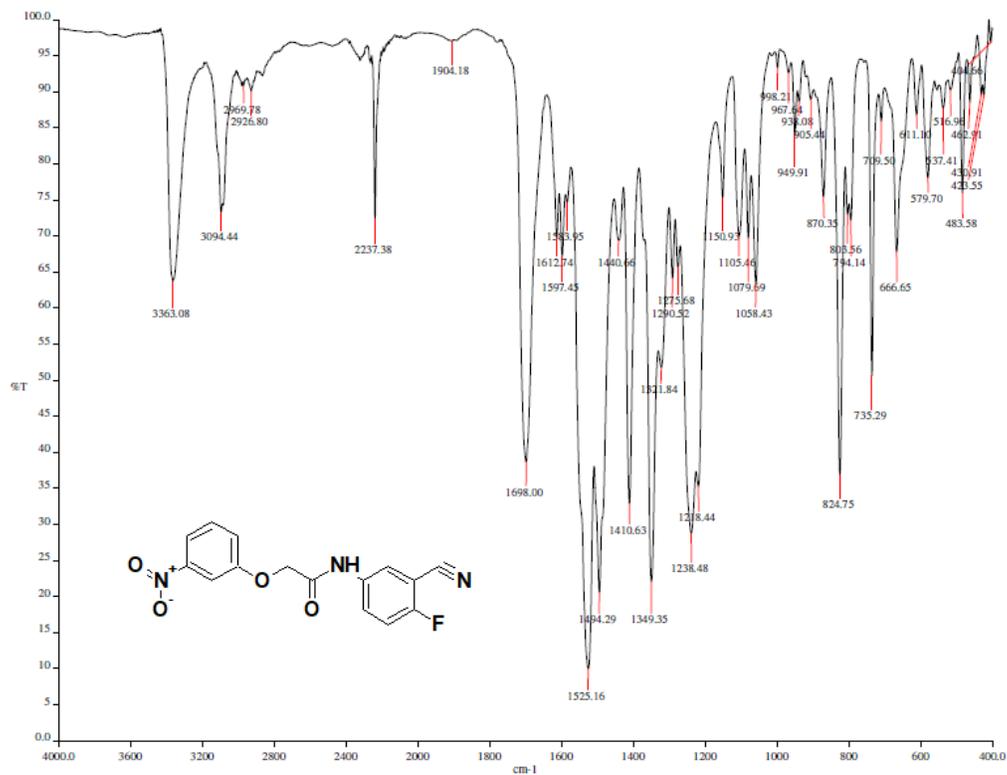


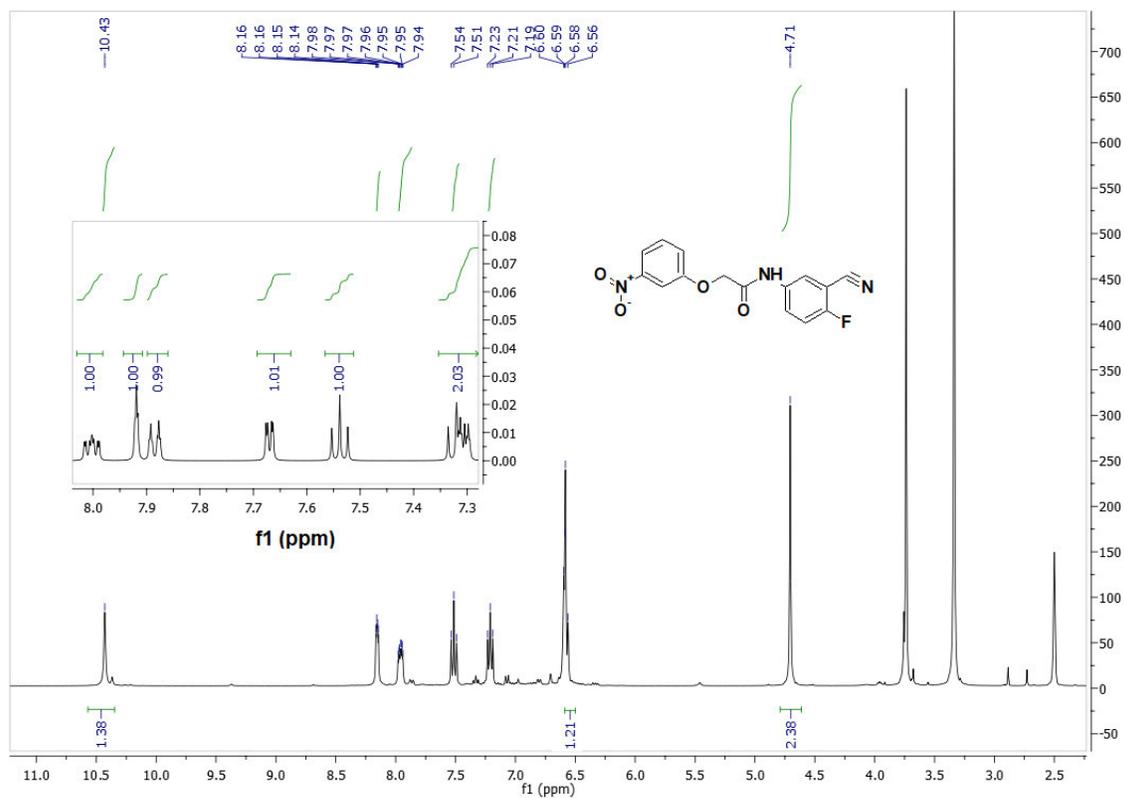
Espectro 1.20 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-01



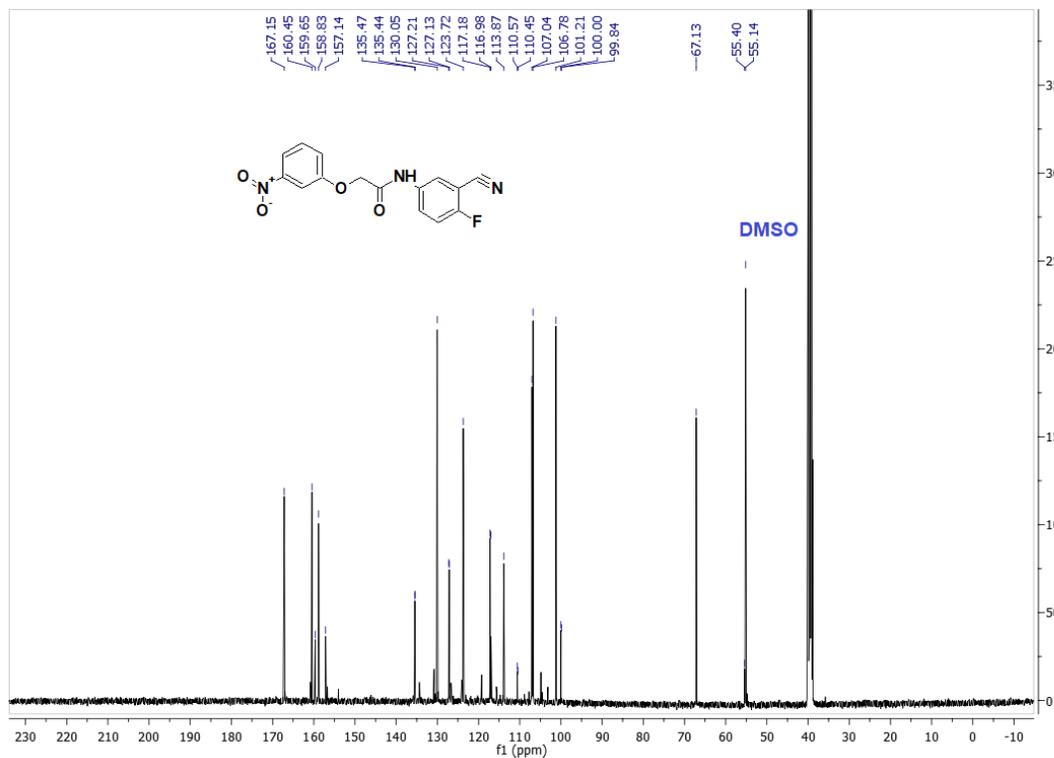
Espectro 1.21 RMN ¹³C 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-01

Espectro 1.22 IR cm⁻¹ de Int2-02Espectro 1.23 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-02

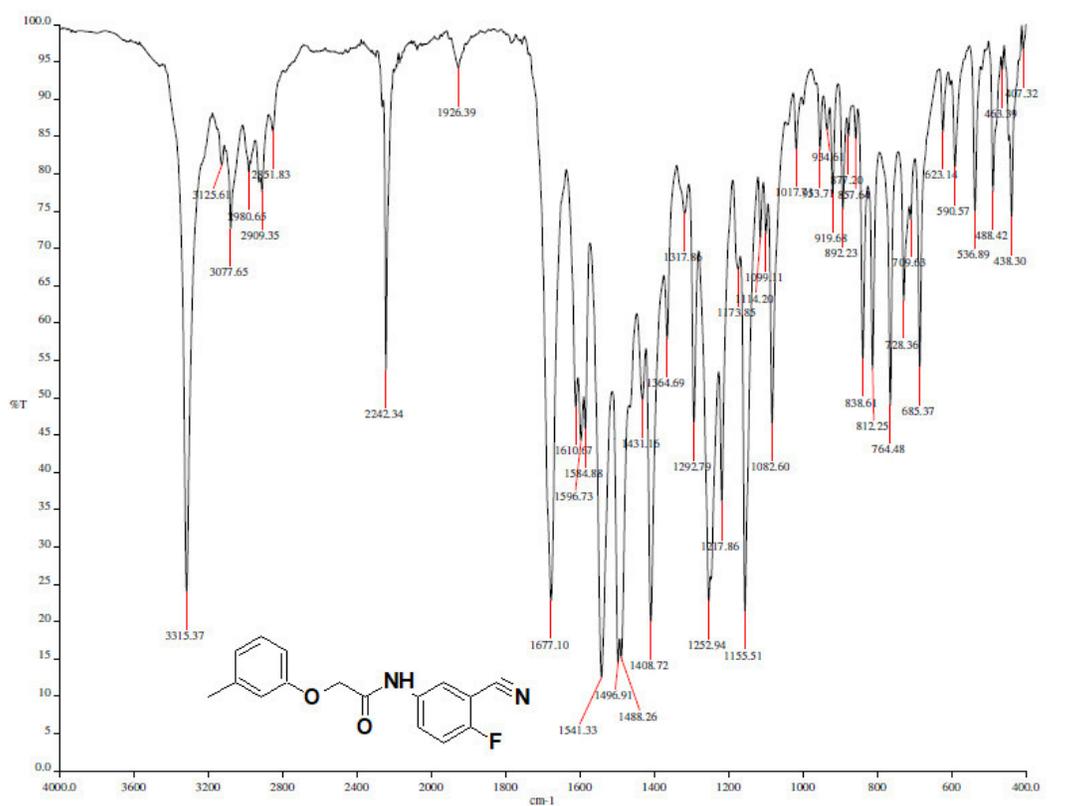
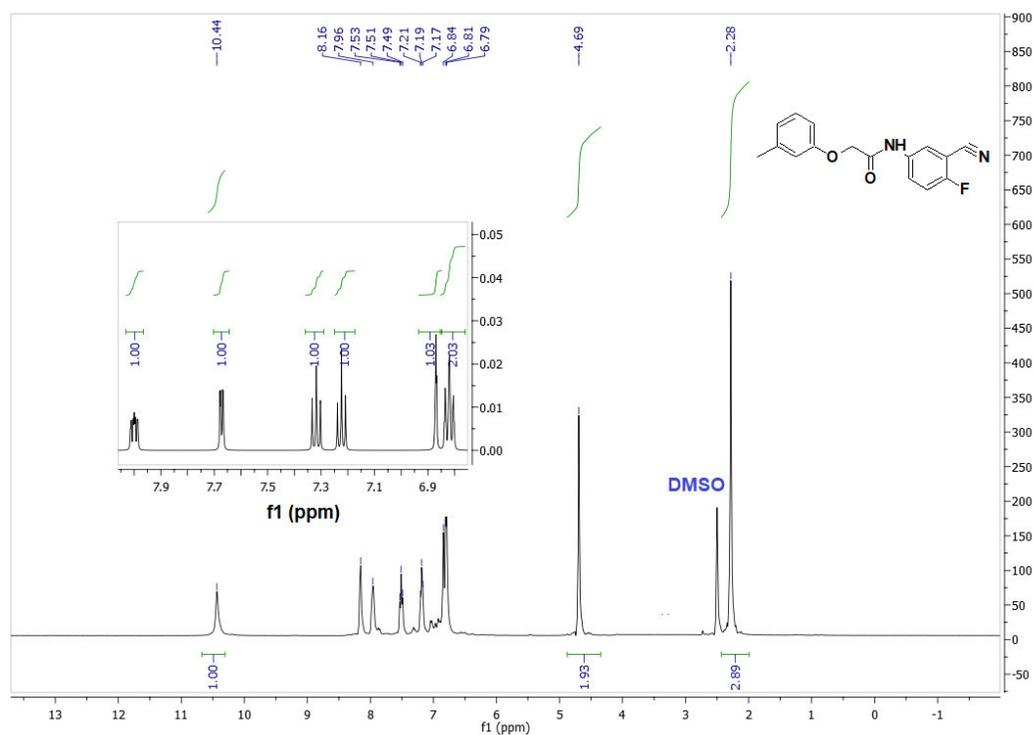
Espectro 1.24 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-02Espectro 1.25 IR cm^{-1} de Int2-03

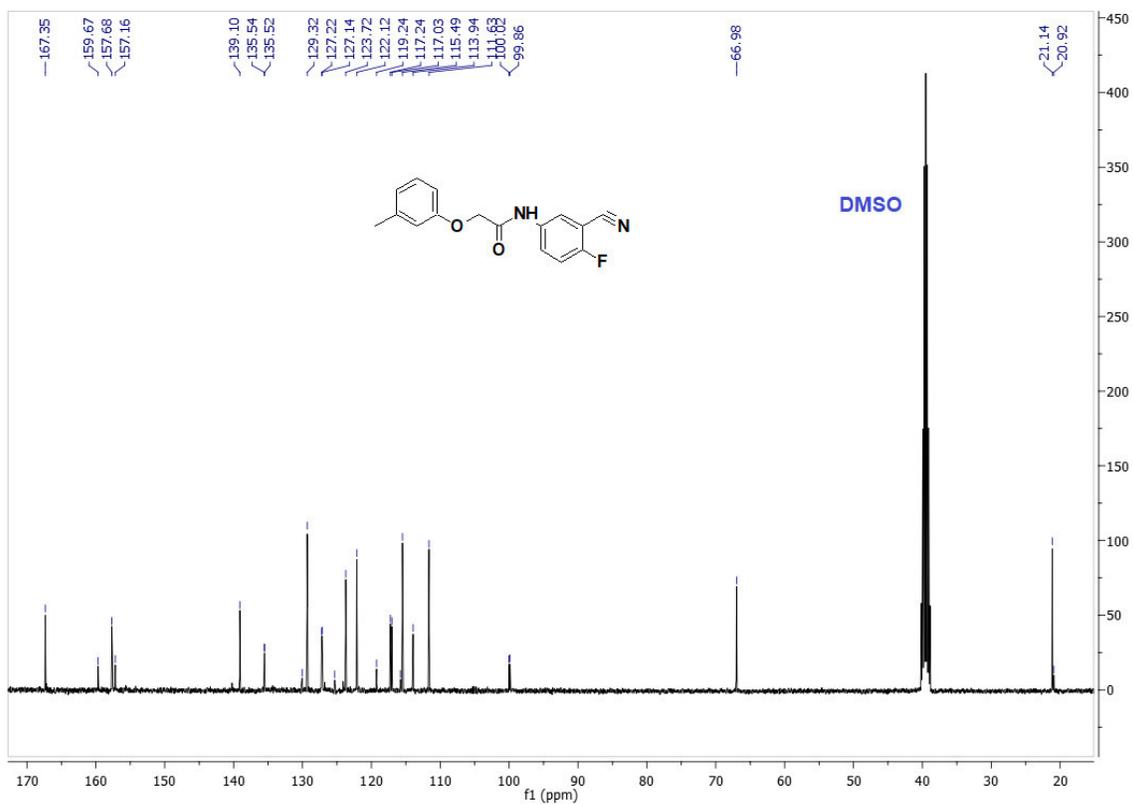
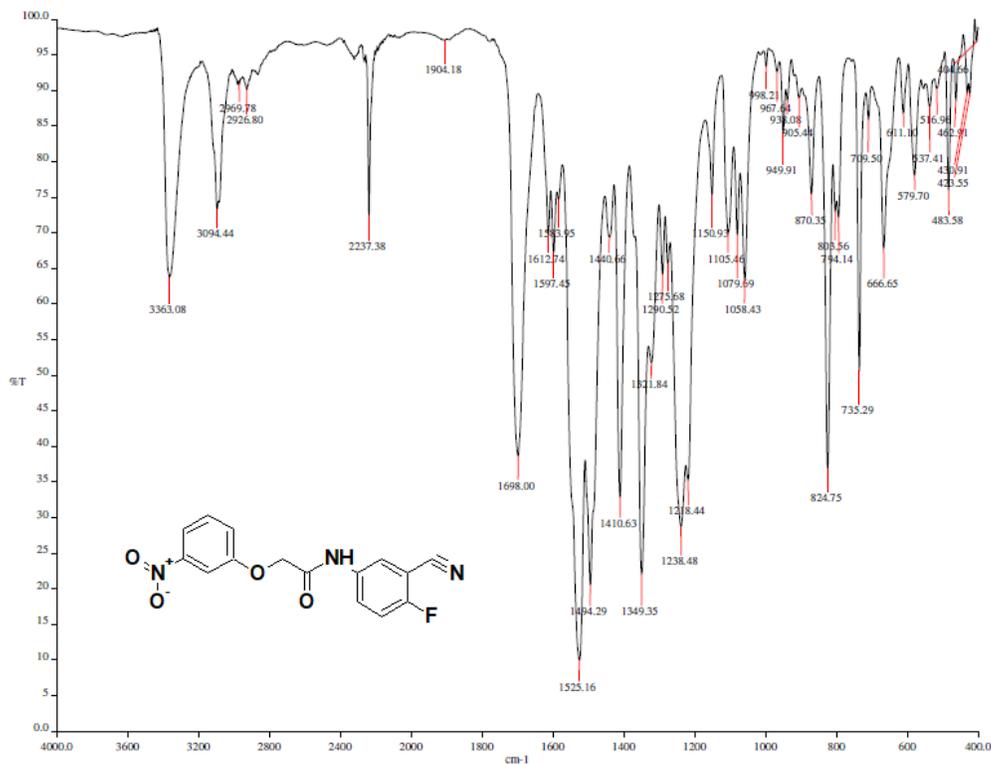


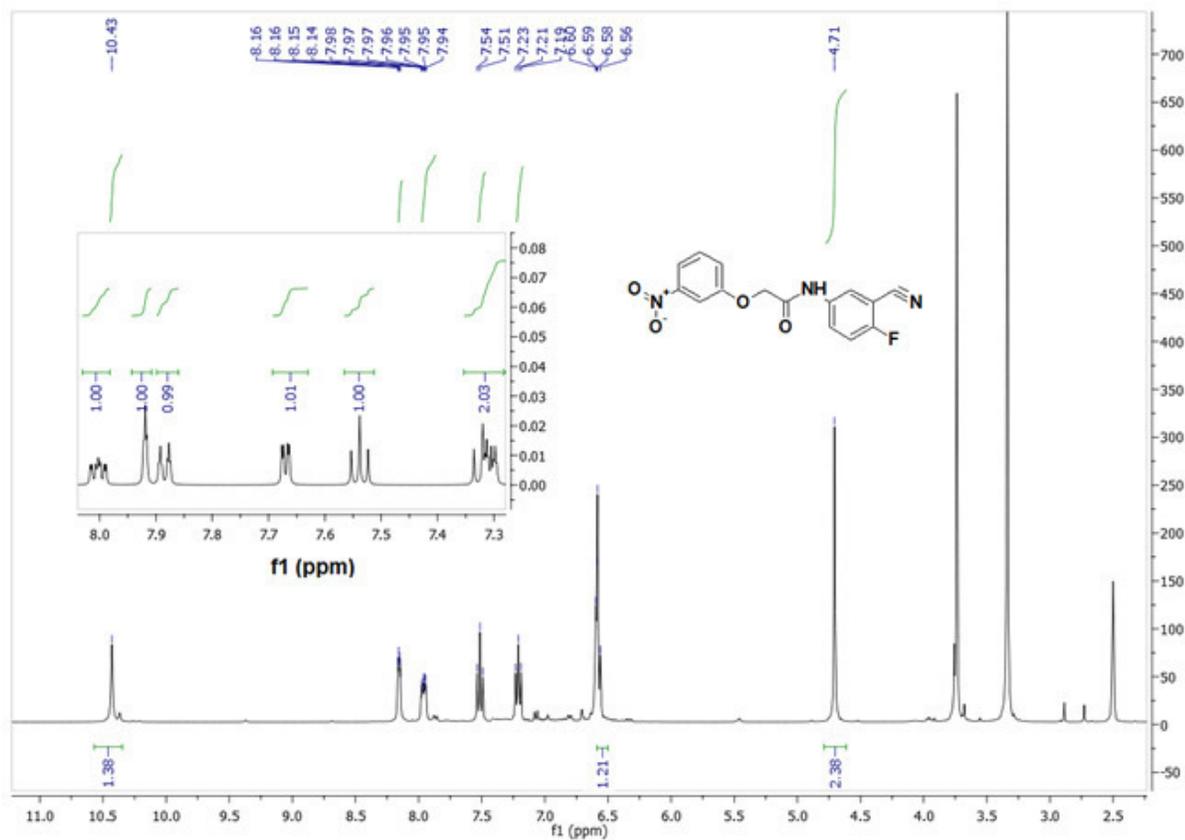
Espectro 1.26 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-03



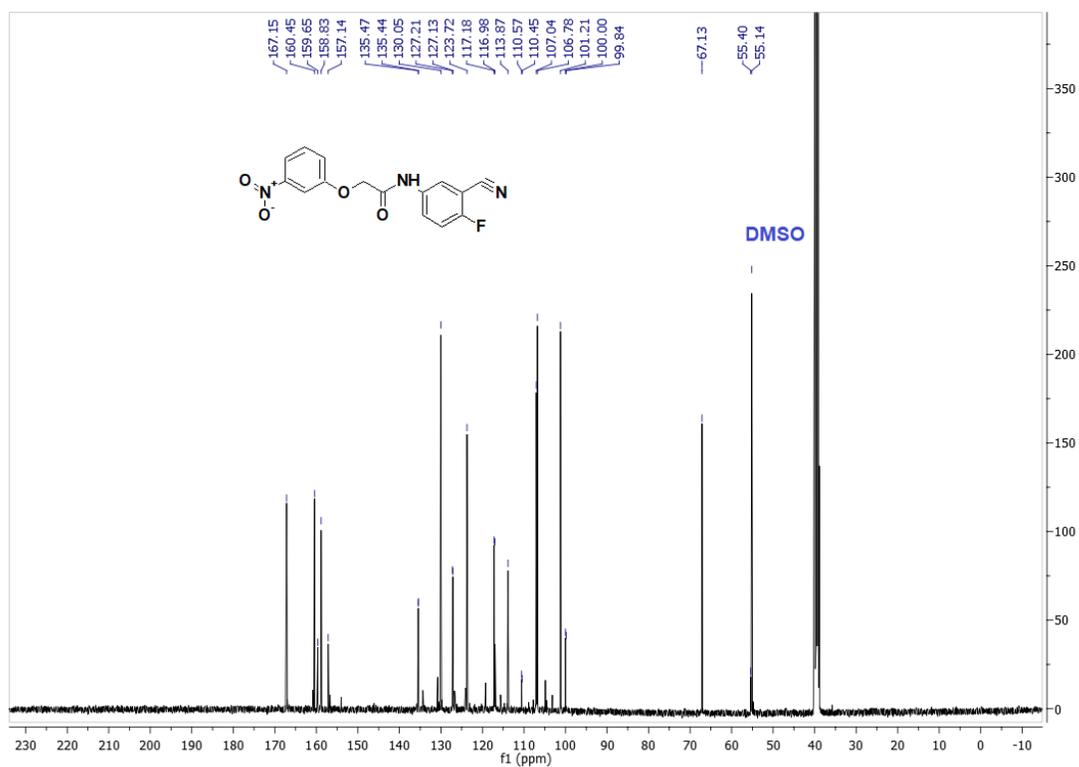
Espectro 1.27 RMN ¹³C 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-03

Espectro 1.28 IR cm⁻¹ de Int2-04Espectro 1.29 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de Int2-04

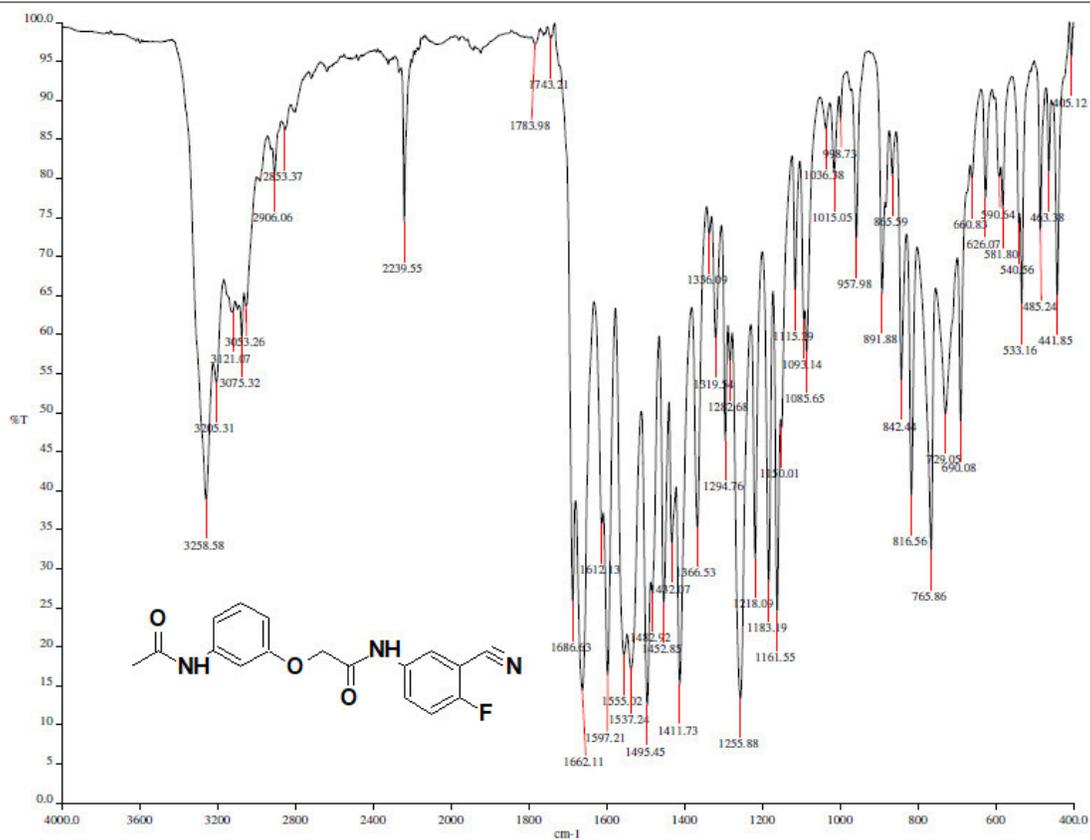
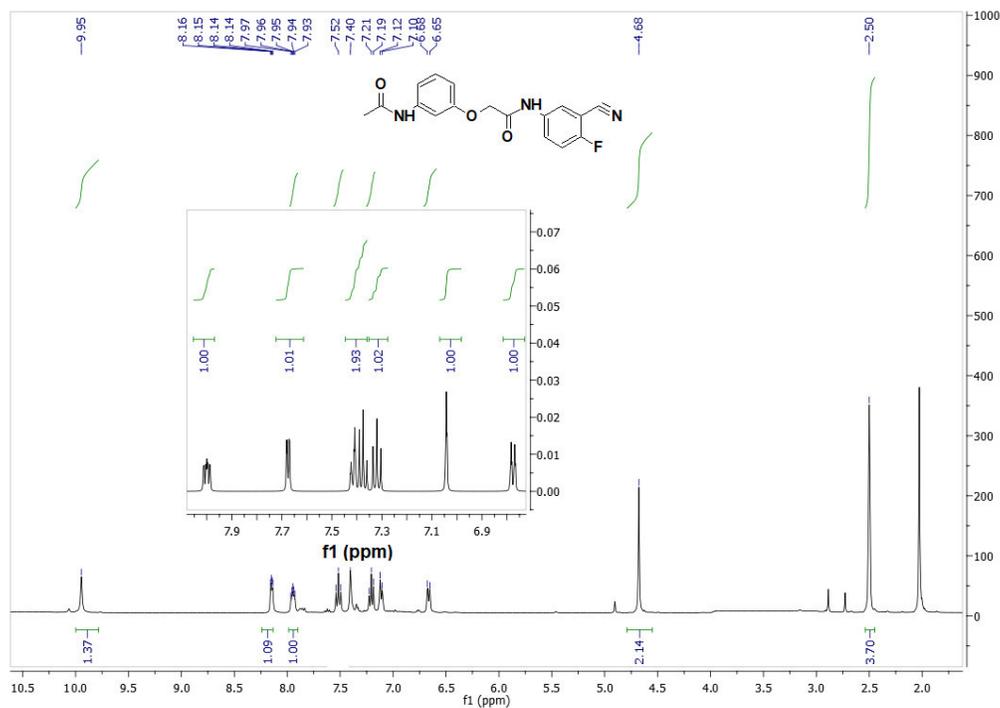
Espectro 1.30 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-04Espectro 1.31 IR cm^{-1} de Int2-05

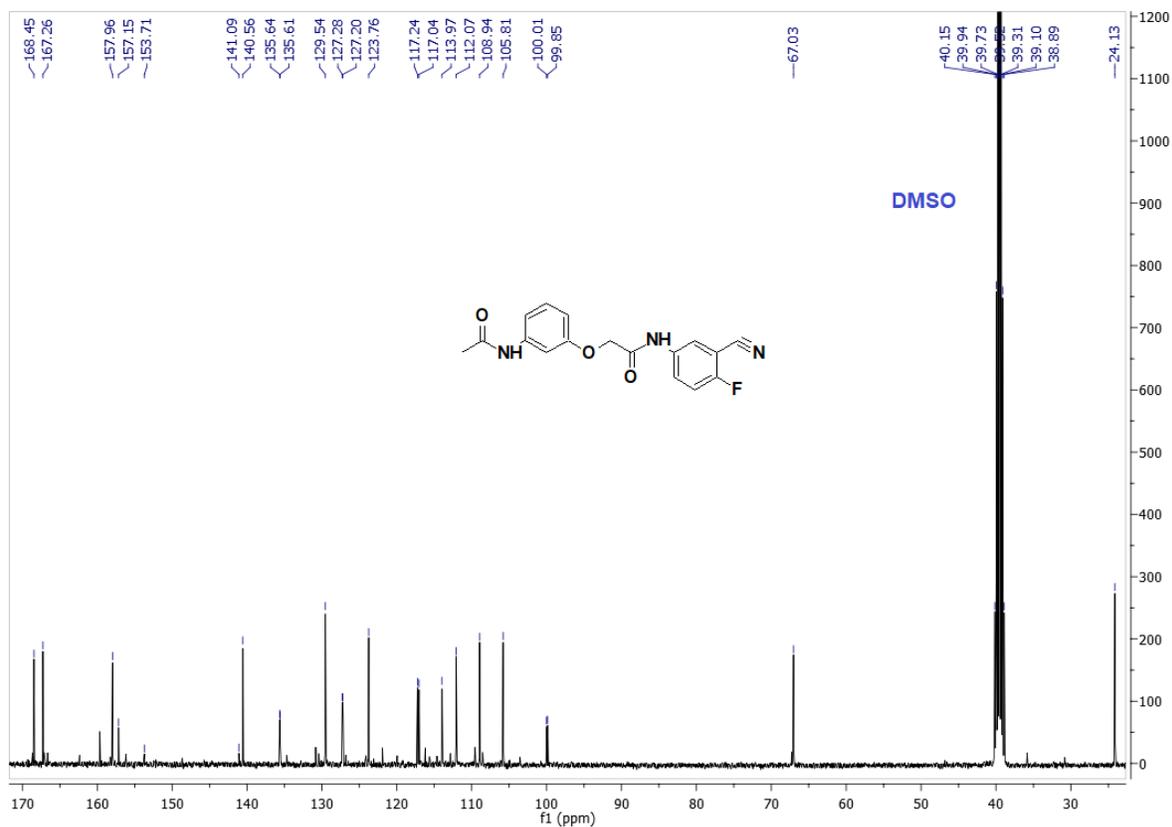


Espectro 1.32 RMN ^1H 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-05

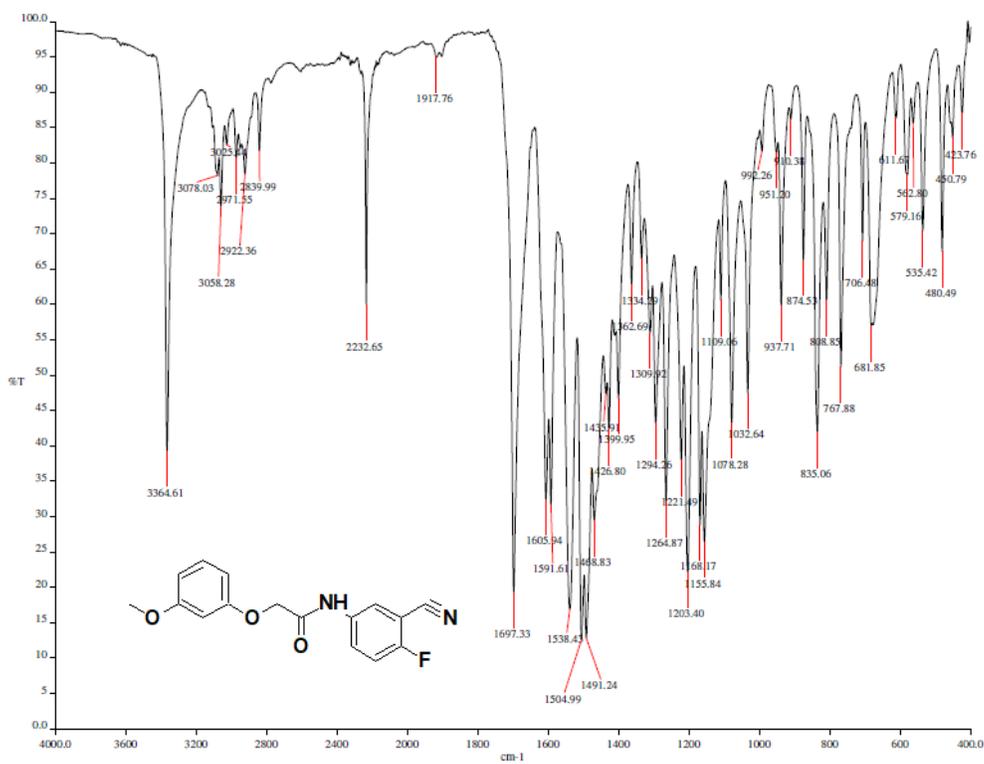


Espectro 1.33 RMN ^{13}C 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-05

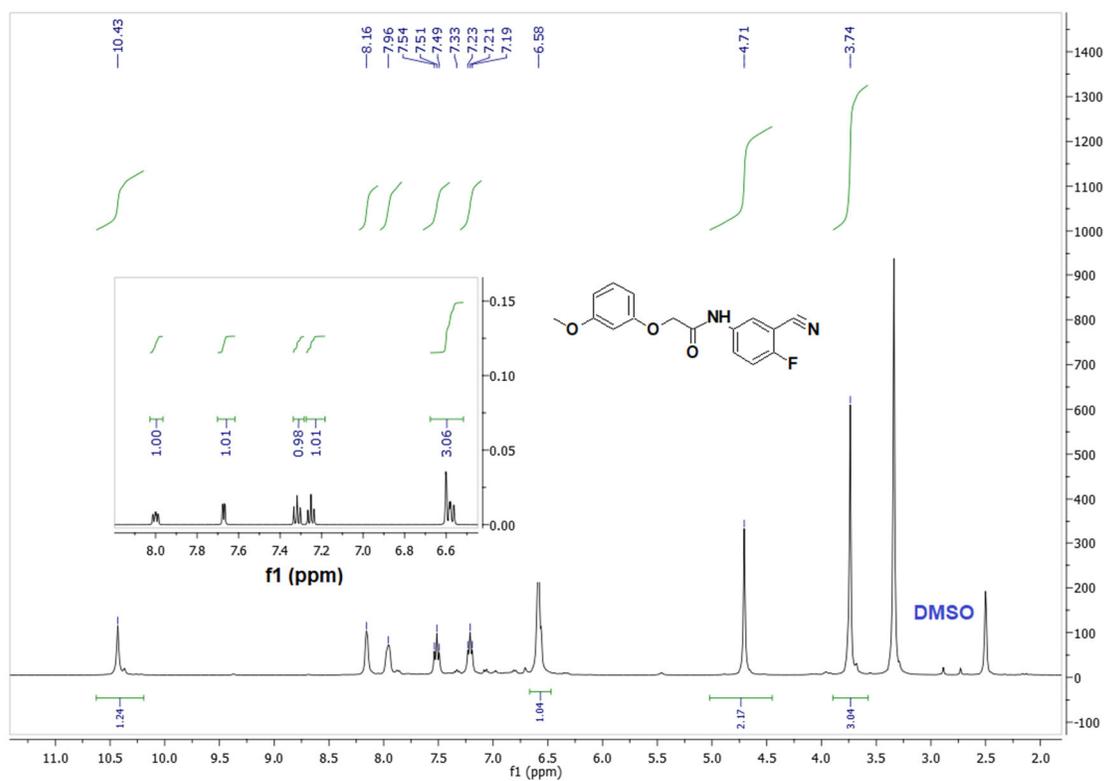
Espectro 1.34 IR cm^{-1} de Int2-06Espectro 1.35 RMN ^1H 400 MHz tms, dmsO-d_6 , δ en ppm de Int2-06



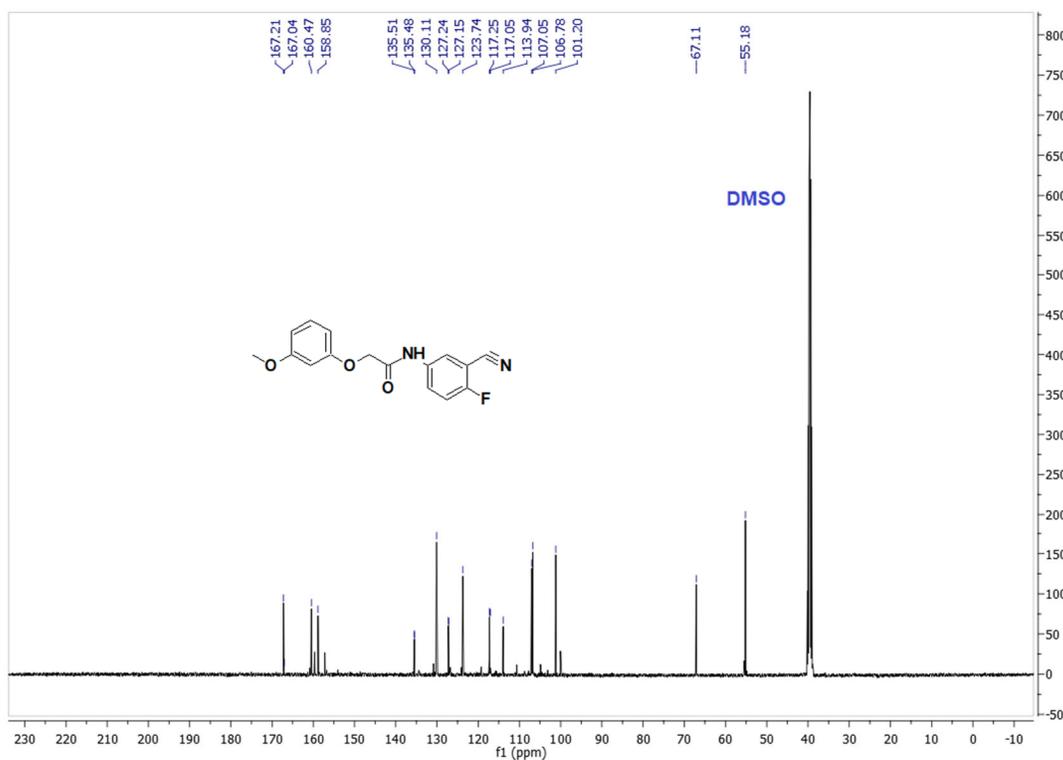
Espectro 1.36 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-06



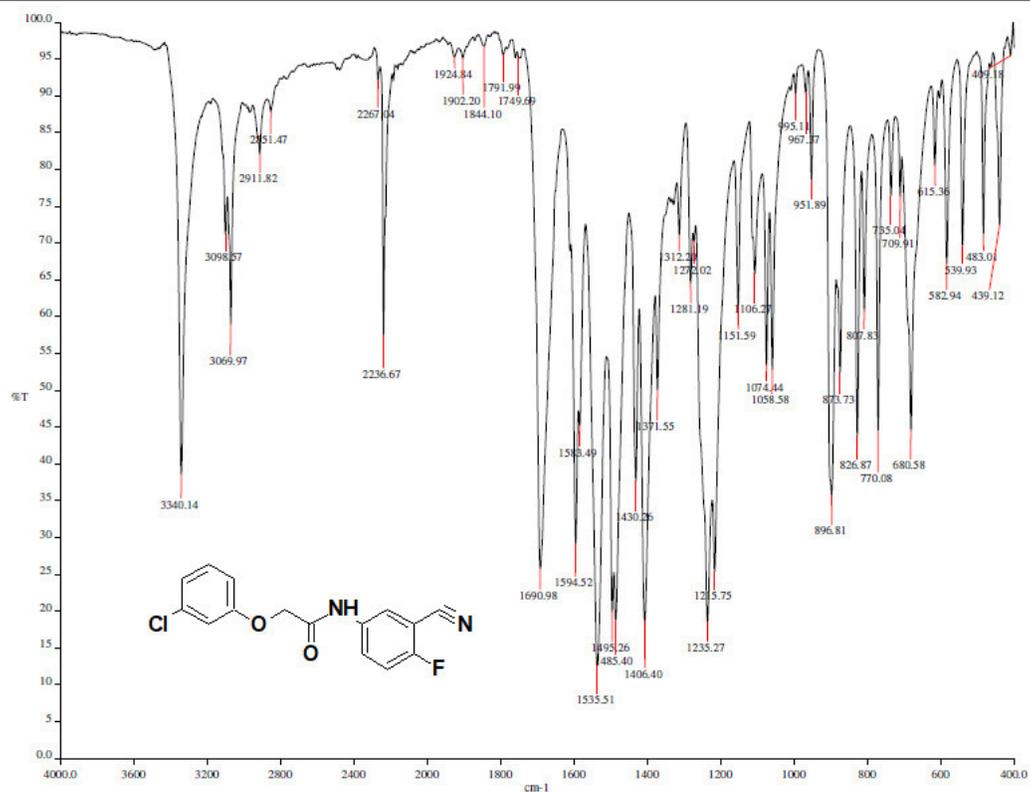
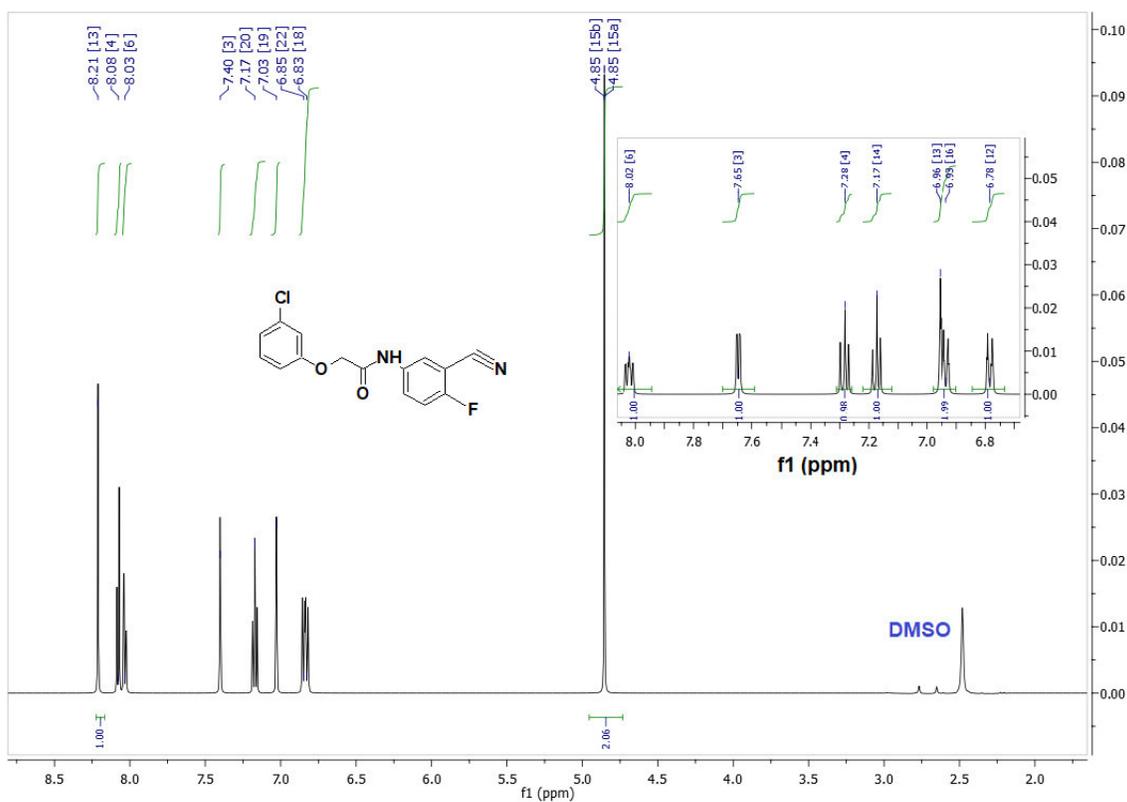
Espectro 1.37 IR cm $^{-1}$ de Int2-07

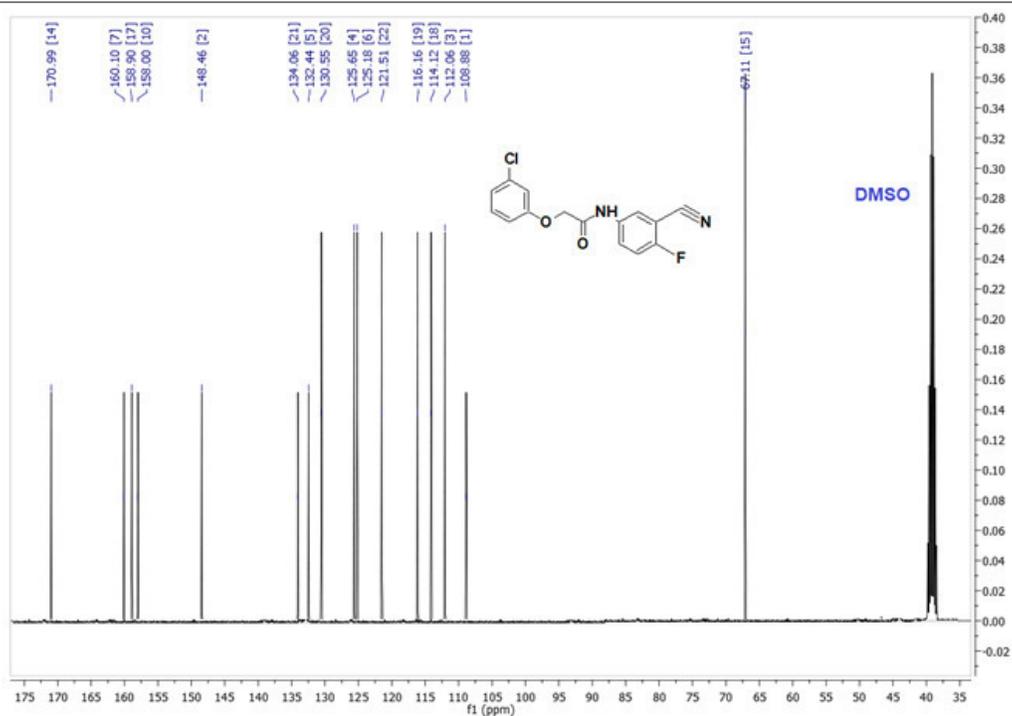


Espectro 1.38 RMN ^1H 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-07

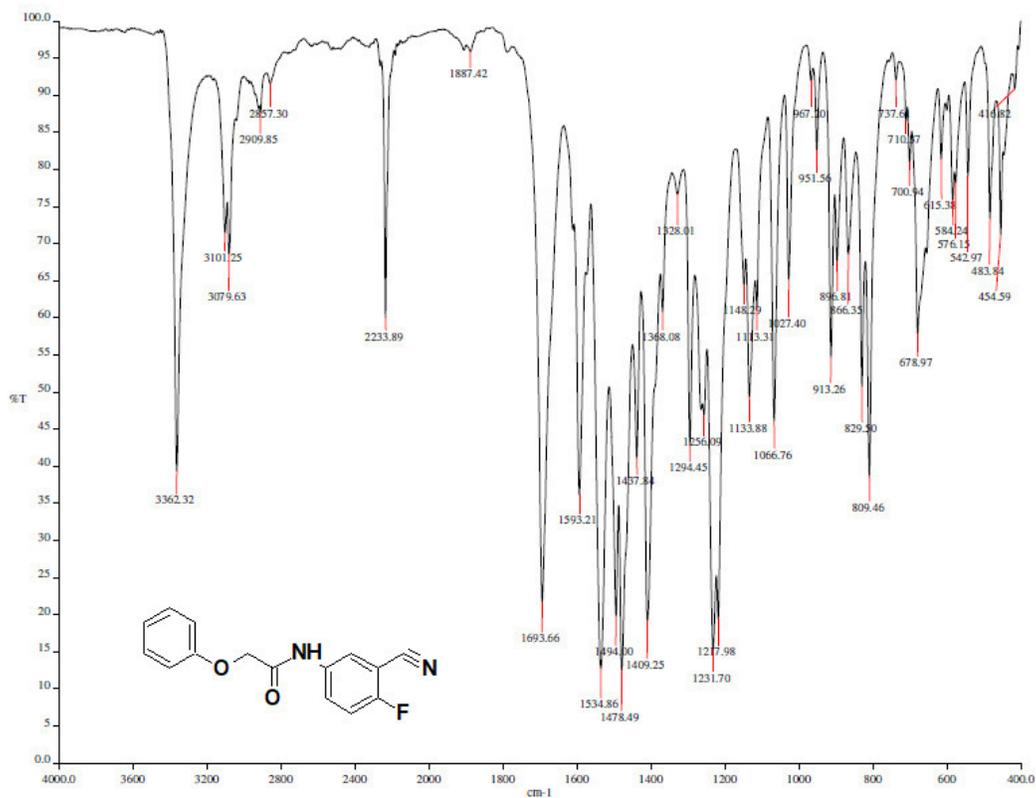


Espectro 1.39 RMN ^{13}C 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-07

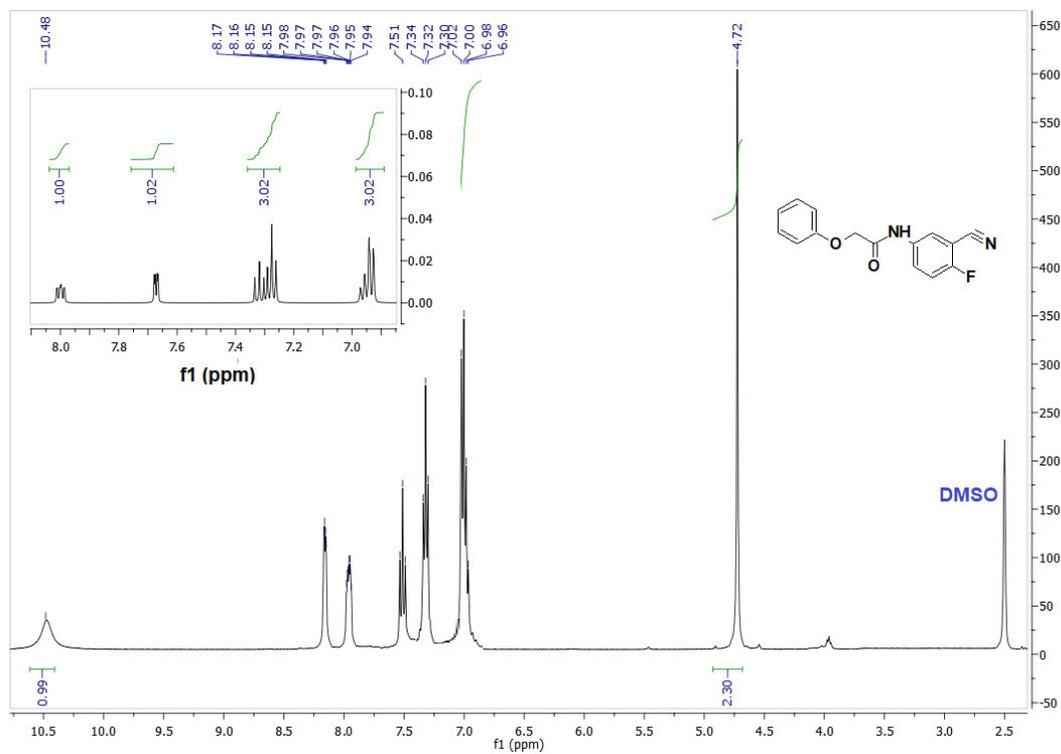
Espectro 1.40 IR cm⁻¹ de Int2-08Espectro 1.41 RMN ¹H 400 MHz tms, dms^{-d}₆, δ en ppm de Int2-08



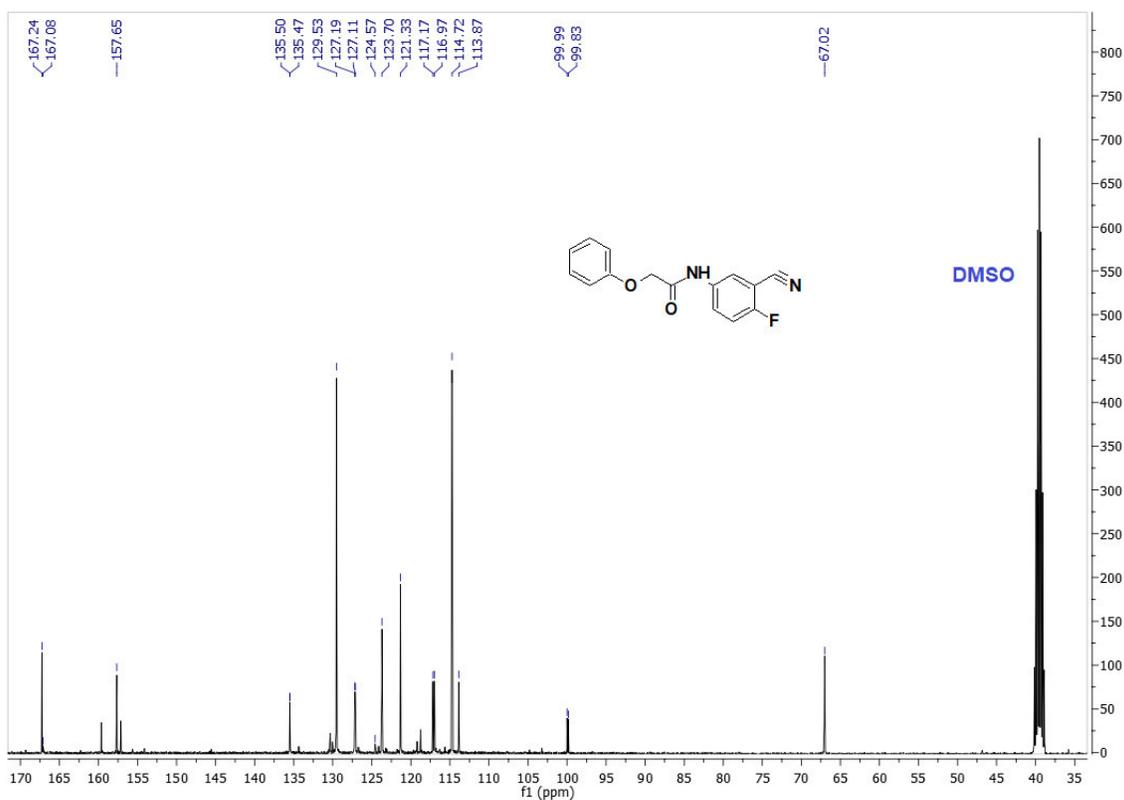
Espectro 1.42 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-08



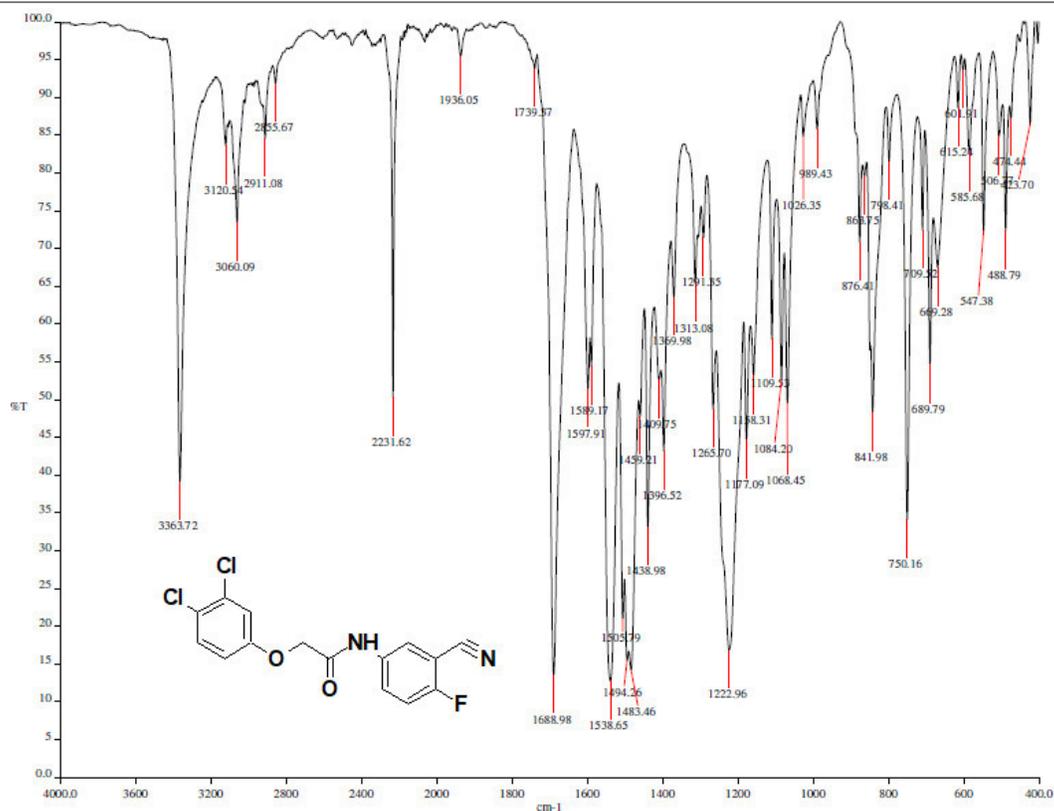
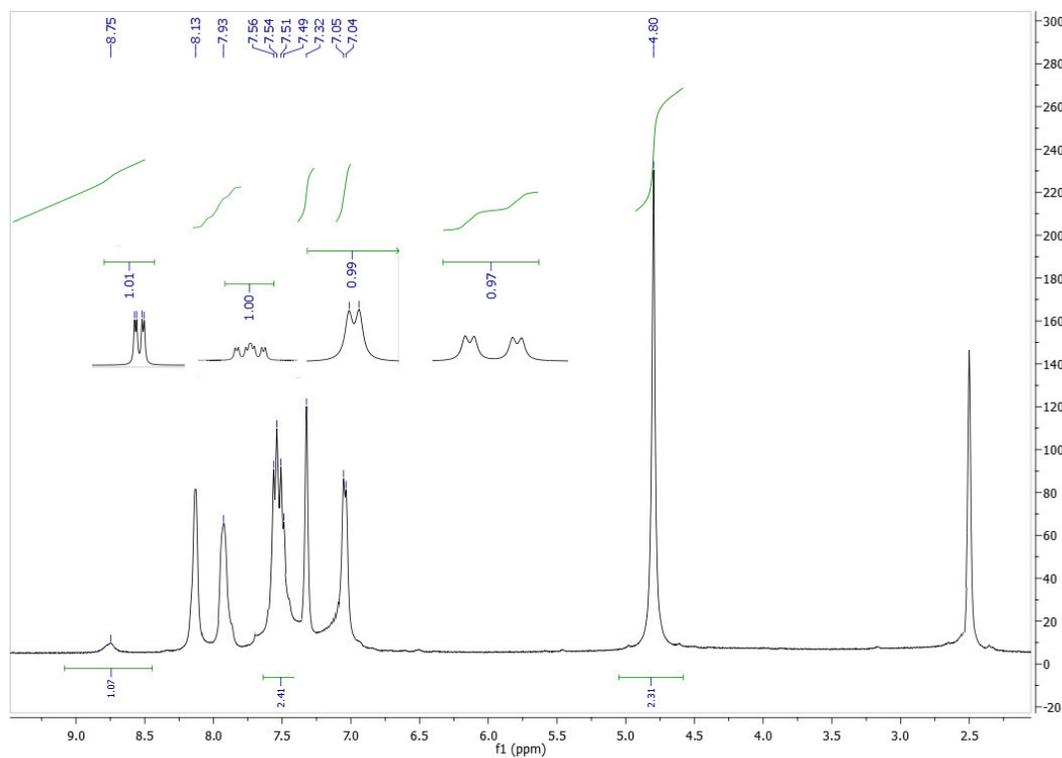
Espectro 1.43 IR cm^{-1} de Int2-09

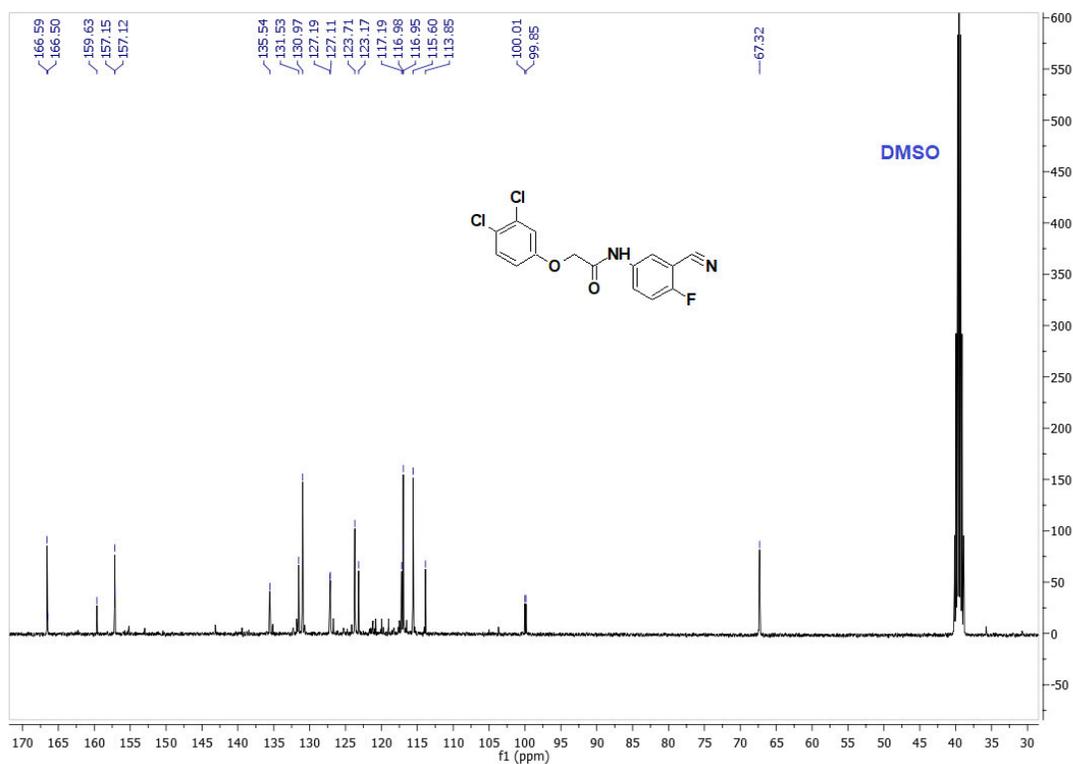


Espectro 1.44 RMN ^1H 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-09



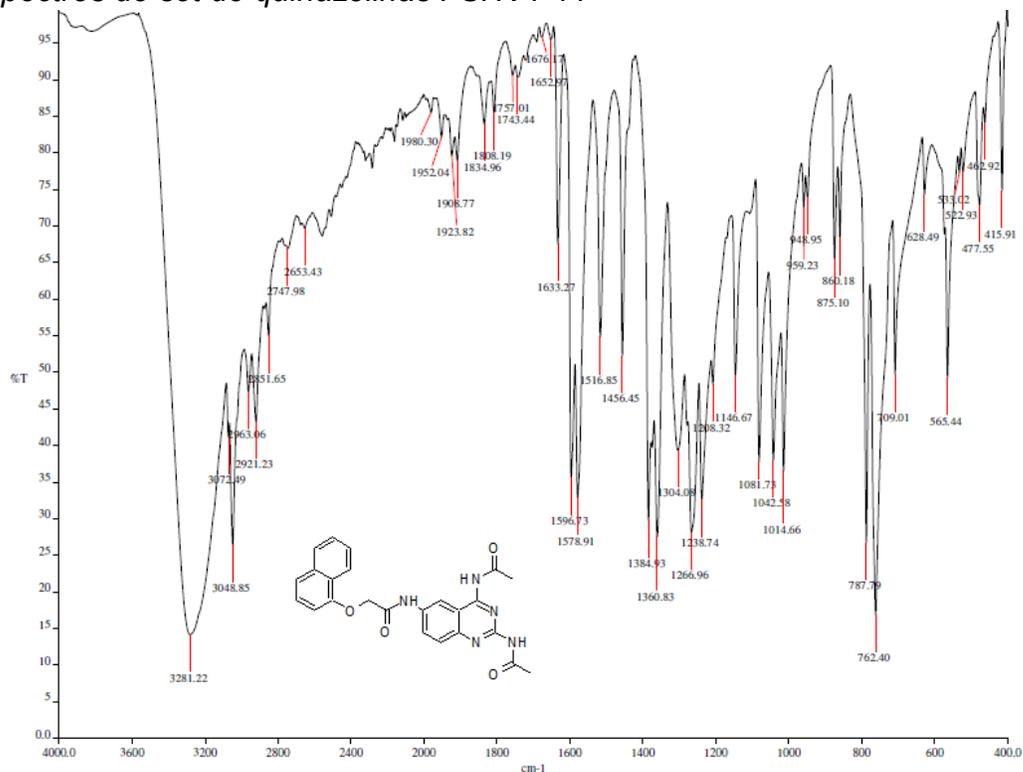
Espectro 1.45 RMN ^{13}C 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de Int2-09

Espectro 1.46 IR cm⁻¹ de Int2-10Espectro 1.47 RMN ¹H 400 MHz tms, dms^o-d₆, δ en ppm de Int2-10

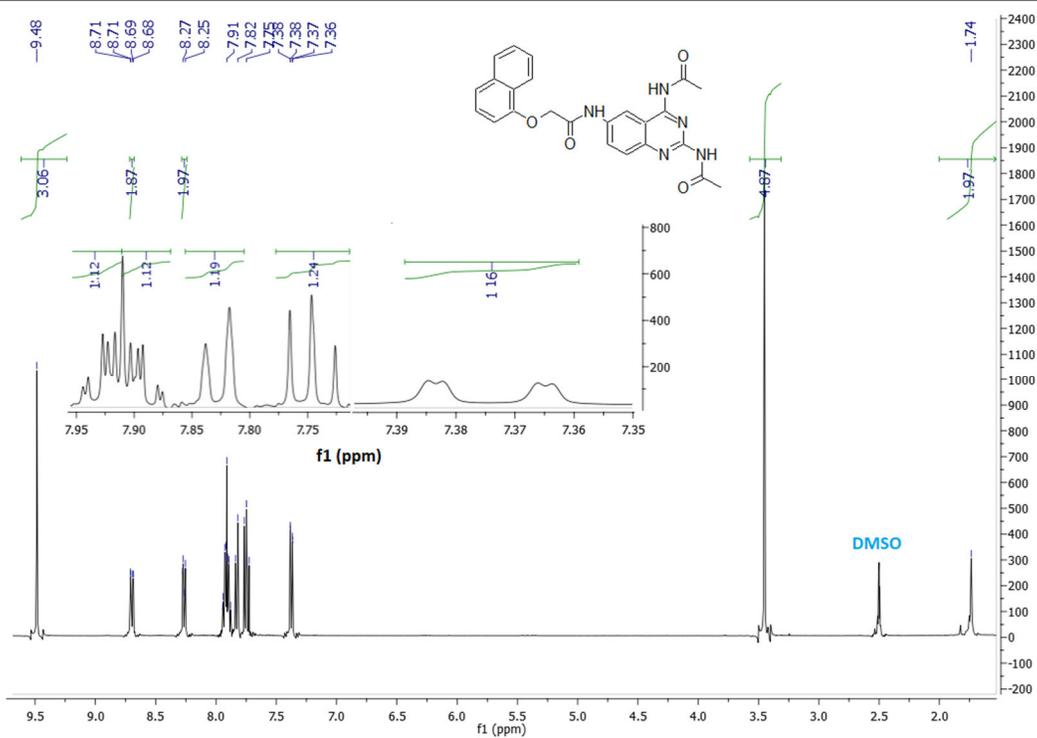


Espectro 1.48 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de Int2-10

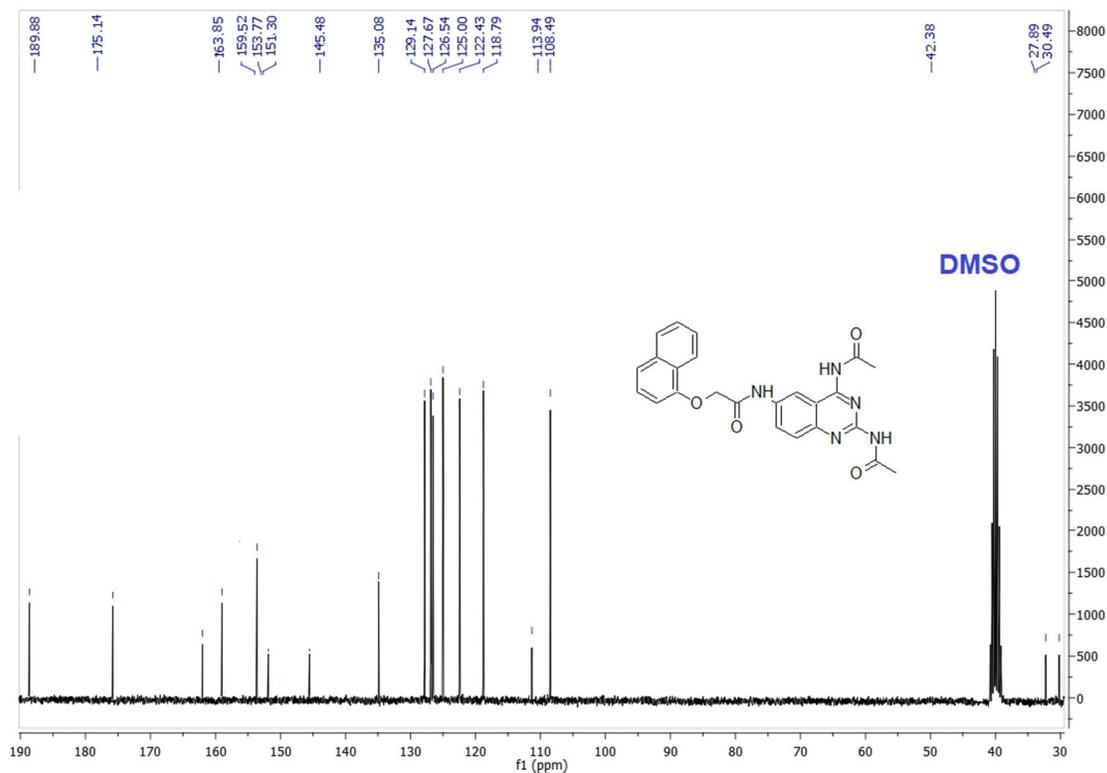
II.3.2 Espectros de set de quinazolinas FSHV1-11



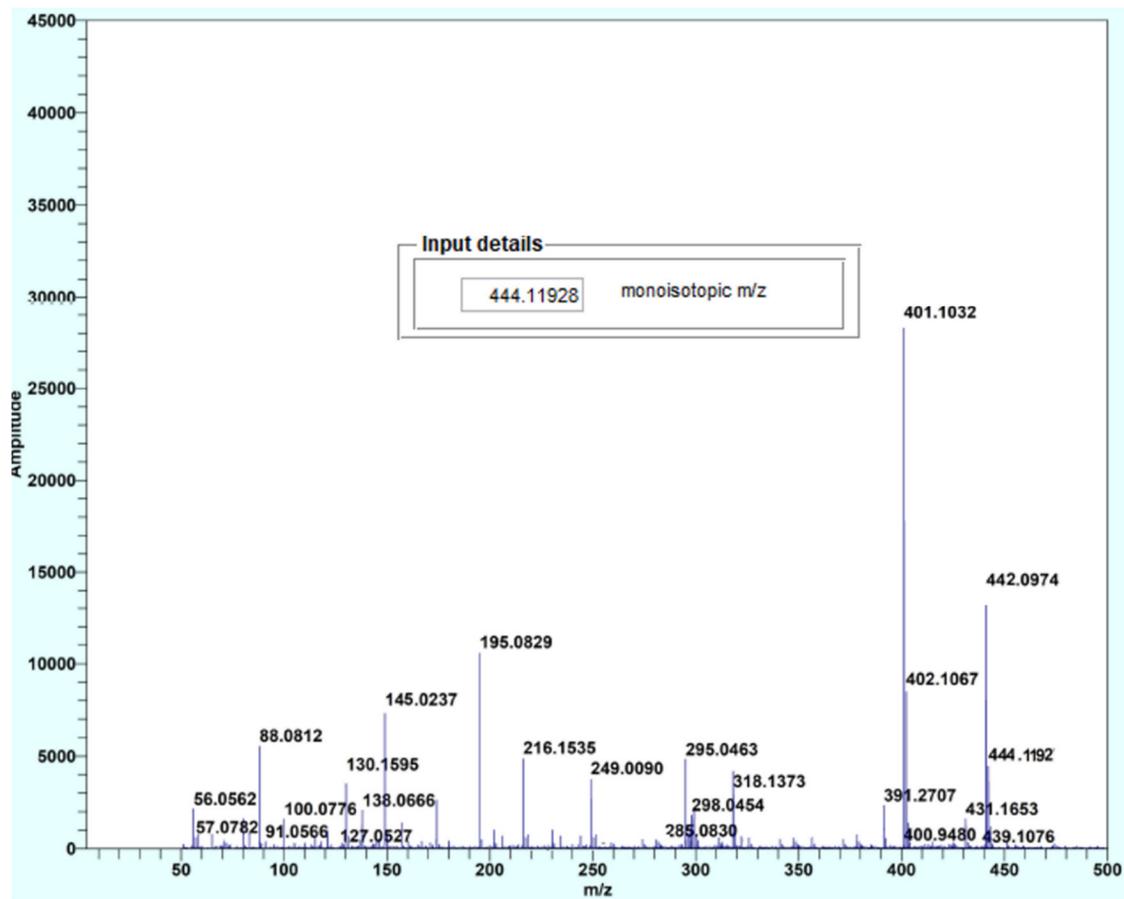
Espectro 1.49 IR cm^{-1} de FSHV1



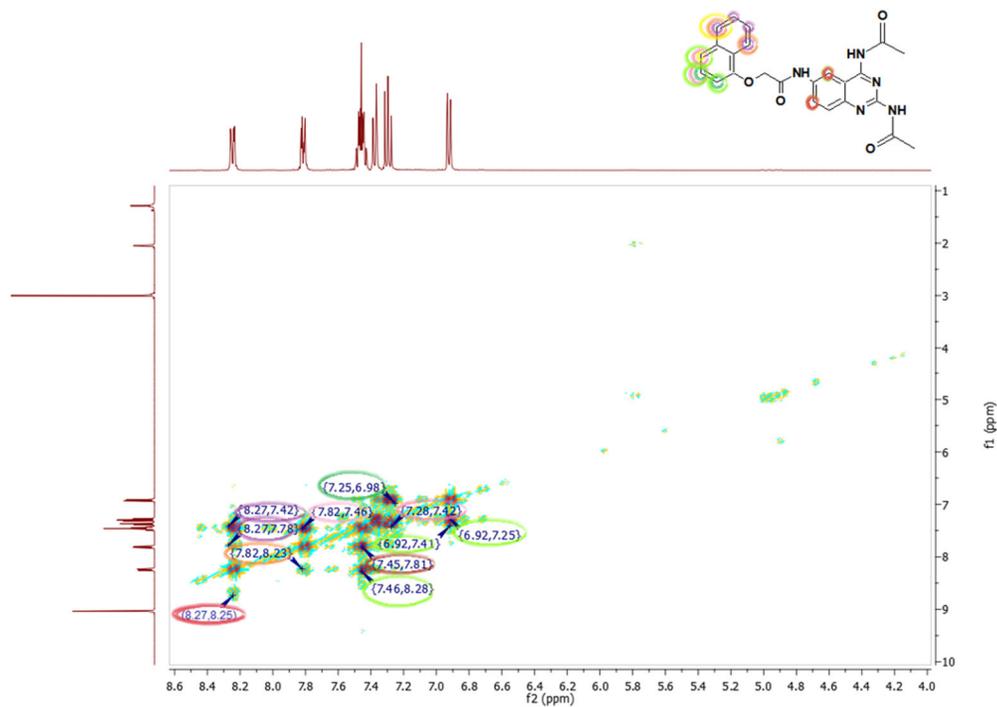
Espectro 1.50 RMN ^1H 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV1



Espectro 1.51 RMN ^{13}C 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV1

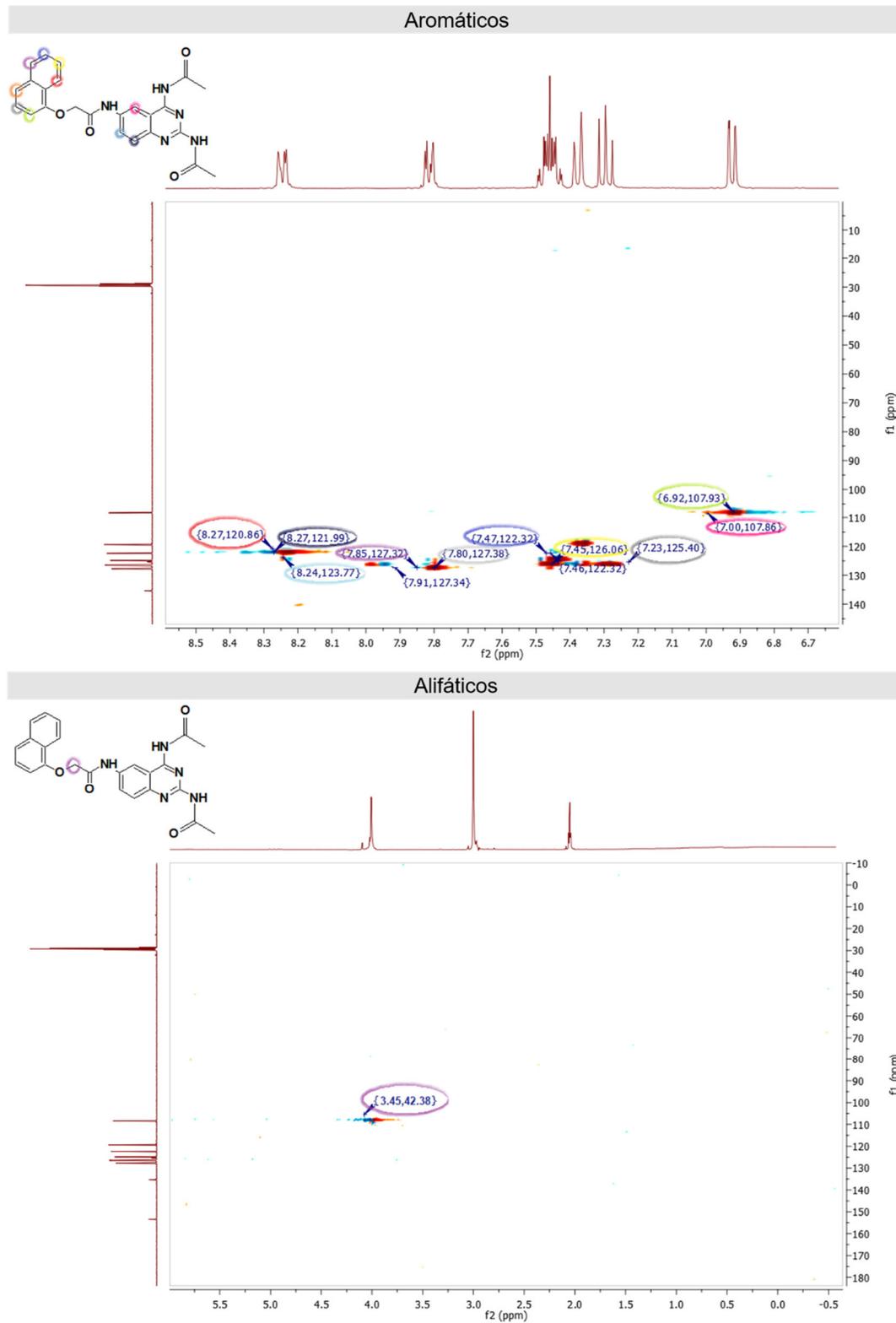


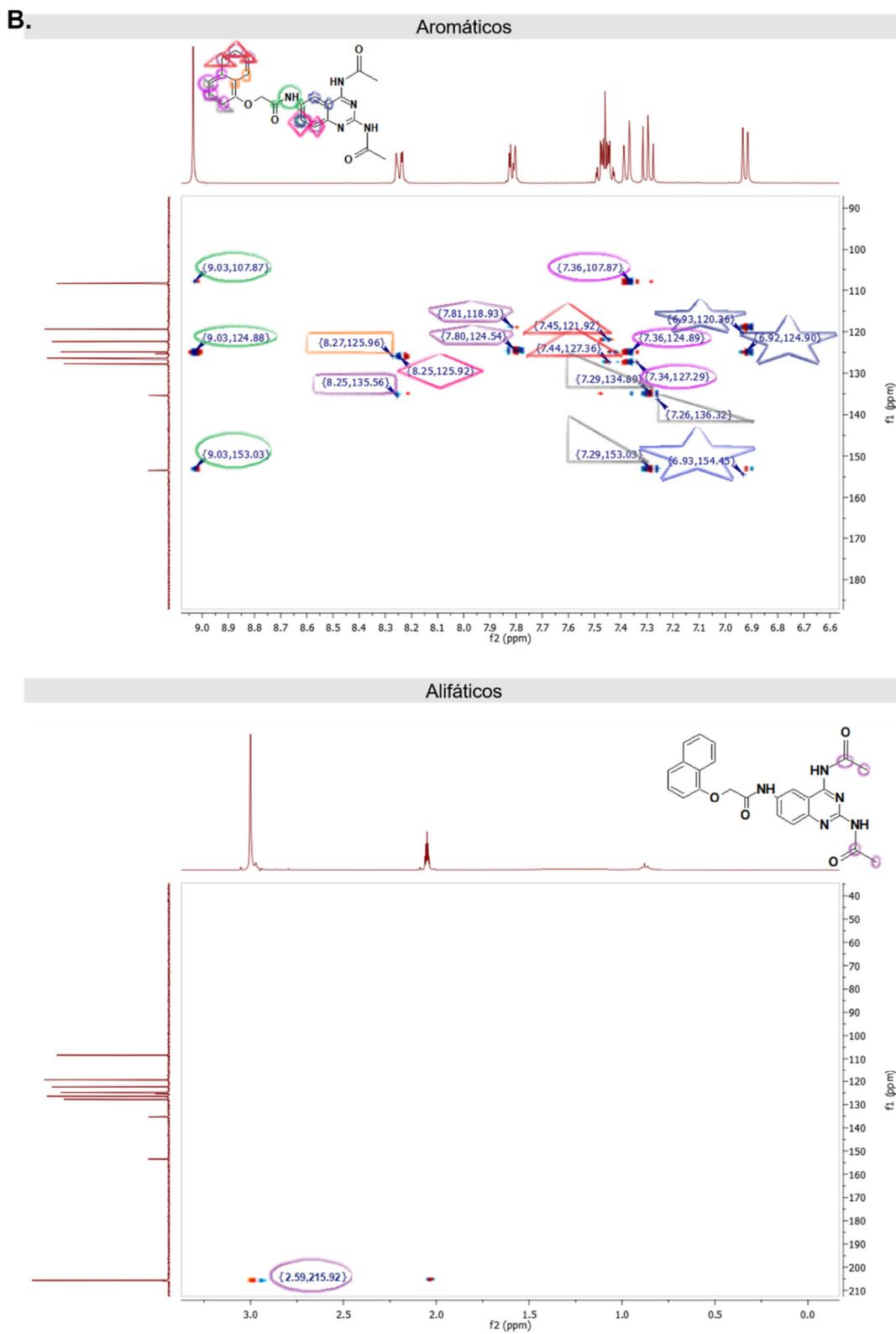
Espectro 1.52 Espectrometría de masas APCI de FSHV1



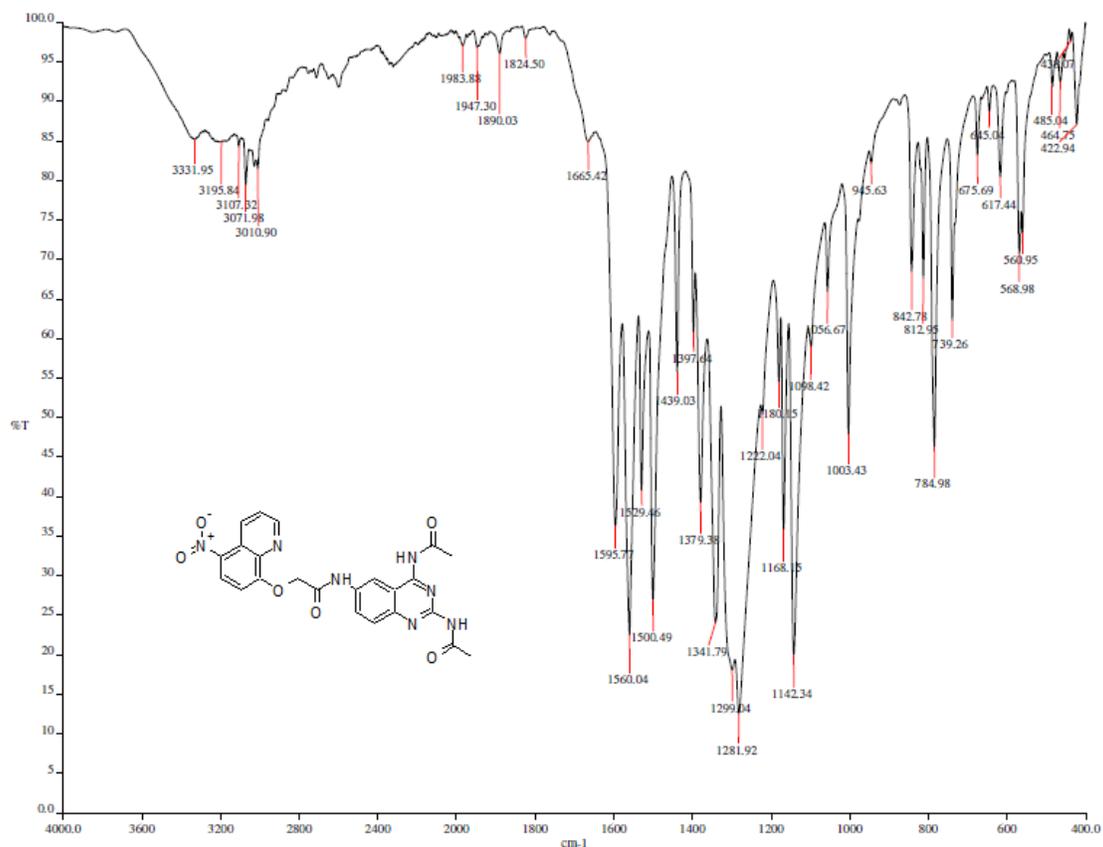
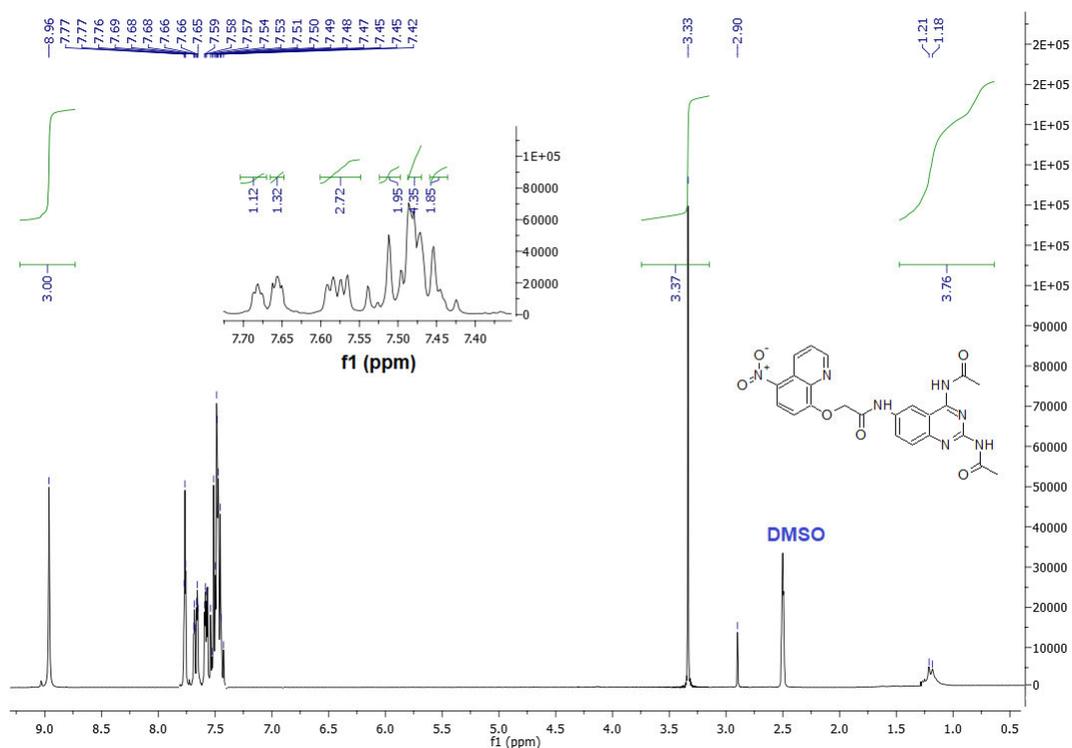
Espectro 1.53 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV1

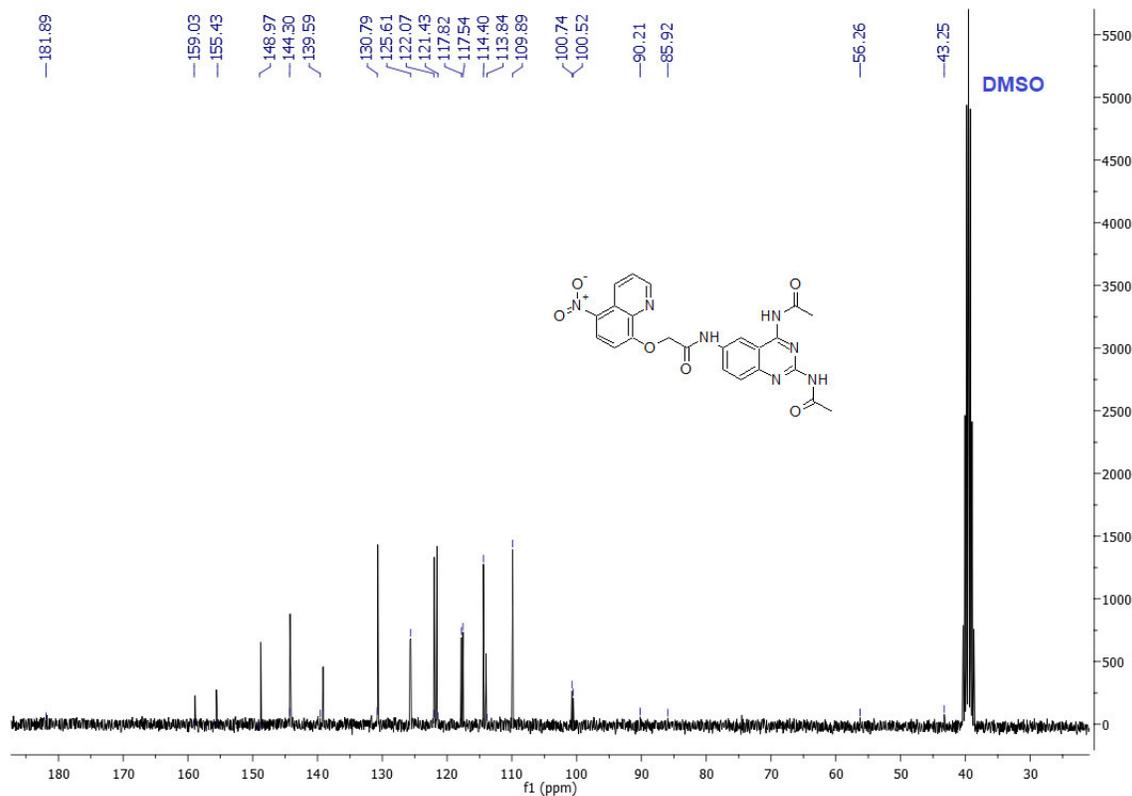
A.



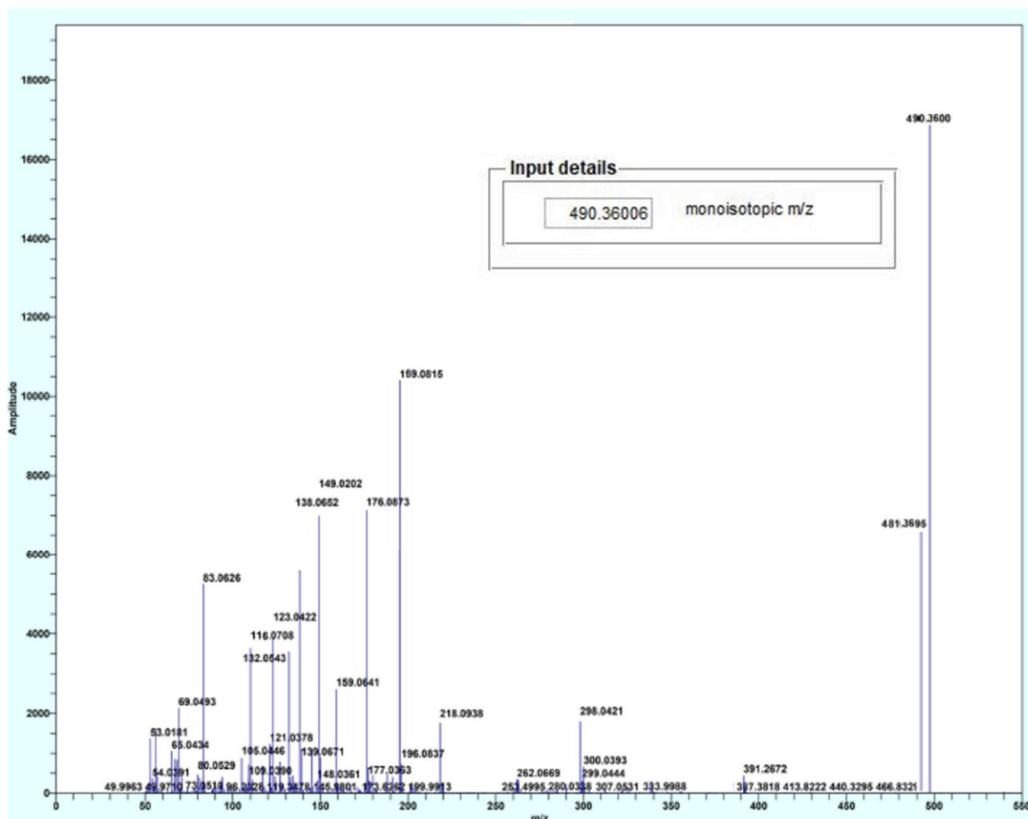


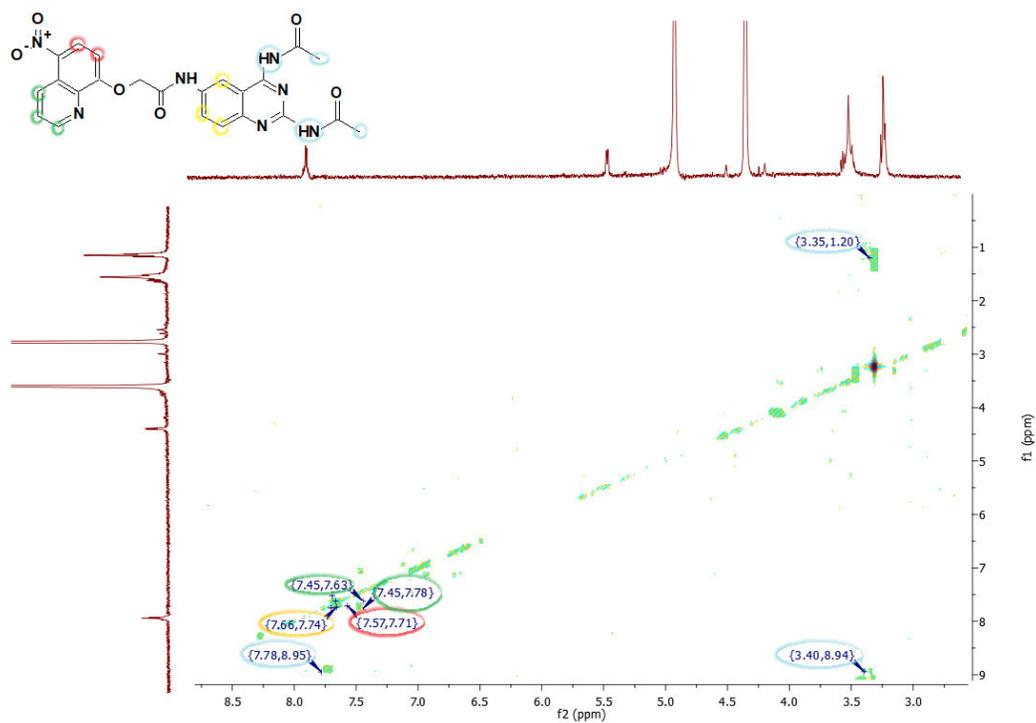
Espectro 1.55 RMN en 2D heteronucleares de **FSHV1 B.** Espectro HMBC

Espectro 1.55 IR cm^{-1} de FSHV2Espectro 1.56 RMN ^1H 300 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV2



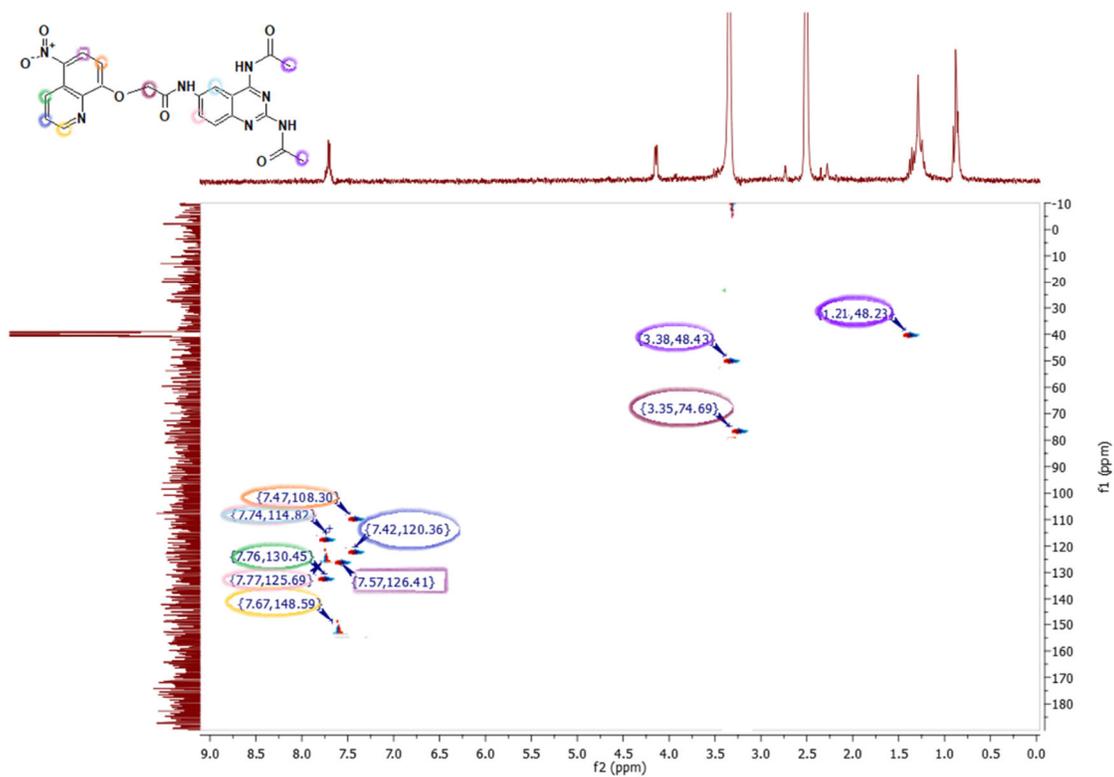
Espectro 1.57 RMN ^{13}C 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV2



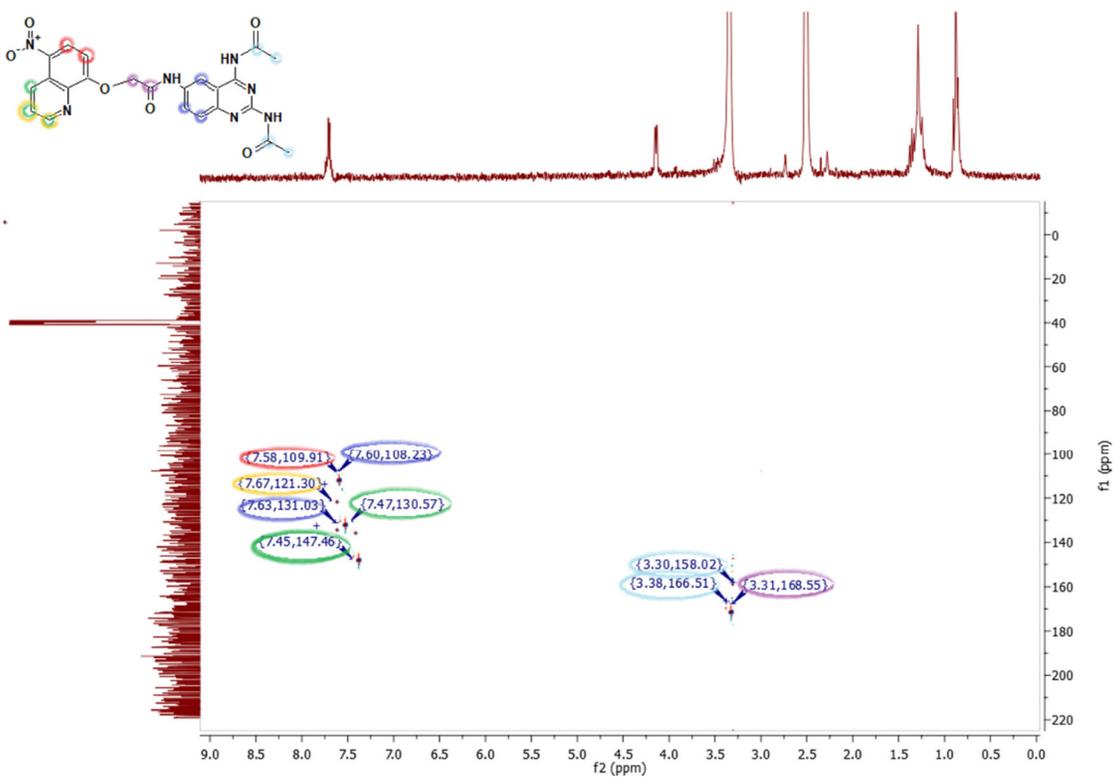


Espectro 1.58 RMN en 2D homonuclear COSY de **FSHV2**

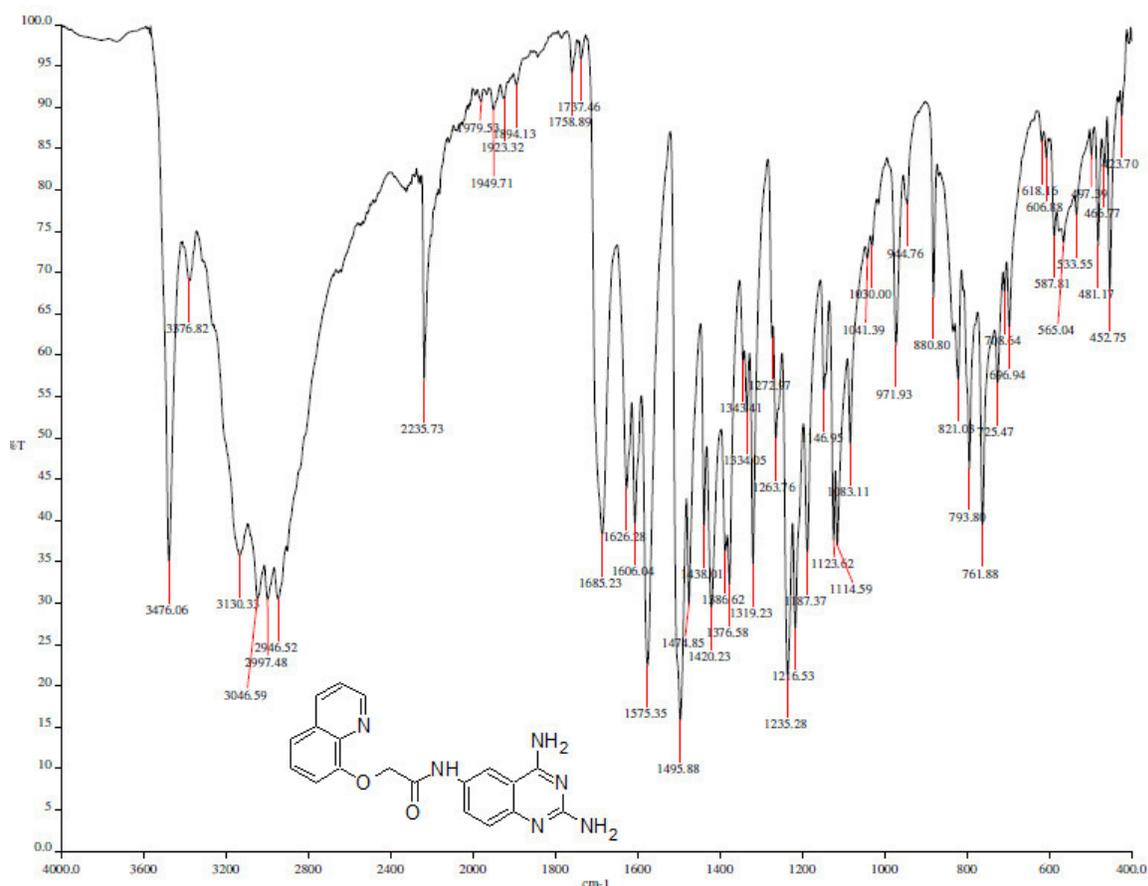
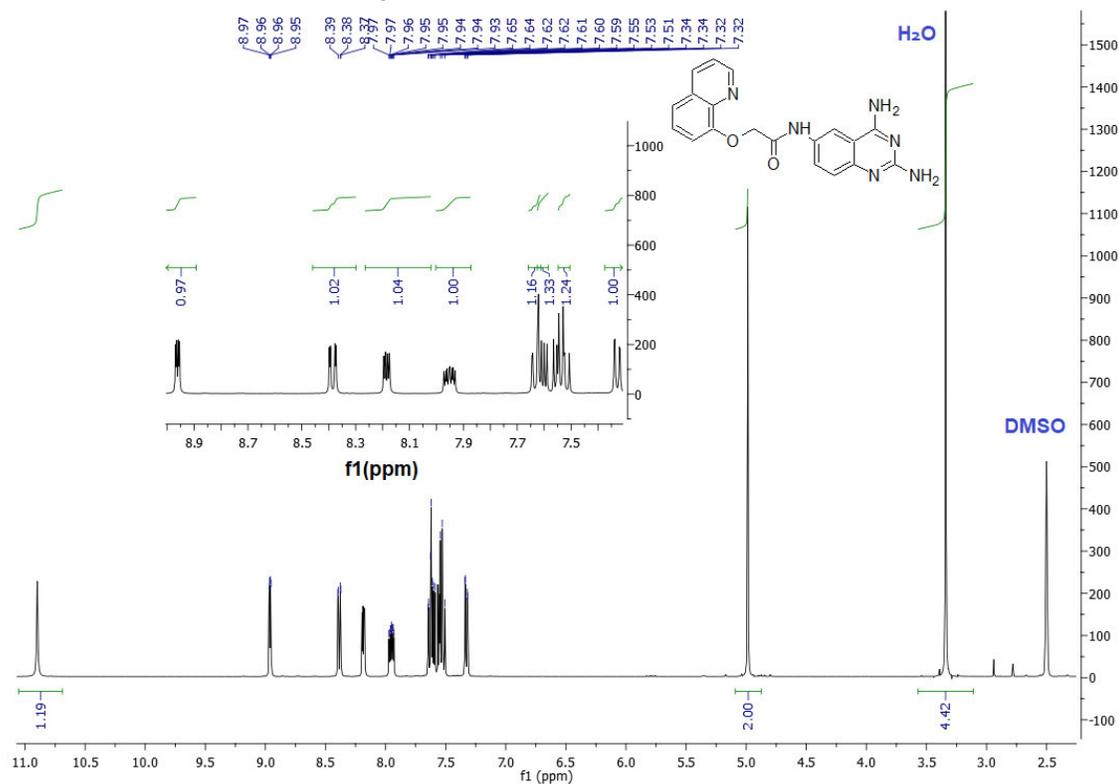
A.

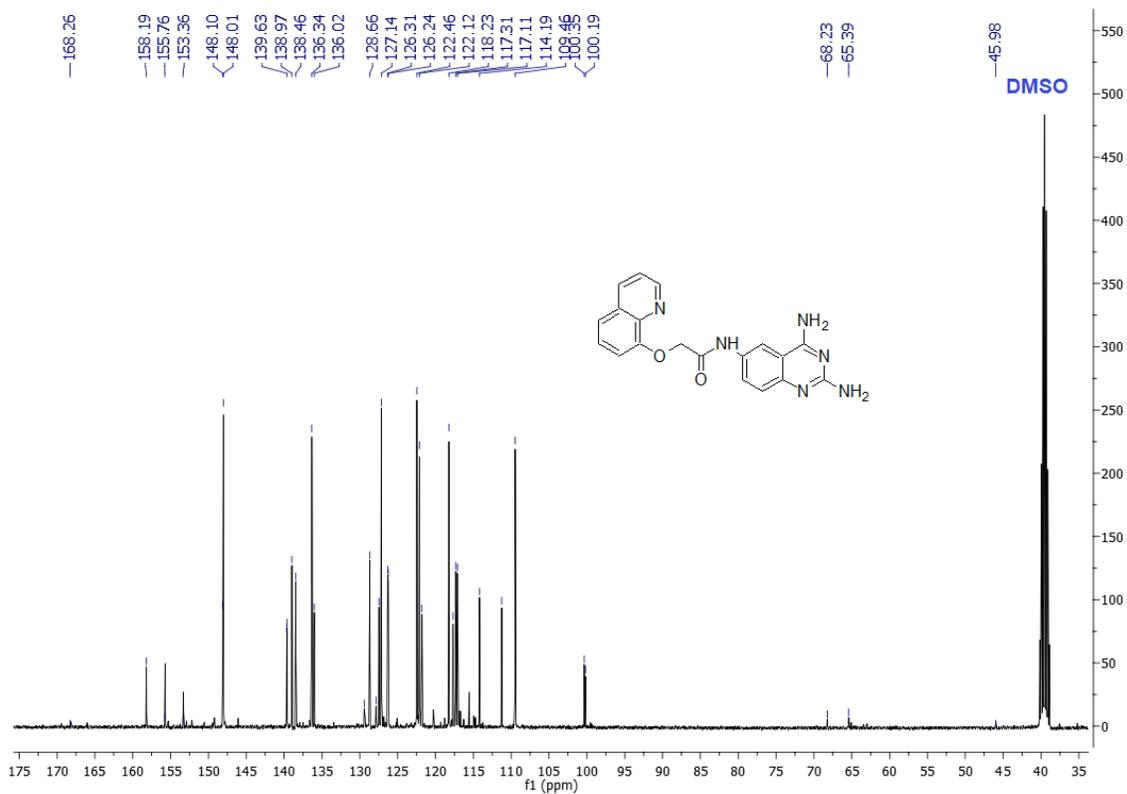


B.

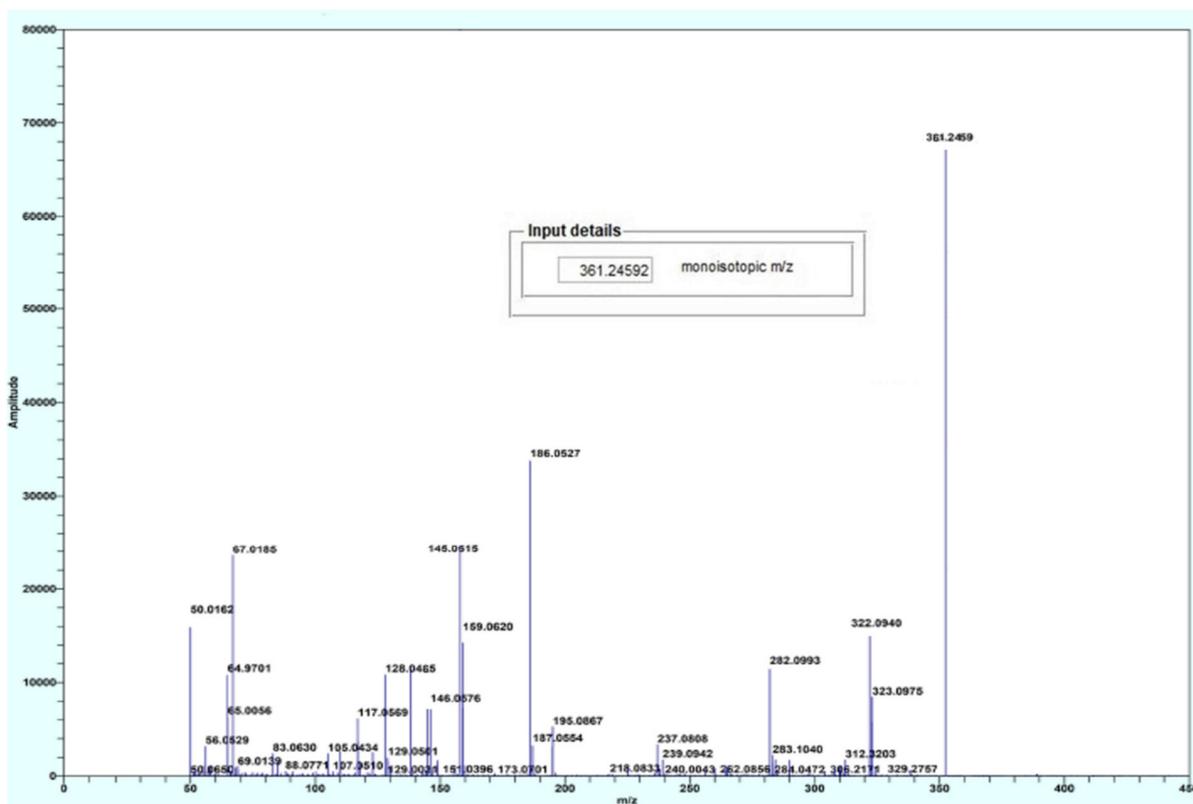


Espectro 1.59 RMN en 2D heteronucleares de **FSHV1** **A.** Espectro HSQC **B.** Espectro HMBC.

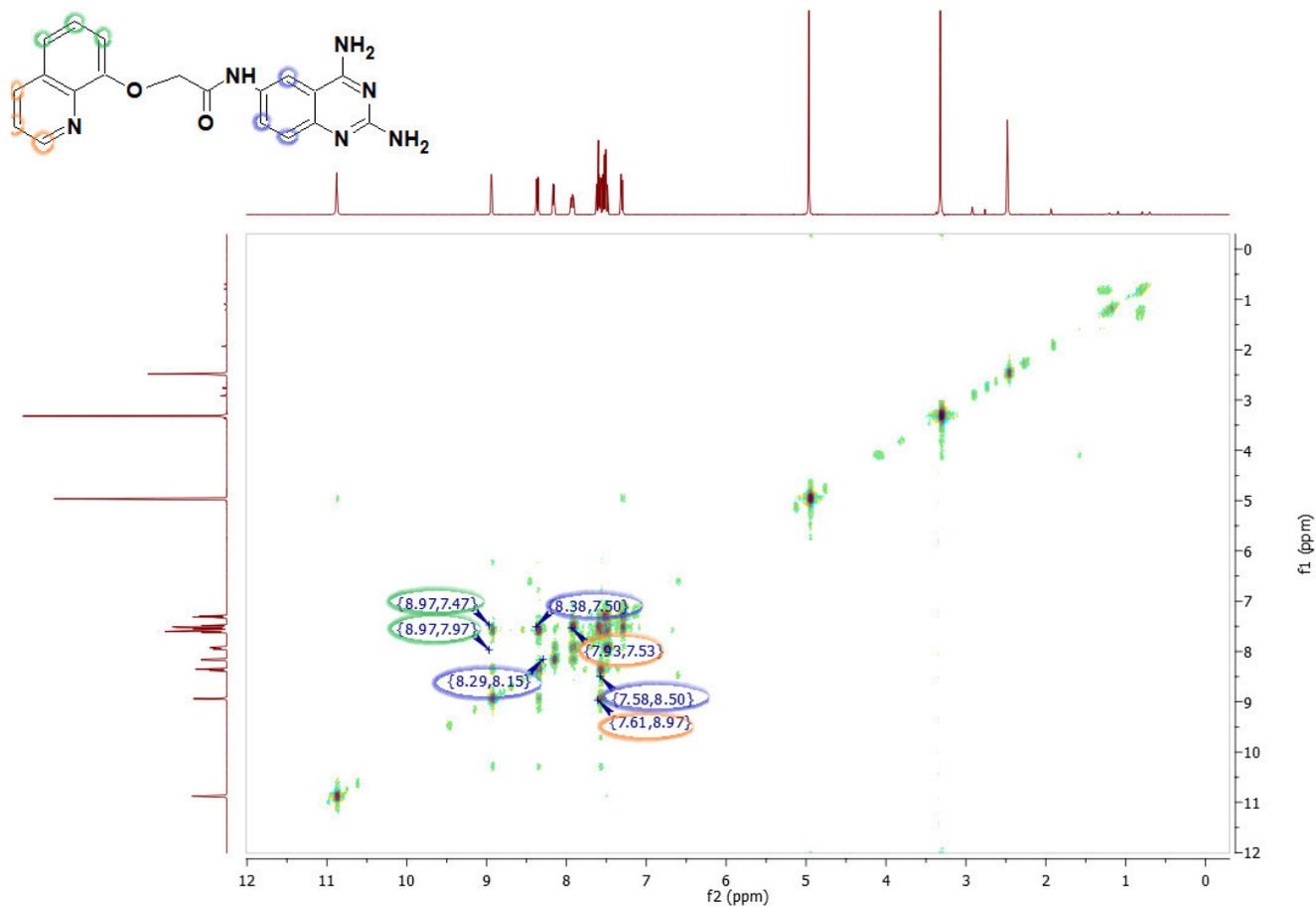
Espectro 1.61 IR cm⁻¹ de FSHV3Espectro 1.62 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV3



Espectro 1.63 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de **FSHV3**

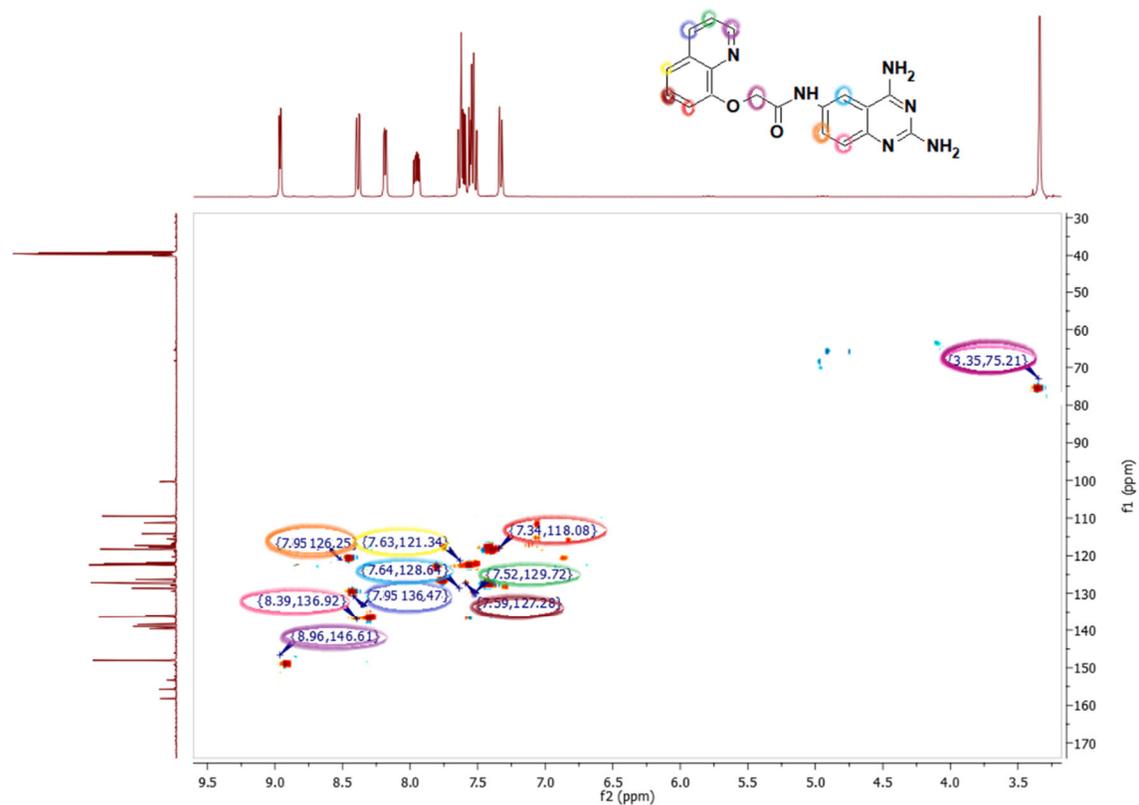


Espectro 1.64 Espectrometría de masas APCI de **FSHV3**

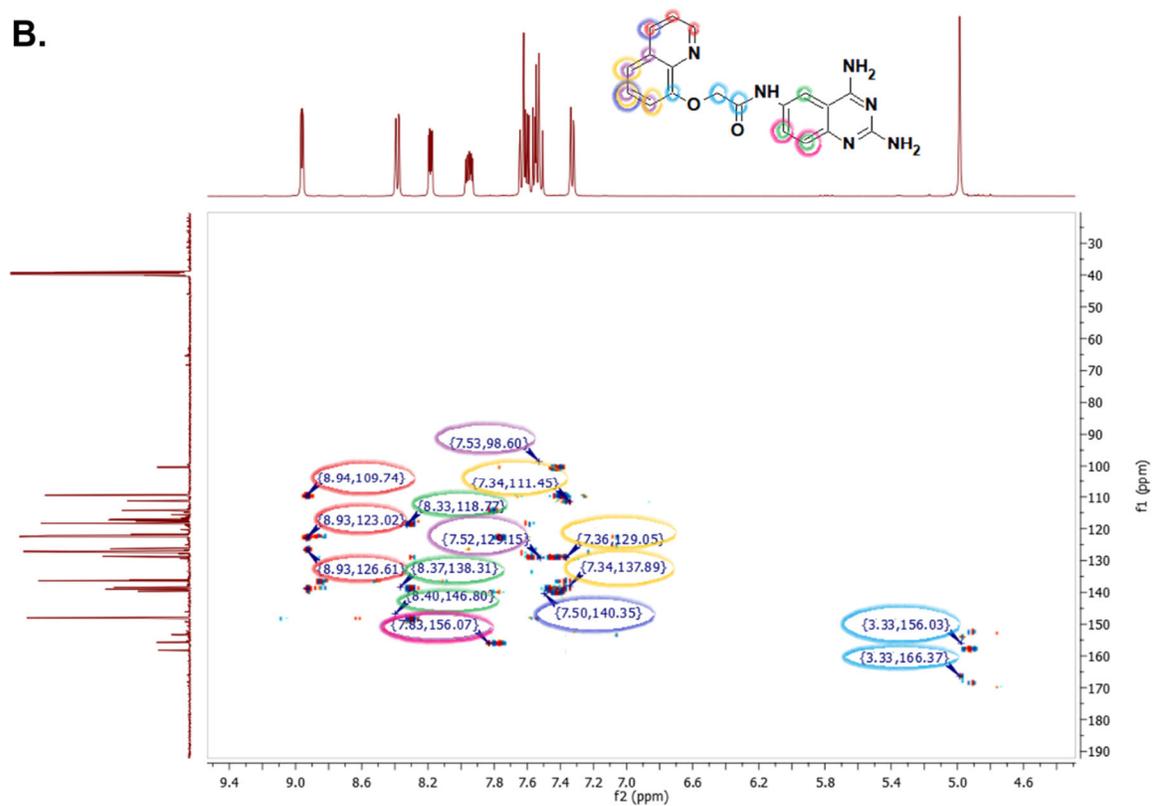


Espectro 1.65 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV3

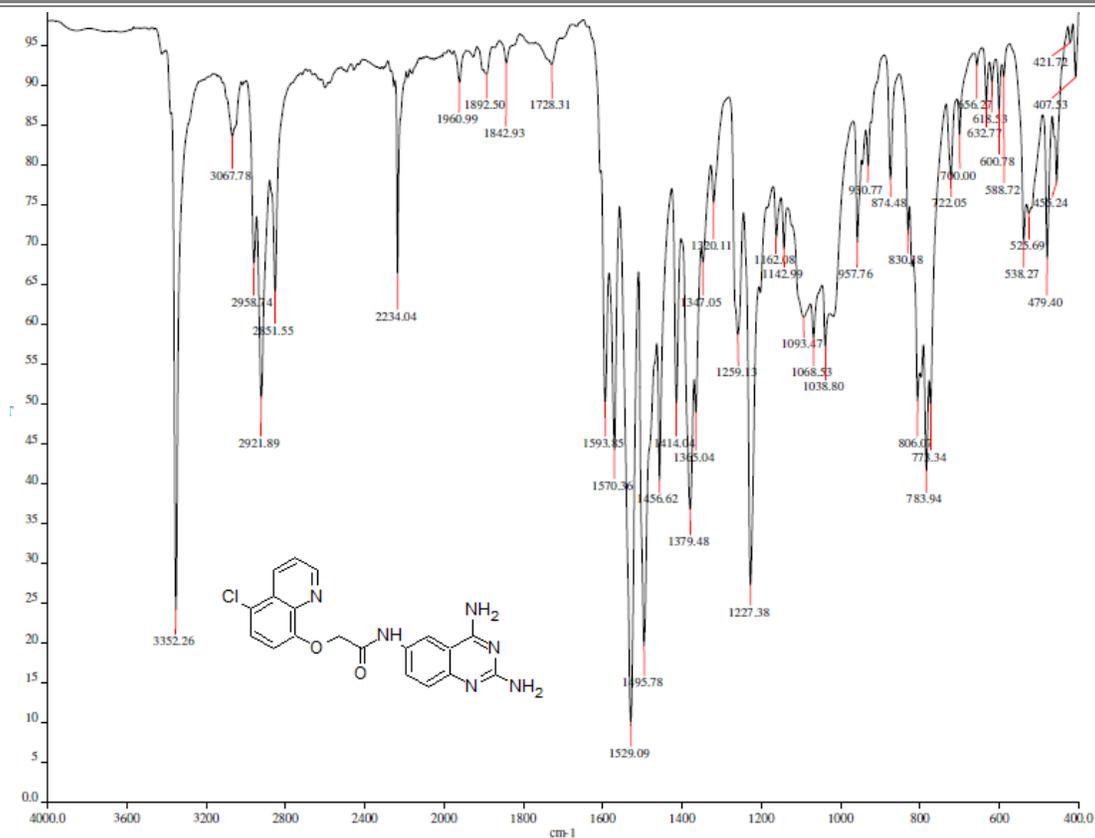
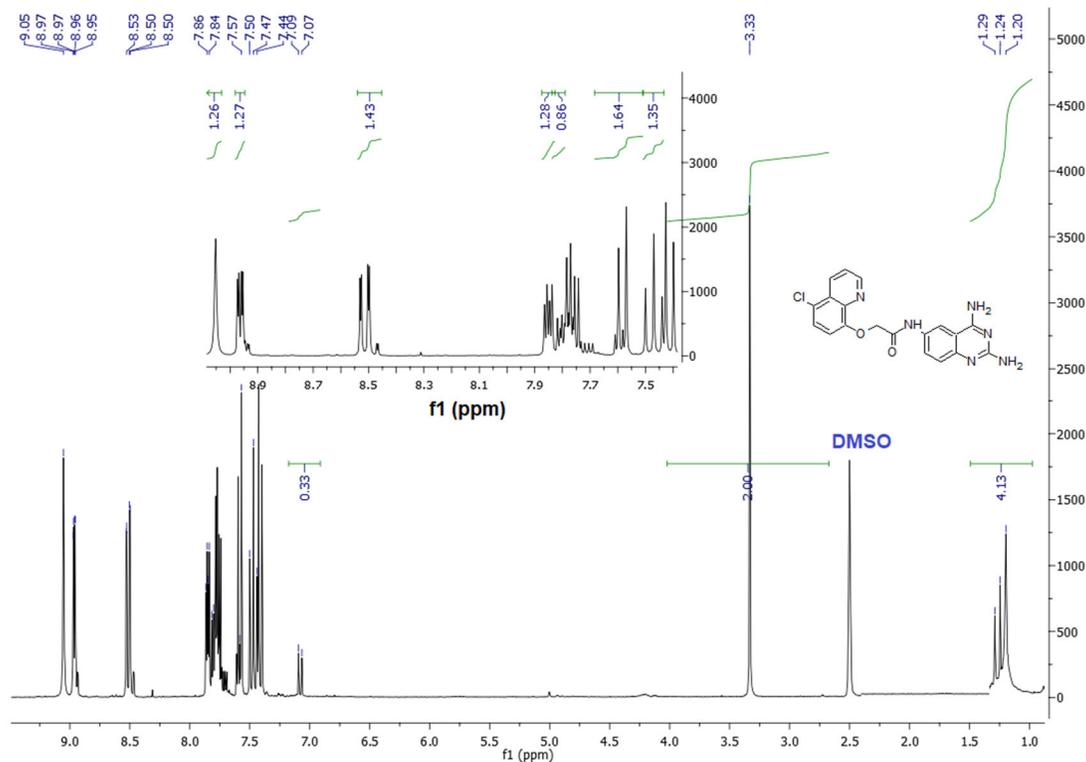
A.

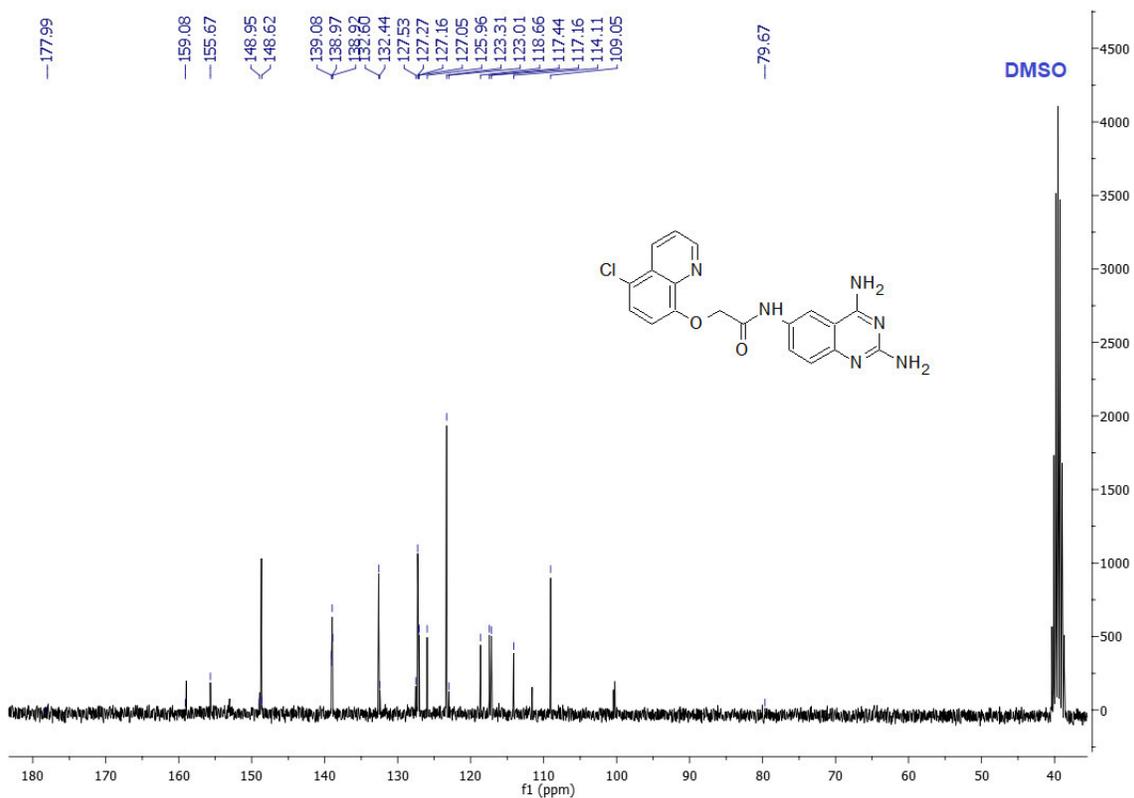
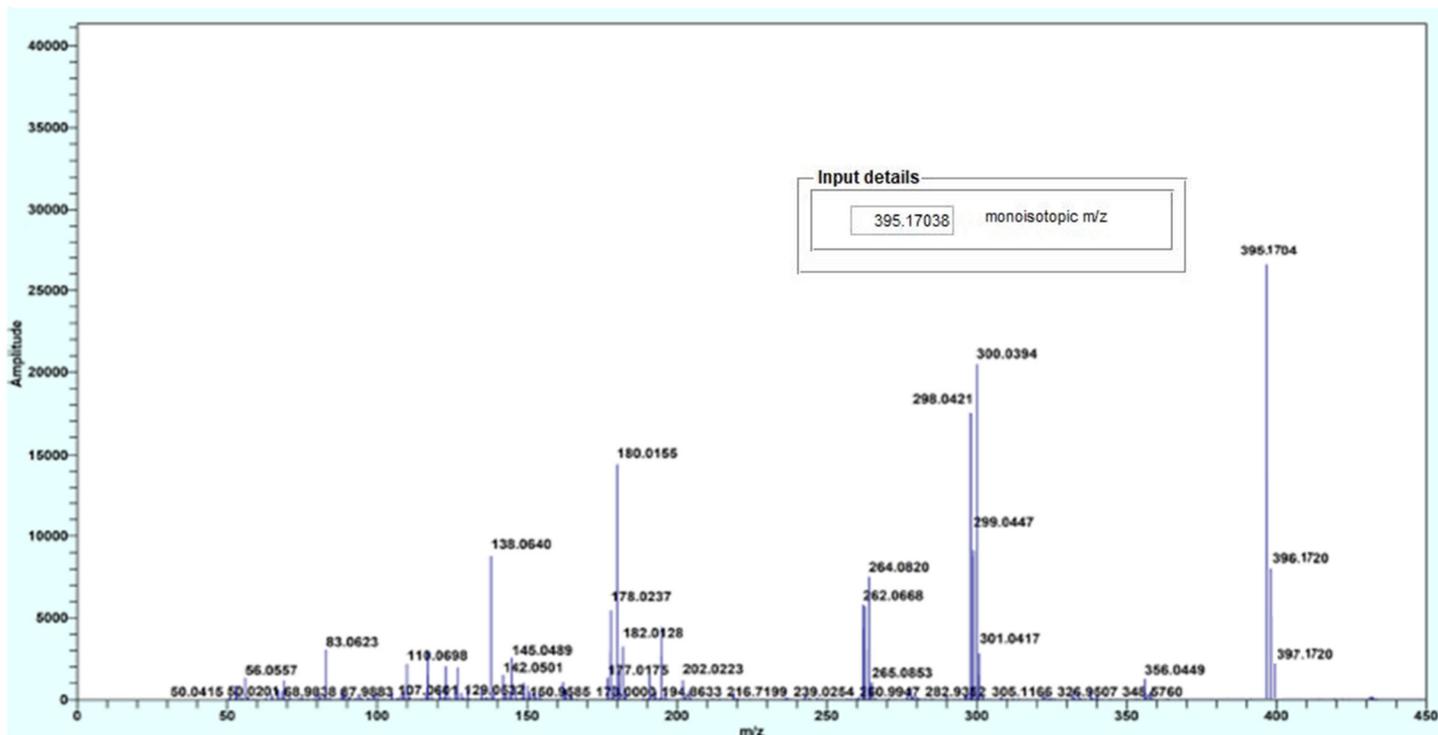


B.

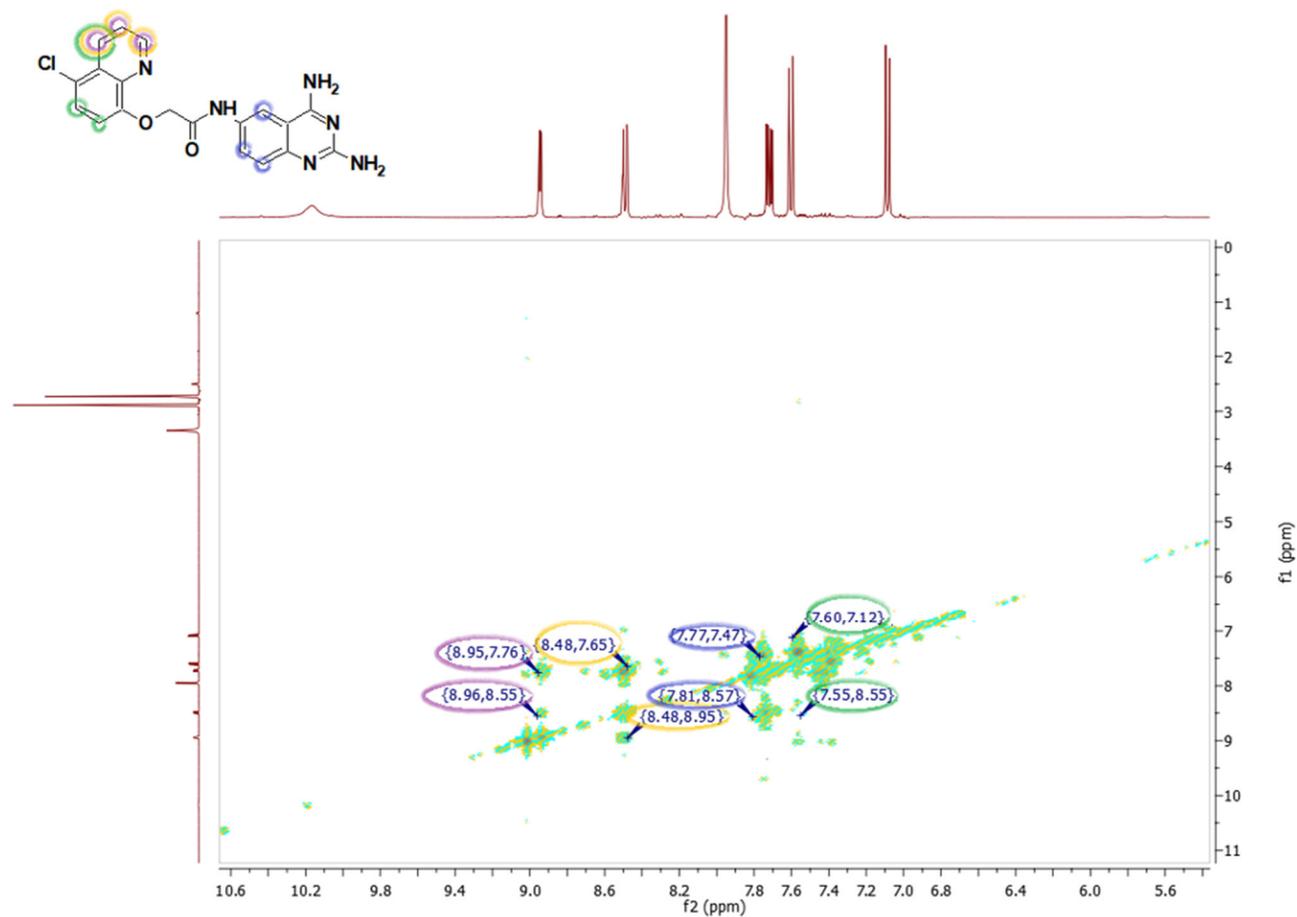


Espectro 1.66 RMN en 2D heteronucleares de FSHV3 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

Espectro 1.67 IR cm^{-1} de FSHV4Espectro 1.68 RMN ^1H 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV4

Espectro 1.69 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV4

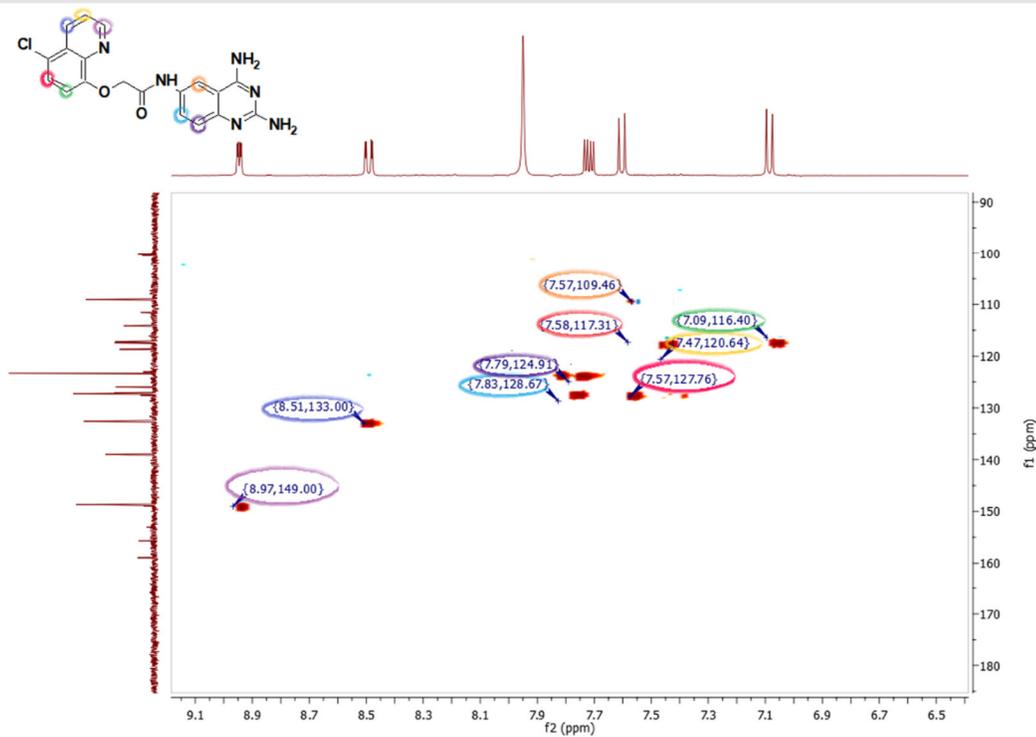
Espectro 1.70 Espectrometría de masas APCI de FSHV4



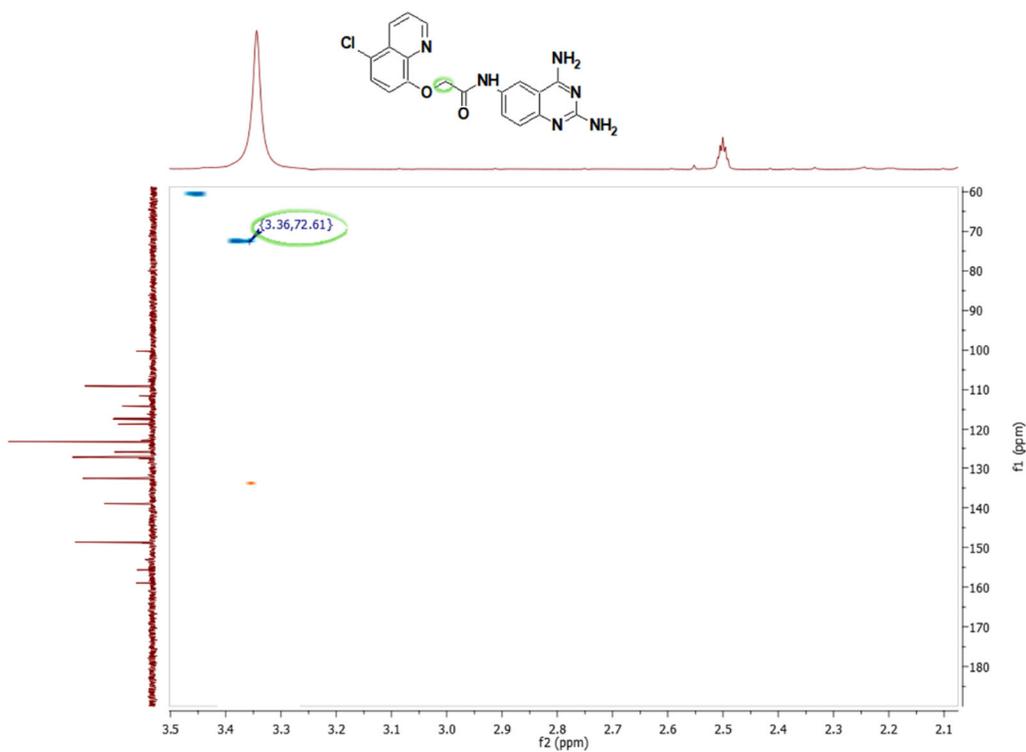
Espectro 1.71 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV4

A.

Aromáticos

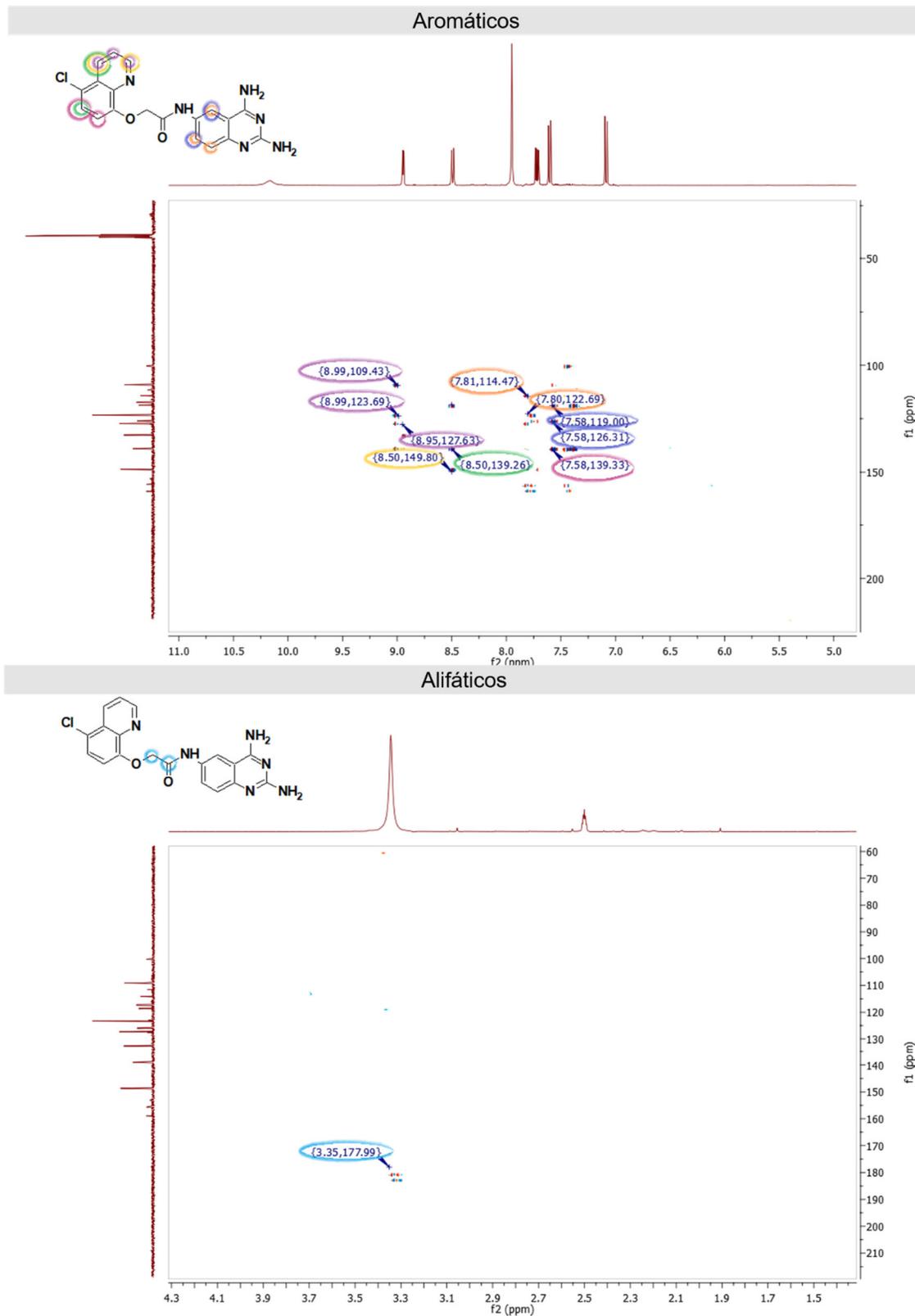


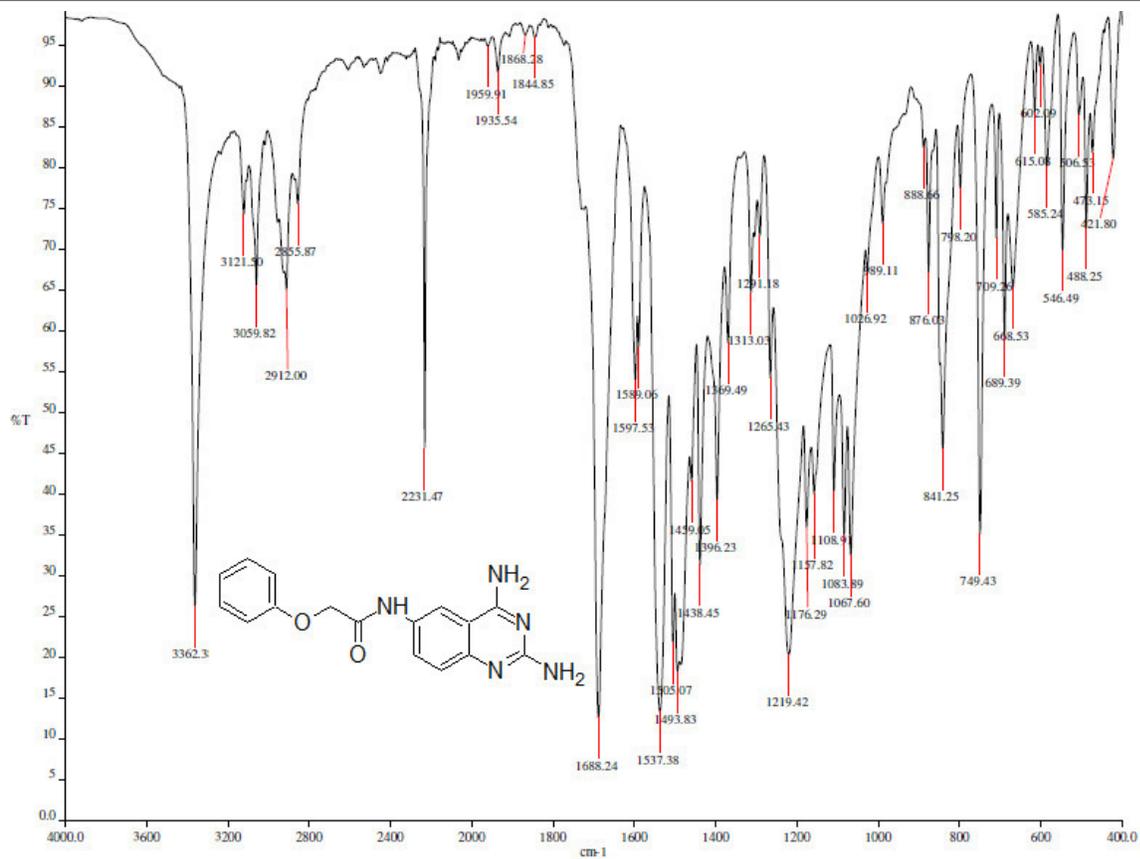
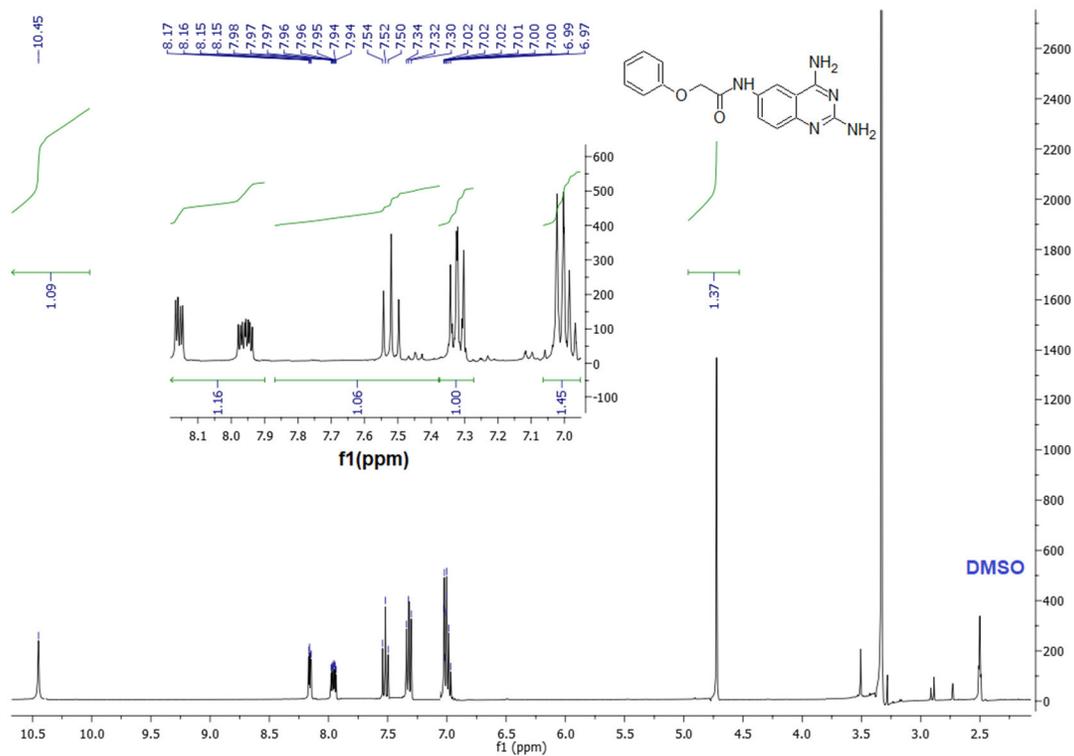
Alifáticos

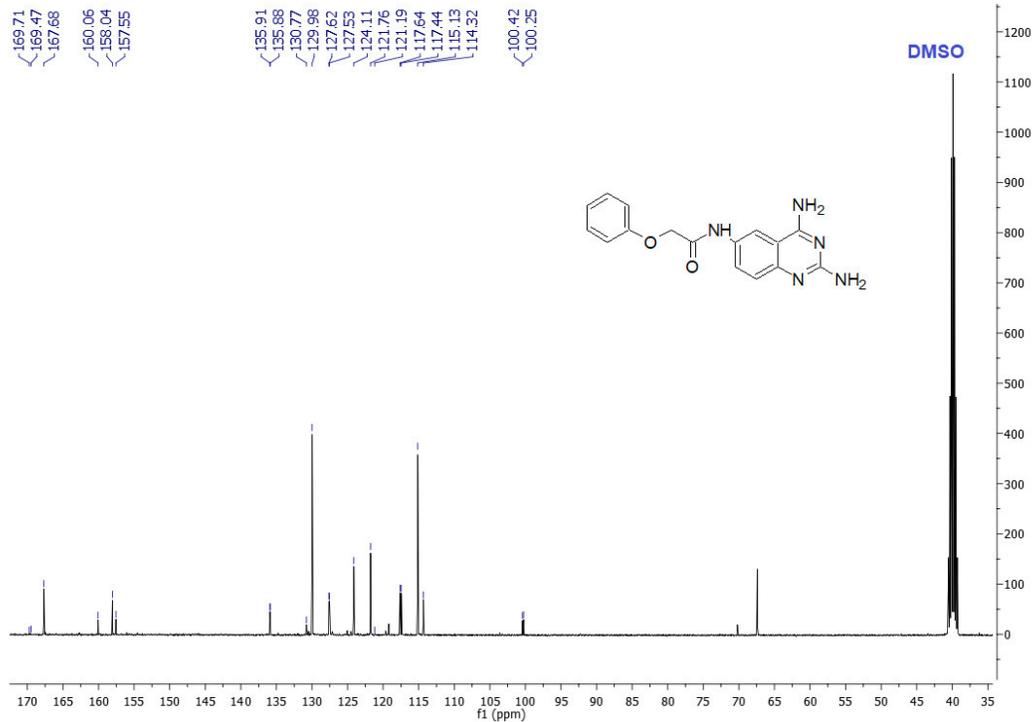
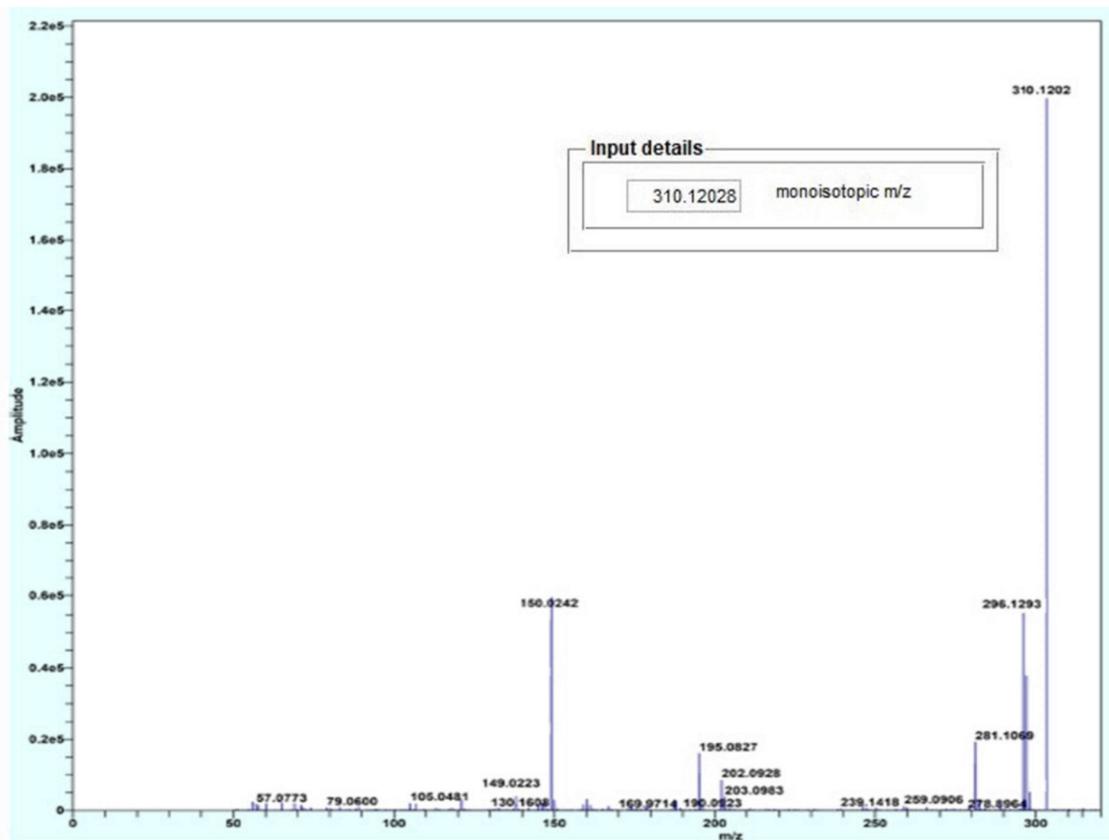


Espectro 1.72 RMN en 2D heteronucleares de FSHV4 A. Espectro HSQC

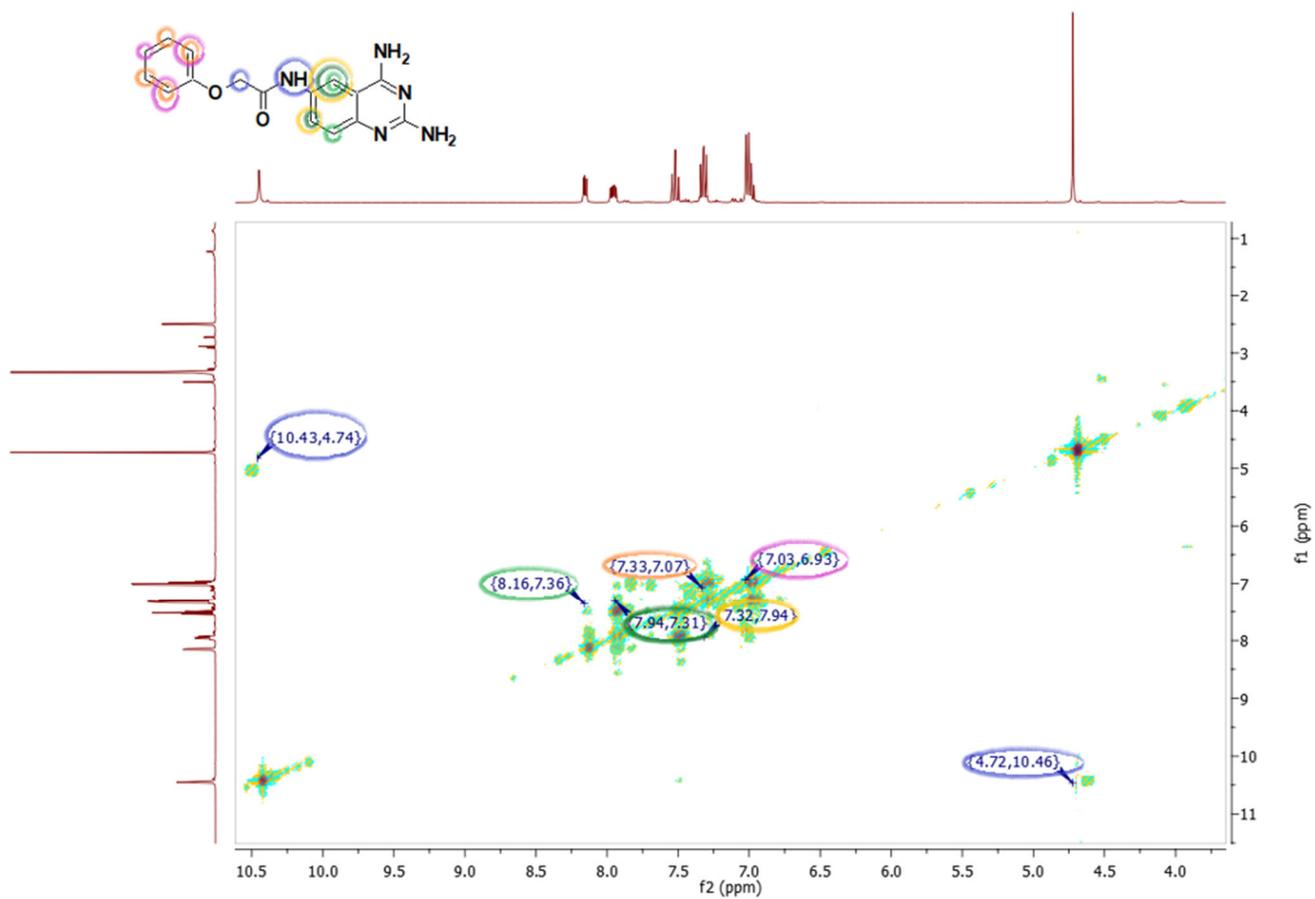
B.



Espectro 1.73 IR cm⁻¹ de FSHV5Espectro 1.74 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV5

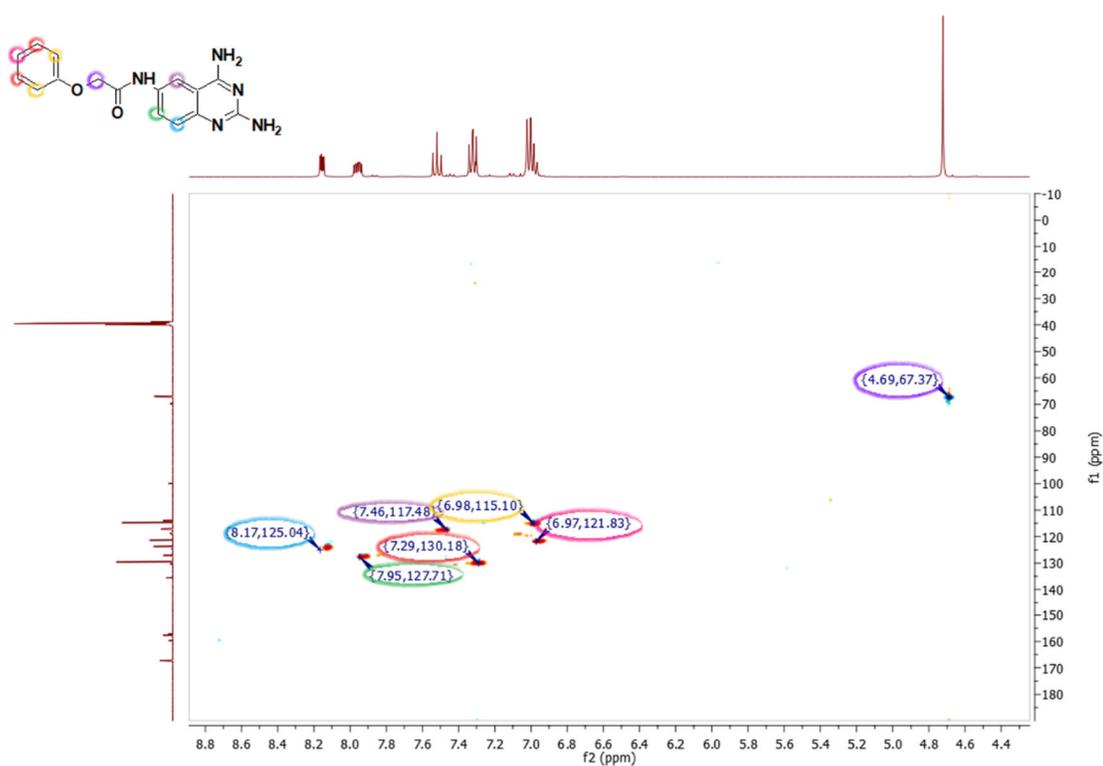
Espectro 1.75 RMN ^{13}C 400 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV5

Espectro 1.70 Espectrometría de masas APCI de FSHV5

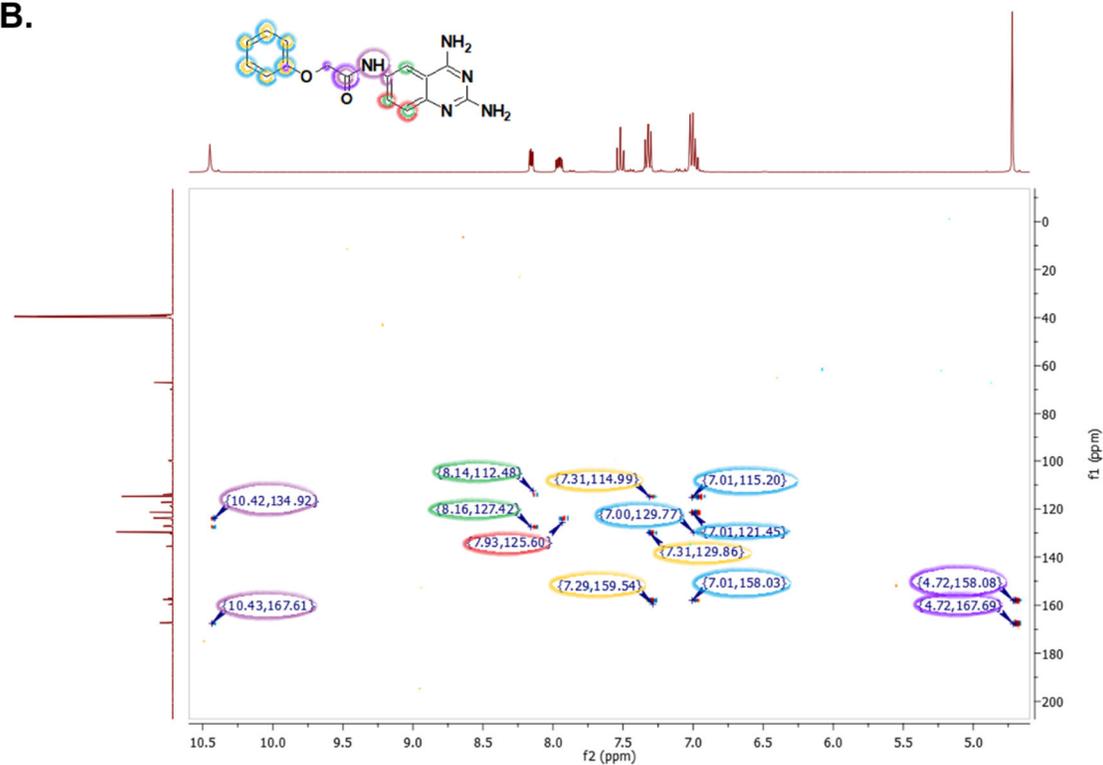


Espectro 1.77 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV5

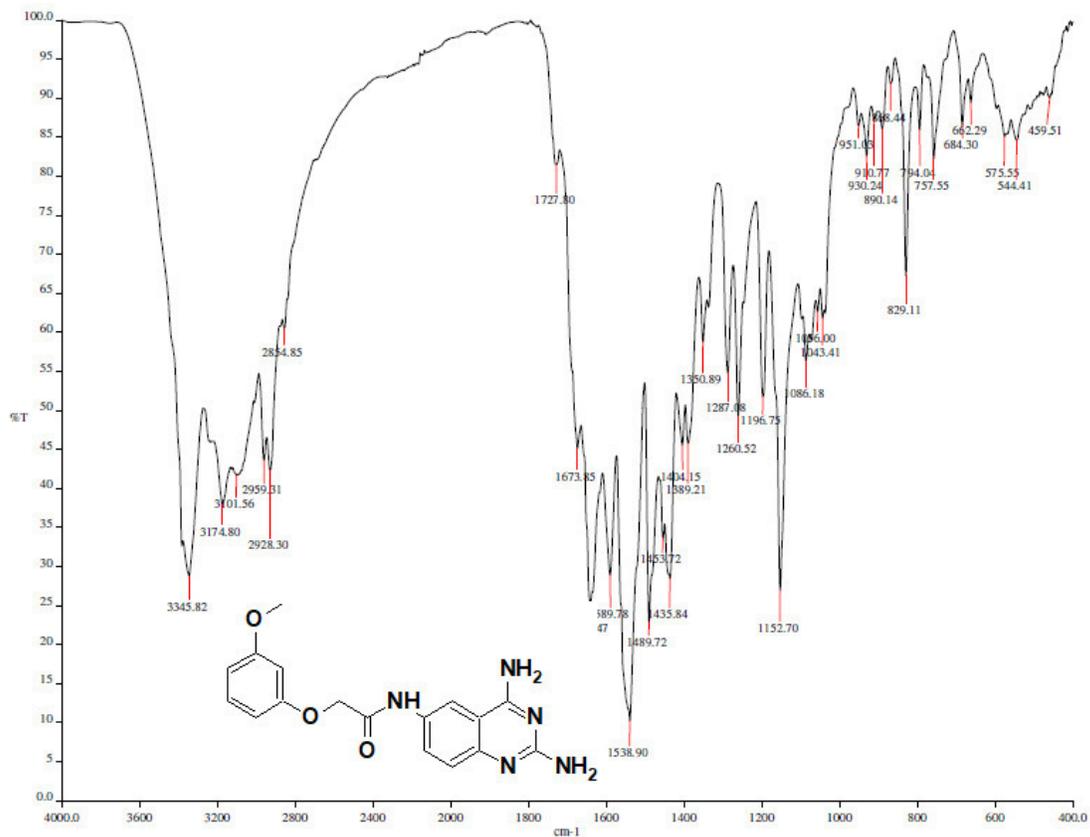
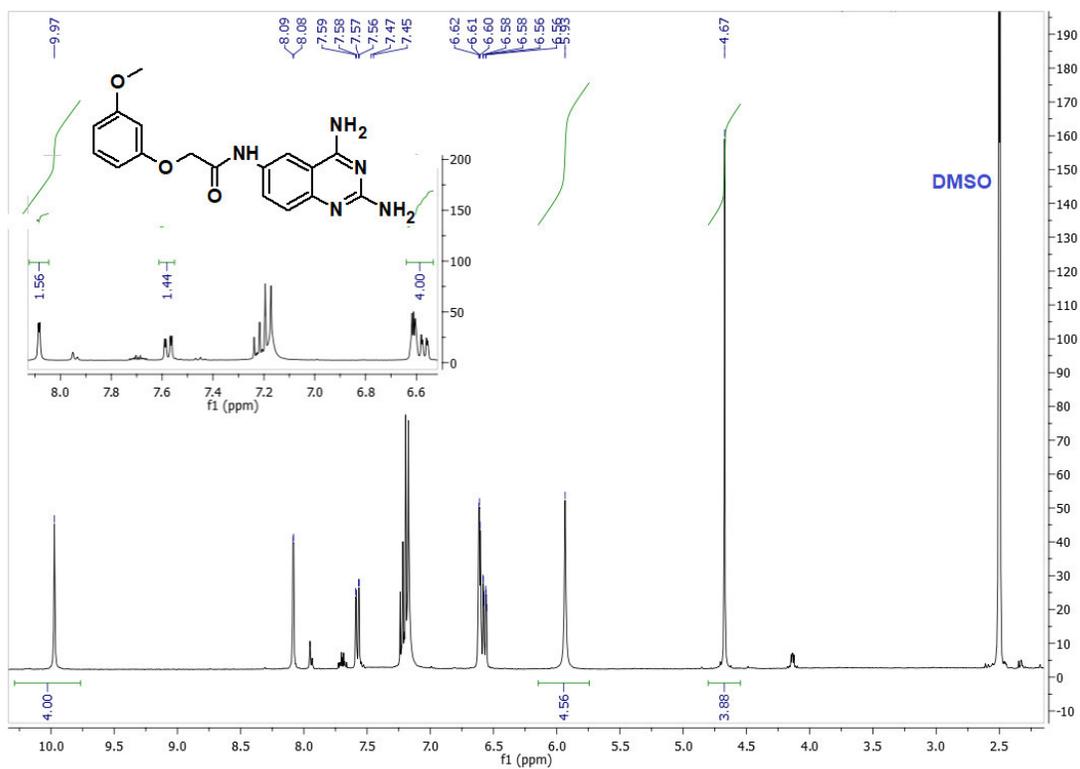
A.

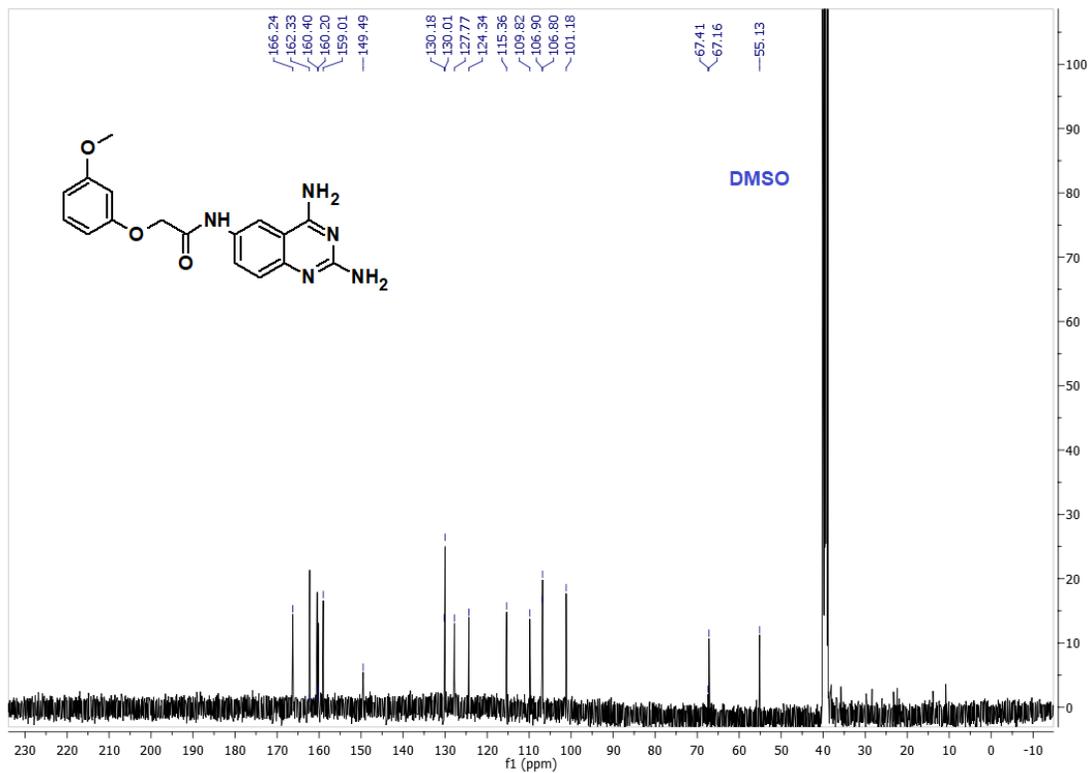


B.

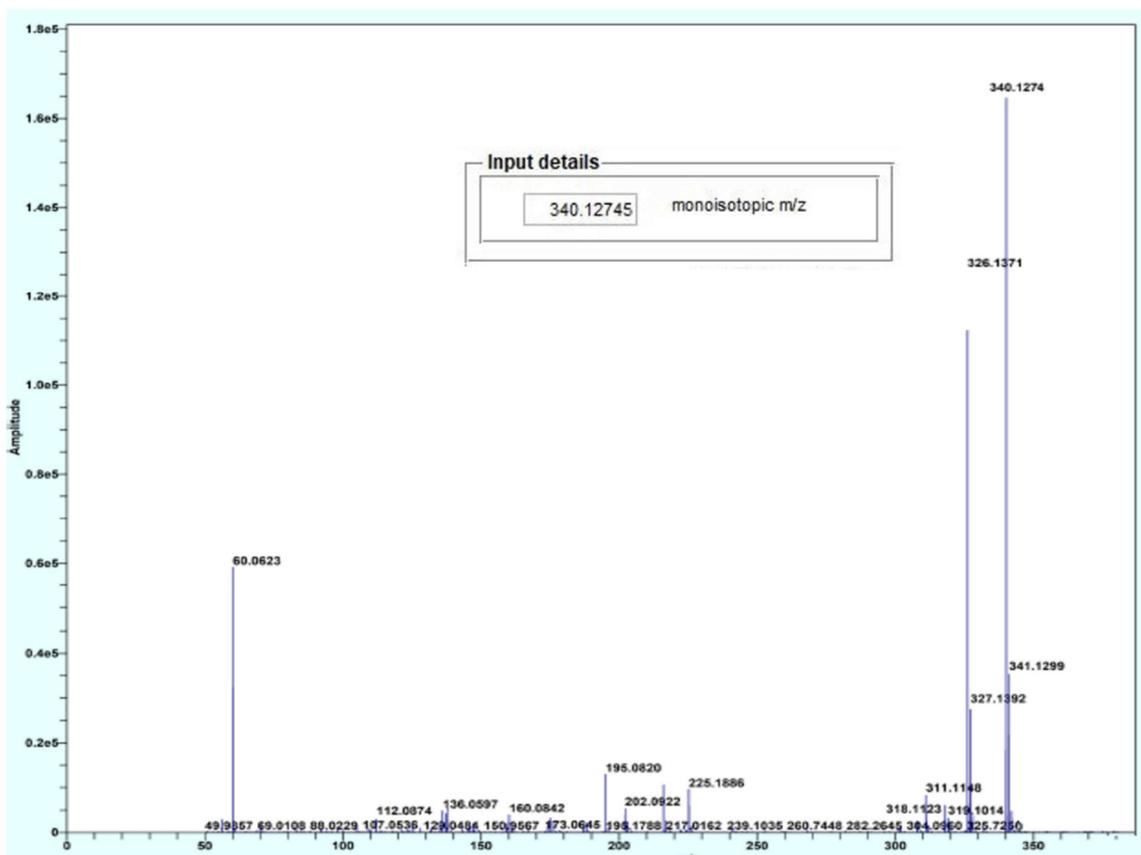


Espectro 1.78 RMN en 2D heteronucleares de FSHV5 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

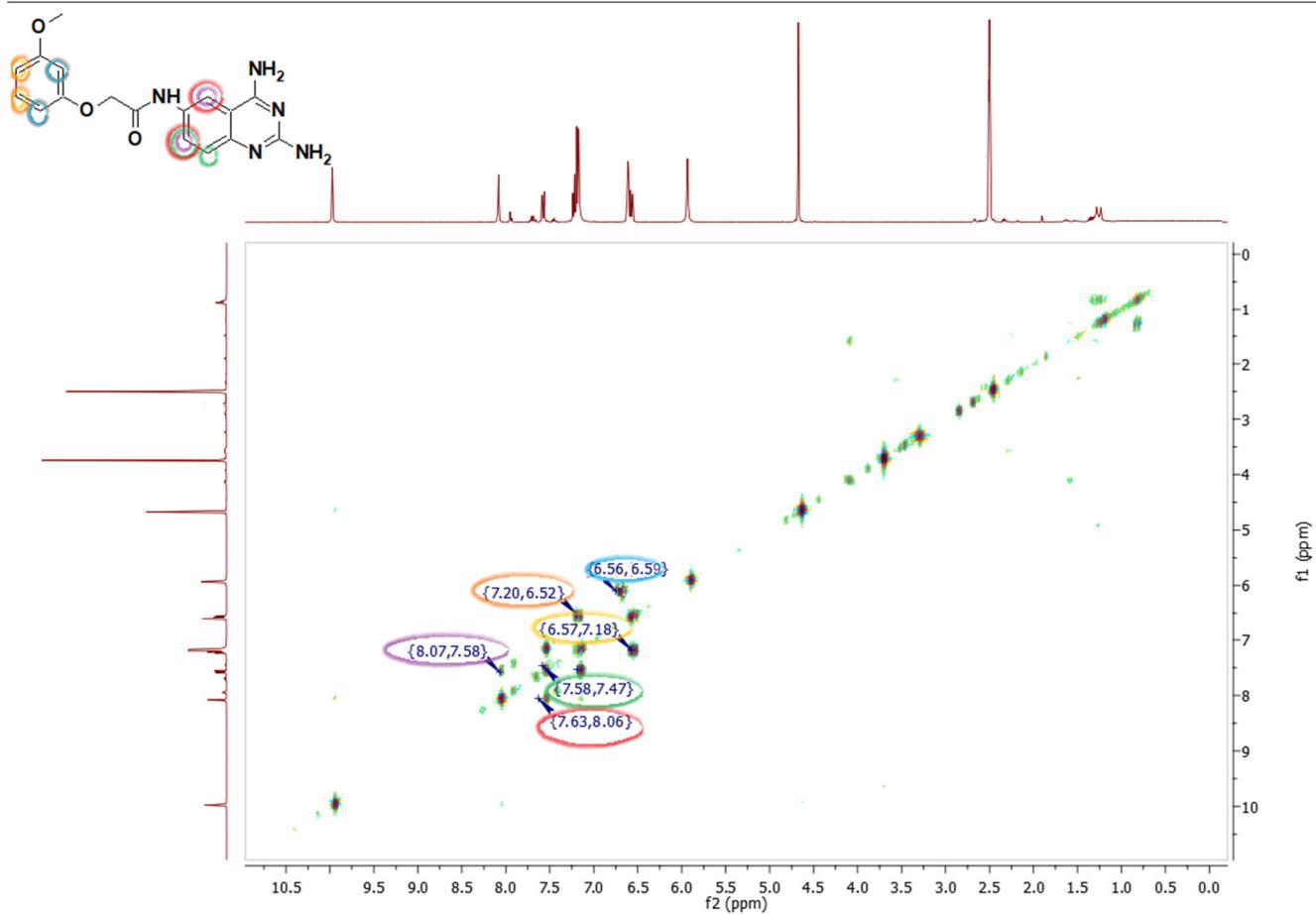
Espectro 1.79 IR cm⁻¹ de FSHV6Espectro 1.80 RMN ¹H 400 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV6



Espectro 1.81 RMN ^{13}C 400 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV6

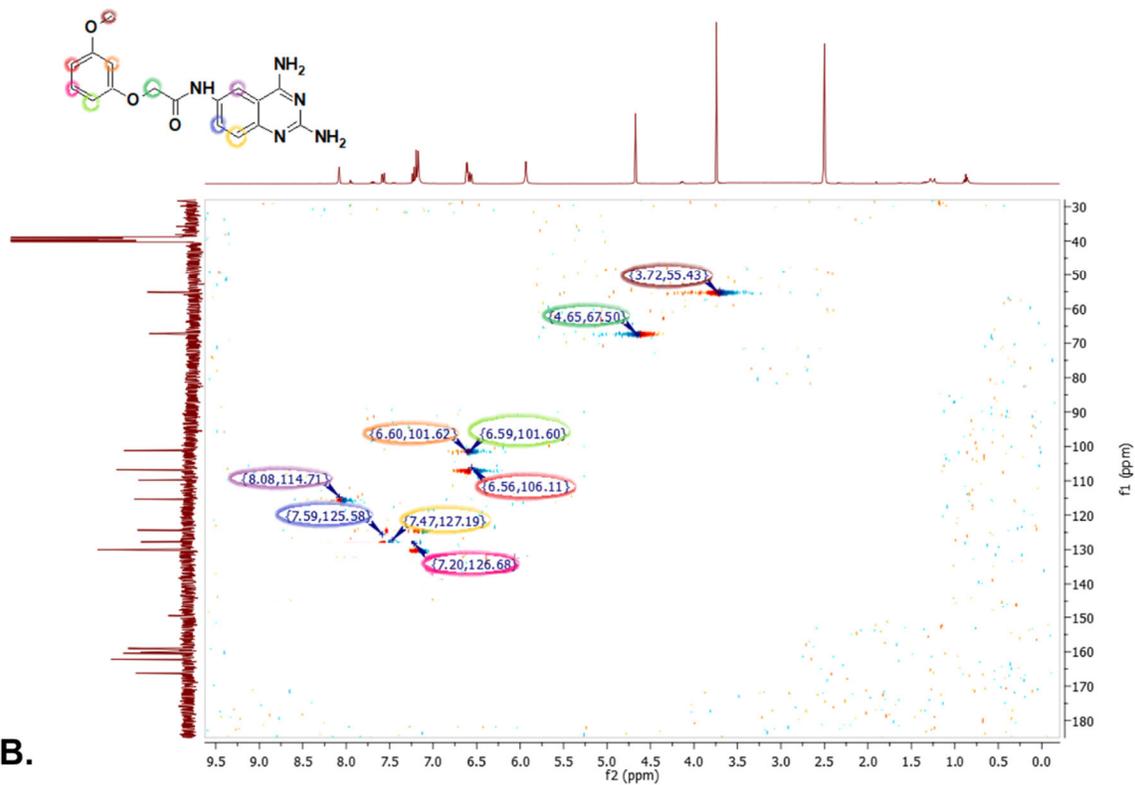


Espectro 1.82 Espectrometría de masas APCI de FSHV6

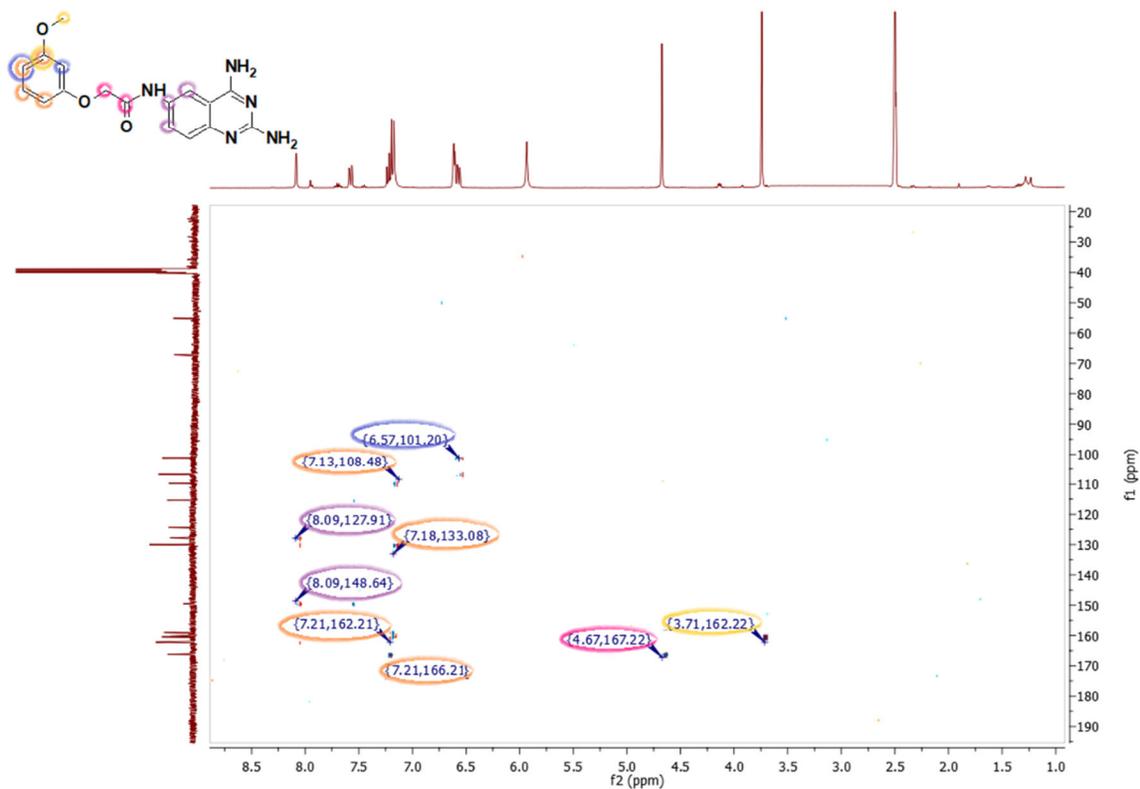


Espectro 1.83 RMN en 2D homonuclear COSY de **FSHV6**

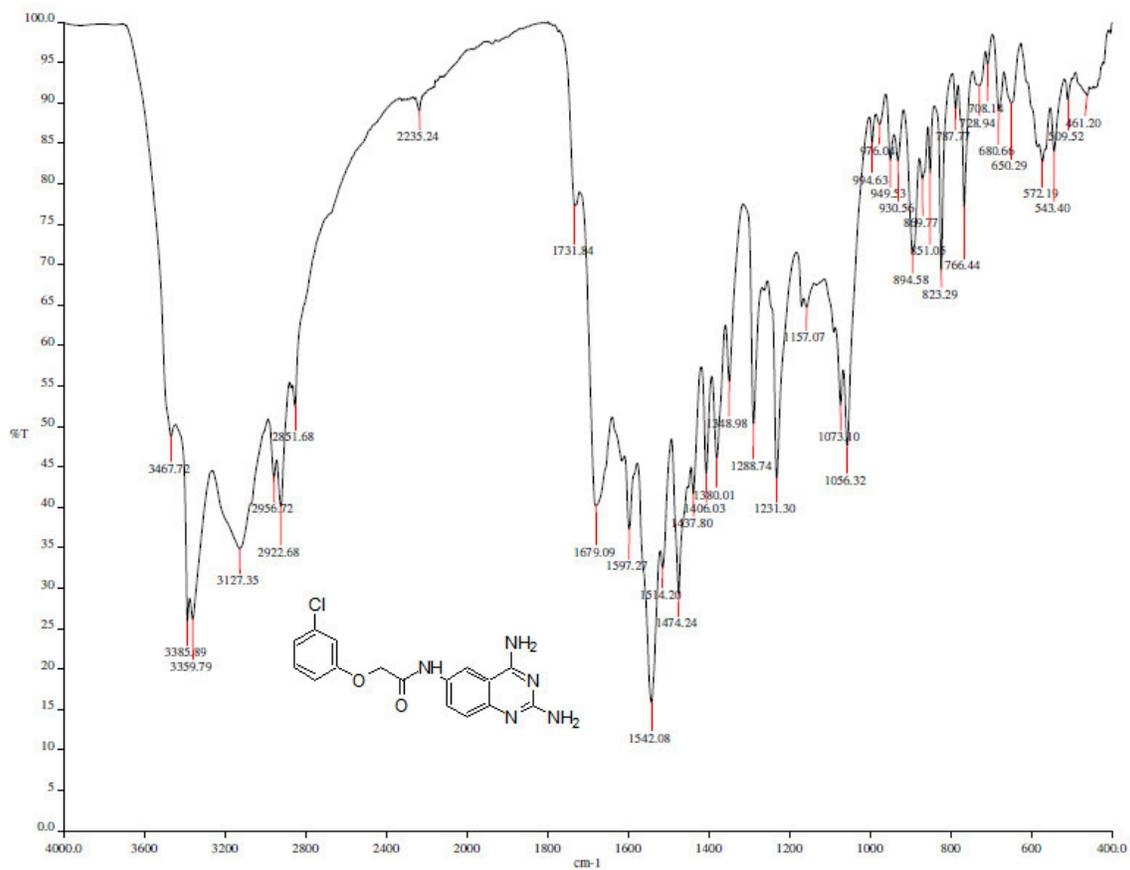
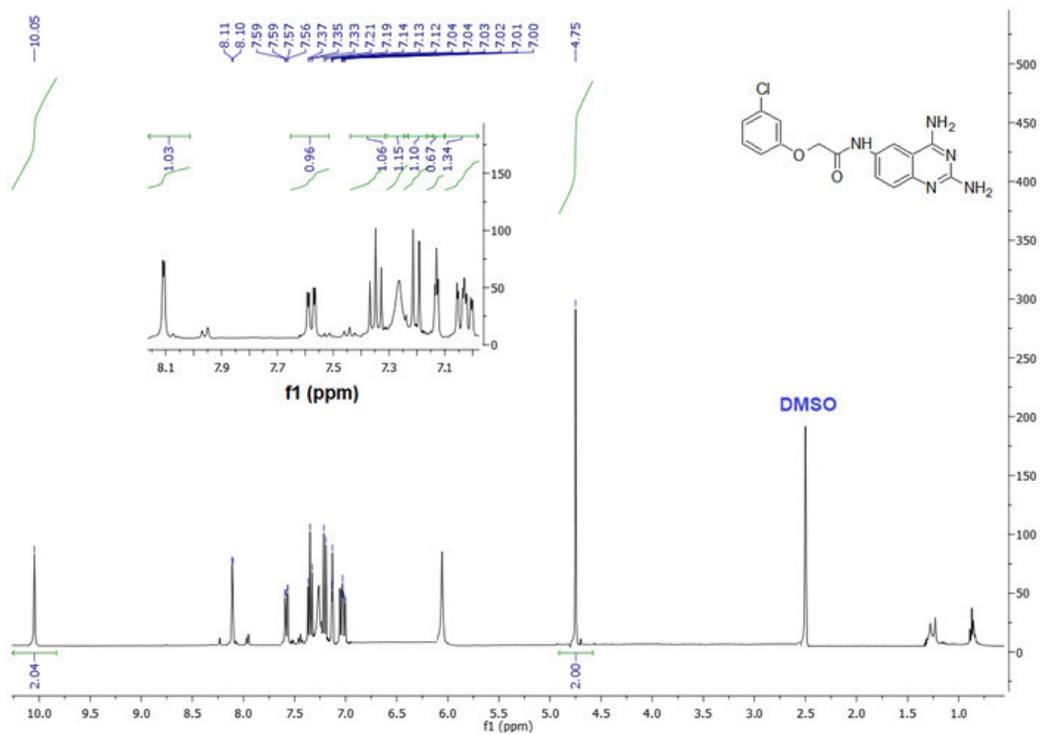
A.

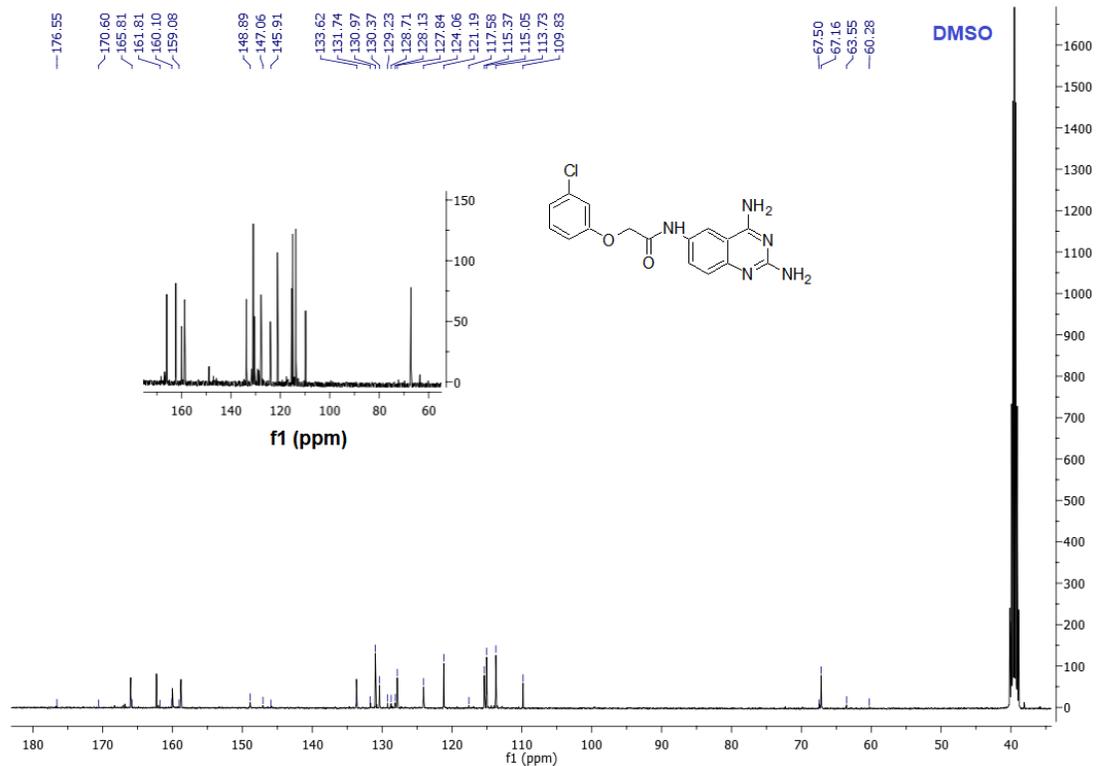
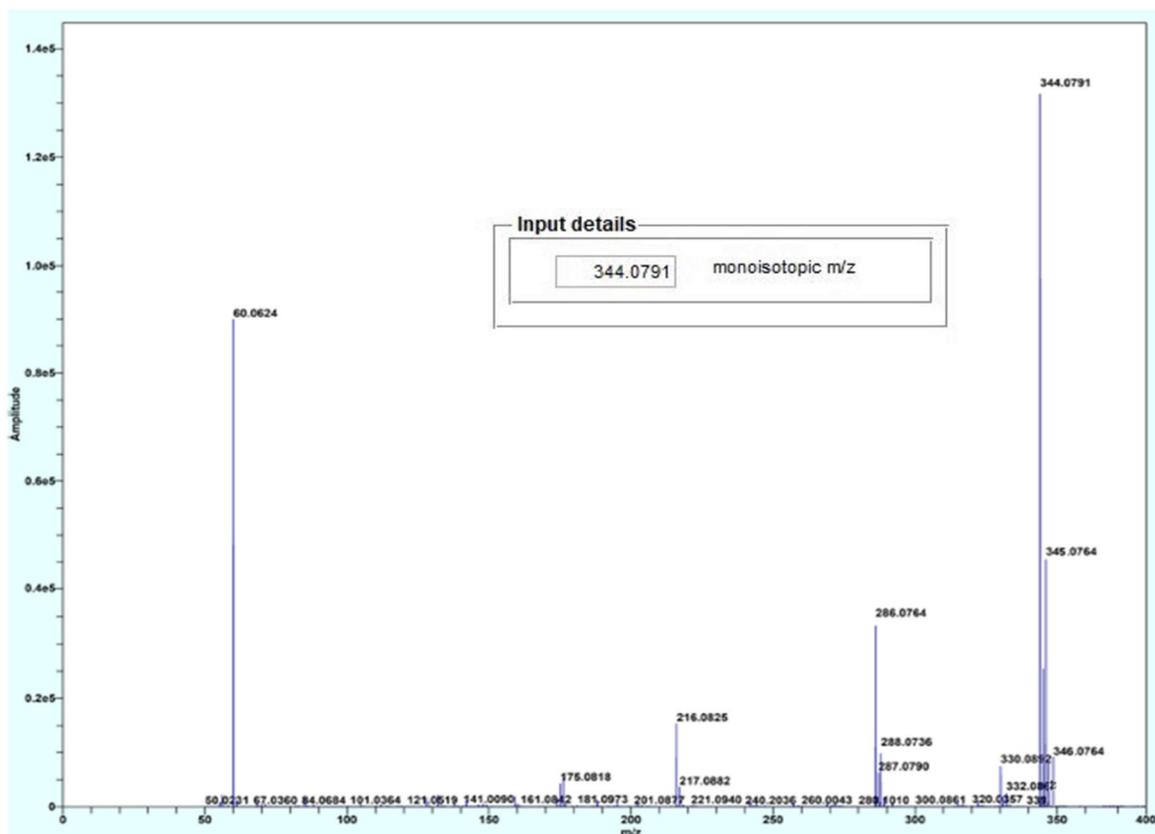


B.

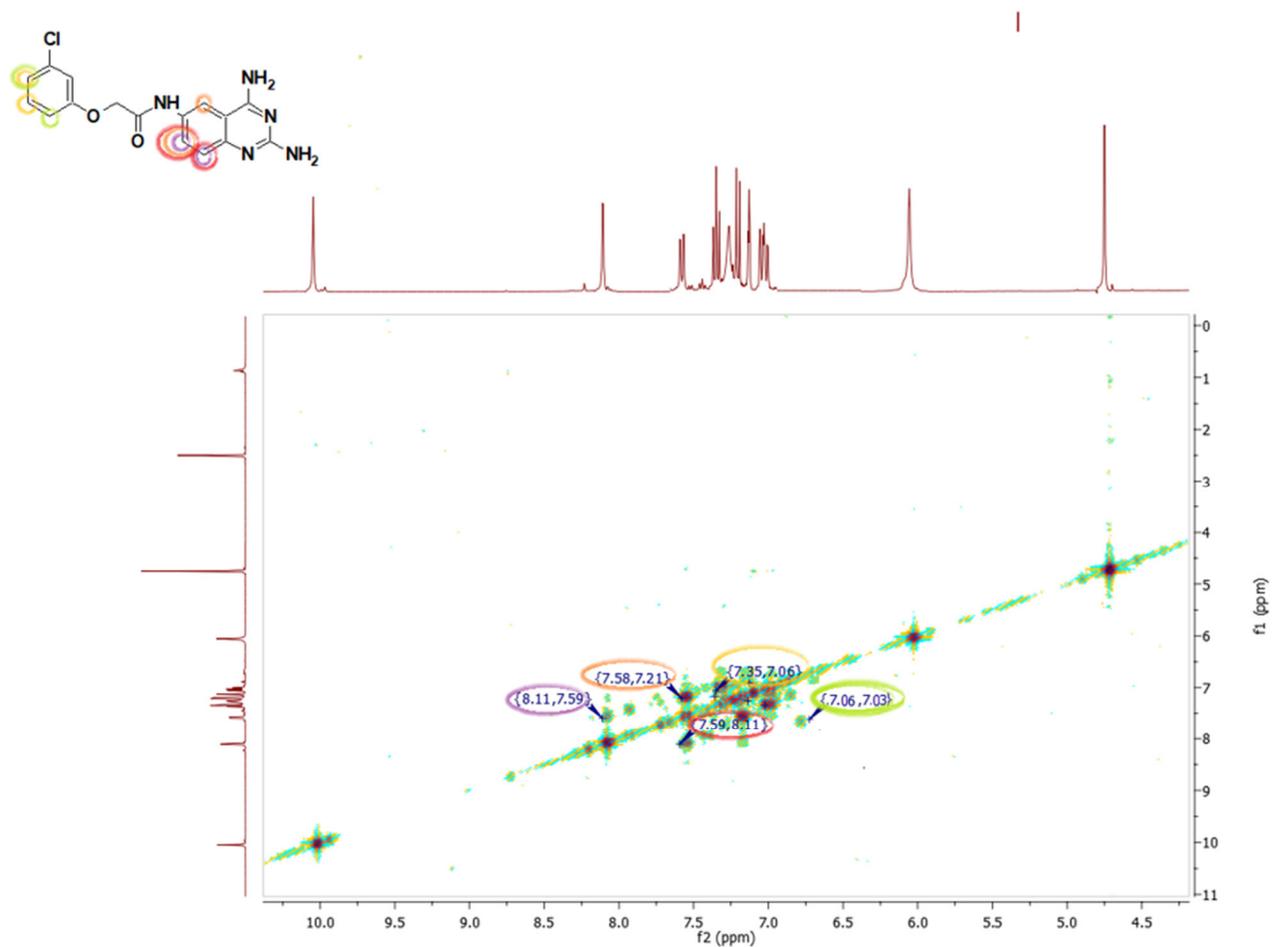


Espectro 1.84 RMN en 2D heteronucleares de FSHV6 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

Espectro 1.85 IR cm⁻¹ de FSHV7Espectro 1.86 RMN ¹H 300 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV7

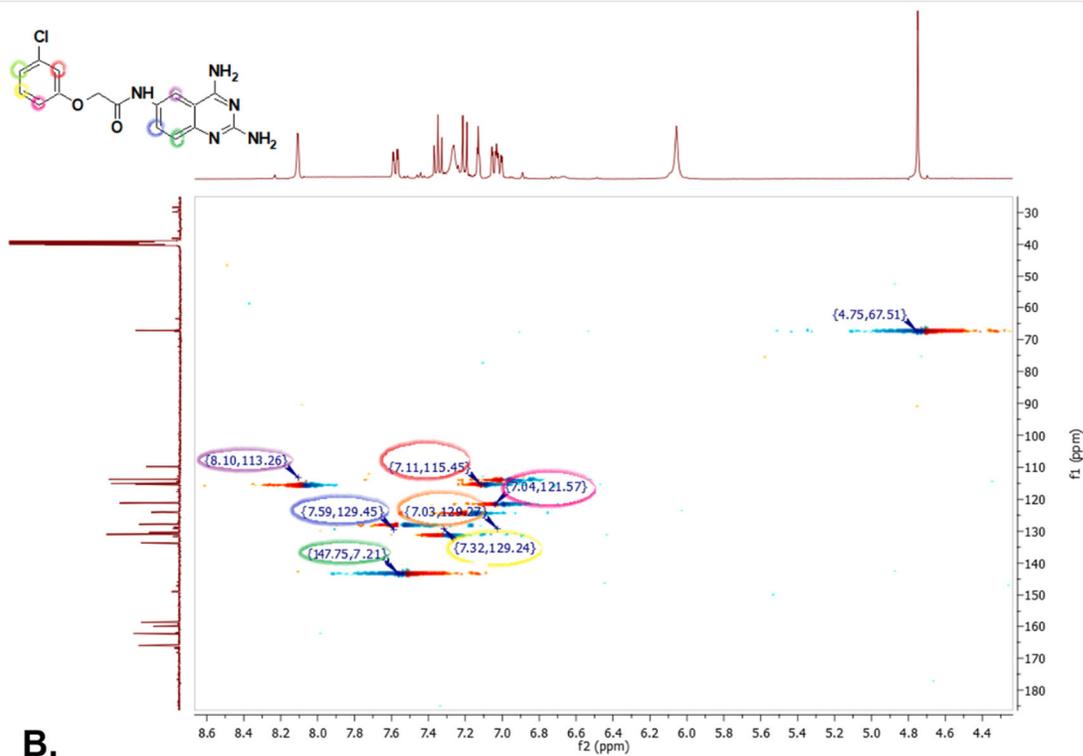
Espectro 1.87 RMN ^{13}C 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV7

Espectro 1.88 Espectrometría de masas APCI de FSHV7

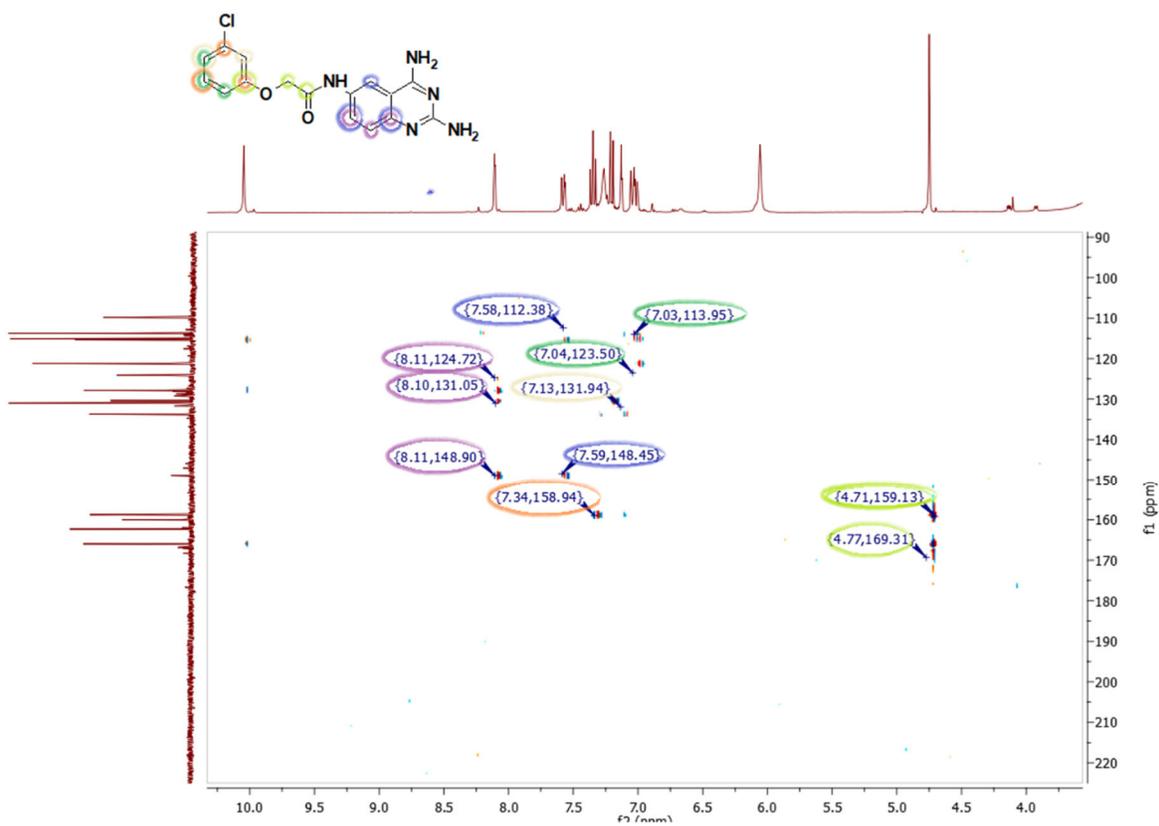


Espectro 1.89 RMN en 2D homonuclear COSY de **FSHV7**

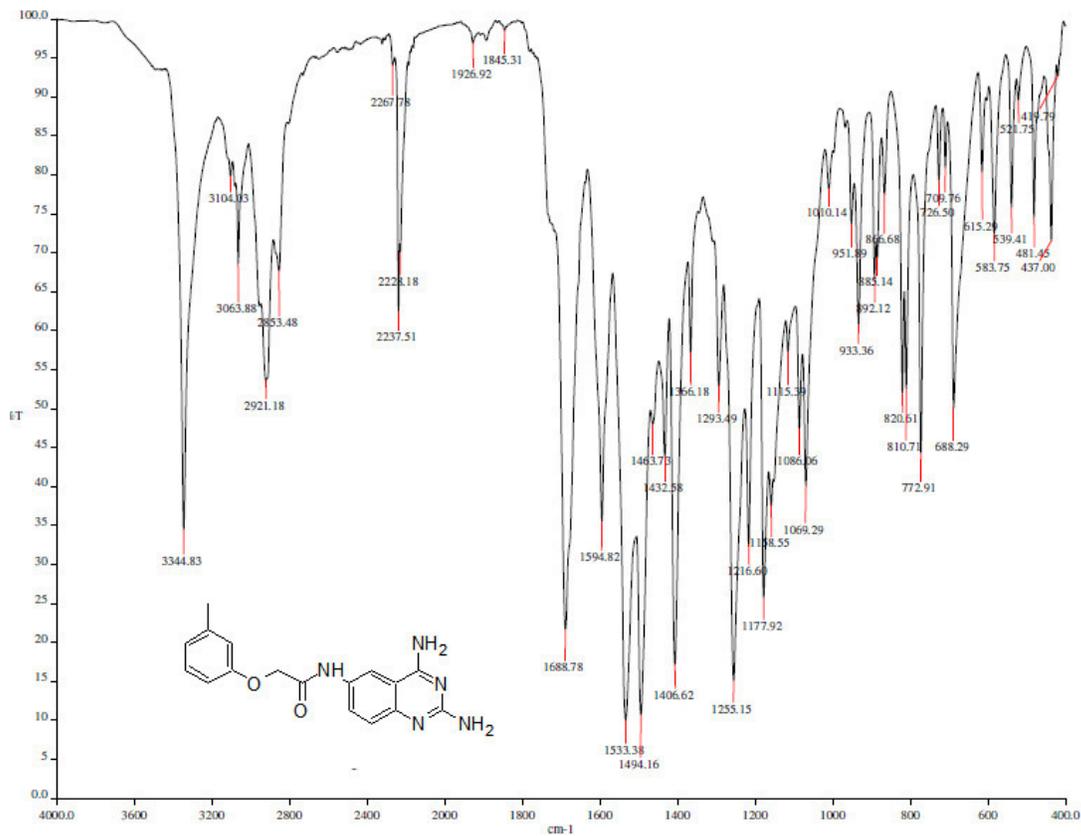
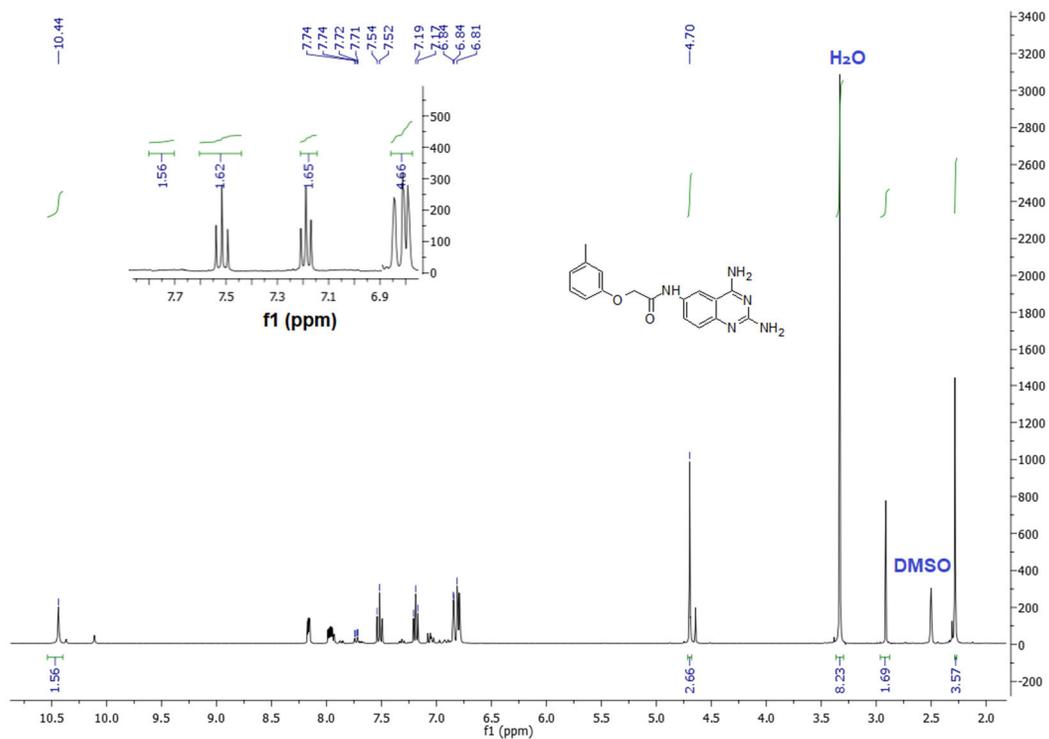
A.

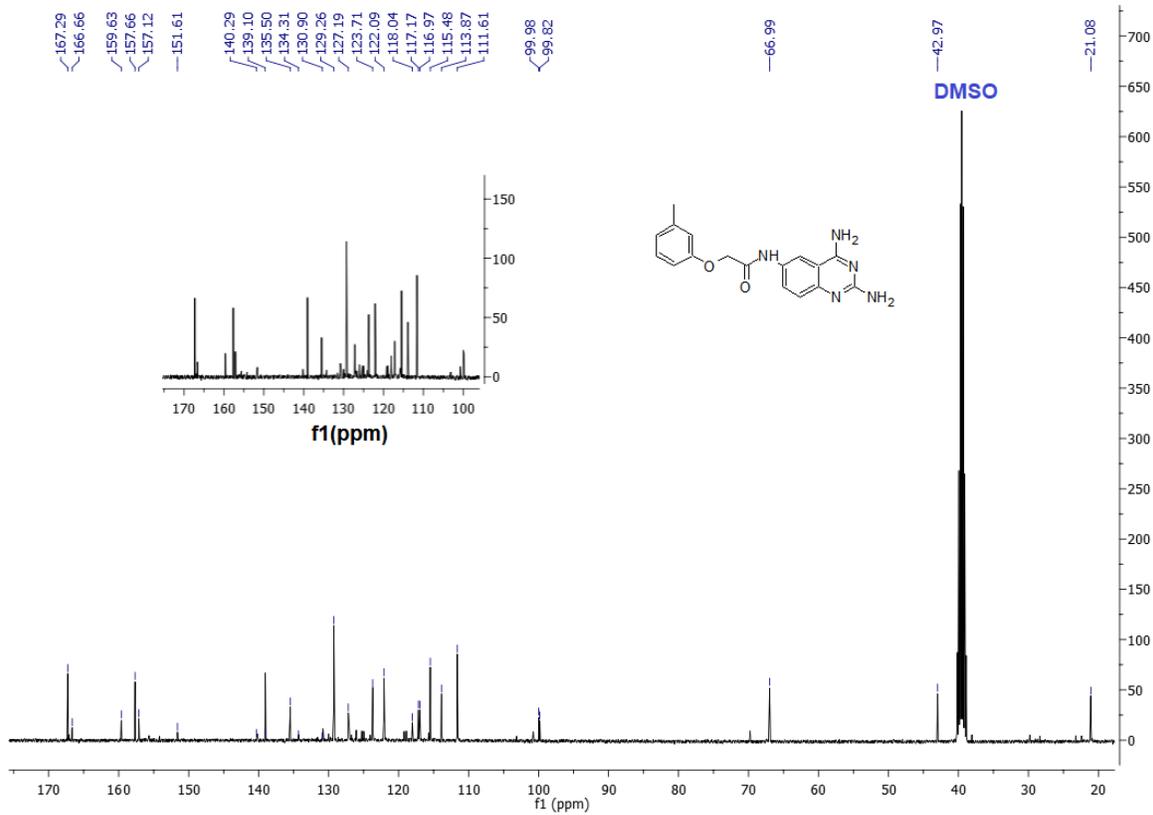


B.

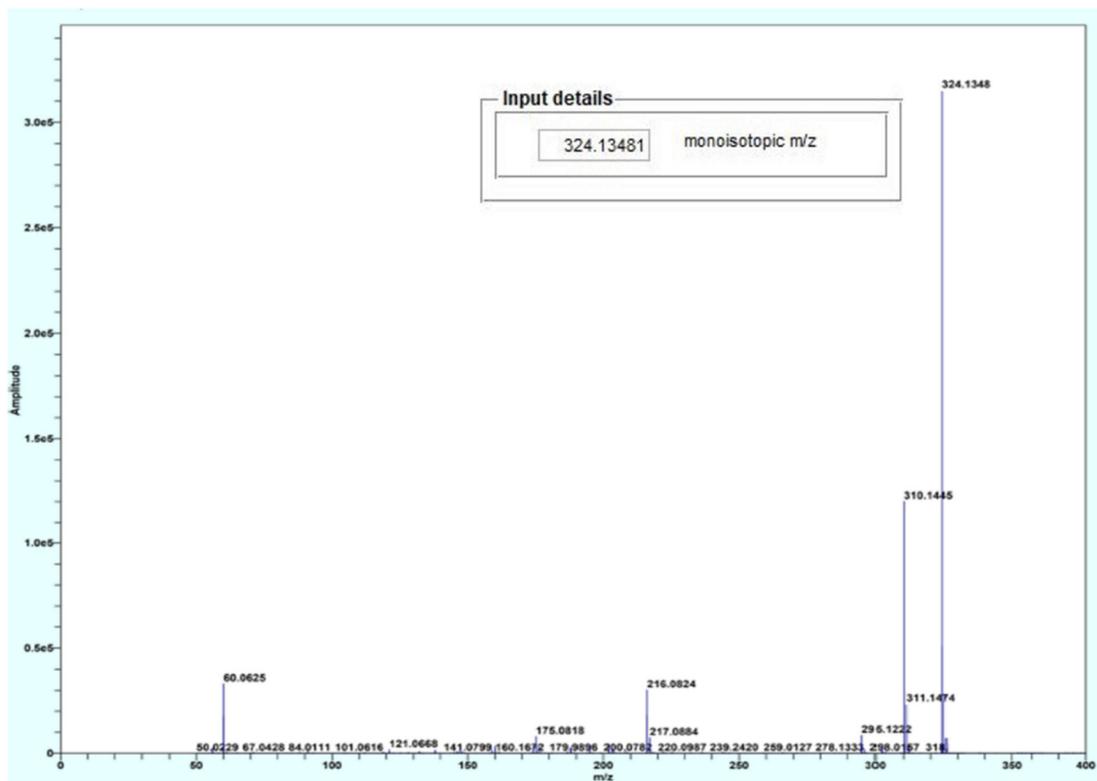


Espectro 1.90 RMN en 2D heteronucleares de FSHV7 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

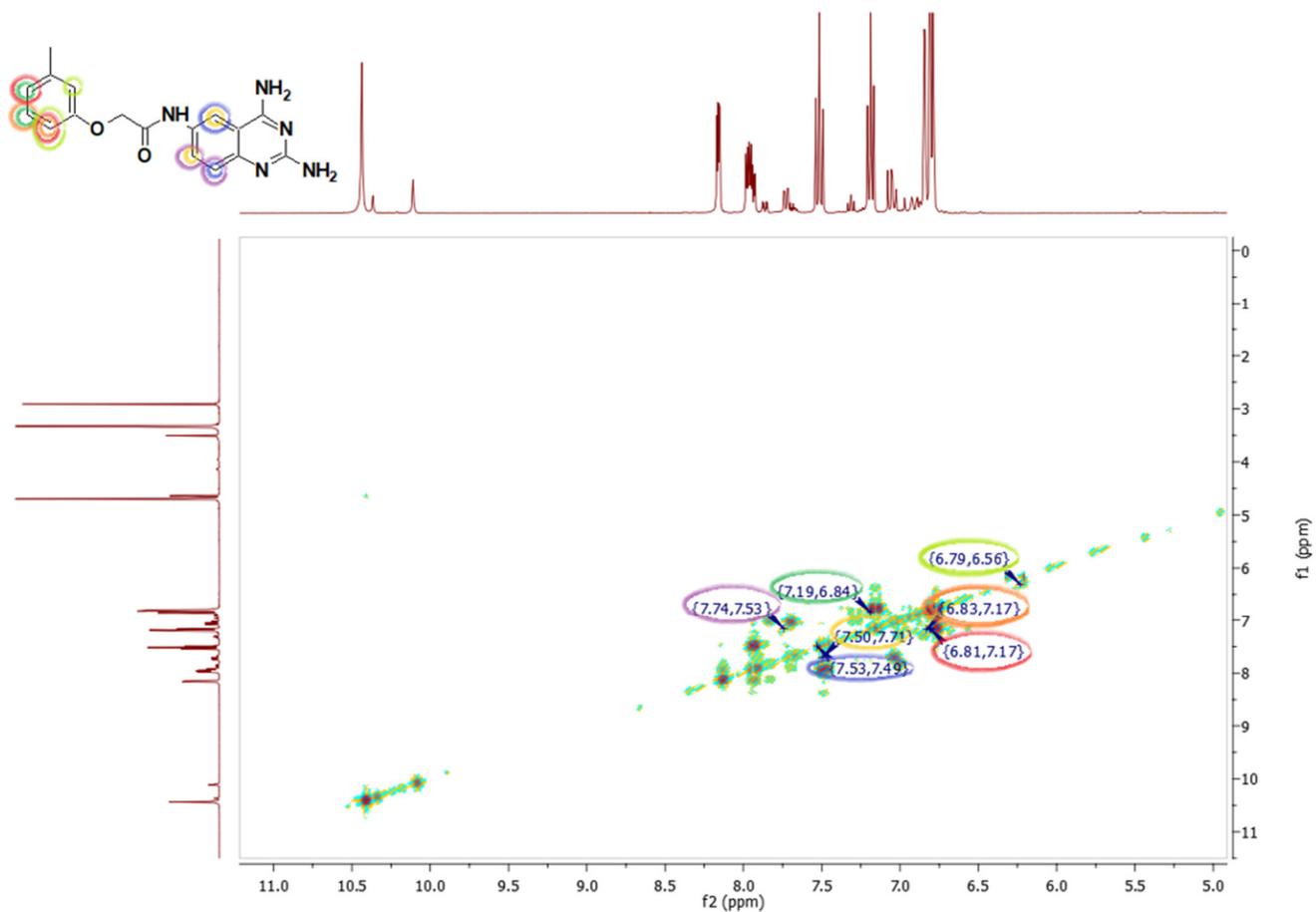
Espectro 1.91 IR cm^{-1} de FSHV8Espectro 1.92 RMN ^1H 300 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV8



Espectro 1.93 RMN ^{13}C 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de **FSHV8**

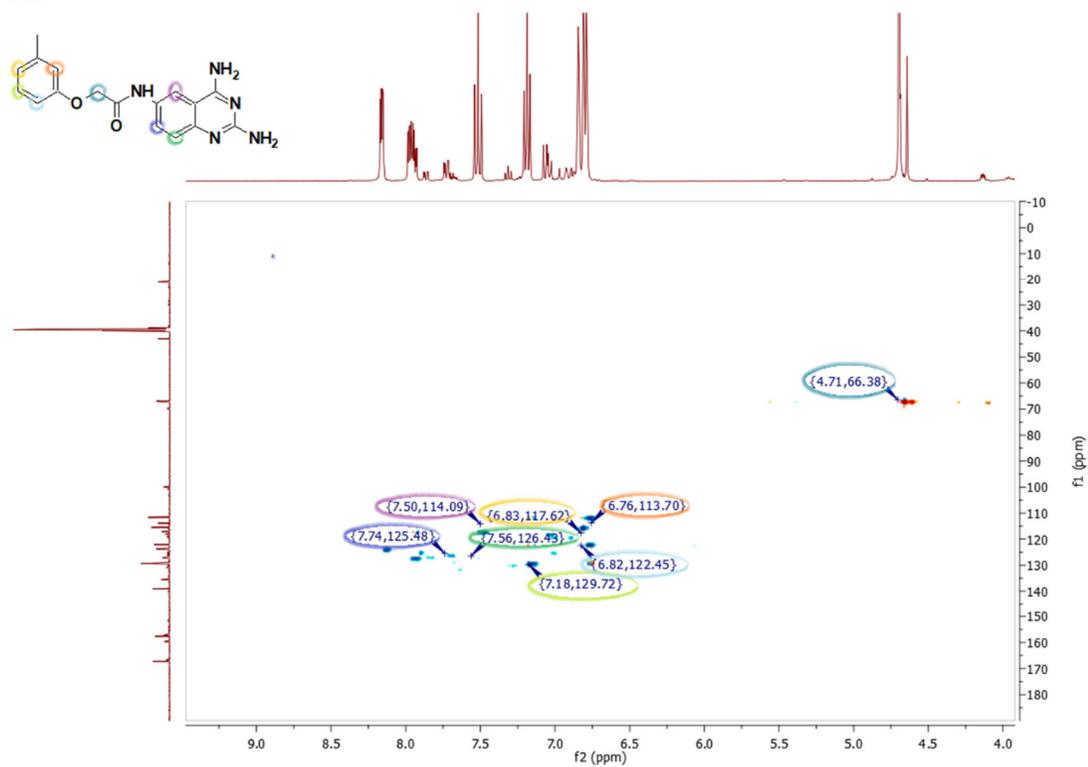


Espectro 1.94 Espectrometría de masas APCI de **FSHV8**

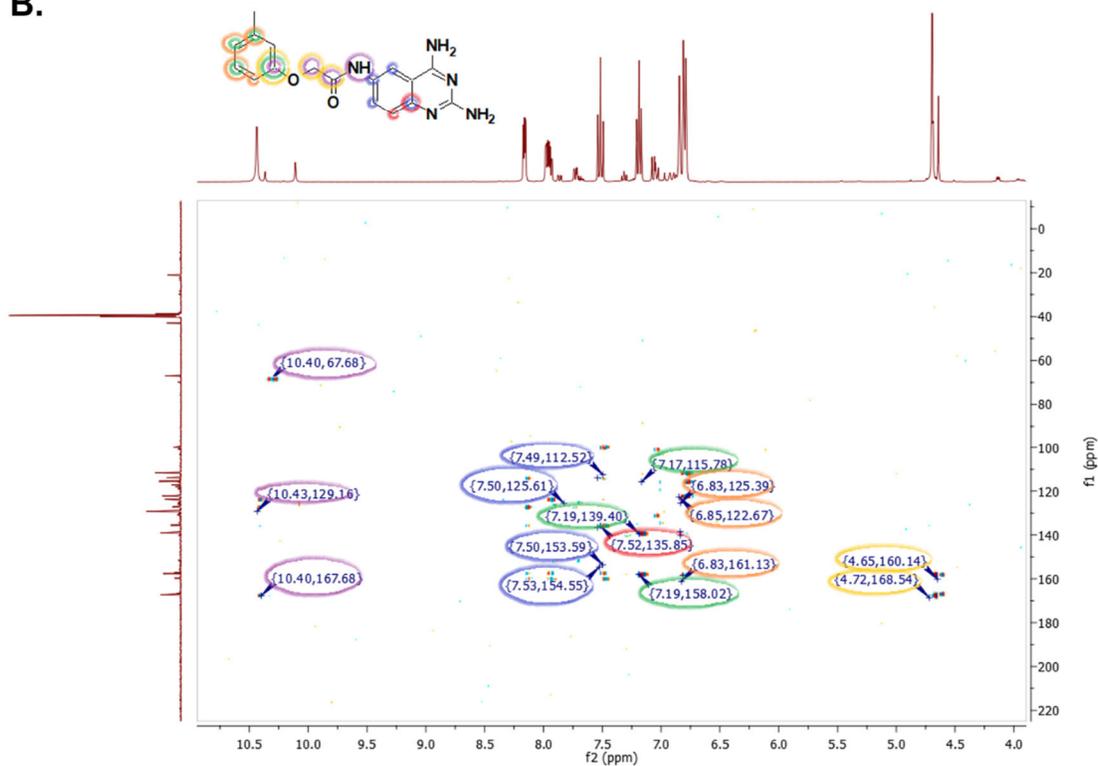


Espectro 1.95 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV8

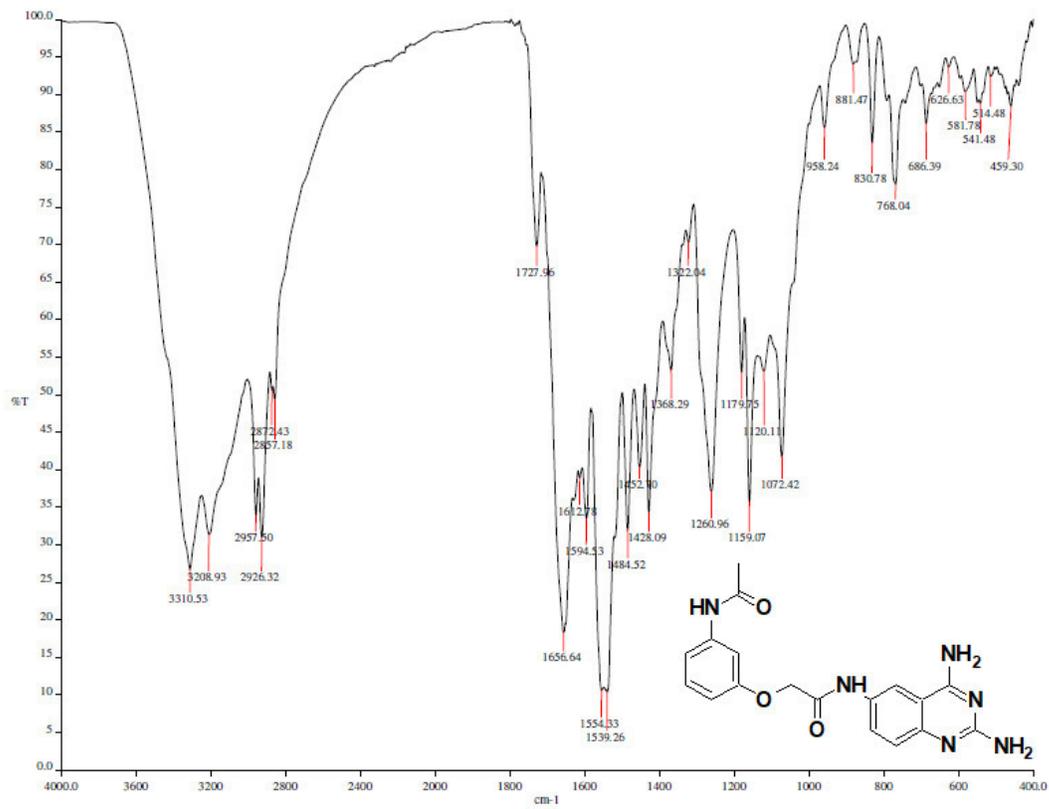
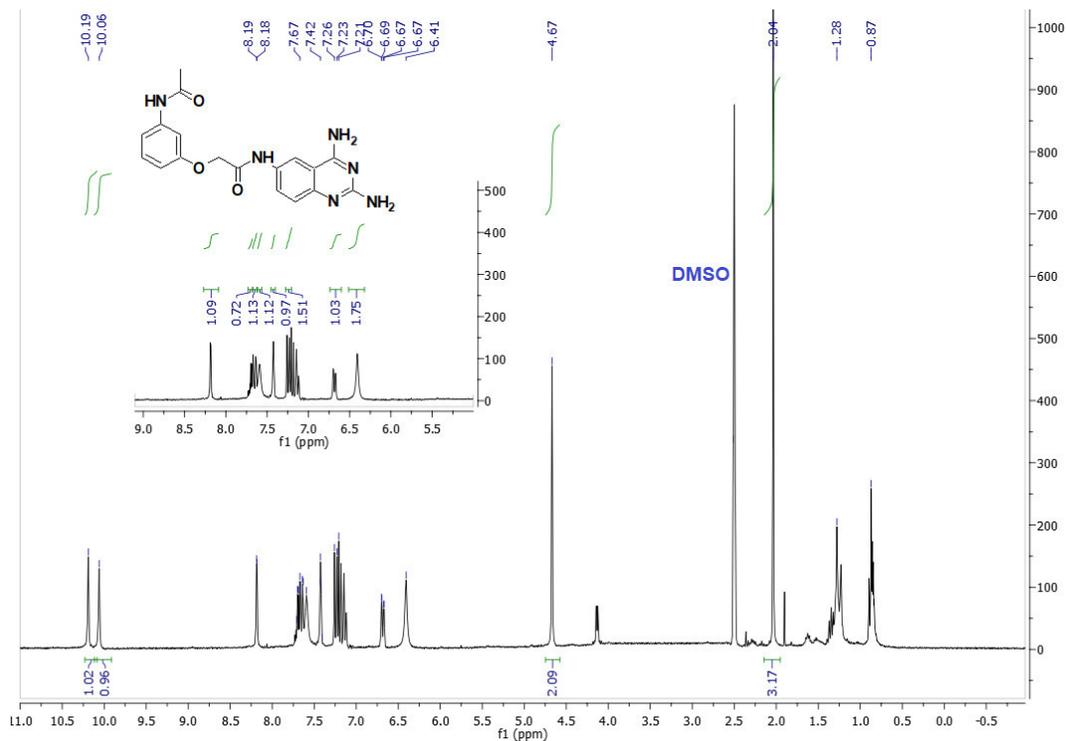
A:

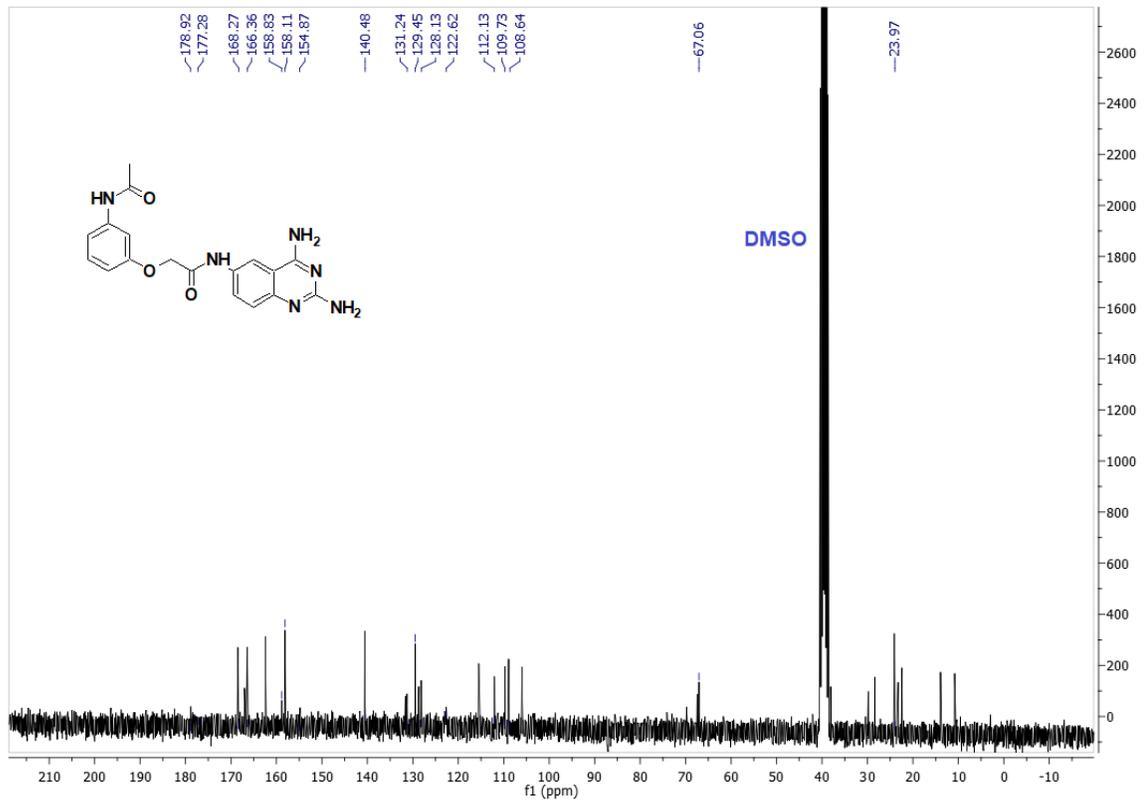


B:

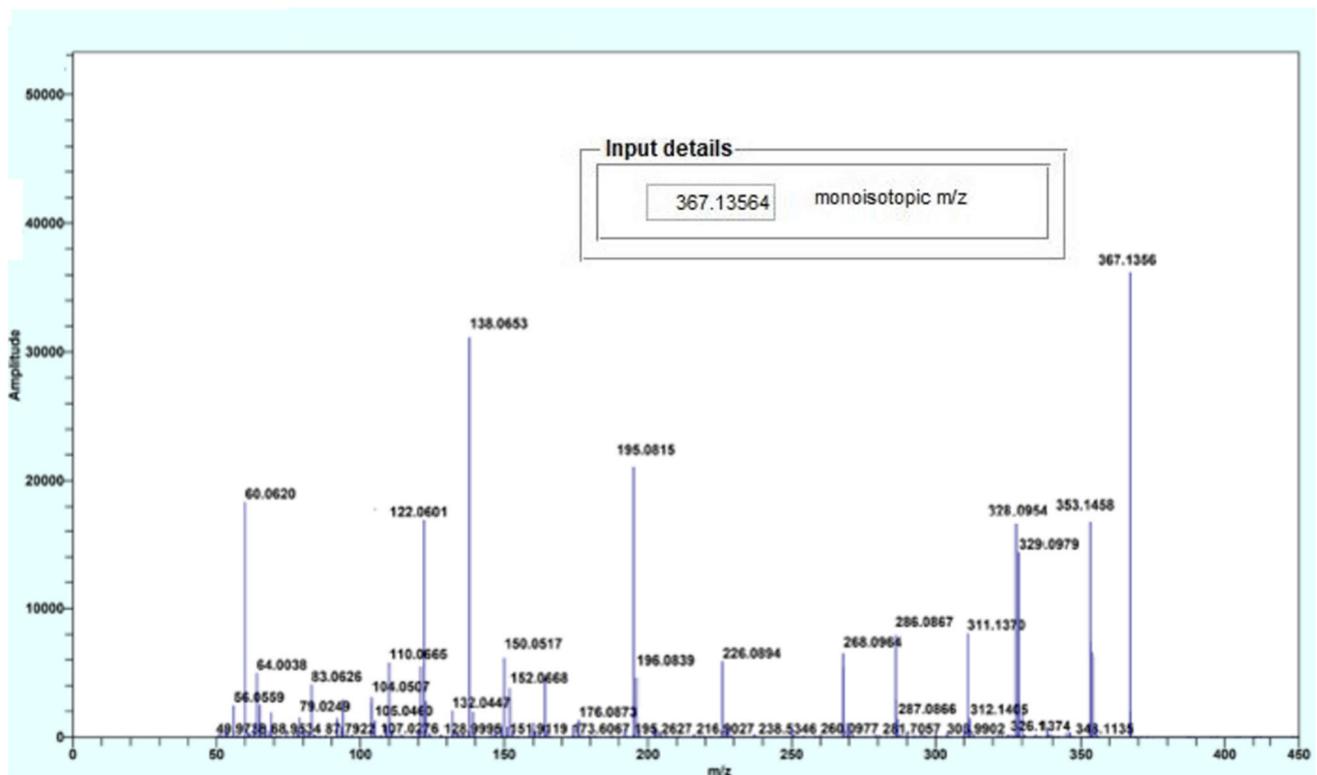


Espectro 1.96 RMN en 2D heteronucleares de FSHV8 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

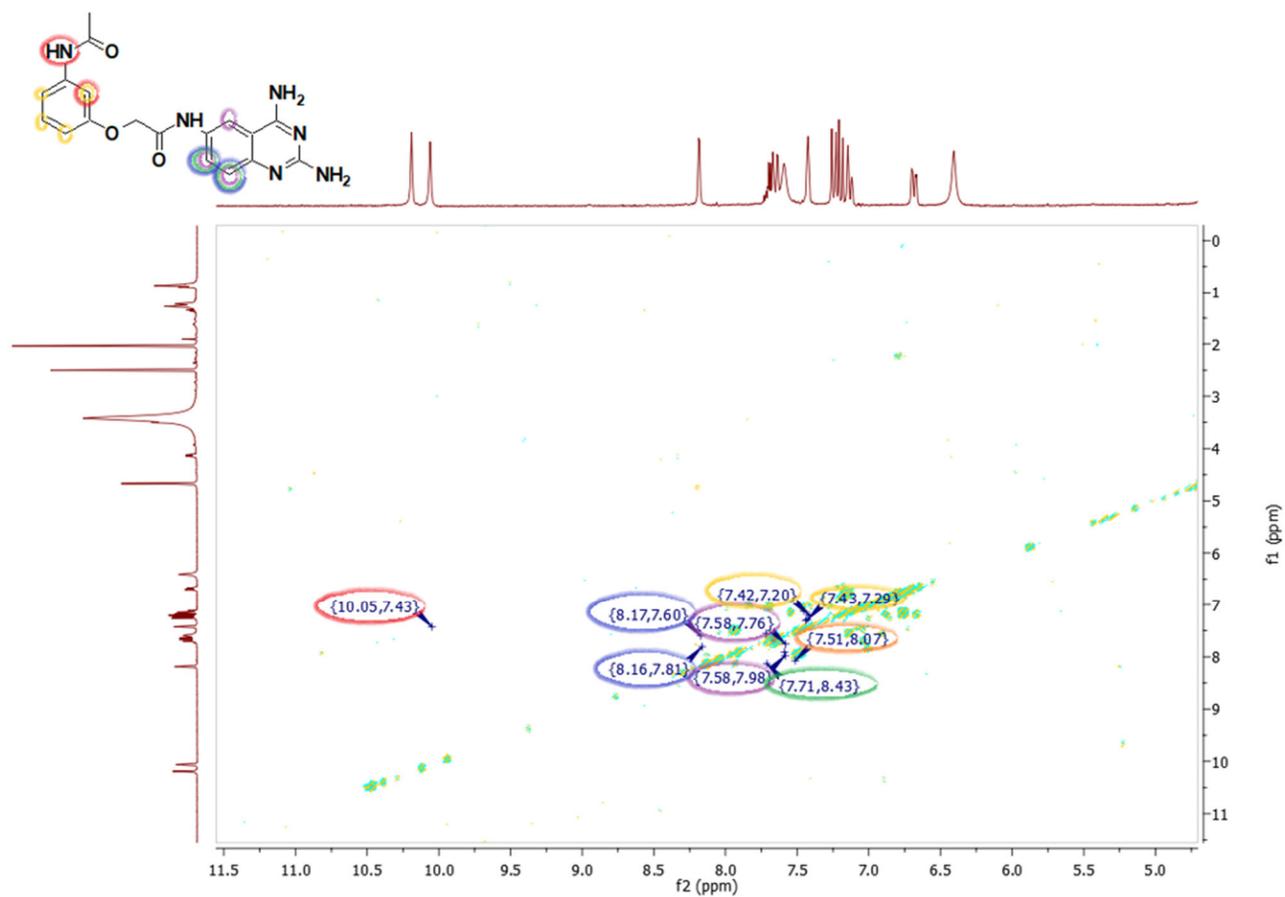
Espectro 1.97 IR cm^{-1} de FSHV9Espectro 1.98 RMN ^1H 300 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV9



Espectro 1.99 RMN ^{13}C 300 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de **FSHV9**

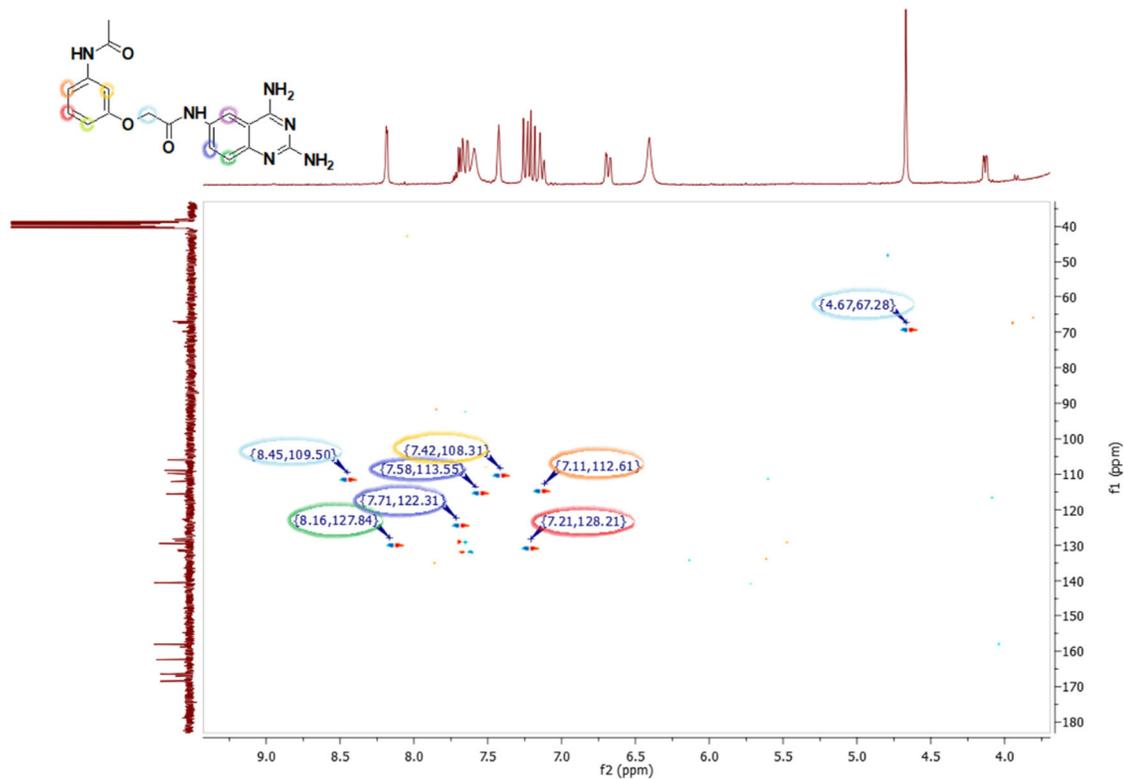


Espectro 1.100 Espectrometría de masas APCI de **FSHV9**

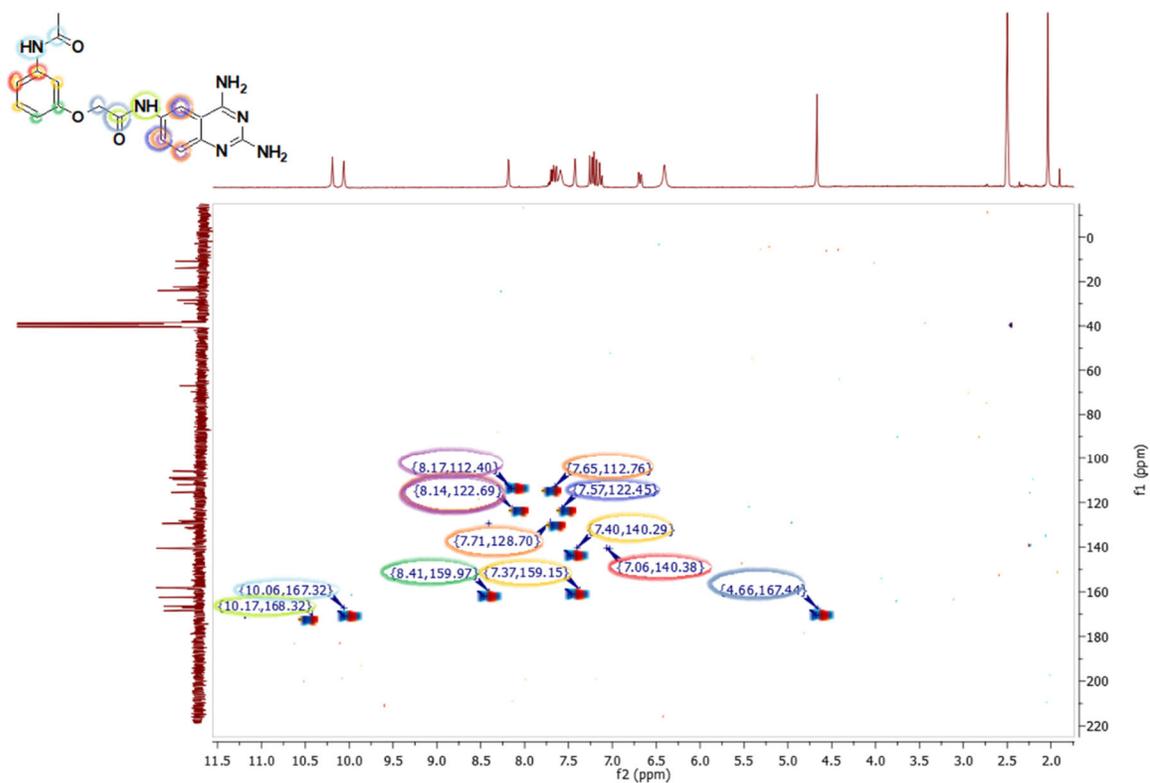


Espectro 1.101 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV9

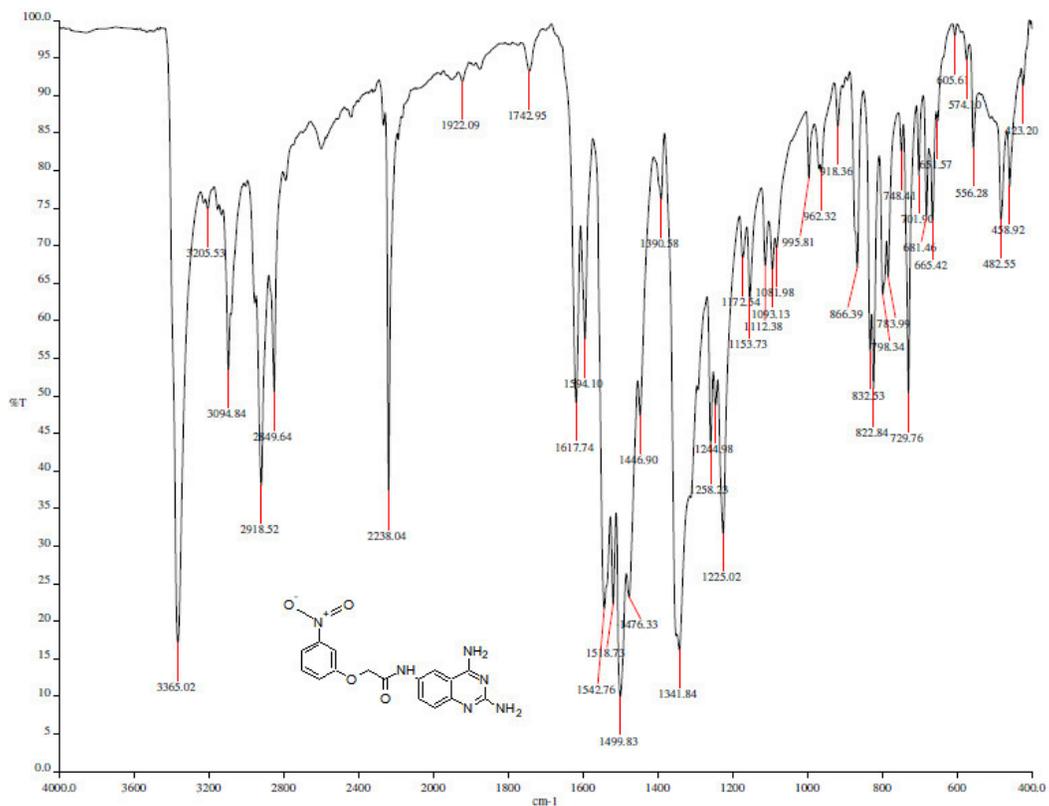
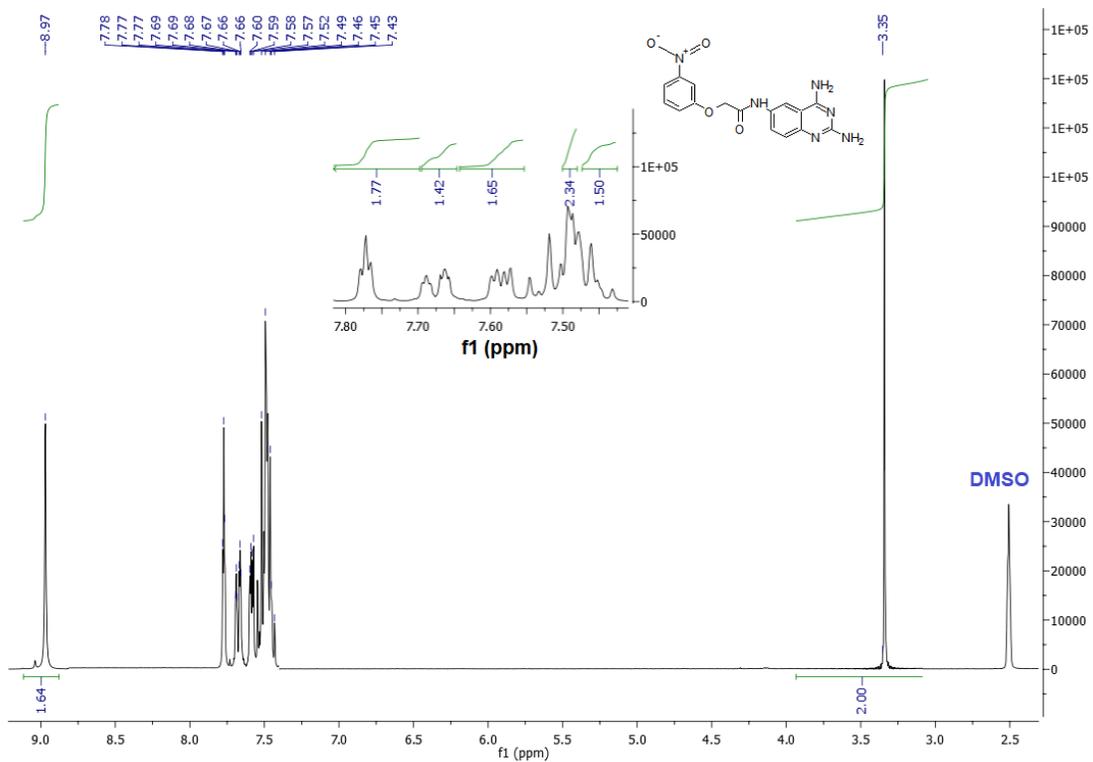
A.

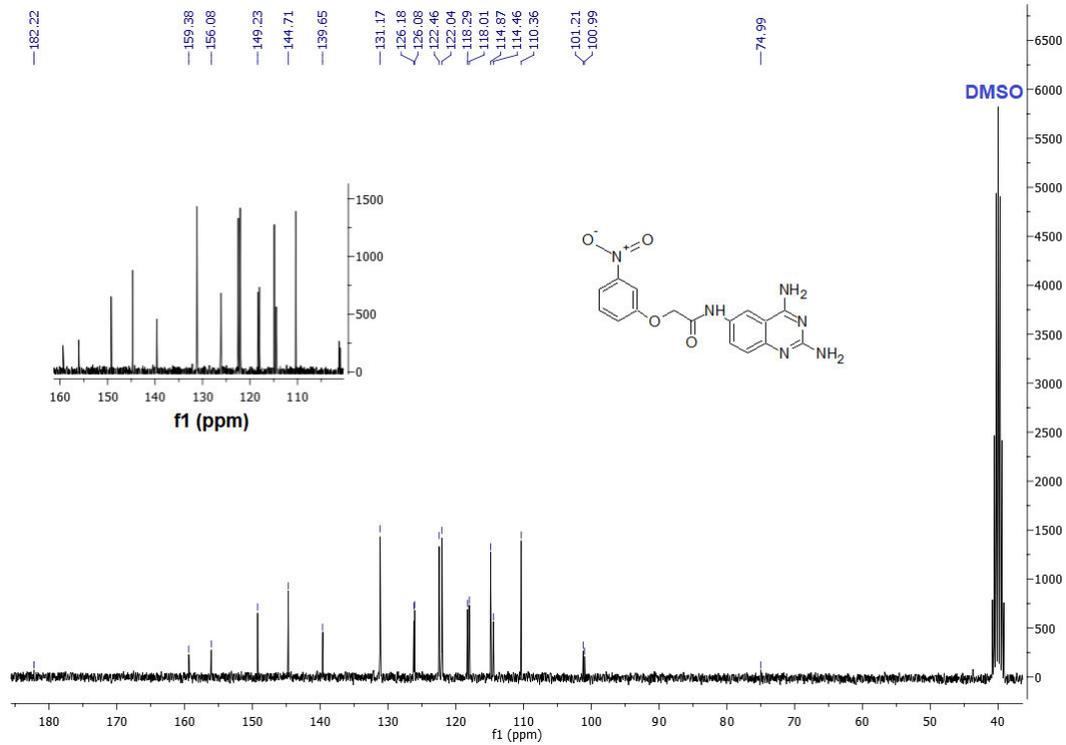


B.

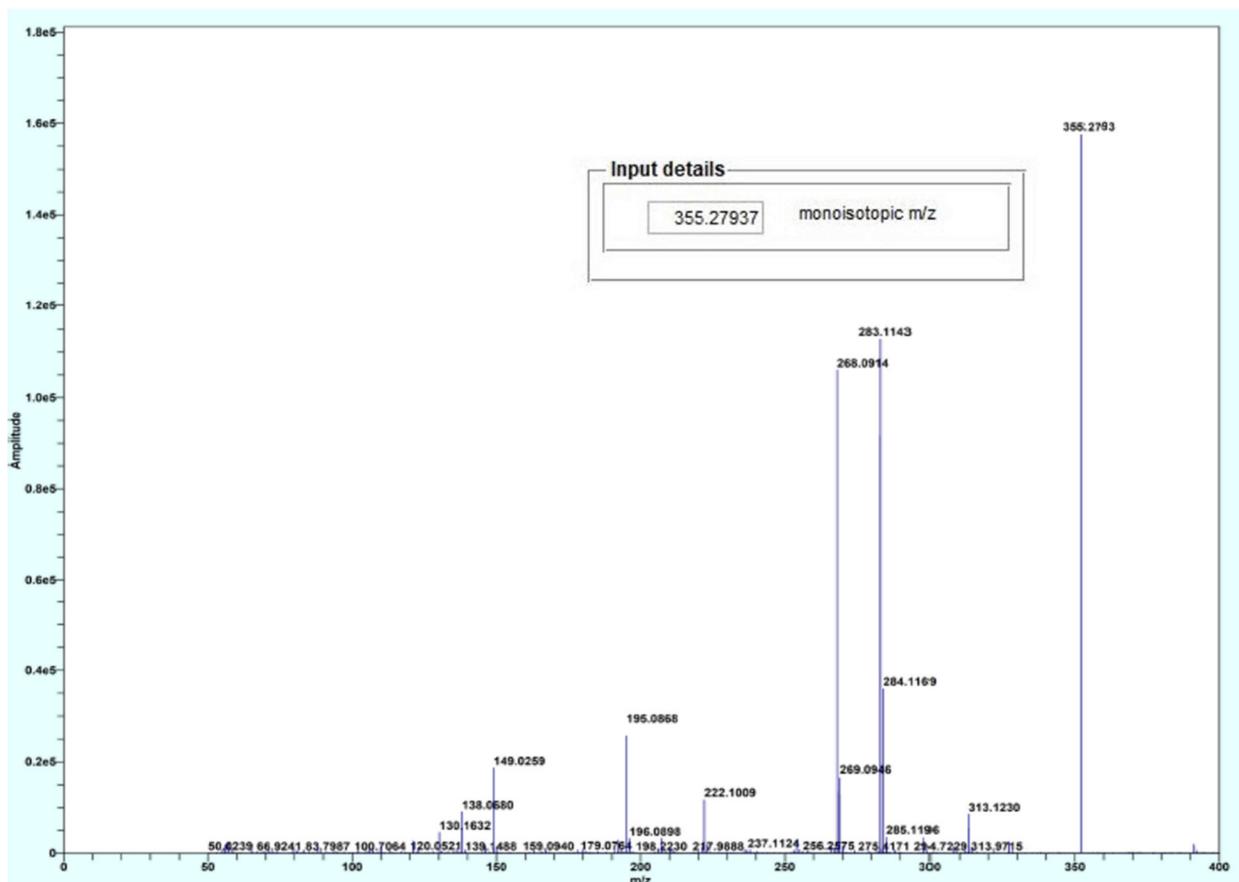


Espectro 1.102 RMN en 2D heteronucleares de FSHV9 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

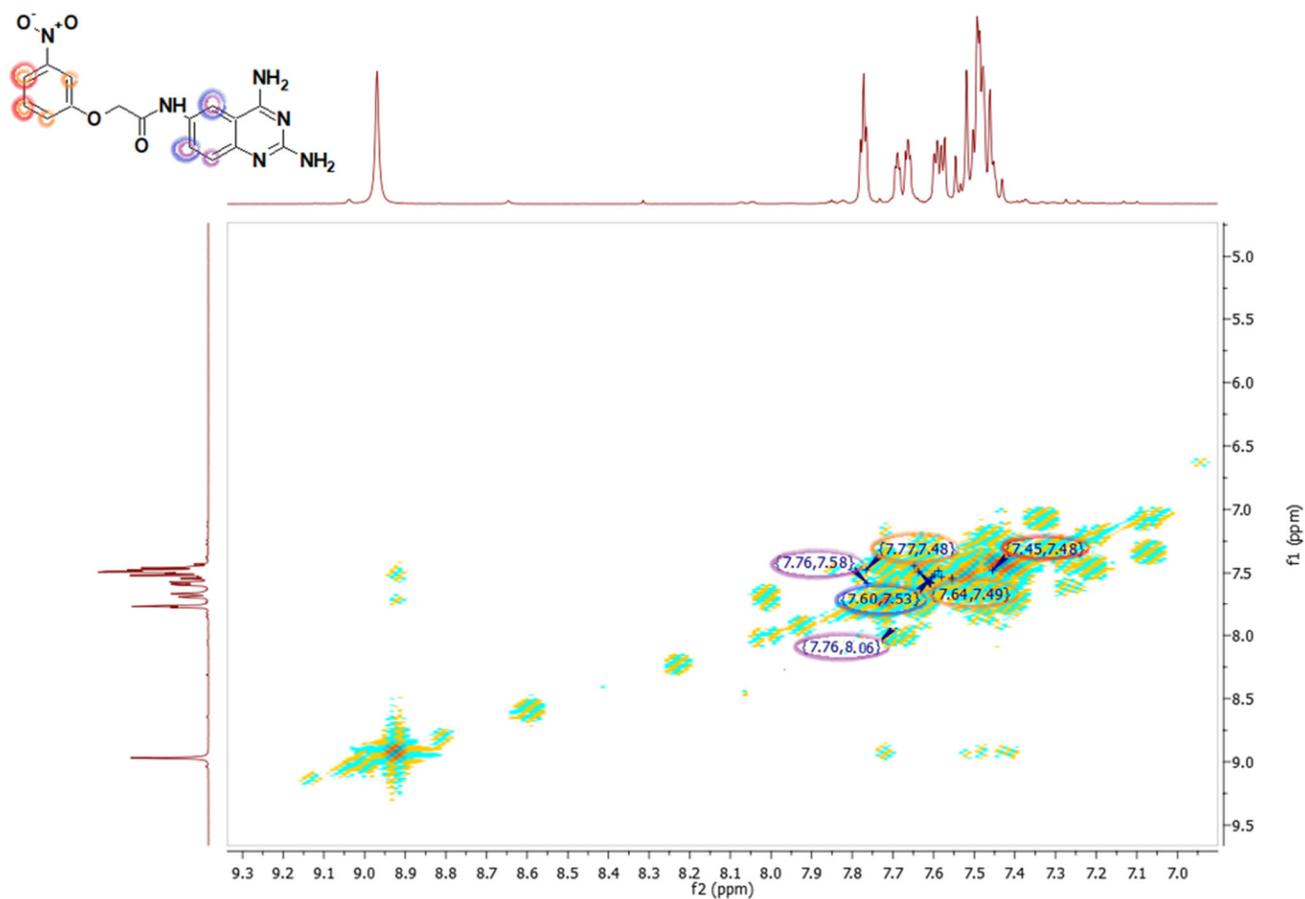
Espectro 1.103 IR cm^{-1} de FSHV10Espectro 1.104 RMN ^1H 300 MHz tms, $\text{dms}\text{-}d_6$, δ en ppm de FSHV10



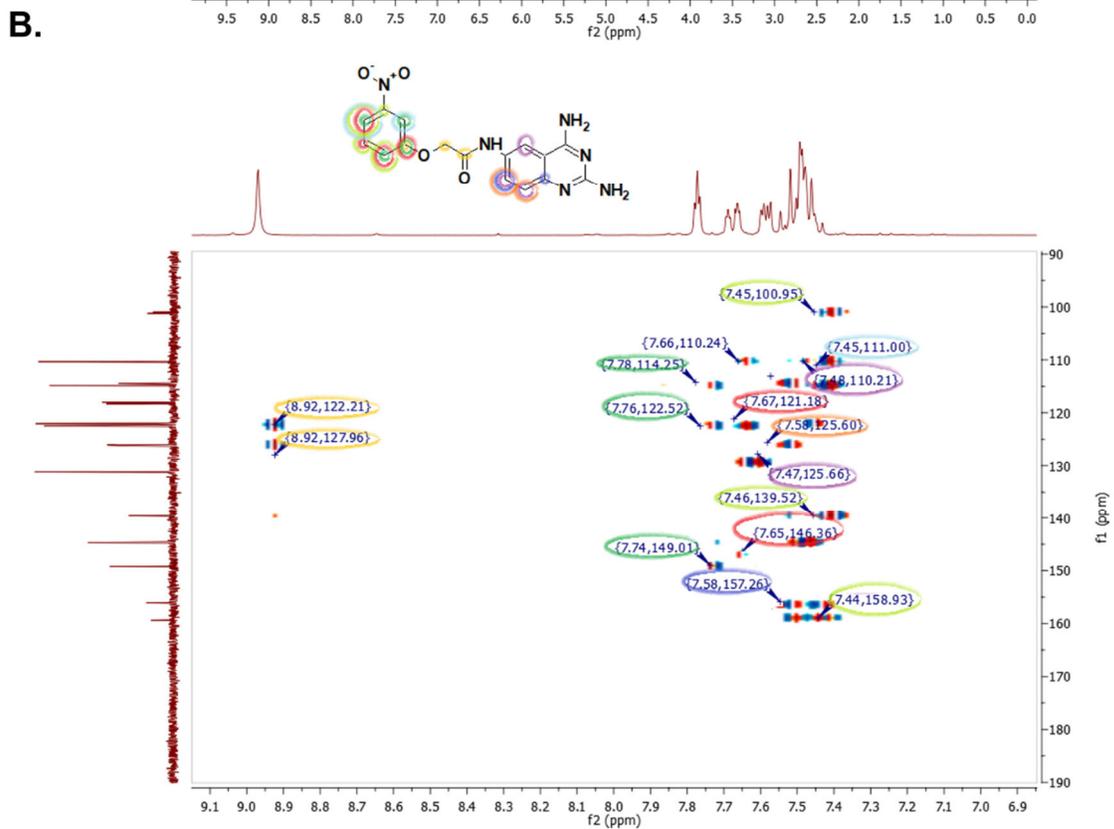
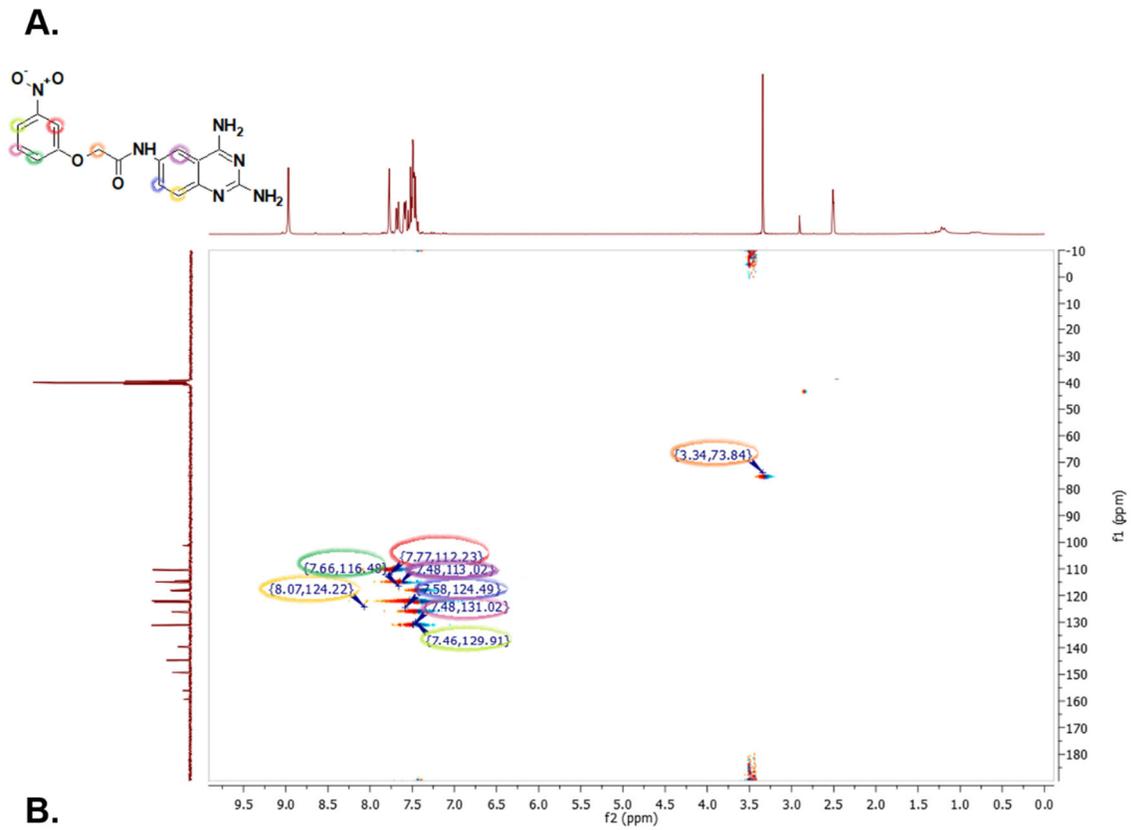
Espectro 1.105 RMN ^{13}C 300 MHz tms, dms o - d_6 , δ en ppm de FSHV10



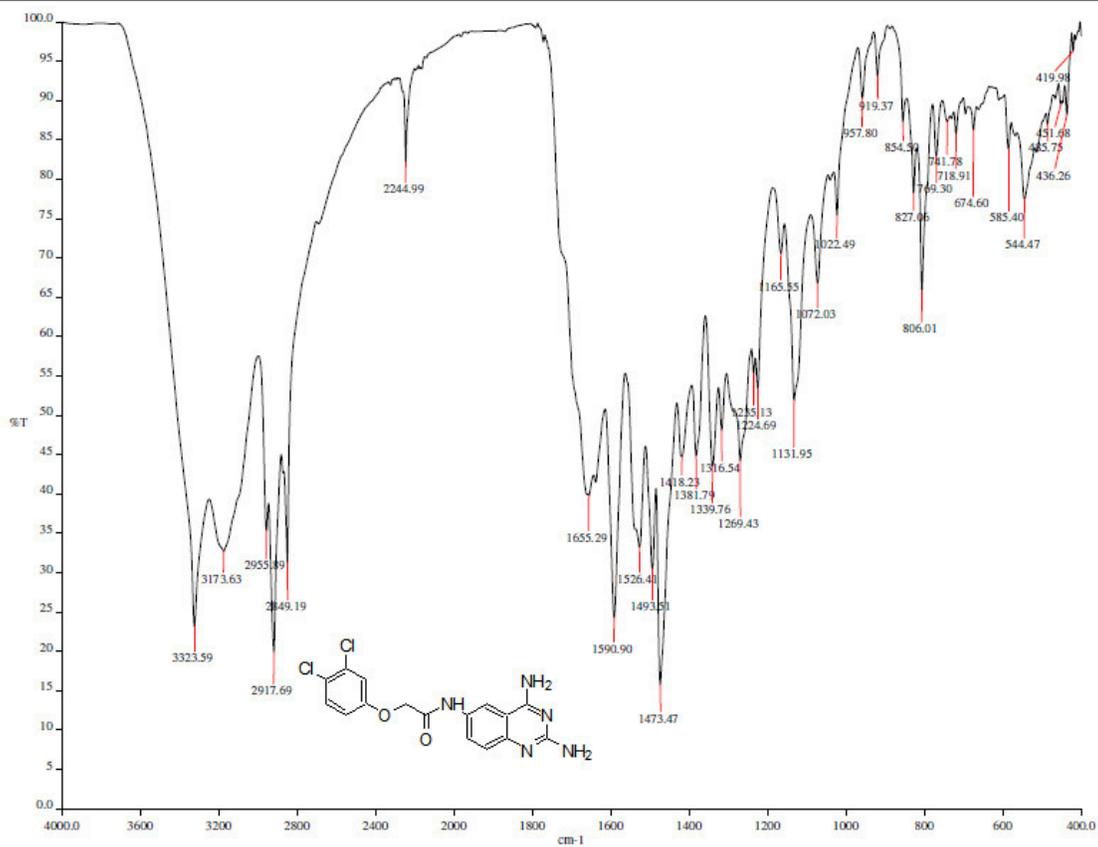
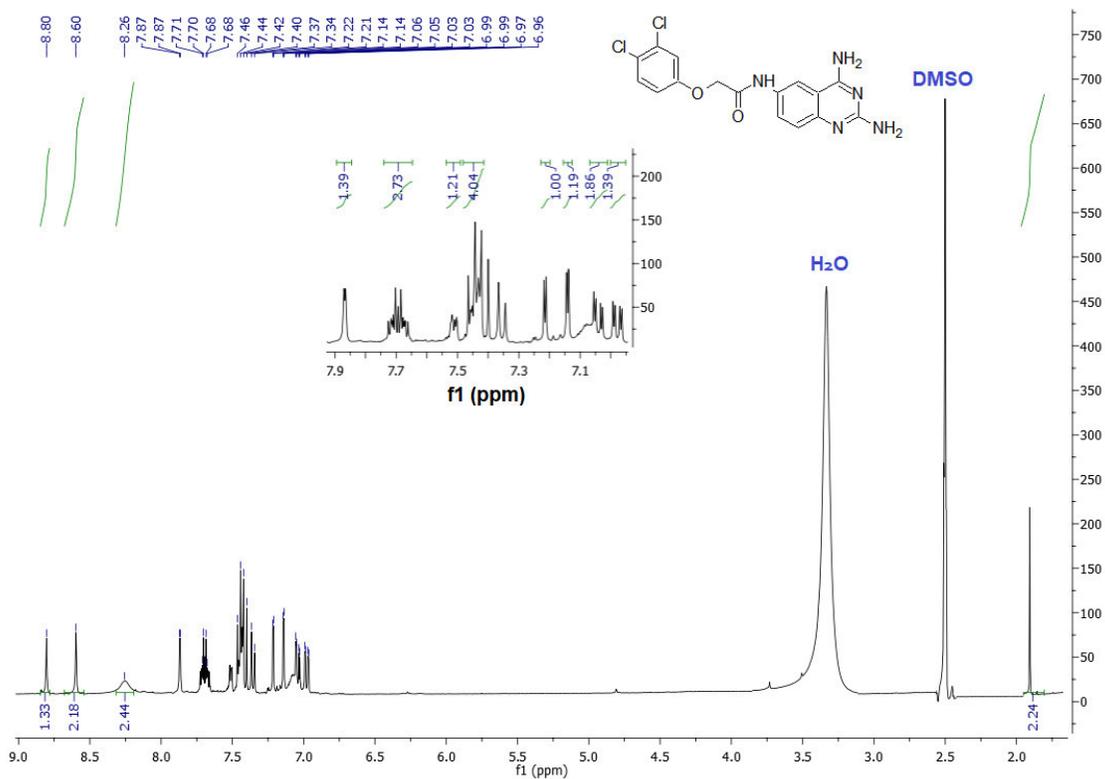
Espectro 1.106 Espectrometría de masas APCI de FSHV10

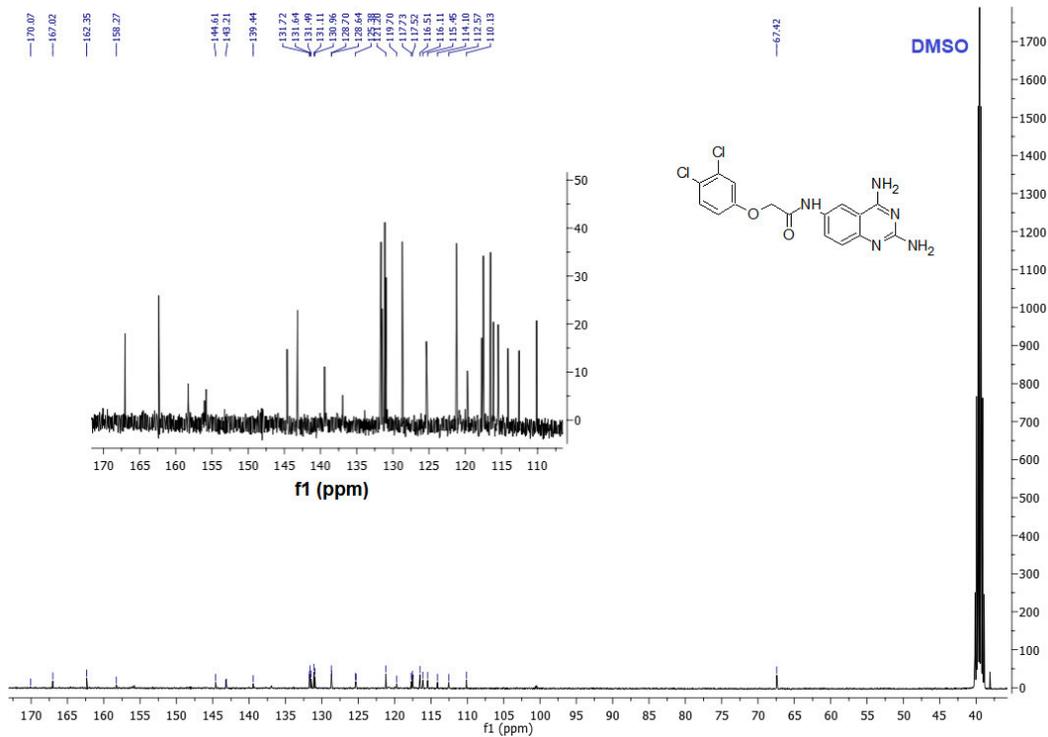


Espectro 1.107 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV10

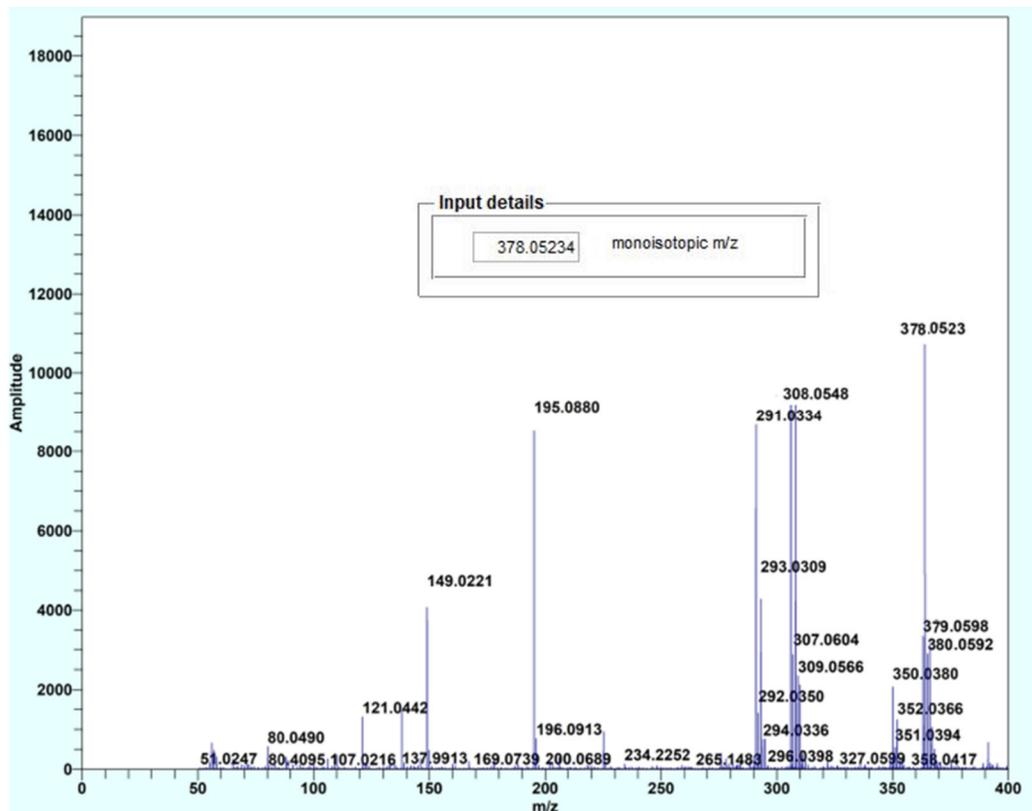


Espectro 1.108 RMN en 2D heteronucleares de FSHV10 A. Espectro HSQC B. Espectro HMBC

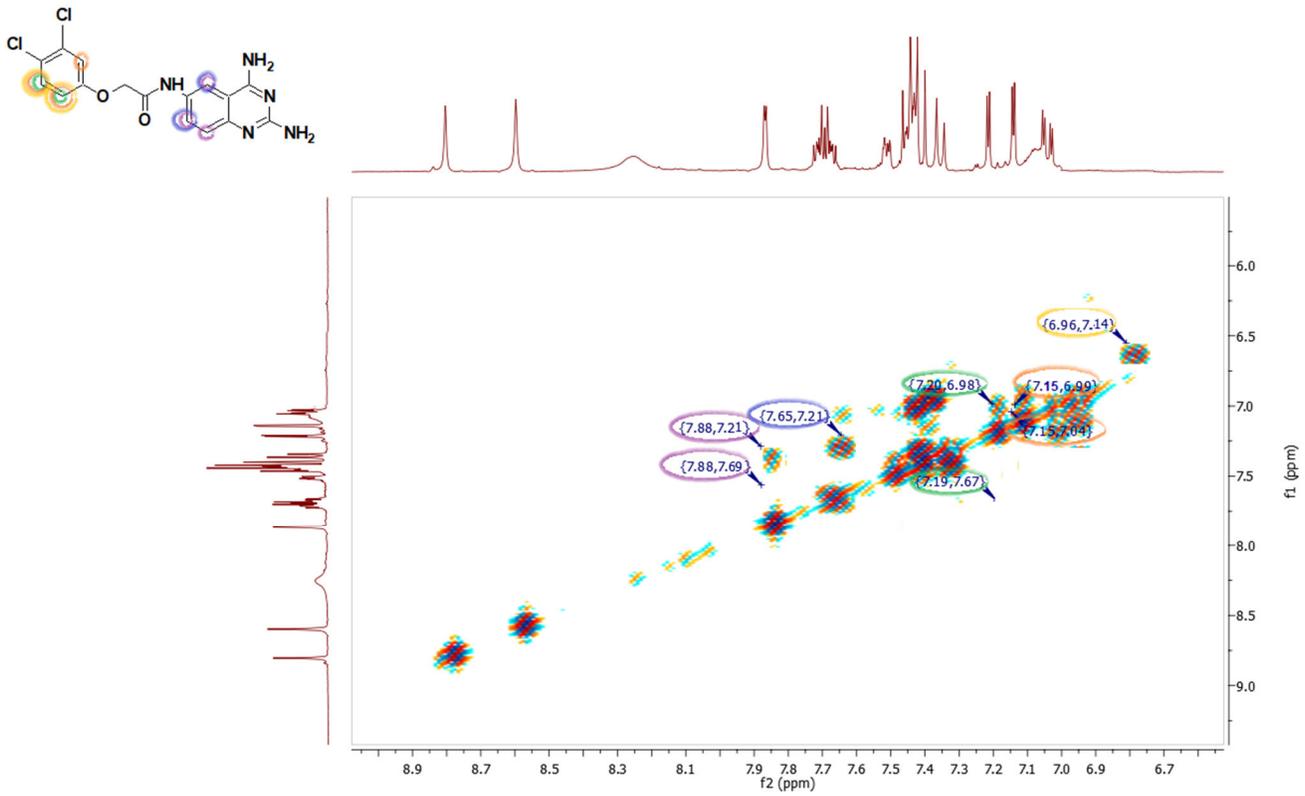
Espectro 1.109 IR cm⁻¹ de FSHV11Espectro 1.110 RMN ¹H 300 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV11



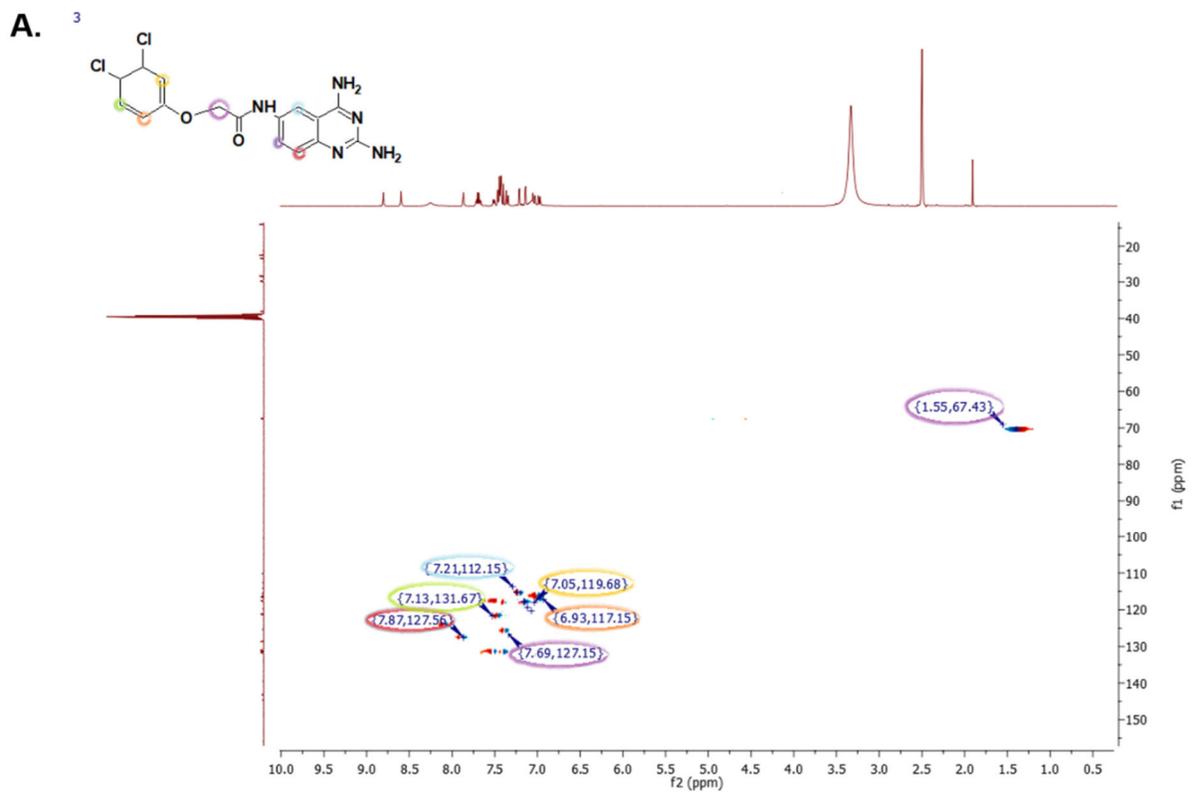
Espectro 1.111 RMN ¹³C 300 MHz tms, dms_o-d₆, δ en ppm de FSHV11



Espectro 1.112 Espectrometría de masas APCI de FSHV11



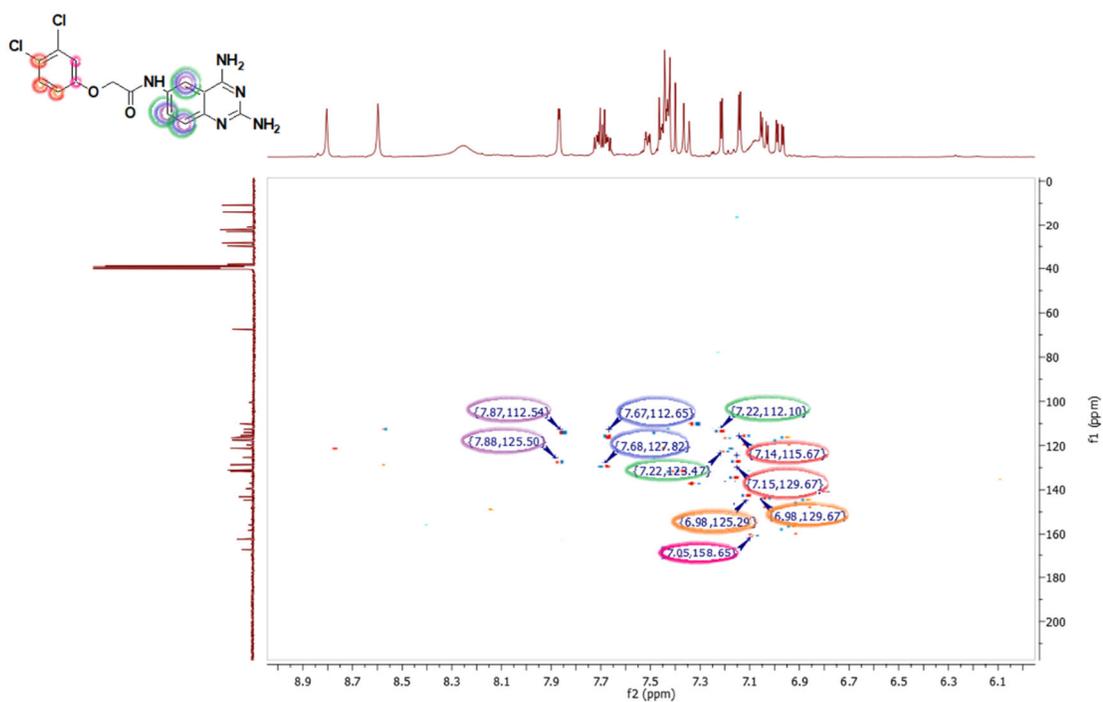
Espectro 1.113 RMN en 2D homonuclear COSY de FSHV11



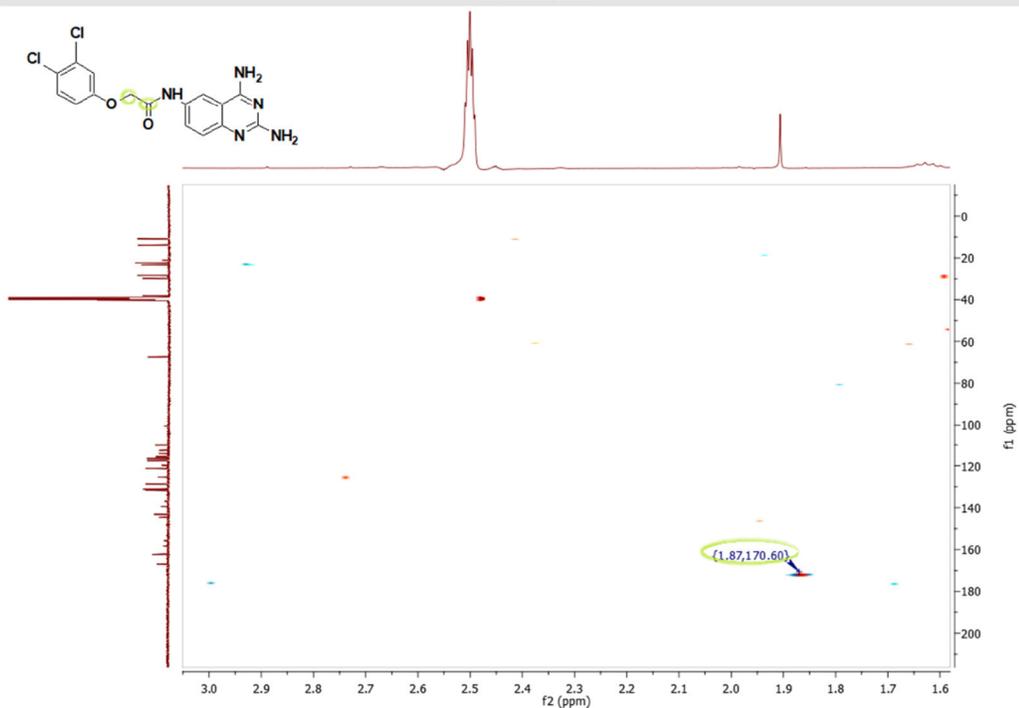
Espectro 1.114 RMN en 2D heteronucleares de FSHV11 A. Espectro HSQC

B.

Aromáticos



Alifáticos



Espectro 1.114 RMN en 2D heteronucleares de FSHV11 B. Espectro HMBC,

ANEXO III
“Ensayos biológicos”

ANEXO III. "Ensayos Biológicos"

*III.1 Metodología experimental**III.1.1. Cultivo de celular*

Las líneas celulares tumorales y la línea control utilizadas se obtuvieron de la ATCC® con número de catálogo: CRL-1435 adenocarcinoma de próstata (PC-3), CCL-225 colorrectal (HCT-15), CRL-3435 mamario triple positivo (MCF-7), HTB-26 mamario triple negativo (MDA-MB231), HTB-57 de pulmón (SK-LU-1) y CRL-1651 una línea celular benigna de riñón de mono (COS 7). Las líneas celulares para este ensayo se cultivaron en el medio de RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (1%), antibióticos y antifúngicos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas de cultivos para cultivos celulares cambiando el medio de cultivo según fuera requerido, cada dos o tres días. Dado que las líneas celulares empleadas son adherentes, el medio de cultivo se retiró por decantación para eliminar detritos posteriormente se le adicionó 1.5 mL SFB suplementado colocándose en incubación nuevamente. Es importante mencionar que todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, tanto para la manipulación, así como todo el material utilizado empleados, en una campana de flujo laminar.

III.1.2. Preparación de soluciones

La preparación de las soluciones siguientes requeridas bajo esterilidad se realizó en condiciones asépticas, es decir, en una campana de flujo laminar y utilizando material estéril.

III.1.2.1. PBS

La solución amortiguadora de fosfatos (PBS) se preparó de tal manera que los siguientes componentes tuvieran la concentración final indicada:

Solutos	Concentración (mM)
NaCl	136.89 (Baker®)
KCl	2.68 (Baker®)
KH ₂ PO ₄	1.76 (Baker®)
Na ₂ HPO ₄	10.14 (Baker®)

Cuando los compuestos se disolvieron, éstos se aforaron con agua desionizada a 1000 mL ajustándose el pH: 7.4 en caso de ser necesario. Para la esterilización de la disolución se empleó un sistema de filtración con una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro. Se almacenó en un recipiente estéril a 4°C hasta su uso.

III.1.2.2. Medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Para la preparación del medio de cultivo DMEM/ F12K se requirió de los siguientes componentes:

Solutos	Cantidad
DMEM bajo en glucosa	10 g (1 frasco, Sigma®)
L-piruvato de sodio 100X	10 mL (Invitro®)
Antibiótico-antimicótico 100X	10 mL (Invitro®)
Aminoácidos no esenciales 100X	10 mL (Invitro®)
Na ₂ HCO ₃	63.3 mM
L-glutamina	2.5 mM
Rojo fenol	0.0215 mM
HEPES	9.23 mM

El contenido del sobre de medio de cultivo se disolvió en 700 mL de agua desionizada y estéril manteniéndose en agitación constante para la homogenización de la disolución. Posterior a esto, se aforó a 900 mL. Consecuentemente ésta se esterilizó por filtración empleando una membrana de poro de 0.22 µm. Se complementó adicionando 100 mL de Suero Fetal Bovino GIBCO® correspondiente al 10% del volumen final y el cual previamente se descomplementó a 56°C aproximadamente 1h. El medio de cultivo se almacenó en frascos estériles y a 4°C.

III.1.2.3. Medio de congelación

El medio de congelación se obtuvo de la mezcla homogénea de DMSO y medio de cultivo DMEM/F12K complementado el cual había sido preparado previamente. Utilizando el volumen requerido para este medio de congelación, el 95% principalmente consistió de medio DMEM y el 5% al DMSO.

III.1.2.4. Solución de SRB al 0.4%

Para preparar 100 mL de la disolución de sulforrodamina, se pesó 4 g de sulforrodamina B en polvo y se le adicionó agua desionizada hasta que esta se disuelva en su totalidad. Finalmente, se aforó a 100 mL para su posterior filtración empleando una membrana de poro 0.22 µm la cual se almacenó en un frasco estéril a 4°C.

III.1.2.5. Solución de ácido acético al 1%

Para la preparación de la disolución correspondiente, se tomó una alícuota de 1 mL de ácido acético concentrado y se aforó con agua desionizada a un volumen final de 100 mL,

posteriormente la solución se agitó para poder tener una solución homogénea. Consecuentemente ésta se esterilizó por filtración empleando una membrana de poro de 0.22 μm la cual se almacenó en un frasco estéril a 4°C.

III.1.2.6. Solución de ácido tricloroacético al 5%

Para la preparación de la disolución correspondiente, se tomó una alícuota de 5 mL de ácido tricloroacético concentrado y se aforó con agua desionizada a un volumen final de 100 mL. Consecuentemente ésta se esterilizó por filtración empleando una membrana de poro de 0.22 μm la cual se almacenó en un frasco estéril a 4°C.

III.1.2.7. Buffer Tris pH: 10.5

Para la preparación del buffer se requirió pesar la cantidad necesaria de 2-hidroximetilpropano-1,3-diol (Tris) disolviéndola en agua desionizada. Antes de aforar se ajustó el pH con un potenciómetro. La solución se deja en agitación constante por 10 min y se lleva al aforo. Posterior, a ello se esterilizó por filtración. El buffer se almacenó en un frasco estéril a 4°C.

III.1.2.8. PBS- EDTA

Para preparar 50 mL de la solución se requiere:

Solutos	Concentración
NaCl	136 mM (Baker®)
KCl	2.68 mM (Baker®)
KH ₂ PO ₄	1.76 mM (Baker®)
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM (Baker®)
EDTA	1 mM (Research Organics®)
pH	7.4

Al finalizar se transfiere a un recipiente estéril y esta solución su vez se esteriliza con un método húmedo para su posterior uso. Ésta se almacena a rt.

III.1.2.9. Buffer de Lisis

Para preparar 10 mL de este buffer se requiere:

Concentración	Solutos
80 mM	Pipes-KOH pH: 6.8 (Baker®)
1 mM	MgCl ₂ (Baker®)
1mM	EDTA (Research Organics®)
0.2%	Tritón X-100 (Sigma®)
10%	Glicerol (Sigma®)
500 µL	TLCK (Sigma®)
1000 µL	TPCK (Sigma®)

Se afora con 10 mL de agua desionizada, y de ahí se transfiere a un tubo cónico de 25 mL en el cual se almacena a rt.

III.1.2.10. Buffer de Laemmli

Para preparar 10 mL de este buffer se requiere:

Concentración	Solutos
180 mM	Tris-HCl pH: 6.8 (Sigma®)
6 %	SDS (Biorad®)
7.5 %	B-mercaptoetanol (Sigma®)
15 %	Glicerol (Sigma®)
500 µL por	TLCK (Sigma®)
1000 µL	TPCK (Sigma®)

Se afora con 10 mL de agua desionizada, y de ahí se transfiere a un tubo cónico de 25 mL en el cual se almacena a rt.

III.1.2.11. Buffer de Transferencia

Para 4L de solución de buffer se requiere:

Cantidad	Solutos
12.11 g	Tris-base (Sigma®)
57.68 g	Glicina (Biorad®)
800 mL	MeOH (Sigma®)

Se afora con 4000 mL de agua desionizada, y de ahí se transfiere a un recipiente con la misma capacidad o mayor almacenándose a rt.

III.1.2.12. Solución de Revelado

Para ~ 6 mL de esta solución se requiere:

Cantidad	Solutos
5 mL	Buffer de trietanolamina pH: 7.5 *
1 mL	1 tableta de 4-cloro-1-naftol en 10 mL de MeOH (Sigma®)
2.5 µL	Solución al 30% H ₂ O ₂ (Sigma®)

* 0.128 M de NaCl y 0.021 M de una solución de trietanolamina.

III.1.2.13. Paraformaldehído al 4%

Para 10 mL de esta solución se requiere:

Cantidad	Solutos
0.4 g	Paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences®)
10 mL	PBS 1X

III.1.2.14. Albúmina sérica bovina (BSA) al 3%

Para 10 mL de esta solución se requiere:

Cantidad	Solutos
0.3 g	Albúmina Sérica Bovina (US Biological®)
10 mL	PBS 1X

III.1.2.15. Solución permeabilizante

Para 10 mL de esta solución se requiere:

Concentración	Solutos
0.5%	Tritón 100x (Sigma®)
0.5%	SDS 10% (BioRad®)
9.5 mL	PBS 1X

III.1.2.16. Solución Gelvatol

Para 500 μ L de esta solución se requiere:

Cantidad	Solutos
475 μ L	Tritón X-100 (Sigma Aldrich®)
25 μ L	<i>p</i> -fenilendiamina (Sigma®)

III.1.2.17. Solución de XTT/PMS

La solución debe ser preparada al momento que se requerirá, para un volumen de 8 mL se requirió sólo 20 μ L de la disolución de PMS disuelta en PBS 1X, agitándose constantemente para la disolución total:

Cantidad	Solutos
10 mM	Agente electroacoplante (i.e. N-metildibenzopirazin metil sulfato) (PMS, Roche ®)
5 mg	XTT (Roche ®)
25 mL	RPMI 1640 (Gibco®) *
1.25 mM	PBS estéril

*Se adiciona a 37°C para facilitar la solubilidad de los solutos

III.1.3. Propagación de líneas celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones óptimas de incubación y cambiando de forma continua el medio hasta que las células confluyeran más del 90% de la superficie de la caja de cultivo. Posteriormente se procedía a eliminar el exceso de células para evitar la saturación de la caja de cultivo por un exceso de confluencia. Para ello, fue necesario decantar, así como realizar lavados con PBS hasta eliminar completamente los detritos; en el último lavado se adiciona PBS-Tripsina o PBS-EDTA (1:1). Posterior a ello, se observan al microscopio para rectificar que las células hayan cambiado su morfología (i.e. se encuentren despegadas). Una vez realizado el conteo células, dependiendo de número de células y del número de experimentos que se realicen, se toma la alícuota y se transfieren a caja de Petri o frascos para cultivo celular (Botellas T-25), adicionándose 3 mL de medio de cultivo distribuyéndose de forma homogénea alrededor de la caja con movimientos suaves en la orilla de la caja. Finalmente, éstas se colocaron en incubación bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

III.1.4. Conteo celular con la cámara de Neubauer

Para el conteo celular, primero se obtuvo una suspensión celular homogénea mediante el proceso descrito en el apartado anterior para despegar células. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL de azul tripano y una de 100 µL suspensión celular en 800 µL de medio de cultivo, de ésta mezcla se toma un volumen de 12 µL con la micropipeta, para ponerla sobre la cámara de Neubauer, de forma que cubriera la parte central de la cámara; el espacio delimitado entre la cámara y cubreobjetos de 0.1 mm. El conteo se realizó en un microscopio invertido marca Olympus CKX41, contando los cuadrantes centrales de la cámara.

Para determinar la concentración de la suspensión celular (células/mL), se calculó en promedio de células por cuadrante a partir del promedio de células contadas en los 4 cuadrantes donde se realizó el recuento y se aplicó la fórmula para el conteo de los linfocitos en la cámara de Neubauer:

$$\text{Concentración (células/mL)} = \text{promedio de células} * 10,000 * 5\text{mL} * 5\text{mL}$$

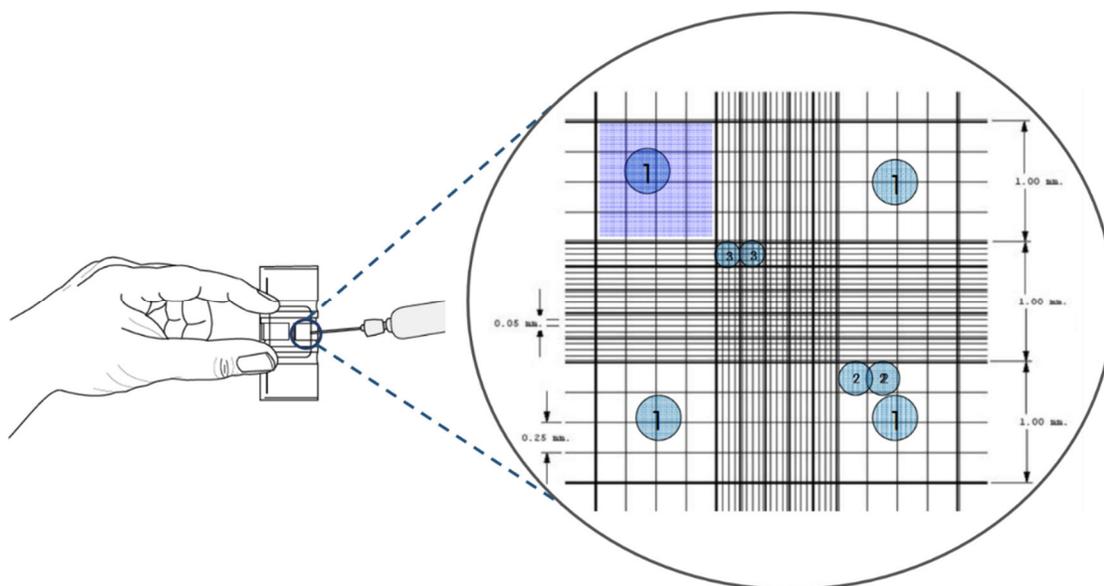


Figura All.1. Representación esquemática de una cámara de Neubauer, área del conteo, se exponen los cuadrantes, para este caso en se tomaron en cuenta sólo las células que se encontraban en el cuadrante 1.

En el recuento es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones; en principio, sólo se toman en cuenta las células refringentes (viables). Según lo reportado en la literatura, se sabe que el número ideal es de 10^6 células/mL; en caso de que sobrepase este número, se debe diluir la suspensión para obtener una concentración apta para su recuento.

III.1.5. Congelar células

Las líneas celulares fueron congeladas para preservarlas, se requirieron células refringentes con una confluencia superior al 90%. Las células se desprendieron como se indica en la *subsección III.1.3*. De ahí, las células se transfirieron a un criovial estéril; cada tubo contenía un volumen final de aproximadamente 1.5 mL de suspensión celular. Los tubos se colocaron durante 5 min a 800 rpm. Por último, se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 1.5 mL de medio de congelación. Colocando una alícuota de 1mL de suspensión celular a cada tubo de criogenia etiquetado preservándose a una temperatura de -70 °C.

III.1.6. Descongelar células

Este proceso consiste en tomar una alícuota, o las necesarias del almacén a -70 °C y se deja que se descongelen. Cuando se han descongelado completamente, esto se realiza en un baño maría a 32 °C una vez descongelados, se transfieren a cajas de Petri con medio de cultivo suplementado, distribuyéndose se forma homogénea alrededor de la caja, a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5%.

III.1.7. Ensayo de viabilidad SRB

El fundamento de este ensayo colorimétrico se basa en que la sulforrodamina B se une por interacciones electrostáticas el cual es dependiente del pH con los residuos básicos de células adherentes viables. (ver **Figura AIII.2.**)

Las líneas celulares para este ensayo se cultivaron en el medio de RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), antibióticos y antifúngicos. Transcurrido el tiempo necesario para que la confluencia sea de 85-100% en las líneas celulares tumorales, se sembraron en una placa de 96 pozos cada compuesto se evalúa por triplicado. Consecuentemente se dejó que la monocapa se adhiriera a la superficie del pozo por 24 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La disolución de los compuestos se realizó con DMSO de tal forma que considerando el volumen total en cada pozo la concentración del mismo fuera ~ 0.01% en todas las muestras. Al concluir este periodo de exposición, las células se fijaron *in situ* 50 µL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 5% dejándose en incubación 1h. Concluido el periodo de incubación se desechó el sobrenadante, realizándose 5 lavados con agua desionizada para retirar el excedente, éstas se dejan secar a temperatura ambiente (rt). La tinción se realizó vertiendo 100 µL de una solución al 0.4% de SRB a cada pozo 0.5 h a rt. La SRB no unida se removió con lavados de una disolución de ácido acético al 1%, las placas se dejaron secar a rt. La lectura de las placas se realizó añadiendo de forma inicial 100 µL de buffer Tris pH:10.5 agitándose por 10 min para favorecer la disolución del complejo colorido formado (tonalidad rosa), y en seguida se mide por densidad óptica en un lector de microplacas DAIGGER (BioTek®) a 490 nm. Con los datos obtenidos se calculó la viabilidad comparada con el control y el vehículo, determinándose así la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) o el porcentaje antiproliferativo según el caso.

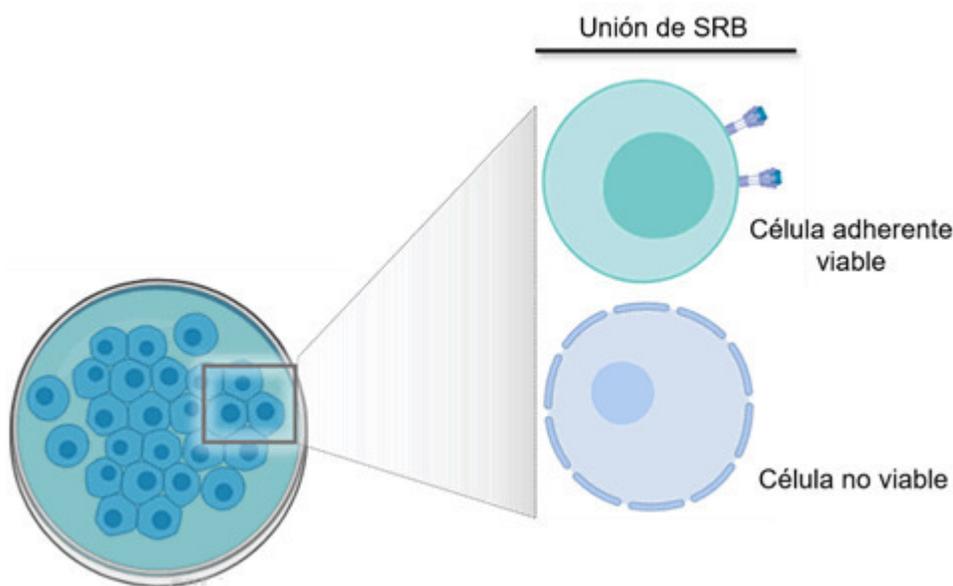


Figura AIII.2. Representación esquemática de la unión de SRB a residuos expuestos en celular adherentes o viables.

III.1.7. Panel de adición de compuestos

Se emplea una placa de 96 pozos en los que previamente se sembraron de ~100.000 a 20,000 células por pozo dependiendo de la tasa de división celular dependiendo de la estirpe celular, éstas se dejan adherir previamente por 24 h. Posteriormente la administración de cada compuesto se hizo por triplicado y para cada línea celular se realizaron dos placas. La exposición de los compuestos se realizó con una pipeta multicanal la concentración va decreciendo como se muestra en la **Figura AIII.3.**, la fila H corresponde al control del medio de cultivo.



Figura AIII.3. Esquema de exposición de los distintos compuestos sobre la placa, en el cual las primeras tres columnas corresponden al primer compuesto de prueba y así sucesivamente y a nivel de filas va aumentando en términos de concentración hacia abajo (fila H).

III.1.8. Ensayo de viabilidad celular mediante XTT

En el caso de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP ó PBMCs), la evaluación de la viabilidad celular se realizó a través de ensayo colorimétrico de XTT (**Figura AIII.4.**).

Para ello se sembraron 100, 000 células por pozo en 90 μ L de medio de cultivo RPMI suplementado al 10% de SFB en una placa de 96 pozos. Inmediatamente después, se exponen los derivados de triamin-2,4,6-quinazolina (10 μ L) considerando para cada a distintas concentraciones despendiendo del compuesto (véase **Tabla AIII.1**). Utilizando en todas las muestras una concentración máxima de DMSO de 0.01% ya que de lo contrario éste podrías afectar la viabilidad celular. Consecuentemente el periodo de incubación fue de 48 h a 37°C con 5% de CO₂. Terminado el periodo de incubación se adicionaron (50 μ L) por pozo de la solución de XTT/PMS incubándose por un periodo de 24 h. En seguida se midieron por densidad óptica en un lector de microplacas modelo DAIGGER marca BioTek a 490 nm. Con los datos obtenidos se calculó la viabilidad comparada con el control y el vehículo, las evaluaciones se realizaron por triplicado de manera independiente y el análisis de los datos con el programa Gen 5 Reader Control.

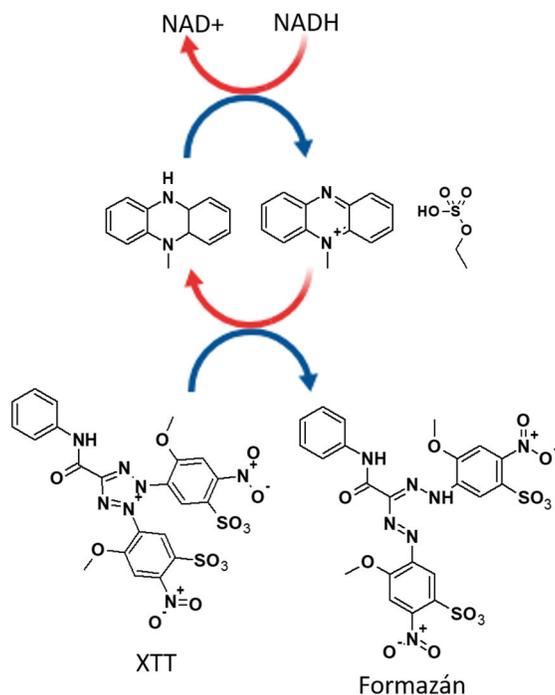


Figura AIII.4. Reacción general de la reacción de óxido reducción del ensayo colorimétrico de XTT.

	A	B	C	D	E	F	G	H	
FSHV4	1	1.601	1.151	1.011	1.923	2.253	2.644	2.353	2.148
	2	1.556	1.139	0.966	2.279	2.348	2.458	2.404	2.325
	3	1.574	1.186	1.022	2.264	2.374	2.507	2.484	2.345
FSHV7	4	1.694	1.205	0.919	0.876	2.38	2.543	2.435	2.455
	5	1.855	1.329	0.981	0.908	2.489	2.411	2.386	2.438
	6	1.838	1.251	0.965	0.911	2.395	2.457	2.372	2.568
FSHV8	7	1.692	1.302	0.962	2.406	2.544	2.542	2.523	2.485
	8	1.665	1.365	0.999	2.283	2.582	2.275	2.408	2.459
	9	1.73	1.505	0.956	2.287	2.461	2.384	2.368	2.47
FSHV10	10	1.99	1.708	1.62	2.122	2.336	2.413	2.389	2.295
	11	1.973	1.778	1.611	1.997	2.405	2.414	2.446	2.464
	12	1.882	1.768	1.58	1.934	2.362	2.396	2.368	2.14
COL	1	1.227	1.517	1.669	2.024	2.093	2.138	2.37	2.047
	2	1.333	1.449	1.852	2.145	2.199	2.431	2.337	2.487
	3	1.313	1.473	1.864	2.061	2.195	2.363	2.549	2.502
NZ	4	1.94	2.022	2.163	2.371	2.545	2.686	2.645	2.511
	5	1.94	2.041	2.171	2.414	2.478	2.633	2.635	2.513
	6	1.927	1.991	2.125	2.296	2.546	2.647	2.707	2.501
Cis-Platino	7	1.174	1.148	1.259	1.822	2.572	2.682	2.759	2.471
	8	1.176	1.175	1.237	1.67	2.513	2.682	2.556	2.374
	9	1.186	1.112	1.232	1.645	2.442	2.692	2.552	2.391

Figura AIII.5. Absorbancia de compuestos a λ 490 nm en PBMCs.

Tabla AIII.1 Porcentaje proliferativo en polimorfonucleares (PBMCs).

Concentración (µg/mL)	0	0.01	0.1	1	10	100	500	1000
FSHV4	100	109.54	123.09	104.89	89.53	47.07	53.58	74.53
	100	103.40	105.72	100.99	98.02	41.55	48.99	66.92
	100	105.93	106.91	101.24	96.55	43.58	50.58	67.12
Promedio	100	106.29	111.91	102.37	94.70	44.07	51.05	69.53
Desv	0	3.09	9.70	2.18	4.54	2.79	2.33	4.34
FSHV7	100	99.19	103.58	96.95	35.68	37.43	49.08	69.00
	100	97.87	98.89	102.09	37.24	40.24	54.51	76.09
	100	92.37	95.68	93.26	35.48	37.58	48.71	71.57
Promedio	100	96.47	99.38	97.43	36.13	38.42	50.77	72.22
Desv	0	3.62	3.98	4.43	0.97	1.58	3.25	3.59
FSHV8	100	101.53	102.29	102.37	96.82	38.71	52.39	68.09
	100	97.93	92.52	105.00	92.84	40.63	55.51	67.71
	100	95.87	96.52	99.64	92.59	38.70	60.93	70.04
Promedio	100	98.44	97.11	102.34	94.08	39.35	56.28	68.61
Desv	0	2.86	4.92	2.68	2.37	1.11	4.32	1.25
FSHV10	100	104.10	105.14	101.79	92.46	70.59	74.42	86.71
	100	99.27	97.97	97.61	81.05	65.38	72.16	80.07
	100	110.65	111.96	110.37	90.37	73.83	82.62	87.94
Promedio	100	104.67	105.03	103.26	87.96	69.93	76.40	84.91
Desv	0	5.71	7.00	6.51	6.08	4.26	5.50	4.23
COL	100	115.78	104.45	102.25	98.88	81.53	74.11	59.94
	100	93.97	97.75	88.42	86.25	74.47	58.26	53.60
	100	101.88	94.44	87.73	82.37	74.50	58.87	52.48
Promedio	100	103.88	98.88	92.80	89.17	76.83	63.75	55.34
Desv	0	11.04	5.10	8.19	8.63	4.07	8.98	4.02
Cis-Platino	100	111.66	108.54	104.09	73.74	50.95	46.46	47.51
	100	107.67	112.97	105.86	70.35	52.11	49.49	49.54
	100	106.73	112.59	102.13	68.80	51.53	46.51	49.60
Promedio	100	108.69	111.37	104.03	70.96	51.53	47.49	48.88
Desv	0	2.61	2.46	1.86	2.52	0.58	1.74	1.19
Concentración (µg/mL)	0	0.004	0.04	0.4	4	40	200	400
	100	105.34	106.97	101.35	94.42	86.14	80.53	77.26
	100	104.85	104.78	98.61	96.06	86.39	81.22	77.20
NZ	100	108.24	105.84	101.80	91.80	84.97	79.61	77.05
	100	106.14	105.86	100.59	94.10	85.83	80.45	77.17
	100	106.14	105.86	100.59	94.10	85.83	80.45	77.17
Promedio	100	106.14	105.86	100.59	94.10	85.83	80.45	77.17
Desv	0	1.83	1.10	1.73	2.15	0.76	0.81	0.11

III.1.9. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

El cultivo primario de leucocitos fue obtenido de sangre periférica, la cual se extrajo por venopunción de donadores sanos adultos empleando un sistema de vacutainer en tubos con EDTA. Después de obtener la sangre, se mezcló con PBS 1X en una proporción equivalente. Para separar a las células mononucleares de sangre periférica se utilizó el método de separación por gradiente con Ficol-Paque PLUS (GE Healthcare®) y por centrifugación diferencial de 3 ciclos de centrifugación. Se tomó los 10 mL de sangre vertiéndolos en un tubo cónico estéril los cuales se diluyeron en PBS 1X estéril, adicionándose 10 mL de ficol lentamente por la pared del tubo de la mezcla de sangre-PBS sin que se mezcle las fases para no romper el gradiente, y posteriormente se centrifuga a 2000 rpm por 30 min con aceleración y sin rampa de frenado. Obteniéndose un anillo blanco que contiene leucocitos con un pipetor, de ahí se procede al lavado con medio RPMI suplementado con 10% de SFB para recuperar el restante se realizan tres ciclos de centrifugación por 5 min cada uno el primero es a 1500 rpm luego es a 1200 rpm y finalmente a 900 rpm. Si al momento de contar se observan plaquetas se puede efectuar un último ciclo de centrifugación de 900 rpm por 5 min.

Una vez efectuada esta separación se sembró 100,000 CMSP en una placa de 96 pozos, teniendo un volumen final de 100 μ L en cada pozo el volumen se completó con medio RPMI suplementado con 10% SFB, las placas se incubaron a 5% de CO₂ a 37°C. Estas células se emplearon para ensayos de viabilidad celular con XTT.

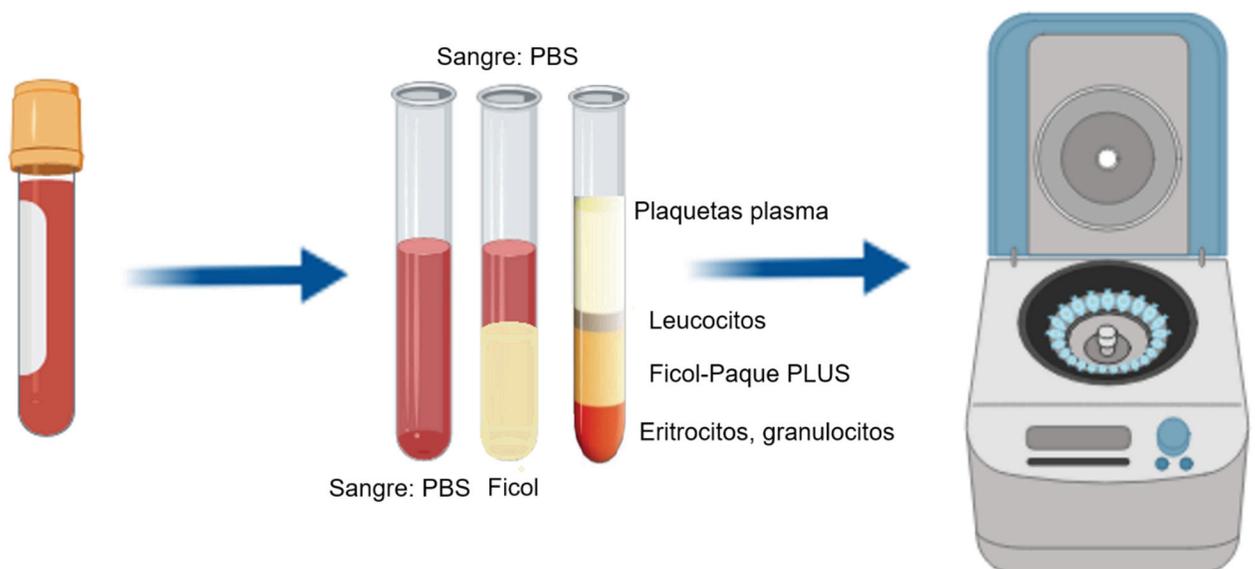


Figura AIII.6. Curva Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica por Ficol-Paque PLUS. Se muestra un esquema general de la separación por gradiente, así como las fases resultantes.

III.1.10. Análisis de distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para analizar la distribución para analizar la distribución de los microtúbulos en células de adenocarcinoma de pulmón. De forma inicial se sembraron 400, 000 células SK-LU-1 sobre cubreobjetos de 18 mm de diámetro previamente esterilizados en cajas de Petri de 3.3 cm con medio DMEM (Sigma®). Posterior a ello se aplicó el tratamiento correspondiente (i.e **NZ**, **TX**, **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8**) en concentraciones distintas (ver **Figura AIII.8**), basadas en los resultados del primer screening, incubándose 24 h a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂.¹

Posterior a ello se retiró el medio de cultivo, y se realiza 3 lavados con 1.5 mL de PBS 1X. pH: 7.4. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por ~12 h de ahí se puso en contacto durante 10 min con la solución de permeabilización. Pasado el tiempo de incubación se procede con el bloqueo con 1.5 mL de la solución de albúmina al 3% 1h a 37°C.

Consecuentemente se incubaron los anticuerpos el primario anti β -tubulina T0198 o monoclonal (Aldrich® Cat. #T0198) (1:1000) y posteriormente el secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (1:500) (Millipore ® Cat. #AP308F) y DAPI (1:1000) (Aldrich ®) estos se 1 h a 37°C entre cada uno de estos anticuerpos se realizaron cuatro lavados con 2 mL de PBS 1X. El montaje sobre un portaobjetos con 10 μ L de Vectashield ® sobre una solución de gelvatol. Para la visualización y captura de las imágenes a 20X y 60X se empleó un microscopio confocal invertido (Nikon Ti Eclipse ®) y estos fueron analizados utilizando el programa NIS Elements v.5.0 ® con el apoyo del Dr. Vadim Pérez Koldenkova, en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada.

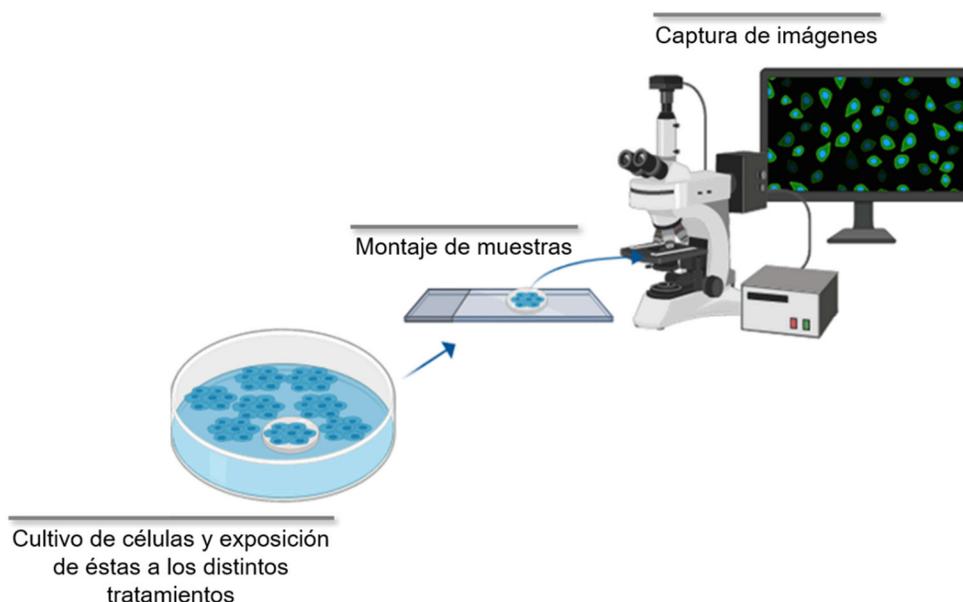


Figura AIII.7. Esquema que muestra parte de la metodología de la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

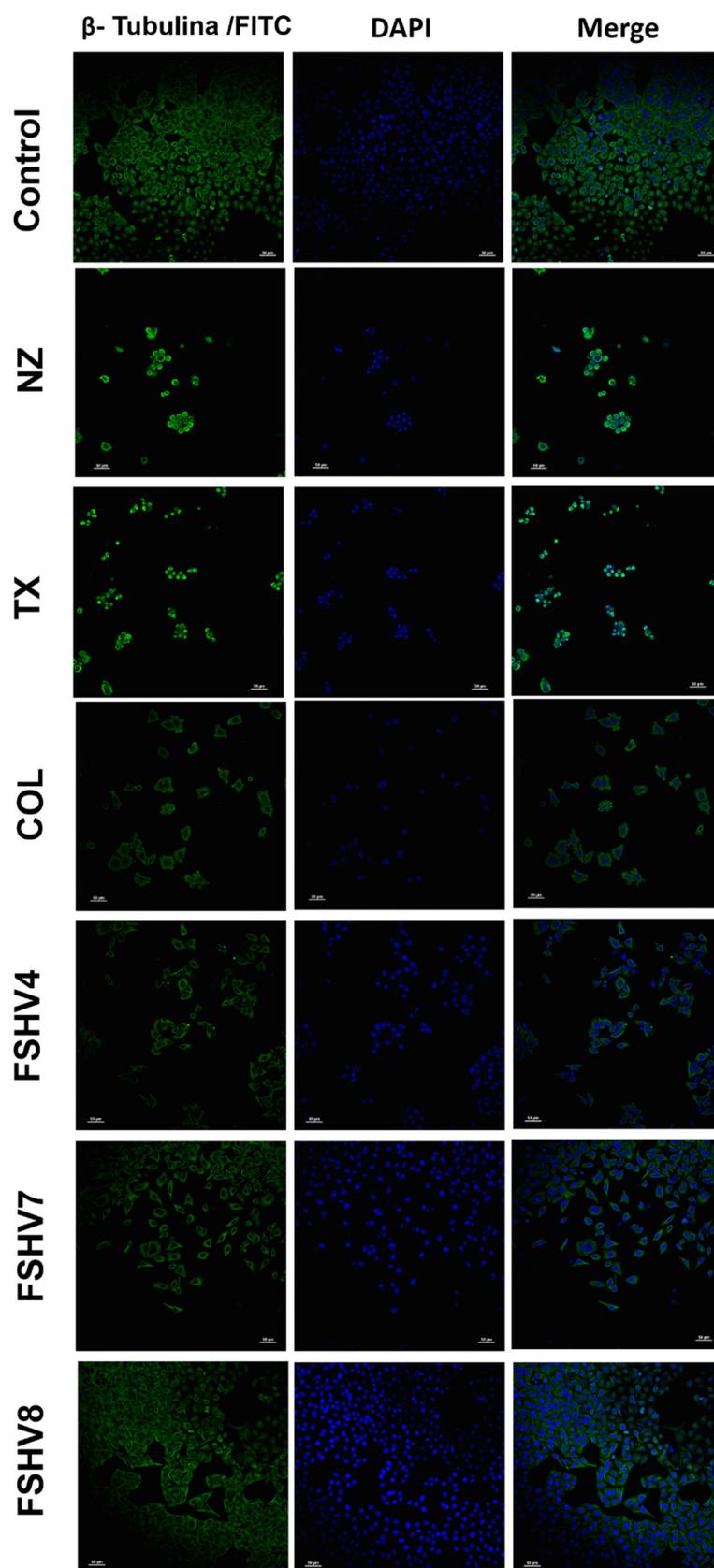


Figura AIII.8. Efecto de los compuestos en la distribución de β -tubulina SK-LU- 1 por 24 h bajo los distintos tratamientos NZ (0.16 μ M), TX (0.08 μ M), COL (0.30 μ M) FSHV4 (5 μ M), FSHV7 (12.5 μ M), FSHV8 (25 μ M) a un aumento de 50 μ m.

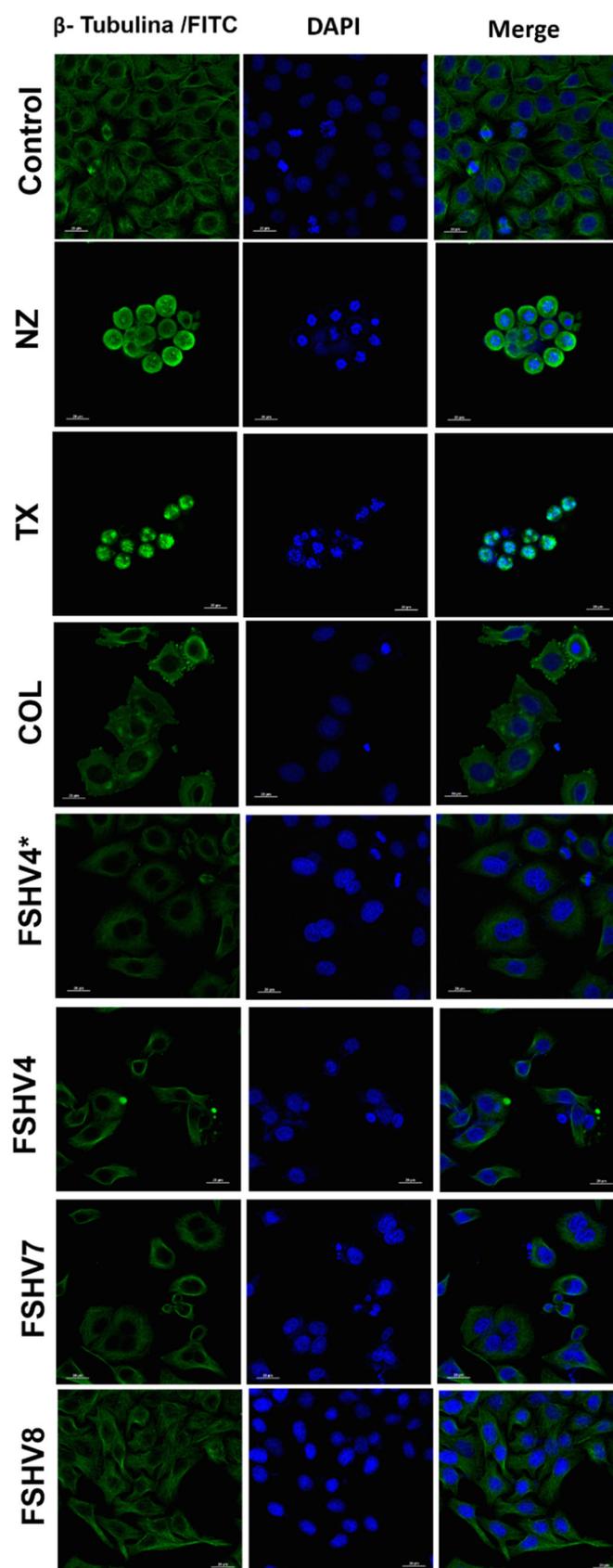


Figura AIII.9. Efecto de los compuestos en la distribución de β -tubulina SK-LU- 1 por 24 h bajo los distintos tratamientos NZ (0.16 μ M), TX (0.08 μ M), COL (0.30 μ M) FSHV4* (2.5 μ M), FSHV4 (5 μ M), FSHV7 (12.5 μ M), FSHV8 (25 μ M) a un aumento de 20 μ m.

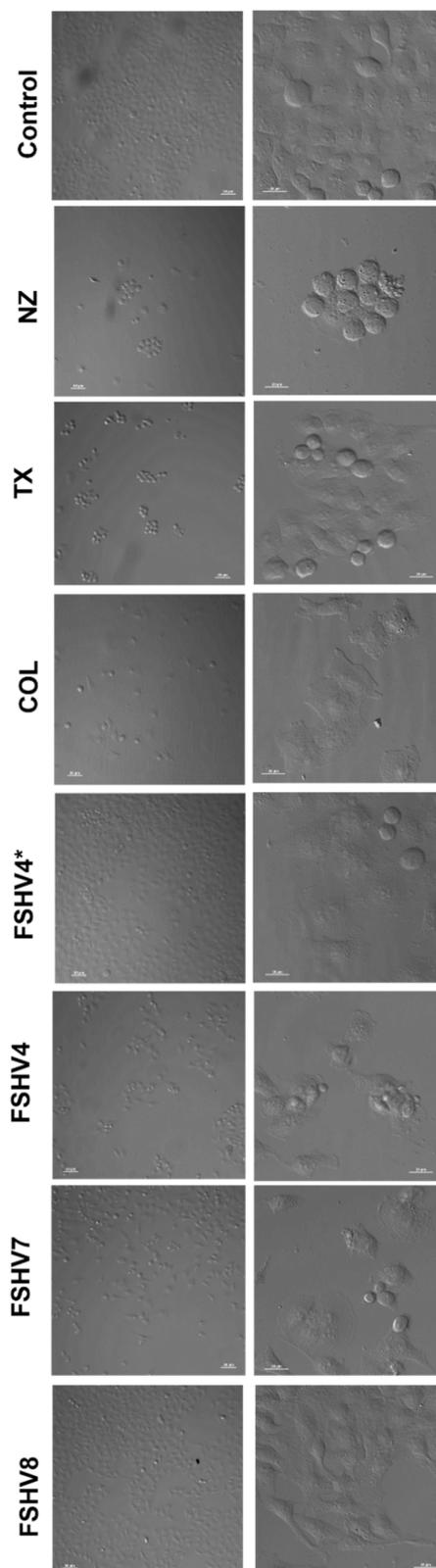


Figura AIII.10. Efecto de los distintos tratamientos en células SK-LU-1 a 24h NZ (0.16 μM), TX (0.08 μM), FSHV4* (2.5 μM), FSHV4 (5 μM), FSHV7 (12.5 μM), FSHV8 (25 μM) en campo claro a un aumento de 50 μm y 20 μm.

III.1.11. Análisis por Western blot de la tubulina soluble y polimerizada.

Este ensayo consistió en un comparativo entre la cantidad de tubulina soluble y polimerizada en células SK-LU-1 tratadas con los derivados de triamin-2,4,6-quinazolina (i.e. **FSHV4**, **FSHV7** y **FSHV8**) así como **NZ** y **TX**. Utilizando la metodología de extracción reportada previamente.²

Sembrándose 1,650,000 células por caja en medio de cultivo DMEM (Sigma®) suplementado con 10% de SFB. Transcurridas las horas suficientes como para que la placa tenga una confluencia mayor al 80% (~ 24h) se administraron los compuestos a distintas concentraciones por 24 h a 37°C a una atmósfera 5% de CO₂. Al concluir este periodo, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se procedió a la extracción de ambas fracciones. Para colectar las fracciones correspondiente a la tubulina soluble, las células fueron permeabilizadas con 1000 µL de amortiguador de lisis éstos se incubaron durante 3 min a 30°C. Al finalizar el periodo de incubación, se centrifugó a 800 rpm por 5 min el sobrenadante fue removido de forma suave la cual correspondería a la fracción soluble. Al pellet se le adicionó 1000 µL de buffer Laemmli el cual se colocó en incubación a 95°C durante 3 min inmediatamente después se centrifugó a 1200 rpm por 5 min recuperándose la fracción insoluble la cual correspondía la fracción de tubulina polimerizada. Esta se transfirió a una membrana de celulosa y se dejó dializar en agua desionizada y estéril ~12h, pasadas esas doce horas las membranas de cada extracto se concentró en una cama de sacarosa, para retirar el excedente de agua. De ahí ambas fracciones se cuantificaron con el kit de cuantificación (véase **Figura AIII.8.**) de proteínas 2D Quant (GE Healthcare ®), lo anterior se realizó por duplicado cada una de las muestras.

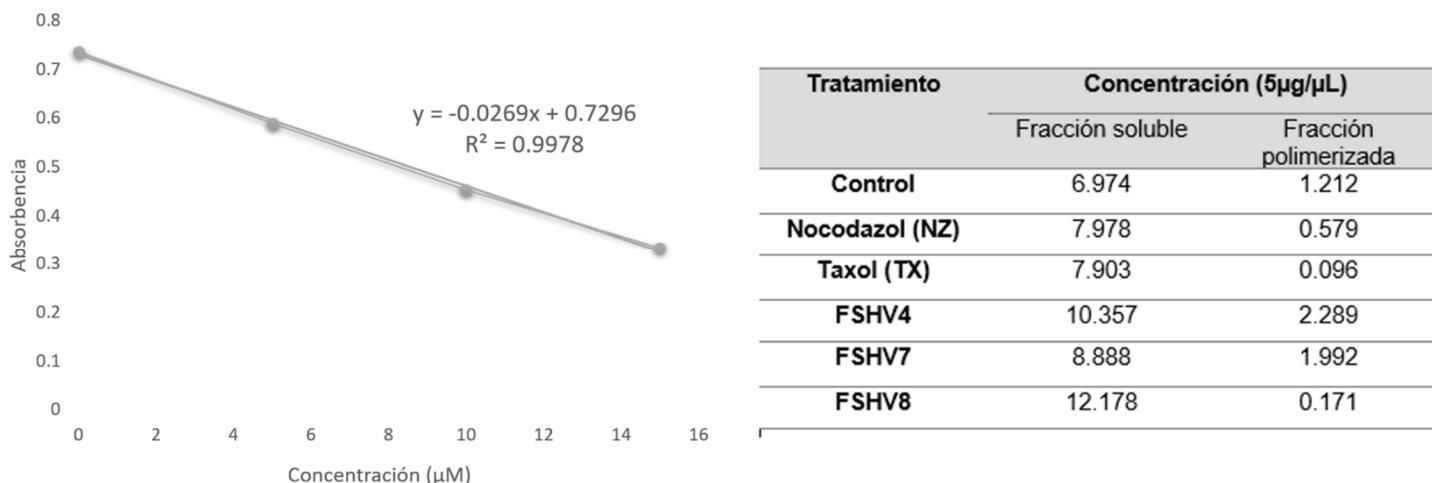


Figura AIII.11. Curva de cuantificación de BSA *Western Blot* y de cada uno de los extractos de tubulina polimerizada y soluble con cada uno de los tratamientos (se reporta el promedio del duplicado).

III.1.11.1. Electroforesis

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida y amortiguador de dodecilsulfato (SDS-PAGE), cada gel presentaba unas dimensiones de (8cm x 12 cm) y los siguientes componentes:

- Gel separador 12%: 3300 μL agua destilada, 4400 μL poliacrilamida 30%, 2500 μL Tris 1.5 M pH: 8.8, 100 μL SDS, 100 μL de persulfato de amonio (PSA) 10% y 4 μL de TEMED.
- Gel concentrador 5%: 1050 μL de agua destilada, 250 μL poliacrilamida 30%, 190 μL Tris 1 M (pH 6.8), 15 μL SDS 10%, 15 μL PSA y 1.5 μL TEMED.

Los geles se colocaron en las cámaras de electroforesis y se agregó amortiguador de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3). A continuación, se cargaron 30 μg de proteína de cada extracto respecto a cada tratamiento, en el primer carril se puso el marcador de peso molecular preteñido de amplio rango de Bio-Rad®. Los geles se corrieron a 100 V. durante 1 h.

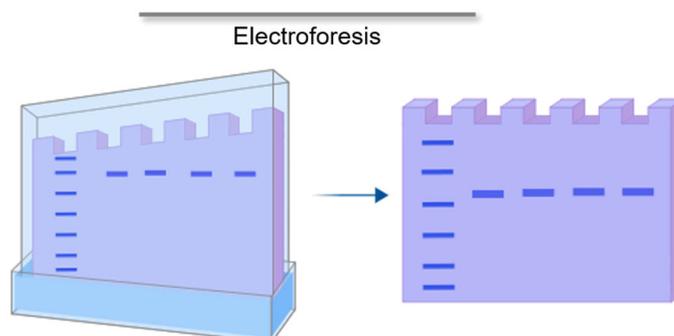


Figura AIII.12. Electroforesis de ambos extractos de β -tubulina de los extractos solubles y polimerizados después de la exposición de cada uno de los tratamientos.

III.1.11.2. Transferencia

Las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE se transfieren a una membrana para que su detección por anticuerpos sea más accesible. La membrana que se empleó fue de celulosa, previamente hidratada en amortiguador de referencia reutilizado. Las membranas se colocaron adecuadamente sobre los geles y se prepararon las cámaras de corrimiento con amortiguador de transferencia durante 1.5 h a 100 V.

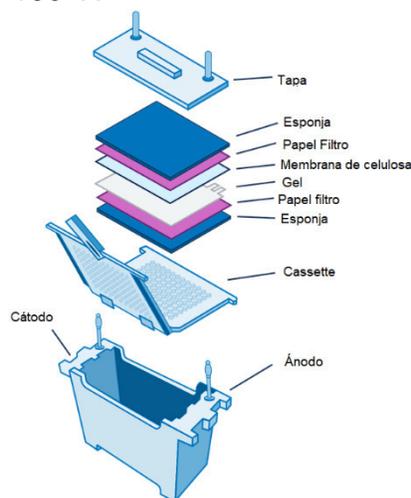


Figura AIII.13. Representación de la transferencia del gel a la membrana de celulosa de la metodología de *Western Blot* (imagen traducida).³

III.1.11.3. Incubación con Anticuerpos.

En este paso se procedió a la detección la β -tubulina en las fracciones soluble y polimerizada. Primero, las membranas se bloquearon con albúmina al 3% durante 1.5 h a 4°C con agitación constante

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario anti β -tubulina T0198 Aldrich® Cat. #T0198 (1:1000) cada 15 min se volteó la membrana incubándose a 37°C en agitación constante 1.5 h. Terminando el periodo de incubación se realizó 3 lavados con PBS 1X entre cada lavado se dejó incubar 5 min a 37°C en agitación constante. Posterior a esto se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado a HRP (peroxidasa de rábano, Millipore® Cat. #AP308) a una dilución (1:1000) durante 1.5 h a 37°C, se realizaron cuatro lavados volteando cada 15 min en agitación constante. Se procedió al revelado cromogénico, cada membrana se sumergió en 6mL de esta solución hasta que se revelaron las bandas correspondientes, para detener la reacción con agua destilada a rt.

Para cuantificar la intensidad de las bandas, se tomaron fotografías a las membranas y se analizaron por densitometría mediante la fotografía capturada de la membrana con el aparato UVITEC Cambridge® empleando el programa Quantity One®. Los resultados se expresaron en intensidad presente dependiendo del número de pixeles asociados en la banda así como el porcentaje tomando 100% a la banda intensidad correspondiente al control sin tratamiento.

Tabla AIII.2 Porcentaje de cada uno de los extractos de β -tubulina (i.e. soluble y polimerizada) resultantes de los tratamientos expuestos.

Tratamiento	% Tubulina polimerizada	% Tubulina soluble
FSHV4	94.07	118.51
FSHV7	96.35	103.31
FSHV8	108.09	77.43
NZ	96.88	102.95
TX	124.91	86.50
Ctrl	100.00	100.00



Quinazolines as inhibitors of chromatin-associated proteins in histones

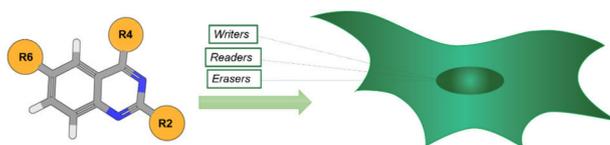
Frida S. Herrera-Vázquez¹ · Francisco Hernández-Luis¹ · José L. Medina Franco¹

Received: 7 December 2018 / Accepted: 24 January 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

It is increasing the evidence that quinazolines are inhibitors of chromatin-associated proteins in histones. Quinazolines have a broad structural diversity among the structural classes that have been designed. Herein, we review the development of selective and potent quinazolines highlighting the current state of these molecules with an emphasis on the structural requirements for the interaction within the target. Chemical synthesis and results of the biological assays *in vitro* or *in vivo* of these compounds are also discussed. There is extensive evidence that support quinazoline derivatives as inhibitors of histone methyltransferase (G9a) and G9a-like protein (GLP). There is one quinazoline analogue that inhibits an extra-terminal bromodomain motif (BET) and that is on clinical trials as potential treatment for different chronic diseases. There is also clinical evidence that quinazolines act as dual inhibitors targeting histone deacetylases (HDACs) Zn²⁺ dependent and kinase receptors for the potential treatment of cancer. Additional proposals of quinazoline structures are being evaluated as inhibitors targeting two or more chromatin-associated proteins simultaneously. Therefore, further improvements in synthetic methods, computational studies, and additional biological assays *in vitro* and *in vivo* remain to be addressed.

Graphical Abstract



Keywords Quinazoline chromatin-associated proteins · Epigenetic · Histone modifiers · Inhibitors

Abbreviations

AML acute myeloid leukemia
ApoA1 apolipoprotein A1
BRDs bromodomains
CRDs chromodomains
CL_{int} intrinsic clearance

DNA deoxyribonucleic acid
EC₅₀ half maximal effective concentration
FAD⁺ flavin adenine dinucleotide
G9a euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2
GLP G9a-like protein
HDACs histone deacetylases
HER1 epidermal growth factor receptor
HER2 human epidermal growth factor receptor-type2
H3K9Me2 dimethylated lysine 9 histone 3
HKMT histone lysine methyltransferases
IC₅₀ half maximal inhibitory concentration
iPS reprogramming induced pluripotent stem cells
Kac acetylated lysine
LSD1 lysine-specific demethylase 1
MAO monoamine oxidases

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00044-019-02300-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José L. Medina Franco
medinajl@unam.mx

¹ Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico 04510, Mexico