



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Síntesis catalítica con níquel en medio acuoso y pruebas
de actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de
 γ -lactamas y piridopirimidinas sustituidas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NORMA ISABEL GARCÍA MACÍAS

Director de tesis: Dr. Noé Rosas Espinosa

MÉXICO, D.F.

2005

0350549



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que a la alumna GARCÍA MACÍAS NORMA ISABEL con número de cuenta 9957504-9 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 20 del mes de junio de 2005 a las 11:00 hrs. para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Dra. FCA. LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA
VOCAL* Dr. NOÉ ROSAS ESPINOSA
SECRETARIO Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN
SUPLENTE MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES
SUPLENTE Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA

Handwritten signatures of the jury members: Leonora Sánchez y García Figueroa, Noé Rosas Espinosa, Evangelina Mercado Marín, Leonor Aguilar Santelises, and Estela Valencia Plata.

El título de la tesis que se presenta es: Síntesis catalítica con níquel en medio acuoso y pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de gamma-lactamas y piridopirimidinas sustituidas.

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 16 de mayo de 2005
MTR. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ DIRECTOR DIRECCION

Vo Bo
Handwritten signature of Roberto Chávez Ruiz
Q.F.B. ROBERTO CHÁVEZ RUIZ
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

RECIBI:
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
5 DE JUNIO

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

El trabajo de investigación que se presenta para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA, proyecto N° IN-218901).

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo

gracias a la asesoría técnica de la

M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan

y del

M. en C. Antonio Nieto Camacho.

Se agradece la asesoría interna, en la

FES-Zaragoza, de la

Q.F.B. Evangelina Mercado Marín

ÍNDICE

TABLA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. 5-HIDROXI-3-PIRROLIN-2-ONAS (γ -LACTAMAS)	1
1.1.1. Definición y nomenclatura	1
1.1.2. Rutas de síntesis	3
1.2. PIRIDOPIRIMIDINAS (1,3-DIMETILPIRIDO[2,3- <i>d</i>]PIRIMIDIN-2,4-DIONAS 5,7-DISUSTITUIDAS)	6
1.2.1. Definición	6
1.2.2. Rutas de síntesis	7
1.3. CATÁLISIS	11
1.3.1. Definición	11
1.3.2. Clasificación	12
1.4. OXIDACIÓN	13
1.4.1. Radicales libres	14
1.4.2. Antioxidantes	16
1.4.3. Métodos para determinar la actividad antioxidante	17
1.4.3.1. Prueba química del 1,1-difenil-2-picrilhidracilo	17
1.4.3.2. Peroxidación de lípidos	18
1.5. INFLAMACIÓN	23
1.5.1. Fármacos antiinflamatorios	23
1.5.2. Modelos para medir la inflamación	24
1.5.3. Óxido nítrico	25
1.6. CÁNCER	27
1.6.1. Fármacos usados en la quimioterapia del cáncer	27
1.6.2. Métodos para evaluar la citotoxicidad	29
2. JUSTIFICACIÓN	31

3. OBJETIVOS.....	32
4. HIPÓTESIS.....	33
5. MATERIAL Y EQUIPO	34
5.1. SÍNTESIS QUÍMICA	34
5.2. EVALUACIONES BIOLÓGICAS	35
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	37
6.1. γ -LACTAMAS (5-HIDROXI-3-PIRROLIN-2-ONAS).....	37
6.1.1. Sistema catalítico	37
6.1.2. Síntesis de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas	37
6.2. PIRIDOPIRIMIDINAS (1,3-DIMETILPIRIDO[2,3-d]PIRIMIDIN-2,4-DIONAS-5,7-DISUSTITUIDAS)	37
6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	38
6.3.1. Reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracilo	38
6.3.2. Lipoperoxidación	39
6.4. PRUEBA DE INFLAMACIÓN (EDEMA EN LA OREJA DE RATÓN)	41
6.5. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y VIABILIDAD CELULAR	42
6.5.1. Aislamiento de macrófagos murinos.....	42
6.5.2. Producción de nitritos	42
6.5.3. Viabilidad celular (Ensayo de MTT).....	43
6.6. ACTIVIDAD CITOTÓXICA	44
7. RESULTADOS	46
7.1. RESULTADOS DE LA SÍNTESIS QUÍMICA	46
7.1.1. Análisis espectroscópico de los productos	47
7.1.1.1. 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas	47
7.1.1.2. 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas.....	49
7.2. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	51
7.3. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	54
7.4. RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD	56

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
9. CONCLUSIONES	65
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO	72

TABLA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
ARN	Ácido ribonucleico
BHT	Hidroxitolueno butilado
c	Cuádruple
CCF	Cromatografía en capa fina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
d	Doble
DMEM	Medio de cultivo
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
Ea	Energía de activación
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
EM	Espectrometría de masas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERON	Especies reactivas de óxido de nitrógeno
ES	Error estándar
FBS	Suero fetal bovino
FeSO ₄	Sulfato ferroso
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IR	Infrarrojo
KCN	Cianuro de potasio
LPS	Lipopolisacárido
m	Múltiple
MDA	Aldehído malónico
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mmoles	Milimoles
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaOH	Hidróxido de sodio
Ni(CN) ₂	Cianuro de níquel
[Ni(CN) ₄] ⁻⁴	Anión tetracianoniquelato
nm	Nanómetro
nmoles	Nanomoles
NO	Óxido nítrico
Ni(CN) ₂ ·4H ₂ O	Cianuro de níquel tetrahidratado

PBS	Buffer de fosfatos salina
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono trece
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
sex	Séxtuple
SONi	Sintasa de óxido nítrico inducible
SRB	Sulforrodamina B
t	Triple
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMP	Tetrametoxipropano
TPA	Acetato de 12- <i>o</i> - tetradecanoilforbol
μg	Microgramo
μM	Micromolar
μmol	Micromol

INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia que tienen los compuestos heterocíclicos en el campo farmacéutico, se ha venido desarrollado en los últimos años una gran variedad de procesos de síntesis para su obtención, la mayor parte de ellos utilizan condiciones drásticas de reacción, temperaturas y presiones altas, disolventes tóxicos y/o la síntesis se efectúa en varias etapas con rendimientos que van de regulares a malos.

Ahora bien, la preparación de heterociclos reportada en este trabajo de tesis, se realizó por métodos catalíticos homogéneos utilizando agua como disolvente, condiciones suaves de reacción, temperatura ambiente, presión atmosférica, la separación de los productos de reacción es fácil, ya que a medida que se forman, no son solubles en el medio acuoso utilizado, los rendimientos son elevados y en algunos casos cuantitativos.

En relación con lo anterior, se propone la síntesis, en un solo paso, de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas en un sistema catalítico acuoso de níquel y empleando condiciones suaves de reacción.

El método de síntesis aquí utilizado nos permite realizar variaciones estructurales, que están relacionadas directamente con la actividad biológica de los compuestos químicos, ya que pequeños cambios estructurales pueden ser suficientes para modificar drásticamente la actividad biológica y farmacológica.

El interés de las 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y de las 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas se debe a que sus estructuras moleculares están presentes en diversos compuestos de origen natural y biomoléculas importantes como la vitamina B₁₂, prodigiosina, distamisina, ADN y ARN, por mencionar algunas; además, se ha reportado que estos compuestos poseen propiedades biológicas como

antiinflamatoria, antitumoral, inhibidora de la agregación plaquetaria, psicotrónica, y antibacteriana^{10,50,51}.

Por lo anteriormente señalado, es necesario llevar a cabo pruebas de actividad biológica a los heterociclos sintetizados mediante bioensayos estandarizados, lo cual nos permitirá seleccionar los compuestos que presenten actividad antioxidante, antiinflamatoria y/o citotóxica.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. 5-HIDROXI-3-PIRROLIN-2-ONAS (γ -LACTAMAS)

1.1.1. Definición y nomenclatura

Los compuestos que contienen un grupo carbonilo adyacente al grupo amino, se conocen como amidas, pueden ser cíclicos o lineales, las amidas lineales dependiendo de su grado de saturación se denominan amidas primarias, secundarias o terciarias (Figura 1).

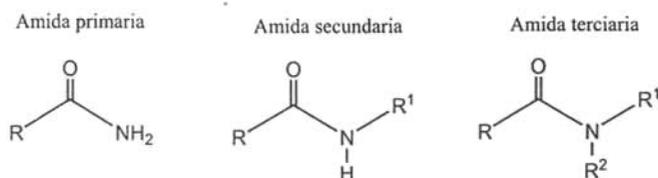


Figura 1. Clasificación de las amidas

Las amidas cíclicas se denominan lactamas. Estas se forman a partir de los aminoácidos, donde el grupo amino y el grupo carboxilo se han unido para formar la amida. Las lactamas son homólogas a las lactonas. Las lactonas se consideran como derivadas de hidroxiaácidos carboxílicos y las lactamas de aminoácidos carboxílicos, por la pérdida de agua intramolecular. La forma tautomérica de una lactama se llama "lactima"¹(Figura 2).

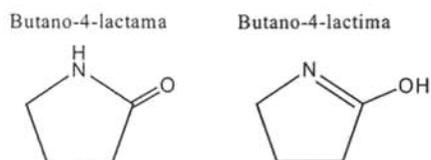


Figura 2. Forma tautomérica de las lactamas

Las lactamas se nombran como a las lactonas, y se emplea con mayor frecuencia los nombres comunes que los nombres de IUPAC. Para las lactamas se derivan de añadir el término lactama al final de la raíz del nombre del ácido correspondiente. Los nombres comunes de las lactamas se forman cambiando la terminación –oico del aminoácido por lactama. Una letra griega designa al átomo del carbono siguiente al grupo carbonilo que cierra el anillo². Los sustituyentes se nombran tal y como aparece en el ácido correspondiente (Figura 3).

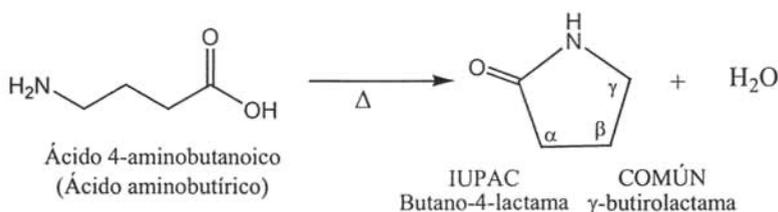


Figura 3. Deshidrogenación de un aminoácido carboxílico y nomenclatura de las lactamas

Las lactamas son un grupo de compuestos ampliamente utilizados como antibióticos, principalmente las β -lactamas. Los antibióticos de la penicilina³, contiene el anillo β -lactama de cuatro miembros cuya estructura se presenta en la Figura 4.

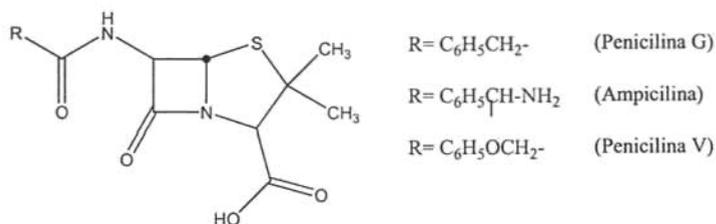


Figura 4. Estructura de los antibióticos de la penicilina.

1.1.2. Métodos de síntesis.

El método de Fariña y col.⁴ describe la síntesis fotoquímica en la cual diversos derivados del pirrol y furano al ser foto-oxigenados producen las lactamas y lactonas respectivamente, este último compuesto es transformado al producto deseado a través de una reacción de amonólisis bajo condiciones suaves, dando buenos rendimientos (Figura 5).

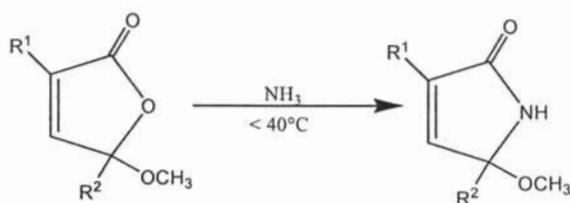


Figura 5. Reacción de amonólisis para producir lactamas

Beltaïef y colaboradores.⁵ reportaron la síntesis de 2-alkil-3-carbometoxi- γ -lactamas utilizando como intermediarios itaconatos.

La reacción se lleva a cabo con una amina primaria (2 equivalentes) con ester itacónico 3- alquilado en una mezcla de metanol agua (9:1) a temperatura ambiente, dando como resultado la formación diastereoselectiva de α -alkil- β -carbometoxi- γ -lactama con moderados a buenos rendimientos (Figura 6).

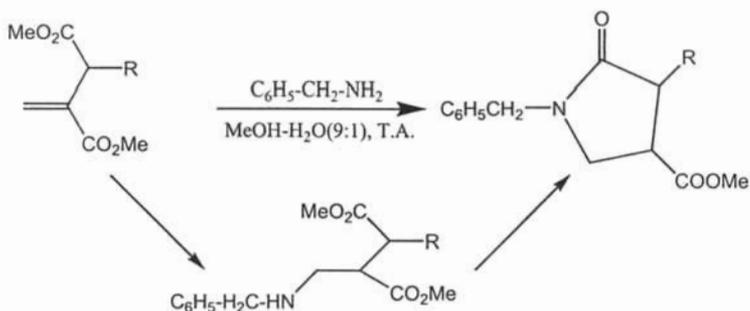


Figura 6. Síntesis de γ -lactamas a partir de itaconatos

Pearsons⁶ describe la ciclización de enamidas para la síntesis de una gama de N-heterocícllos biológicamente importantes, utilizando diferentes métodos, entre los cuales incluye el uso del hidruro de tributilino.

Una estrategia común para formar γ -lactamas trisustituidas es empleando N-alil halo-amidas en presencia de hidruro de tributilino (Figura 7).



Figura 7. Síntesis de γ -lactamas trisustituidas empleando N-alil halo-amidas

El método de Ghelfi y col.⁷ consiste en la reacción de policloro-2-pirrolidionas con metóxido alcalino en alcohol a partir de N-alil- α -percloramidas para obtener γ -lactamas α,β -insaturadas (Figura 8).

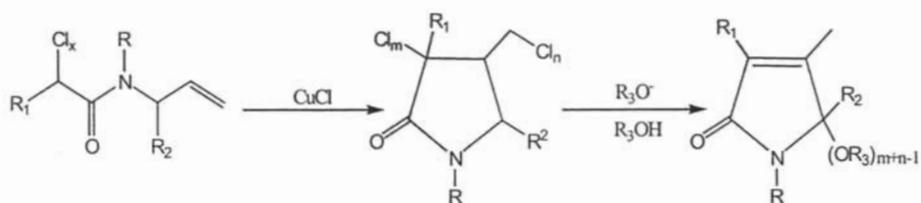


Figura 8. Síntesis de γ -lactamas α,β -insaturadas a partir de N-alil- α -percloramidas

Finalmente, en el método de Rosas y colaboradores⁸ se reporta la síntesis de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas-3,5-sustituidas mediante la hidrocianación de α -cetoalquinos catalizada por un complejo de níquel en medio acuoso.

Este método describe la reacción de α -alquiniilcetonas en un sistema acuoso de KCN/NaOH/CO, catalizado por un complejo formado a partir de $\text{Ni}(\text{CN})_2$. La reacción produce hidrolactamas insaturadas. En la reacción las especies catalíticamente activas $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{4-}$ se forman *in situ* en condiciones de reacción suaves (presión atmosférica y temperatura ambiente) (Figura 9).

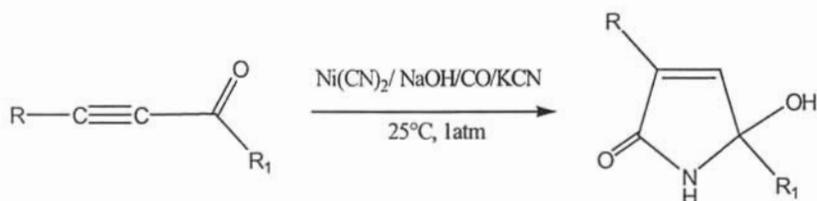


Figura 9. Síntesis de γ -lactamas a partir de α -alquiniilcetonas

La formación de la especie aniónica⁹, que es un ión complejo, se describe a continuación (Figura 10):

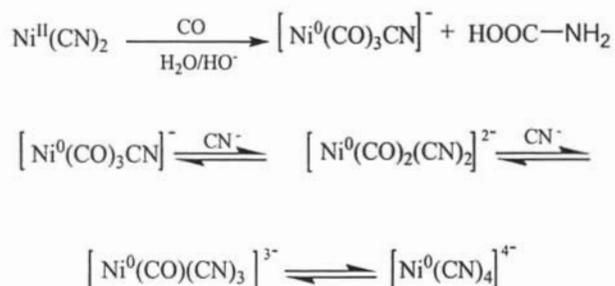


Figura 10. Formación de la especie aniónica activa

Las condiciones reductoras de la reacción favorece el cambio de Ni^{+2} a Ni^0 .

1.2. PIRIDOPIRIMIDINAS (1,3-DIMETILPIRIDO[2,3-d]PIRIMIDIN-2,4-DIONAS 5,7-DISUSTITUIDAS)

1.2.1. Definición

Las 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas pertenecen a una familia de compuestos heterocíclicos, cuya estructura general es 2-4-dioxopirido[2,3-d]pirimidina con fórmula condensada $C_7H_5N_3O_2$, las cuales están dentro de un número de compuestos biológicamente activos que comprenden antitumorales, antibacteriales, antiinflamatorios e insecticidas¹⁰ (Figura 11).

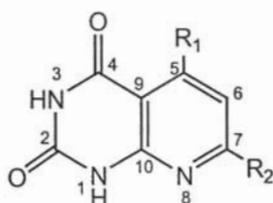


Figura 11. Estructura de 2-4-dioxopirido[2,3-d]pirimidina

La piridina es un análogo aromático nitrogenado del benceno: un anillo heterocíclico de seis miembros con un átomo de nitrógeno y seis electrones π . La pirimidina, al igual que la piridina, es un heterociclo de seis miembros con dos átomos de nitrógeno en posición 1,3. Los átomos de nitrógeno son semejantes en ambas moléculas ya que cada uno tiene un par de electrones no compartidos en el orbital híbrido sp^2 en el plano del anillo aromático (Figura 12).

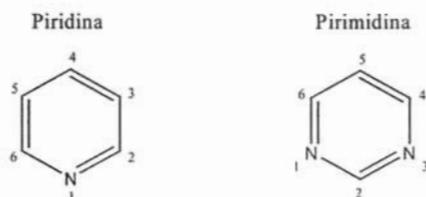


Figura 12. Estructuras de la piridina y pirimidina

Los derivados de las pirimidinas son los pilares del ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN)¹¹, mismos que constituyen el material genético de los seres vivos. Las cuatro bases que normalmente se encuentran en estas moléculas se dividen en dos clases: las bases pirimidínicas que se asemejan a las pirimidinas sustituidas; y las bases púricas, que son semejantes al heterociclo purina (Figura 13).

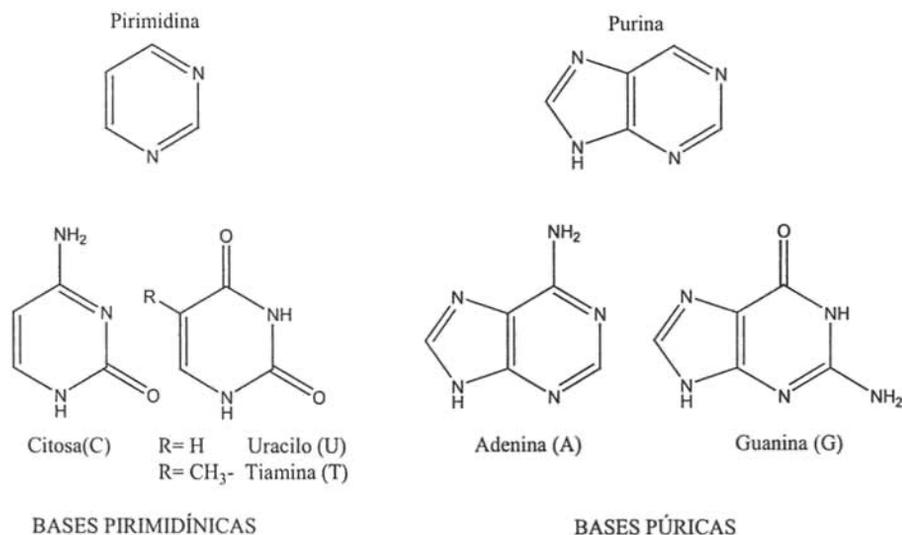


Figura 13. Estructuras de las bases pirimidínicas y púricas del ADN y ARN

1.2.2. Métodos de síntesis.

La propuesta de Pfeleiderer y col.¹² para la síntesis de derivados de pirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas consiste en la reacción de condensación entre 6-aminouracilos y 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Figura 14).

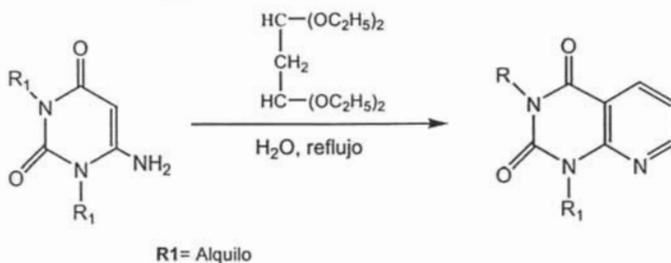
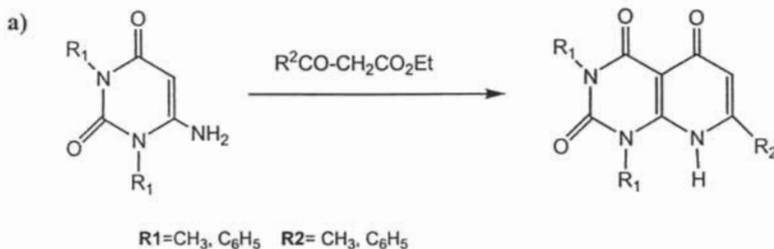


Figura 14. Reacción de condensación de 6-aminouracilos y 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

Khattab y col.¹³ publicaron la síntesis de 1,3-dialquil(7-aryl, fenil)-pirido[2,3-d]pirimidin-2,4,5-trionas-7-sustituidas a partir de la condensación térmica a 250 °C de 1,3-dialquil-6-amiouracilo y acetoacetato de etilo o benzoilacetato de etilo en difenileter, dando rendimientos entre 88% y 92%. Cuando se emplea algún derivado del ester malónico, en lugar de acetoacetato de etilo a 220 °C, se obtiene como producto principal las 1,3-dialquil-5-hidroxipirido[2,3-d]pirimidin-2,4,7-trionas-6-sustituidas (Figura 15).



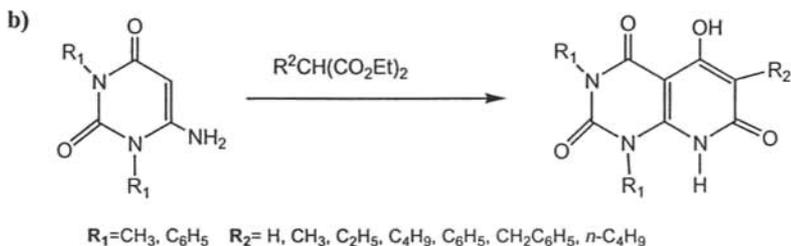


Figura 15. Síntesis de pirido[2,3-d]pirimidinas (a) e hidroxipirido[2,3-d]pirimidinas (b) a partir de 1,3-dialquil-6-aminouracilo

Woo y col.¹⁴ reportaron la reacción de iodouracilo con difenilacetileno en DMF en presencia de acetato de paladio como catalizador y carbonato de potasio como base a 120°C dando dos piridopirimidinas: una dehidrogenada y otra deaminada con un rendimiento de 67% y 27% respectivamente. En presencia de 1 equivalente de cloruro de litio la selectividad aumento, dando un rendimiento del 93% para la primera piridopirimidina y únicamente se obtuvo trazas de la segunda (Figura 16).

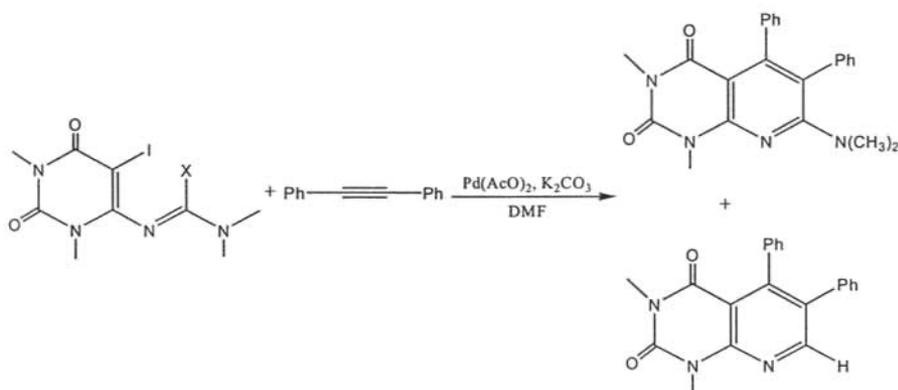


Figura 16. Síntesis de piridopirimidinas a partir de iodouracilo con difenilacetileno catalizada con acetato de paladio.

En Bagley y col.¹⁰ se da a conocer un método eficiente para la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas, por medio de una adición de Michael y una subsecuente ciclodehidración de 2,6-diaminopirimidin-4-onas y una gama de alquinonas a temperatura ambiente o 60°C manteniendo en agitación por 72 horas, en una variedad de disolventes (ácido acético, etanol, DMF o DMSO) obteniéndose buenos rendimientos (Figura 17).

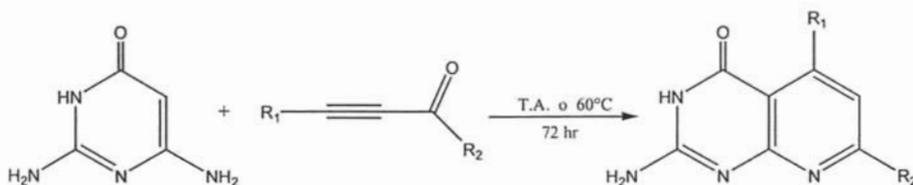


Figura 17. Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas a partir de 2,6-diaminopirimidin-4-onas y una gama de alquinonas.

En Rosas y colaboradores¹⁵ se describe la reacción del 6-amino-1,3-dimetiluracilo con un α -cetoalquino sustituido usando catálisis homogénea con níquel en medio acuoso alcalino para obtener 2,4-dioxopirido[2,3-*d*]pirimidinas-5,7-disustituidas con rendimientos cuantitativos bajo condiciones suaves de reacción (Figura 18).

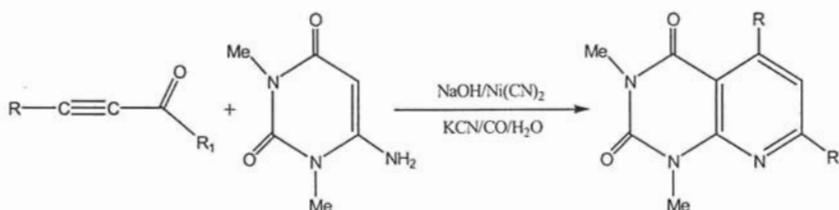


Figura 18. Síntesis de 2,4-dioxopirido[2,3-*d*]pirimidinas-5,7-disustituidas a partir de α -cetoalquinos sustituidos y 6-amino-1,3-dimetiluracilo

1.3. CATÁLISIS

1.3.1. Definición

La catálisis es una disciplina que ha sido fundamental para el desarrollo de la industria química ya que más del 85% de los productos químicos manufacturados se obtienen mediante procesos que requieren el empleo de un catalizador al menos en una de las etapas¹⁶.

Un catalizador se define como una sustancia que químicamente altera un mecanismo de reacción así como la velocidad total de la misma, regenerándose en el último paso de la reacción. Los catalizadores no alteran el balance energético final de la reacción química, sino que sólo disminuyen la energía de activación¹⁷(Figura 19).

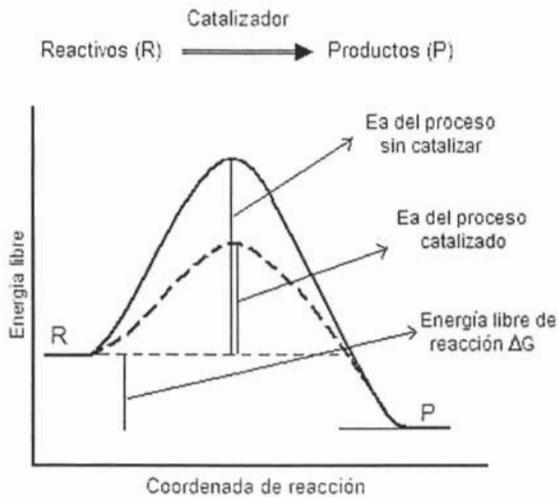


Figura 19. Efecto del catalizador en la energía libre de activación¹⁸

1.3.2. Clasificación

De acuerdo con las condiciones en las que se llevan a cabo las reacciones químicas es posible separar el fenómeno catalítico en dos dominios: *catálisis heterogénea* en la que el catalizador forma una fase distinta al sistema reactivo, como ocurre con los sistemas sólidos, que incrementan la velocidad de reacción en fase gas o, a veces, en disolución y *catálisis homogénea* en donde todas las especies cinéticamente activas, comprendido el catalizador, constituyen una misma fase, con una velocidad de reacción similar en todos los puntos¹⁶.

Una de las ventajas de la catálisis homogénea frente a la heterogénea es que se tiene un acceso más fácil al mecanismo de reacción y por consecuencia se puede dominar mejor el proceso catalítico correspondiente. Otra ventaja no menos despreciable de este tipo de catálisis es la ausencia de efectos de envenenamiento tan frecuentes en el caso de la catálisis heterogénea, y que obliga a tratamientos costosos de eliminación de impurezas¹⁹.

En los últimos años, se ha venido implementando la utilización de agua como disolvente en catálisis homogénea para eliminar los inconvenientes que presentan los procesos homogéneos, cuando se usan disolventes orgánicos. Las investigaciones efectuadas se han enfocado al desarrollo de nuevos catalizadores solubles en agua y técnicas eficientes que permitan obtener de una manera sencilla, práctica y eficiente los productos deseados. La utilización de agua en catálisis presenta las siguientes ventajas²⁰:

- ♦ Elimina el uso de disolventes polares apróticos (DMSO, DMF, etc.).
- ♦ Se evita la desactivación del catalizador.
- ♦ Facilita el aislamiento de los productos ya que generalmente son insolubles en agua.
- ♦ Las condiciones de reacción son más suaves y los rendimientos de los productos más altos.
- ♦ Las reacciones secundarias pueden ser eliminadas o reducidas.

Actualmente, casi el 75% de las reacciones catalíticas industriales utilizan catalizadores heterogéneos frente al 25% que utilizan sistemas homogéneos. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XX el interés hacia la catálisis homogénea ha aumentado notablemente de una manera paralela al desarrollo de la química organometálica^{16, 19}.

1.4. OXIDACIÓN

El término oxidación se aplicaba a todas las reacciones en donde el oxígeno se combinaba con otra sustancia, de esta manera, la sustancia que ganaba oxígeno se decía que se oxidaba, y la que lo perdía se consideraba que se reducía. En la actualidad, los términos oxidación y reducción se aplican a procesos donde hay transferencia de electrones, por lo que la oxidación se define químicamente como la pérdida de electrones y la reducción como la ganancia de estos. Siempre que se lleva a cabo una oxidación se produce una reducción, y viceversa, ya que se requiere que una sustancia química pierda electrones y que otra los gane.

La oxidación en el cuerpo humano es un proceso natural que se produce por el simple hecho de respirar, también involucra la generación de radicales libres que dañan las células sanas y que pueden ser neutralizados por nuestro propio cuerpo a través de la producción de algunas enzimas, sin embargo, cuando nos enfrentamos a un exceso sostenido de estos y el cuerpo es incapaz de neutralizarlos, nos vemos obligados a recurrir a cierto tipo de nutrientes que, también, realizan esta función y que reciben el nombre de antioxidantes.

1.4.1. Radicales libres

La estabilidad de un compuesto químico se relaciona con la organización de la capa de electrones de su órbita externa. Normalmente un compuesto estable tiene sus electrones apareados dos a dos.

Un radical libre se define como un átomo o molécula que poseen uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Esto lo hace muy inestable y extraordinariamente reactivo, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente, en la mayoría de los casos, con otras moléculas o átomos²¹.

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Existen también fuentes exógenas de radicales libres tales como los rayos ultravioleta, rayos X, rayos gamma, iones metálicos, medicamentos, humo de tabaco, pesticidas, disolventes industriales, ozono, entre otros.

La reacción más importante en células aerobias involucra al oxígeno molecular y sus radicales derivados. La toxicidad del O₂ se explica debido a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO), estas especies son derivados del O₂ que son más reactivos que éste en su estado basal de triplete. Las principales son: las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O₂, o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno singulete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Tabla 1).

Además de las especies de oxígeno reactivas mencionadas, en la última década se ha descubierto que hay otras especies de oxígeno combinadas con el nitrógeno que son importantes. Tal es el caso del monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO). El NO es un radical porque tiene un electrón desapareado. Sin

embargo, igual que el O_2^- , al cual se parece mucho, el NO no es muy reactivo y se puede difundir²².

Tabla 1. Especies reactivas

Radicales	No radicales
Especies reactivas de oxígeno (ERO)	
Superóxido, O_2^-	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2^*$
Hidróxilo, OH^\cdot	Ácido hipobromoso, HOBr
Hidroperóxido, HO_2^\cdot	Ozono, O_3
Peróxido de lípido, LO_2^\cdot	Oxígeno singulete ($O_2^1\Delta g$)
Alcóxido de lípido, LO^\cdot	Peróxidos de lípidos, LOOH
	Productos de la reacción de Maillard
Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	
Óxido nítrico, NO^\cdot	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrógeno, NO_2^\cdot	Catión nitrosilo, NO^+
	Anión nitrosilo, NO^-
	Tetróxido de dinitrógeno, N_2O_4
	Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
	Catión nitronio, NO_2^+

* No es estrictamente un radical libre, pero por su capacidad de generar el OH^\cdot en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal.

Se ha observado la intervención de los radicales libres derivados del oxígeno, como mediadores importantes de la lesión y daño celular, no solamente son especies químicas altamente reactivas sino que también se involucran directa o indirectamente en varios desórdenes clínicos tales como la aterosclerosis, envejecimiento, cataratas, cáncer y procesos de inflamación^{23, 24}.

1.4.2. Antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato sin perder su propia estabilidad²⁵.

La importancia de los antioxidantes radica en la capacidad para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente. Estos actúan liberando electrones en la sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables. Recientes estudios²⁶ han demostrado que pueden ser la protección mas eficaz contra el envejecimiento celular y las enfermedades degenerativas.

De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se presenta la que los divide en exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimenticia y endógenos que son sintetizados por las células (Figura 20)²².

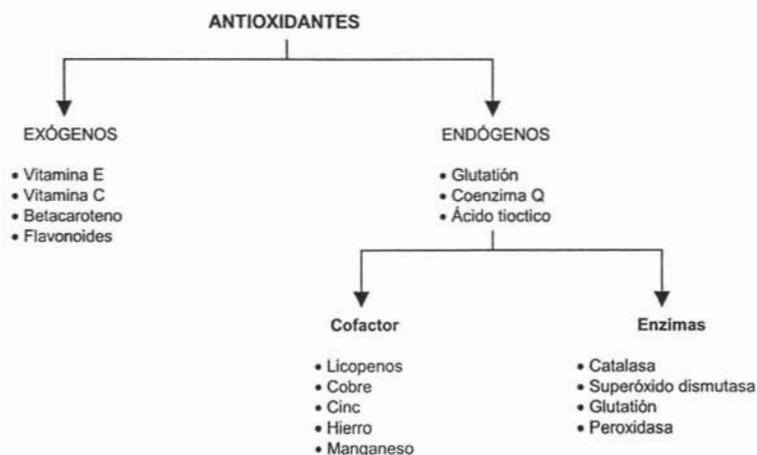


Figura 20. Clasificación de los antioxidantes.

1.4.3. Métodos para determinar la actividad antioxidante

Existen varios métodos para determinar la actividad antioxidante de una molécula, entre los cuales se encuentra la prueba química del 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) y la prueba bioquímica de ácido tiobarbitúrico (TBA).

1.4.3.1. Prueba química del 1,1-difenil-2-picrilhidracilo

El DPPH es un radical libre estable que contiene un electrón impar en su estructura (Figura 21)²⁶.

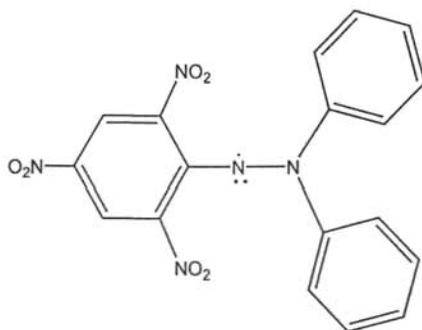


Figura 21. Estructura química del DPPH

Este método se basa en la medición de atrapamiento de los radicales libres por compuestos antioxidantes usando diferentes concentraciones del radical DPPH. El decremento de la absorbancia se debe a que el antioxidante dona un hidrógeno al DPPH produciendo la forma reducida DPPH-H (Figura 22). Esta reducción se observa a simple vista con un cambio de color del púrpura al amarillo. Un decremento rápido en la absorbancia de un compuesto antioxidante indica que es más potente en términos de habilidad para donar hidrógenos²³.

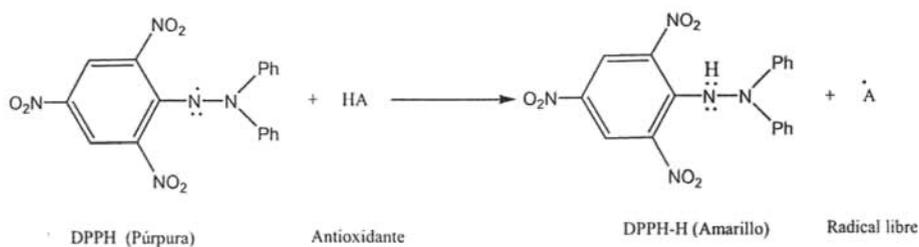


Figura 22. Reacción entre el DPPH y un antioxidante (AH).

En este método la eficiencia antioxidante se mide a temperatura ambiente eliminando los riesgos de una degradación térmica de la molécula de prueba²⁷.

La concentración de antioxidante necesaria para disminuir el 50% de la concentración inicial del sustrato (Cl₅₀) es un parámetro extensamente usado para medir el poder antioxidante. Entre más bajo sea el Cl₅₀, más alto es el poder antioxidante²⁸.

1.4.3.2. Peroxidación de lípidos

Muchos de los métodos usados para determinar el estrés oxidativo se basa en la medición de la concentración de los productos de la peroxidación de lípidos relativamente estables, generalmente ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son susceptibles al ataque por los radicales libres. Los productos iniciales de la peroxidación de lípidos son hidroperóxidos diénicos conjugados. Estas sustancias activas se descomponen en alcanos, aldehídos, alcoholes o si el ácido graso original es ácido araquidónico, en isoprostanos entre otros productos (Figura 23)²⁹.

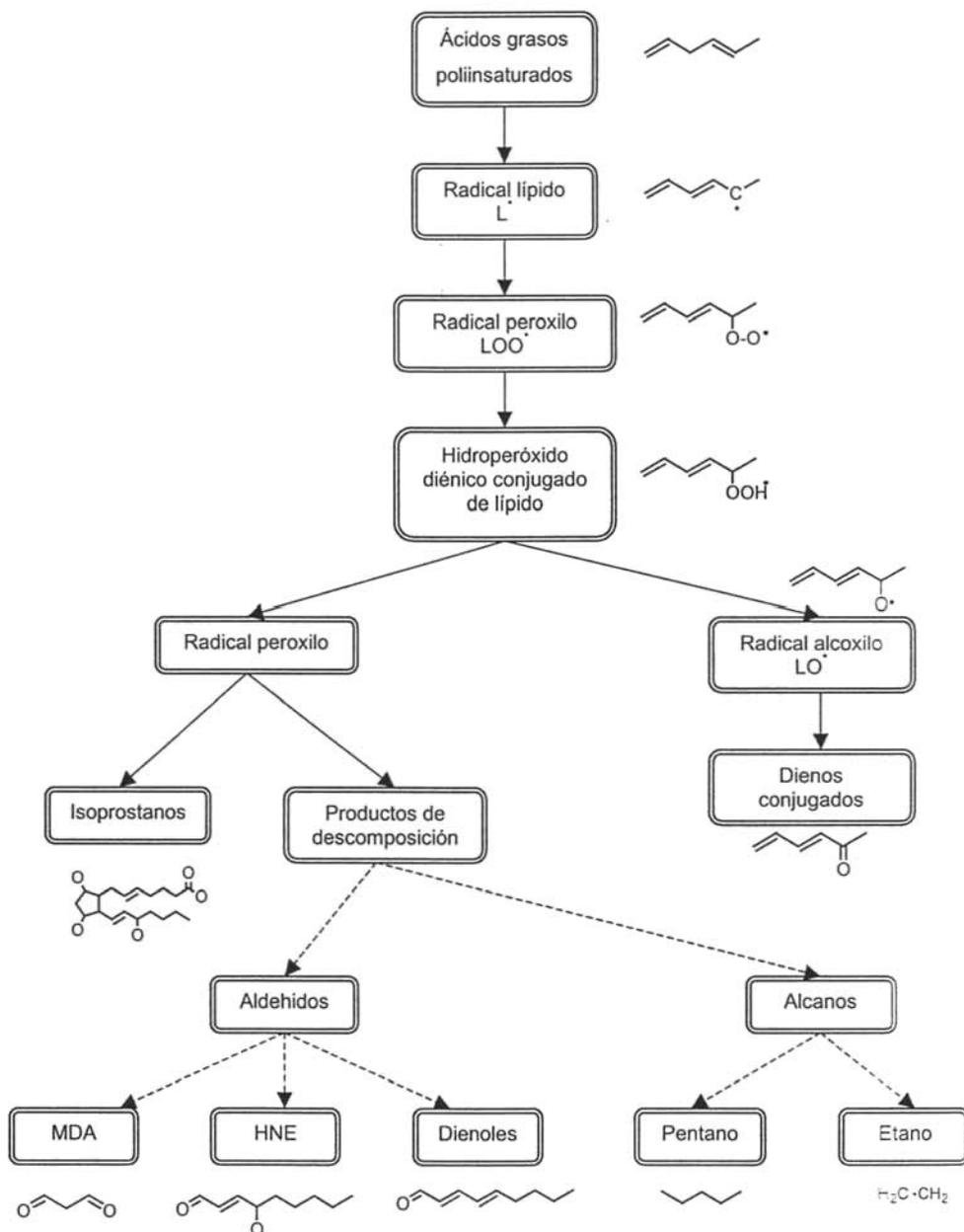


Figura 23. Productos y caminos de la peroxidación de lípidos

La modificación de los ácidos grasos se debe principalmente a un mecanismo autocatalítico de radicales libres llamado autooxidación que consiste en tres fases³⁰:

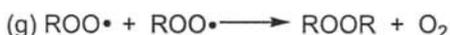
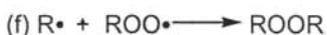
1. Iniciación:



2. Propagación:



3. Terminación:



Uno de los productos, importante para nuestro estudio, resultante de la lipoperoxidación es el aldehído malónico (MDA), el cual es un dialdehído de tres carbonos con dos grupos carbonilo en posición uno y tres (Figura 24). Hay diferentes teorías acerca del posible mecanismo de la formación del MDA, una de ellas es a través de la formación del hidroperóxido de los ácidos grasos poliinsaturados con tres dobles enlaces (trienos) o más asociados con fosfolípidos. Dhale y col³¹ postularon un mecanismo para la formación del MDA en el que demuestran que sólo los peróxidos que poseen α o β insaturaciones al grupo peróxido fueron capaces de sufrir ciclización a la forma final de MDA.

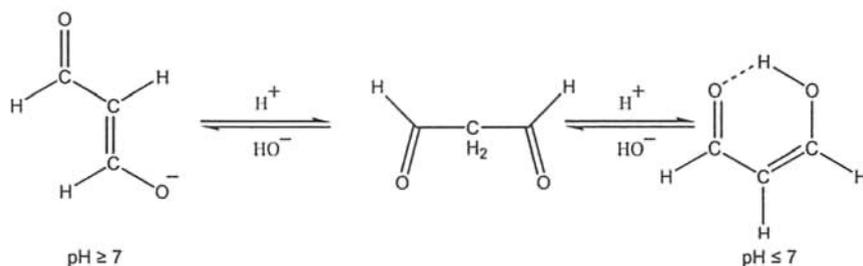


Figura 24. Cambios estructurales del malondialdehído con el pH

Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), pero que no son MDA se les conoce como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) porque:

- a) Reaccionan con el TBA, cuyo espectro es idéntico al obtenido del MDA estándar.
- b) El espectro UV es idéntico con el del MDA estándar a pH 7 y 2.
- c) Coeluye con el MDA estándar cuando se analiza por HPLC.
- d) La determinación de la producción de MDA por la prueba del TBA es conveniente por el método del HPLC.

Los factores que determinan el grado y cantidad de formación de MDA en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados son: el grado de insaturación del ácido graso; la presencia de metales; pH; temperatura y duración del calentamiento.

El hierro cataliza la descomposición de los hidroperóxidos de los ácidos grasos a MDA a pH y temperatura fisiológica.

Hay varios procesos analíticos para la medición de la oxidación de los lípidos. Hay métodos químicos tales como el valor de peróxidos, prueba Kreis, compuestos carbonilos totales y volátiles y prueba del TBA; y métodos físicos tales

como polarografía, espectroscopia infrarroja, refractometría, fluorescencia y el método de dienos conjugados.

La prueba del TBA se basa en la reacción del MDA con TBA para dar un pigmento rojo, el cual resulta de la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de MDA y la eliminación de dos moléculas de agua. Esta reacción ocurre por el ataque de la forma monoenólica del MDA en los grupos metileno activos del TBA (Figura 25). La intensidad del color es una medida de la concentración de MDA. La espectrometría visible y ultravioleta del pigmento da una primera absorbancia máxima a 532-535 nm y una segunda a 245-305 nm³¹.

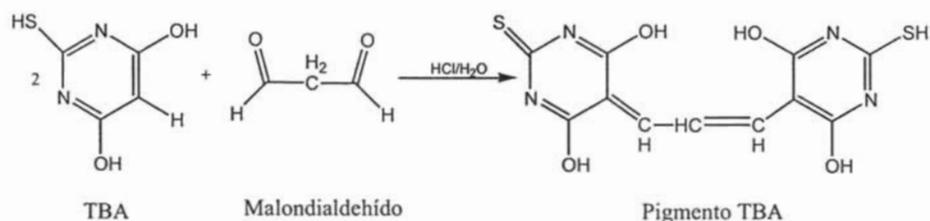


Figura 25. Reacción entre TBA y MDA .

La velocidad de reacción del TBA con el MDA depende de la concentración de la solución TBA, temperatura y pH y la intensidad máxima del complejo rojo de MDA-TBA se puede alcanzar a los 60 minutos en un baño de agua hirviendo o en 15 horas cuando la reacción procede a temperatura ambiente.

1.5. INFLAMACIÓN

La inflamación es una reacción local del tejido conectivo y vascular que se desencadena a consecuencia de una lesión celular³². Los agentes que lesionan tejidos y, por ende, suscitan la respuesta inflamatoria comprenden agentes infecciosos y reacciones de tipo autoinmune, así como agentes no vivientes como traumatismo mecánico, calor, frío, radiación y sustancias químicas³³.

Las reacciones inflamatorias generalmente se dividen en dos tipos: agudas y crónicas. La inflamación aguda a nivel microscópico involucra una serie de eventos que incluye la dilatación de arterias, venas y capilares con un incremento en la permeabilidad vascular, liberación de fluidos y proteínas plasmáticas, así como la migración de leucocitos polimorfonucleares hacia el área afectada. Estos componentes explican los signos locales clásicos de la inflamación aguda: calor, rubor, tumor y dolor. Cuando la inflamación aguda persiste, esta puede desarrollarse en un proceso crónico siendo capaz entonces de producir daño, algunas veces aún mayor que el agente productor, por lo que es necesario frenar dicho proceso mediante fármacos antiinflamatorios³⁴.

1.5.1 Fármacos antiinflamatorios

Los fármacos más conocidos y utilizados para combatir los signos de la inflamación son los AINEs. Por su actividad farmacológica característica, con frecuencia se autoprescriben sin control médico para aliviar dolores moderados o para bajar la fiebre y disminuir la inflamación, bien como fármacos solos o en asociación con otros. Como tienen una elevada capacidad de provocar reacciones adversas de intensidad y gravedad diversas, su toxicidad aguda o crónica alcanza un interés epidemiológico y constituye un motivo de preocupación. El fármaco prototipo es el ácido acetilsalicílico (AAS), pero en la actualidad se dispone de numerosos fármacos que pertenecen a diferentes familias químicas (Figura 26)³⁵.

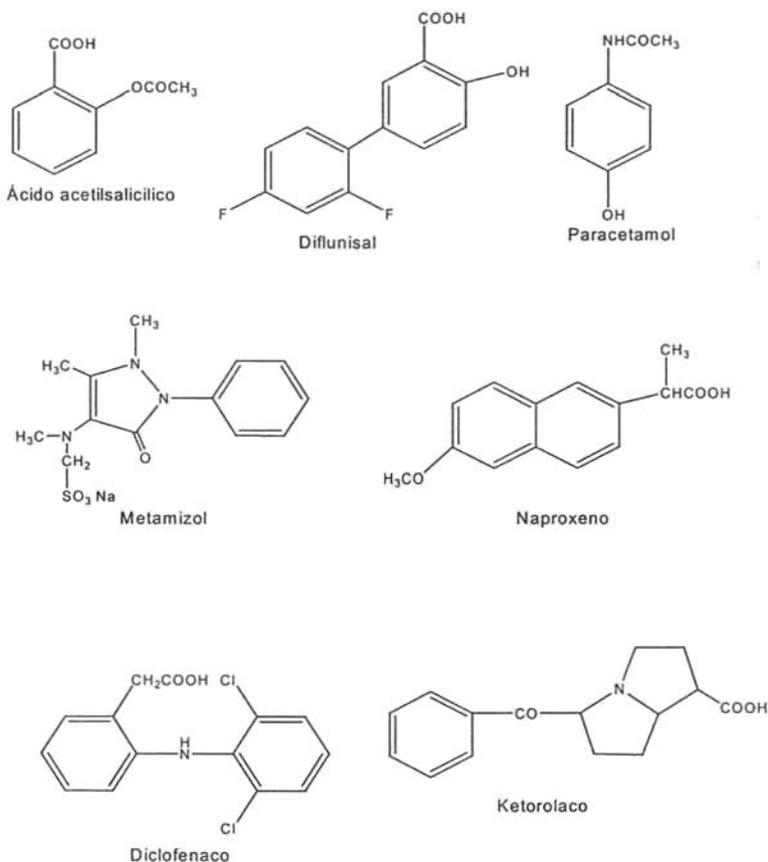


Figura 26. Estructura química de fármacos antiinflamatorios no esteroideos

1.5.2. Modelos para medir la inflamación

Se han desarrollado numerosos modelos para evaluar la actividad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*. Los modelos *in vitro* proporcionan información acerca de los posibles mecanismos de acción de los compuestos, mientras que los modelos *in vivo* permiten estimar la potencia y la eficacia de los compuestos antiinflamatorios³⁶.

Los modelos animales de inflamación *in vivo*, pueden ser de tipo vascular, celular, inmunológico, así como de proliferación y diferenciación. La proliferación epidermal puede ser fácilmente estimulada en piel de animales (rata o ratón) con aplicaciones tópicas de ácido araquidónico (AA) o ésteres de forbol como el acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA) (Figura 27).

La aplicación tópica de AA en orejas de ratón induce una respuesta inflamatoria de vida corta paralela a la generación de prostaglandinas y leucotrienos. En contraste, la aplicación tópica de TPA induce una respuesta inflamatoria de duración larga, asociado con un incremento transitorio de producción de prostanoides³⁷.

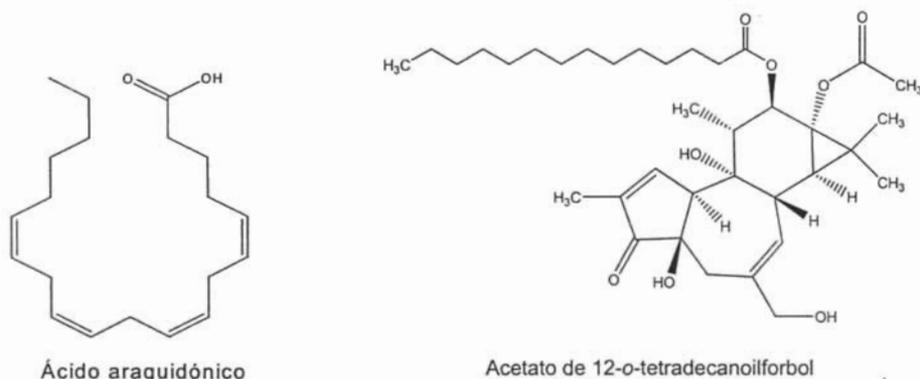


Figura 27. Estructura química del ácido araquidónico y acetato de 12-o-tetradecanoilforbol

1.5.3 Óxido nítrico

Como se ha descrito, la inflamación es un proceso patofisiológico complejo mediado por una variedad de moléculas producidas por los leucocitos, macrófagos, plaquetas, etc. Los macrófagos desempeñan un papel crucial en la generación de moléculas pro-inflamatorias como el óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado por la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (SONi) y está reportado

que participa como un mediador de la inflamación tanto aguda como crónica. Esta molécula es un potente agente vasodilatador producido por el endotelio, participa como regulador de la presión sanguínea y también es un constituyente tóxico de la contaminación ambiental y el humo del cigarro, reacciona con el oxígeno para generar especies reactivas de óxido de nitrógeno (ERON) que puede ejercer graves efectos sobre los sistemas biológicos³⁸.

Los métodos más comúnmente empleados para el análisis del NO en soluciones acuosas son: 1) análisis de nitritos por el reactivo de Griess (1% de sulfanilamida en 5% H₃PO₄/ 0.1% cloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina en agua), 2) quimioluminiscencia y 3) análisis de nitritos con oxihemoglobina³⁹.

Los macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* o bien con citosina, produce grandes cantidades de NO porque en estas células abunda la SONi. El ensayo de Griess es un método simple para determinar la producción de óxido nítrico cuantificado como nitritos en cultivos celulares²⁶. Este reactivo adicionado al sobrenadante de los cultivos celulares convierte el nitrito a un grupo azo púrpura el cual se cuantifica fotométricamente⁴⁰.

1.6 CÁNCER

Entre las principales causas de mortalidad mundial se encuentra el cáncer, enfermedad caracterizada por una multiplicación incontrolable de las células que se originan en los tejidos sin responder a los factores normales de regulación y por la propiedad de invadir y colonizar territorios normalmente reservados por otras células debido a la falta de adherencia mutua entre ellas⁴¹. El término cáncer deriva de la palabra griega 'karkinos' que significa cangrejo porque se adhiere a la parte que se prende de una manera obstinada, al igual que el cangrejo. La semejanza estructural de las células cancerosas con su posible célula de origen permite establecer diagnósticos específicos en cuanto a la fuente y conducta potencial de la neoplasia. La neoplasia, que en latín significa 'nuevo crecimiento' es una anomalía en la diferenciación, maduración y control del crecimiento celular. En general las neoplasias se reconocen por la formación de masas de tejido anormal (tumores).

Se definen dos clases de tumores, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única se dice que el tumor es benigno, y generalmente hay curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente. Un tumor canceroso maligno es aquel que tienen la capacidad de invadir tejidos circundantes a través de entrar al torrente sanguíneo o vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo⁴².

1.6.1 Fármacos usados en la quimioterapia del cáncer

La cura del cáncer puede hacerse a través de extirpar quirúrgicamente las células cancerosas, la quimioterapia y la radioterapia. La primera alternativa no es del todo segura, puesto que solo basta que queden unas cuantas células cancerosas para que resurja la enfermedad. Cuando se emplea la quimioterapia, generalmente los antineoplásicos son fármacos citotóxicos, los cuales se dirigen especialmente a las células que muestran una reproducción muy activa, como son las células malignas; sin embargo, algunos tejidos sanos tienen una alta

frecuencia fisiológica de mitosis (células del folículo piloso, células epiteliales del intestino, algunas células del sistema inmunológico), lo que un tratamiento con estos fármacos perjudica a estos tejidos, dando origen a los efectos secundarios típicos: caída del cabello, diarrea, mareo y vómito, tendencia a las infecciones, etc. El problema en el tratamiento del cáncer consiste en hallar fármacos que destruyan las células cancerosas en forma eficaz, pero que no sean demasiado tóxicos para las células normales. En la tabla 2 se enumeran las siete clases principales de compuestos de uso extenso en el tratamiento del cáncer⁴³.

Tabla 2. Algunos fármacos usados en quimioterapia

Clase de compuesto	Ejemplo	Tipo de cáncer
Agentes alquilantes	Melfalan	Mieloma
Antimetabolitos		
Análogos de purinas	Mercaptopurina	Leucemia mielocítica aguda
Análogos de pirimidinas	Fluorouracilo	Cáncer colorrectal
Análogos de folatos	Metotrexato	Coriocarcinoma
Antibióticos antitumorales	Doxorrubicina	Enfermedad de Hodgkin
Otros fármacos	Cisplatino	Carcinoma pulmonar
	Hidroxiurea	Leucemia mielocítica crónica
Compuestos vegetales	Vinblastina	Sarcoma de Kaposi
Hormonas sexuales	Estrógenos	Cáncer de próstata
Corticosteroides	Prednisona	Mieloma

Los fármacos cuya estructura es similar a los compuestos sintetizados en este trabajo son los análogos de pirimidinas que son diversos e interesantes (Figura 28) y tienen en común su capacidad de inhibir la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos, o imitar la acción de estos metabolitos naturales, al grado que interfieren en funciones celulares vitales, la síntesis o la función de ácidos nucleicos. Medicamentos de este grupo se han utilizado para tratar

diversos cuadros, como trastornos neoplásicos, psoriasis e inflamaciones por hongos y virus de DNA⁴⁴.

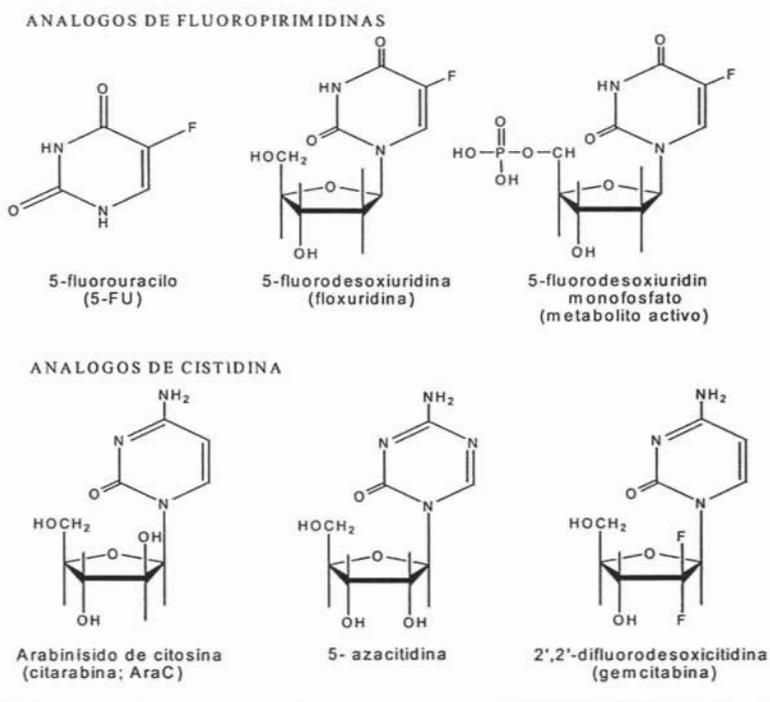


Figura 28. Estructuras de los análogos de pirimidina

1.6.2. Métodos para evaluar la citotoxicidad

El término citotoxicidad es muy amplio, ya que se usa tanto para medir efectos tóxicos específicos, inhibición del crecimiento celular, o bien muerte celular. Dependiendo a que nivel de organización celular se quiera evaluar la citotoxicidad, hay un gran número de bioensayos los cuales varían en complejidad, especificidad y costo.

Así, se han desarrollado modelos *in vitro* orientados al descubrimiento de fármacos con actividad anticancerígena en el que se mide la actividad citotóxica o inhibidora de crecimiento sobre una amplia diversidad de líneas celulares de tumores humanos⁴⁵.

Las pruebas *in vitro* proporcionan la CI_{50} , lo que va a servir como parámetro de selectividad y potencia respecto a los fármacos de referencia⁴⁶.

Un método colorimétrico rápido, sensible y barato en el que se mide el contenido de proteínas celular que se adhieren a la base de una microplaca de 96 pozos utiliza sulforrodamina B (SRB), un colorante aniónico que se une a residuos de aminoácidos básicos en células que han sido fijadas con ácido tricloroacético. El análisis con SRB proporciona un punto final colorimétrico indestructible, indefinidamente estable y visible al ojo humano, así, entre mayor sea la densidad óptica mayor será el contenido de proteínas y por ende menor la inhibición del crecimiento celular⁴⁷.

Además, muchos análisis biológicos requieren la medición de sobrevivencia y proliferación celular. Un análisis colorimétrico versátil y cuantitativo y que se usa comúnmente para determinar proliferación y citotoxicidad celular es el que utiliza sales de tetrazolio como es el bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) que se fija únicamente a las células vivas y cuya densidad óptica se puede leer en un espectrofotómetro para ELISA⁴⁸.

2. JUSTIFICACIÓN

El interés concerniente al estudio de las lactamas del tipo 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas se debe a la presencia del anillo pirrólico, el cual forma parte de algunos productos naturales como la vitamina B₁₂, prodigiosina y distamicina⁴⁹; asimismo se ha reportado que estos compuestos presentan actividad farmacológica como antitumoral, antiinflamatoria, inhibidores de la agregación plaquetaria y psicotrópica^{50,51}.

Por otra parte, los derivados de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas son de importancia considerable por su sistema de anillos heterocíclicos, ya que diversos fármacos de origen natural como los antibióticos, alcaloides, antineoplásicos, etc. y biomoléculas como el ADN y el ARN, presentan este tipo de estructuras; además se ha reportado que estos derivados poseen actividad biológica como antitumoral, antiinflamatoria, antibacteriana e insecticida¹⁰.

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se propone un método sencillo y directo para la síntesis de los heterociclos mencionados, utilizando un sistema catalítico de níquel en medio acuoso y se determinará si poseen actividad antiinflamatoria, citotóxica y antioxidante. Esta última prueba se realizará para corroborar, en caso de que los productos presenten actividad antiinflamatoria y/o citotóxica, si hay alguna relación con la producción de radicales libres, ya que estos pueden ser importantes promotores de la inflamación y generación del cáncer.

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Sintetizar y evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas sustituidas en la posición 4 y 5 con fenilo-metilo y fenilo-terbutilo.
- Sintetizar y evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de las 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas con fenilo-etilo y fenilo-propilo.

Objetivos particulares

- Sintetizar 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas utilizando un sistema catalítico acuoso de níquel y condiciones suaves de reacción.
- Purificar y caracterizar los compuestos obtenidos por espectroscopia en el infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados mediante las pruebas de reducción del 1,1-difenil-2-picrilhidracilo e inhibición de la lipoperoxidación en el cerebro de rata.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos sintetizados en el modelo de edema inducido con acetato de 12-*o*-tetradecanoilforbol en la oreja de ratón y mediante la inhibición de la producción de nitritos en macrófagos de ratón.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en cinco líneas celulares cancerosas.

4. HIPÓTESIS

El empleo de un sistema catalítico acuoso de níquel y de los sustratos correspondientes, da como resultado la síntesis, en un solo paso, de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas que dada la estructura molecular y la información reportada en la literatura se espera tengan actividad antioxidante, antiinflamatoria y/o citotóxica en los modelos de prueba.

5. MATERIAL Y EQUIPO

5.1. SÍNTESIS QUÍMICA

▲ Vidrio y otros

Vasos de precipitados (50, 100, 250 y 500 mL)
Embudo de separación (250 y 500 mL)
Matraz con adaptador para burbujeo (250 mL)
Matraz Erlenmeyer (10, 50, 100 y 250 mL)
Matraz kitazato (50, 100 y 250 mL)
Embudo Buchner
Probeta (250 y 500 mL)
Pipeta graduada (1, 2, 5 y 10 mL)
Embudo de vidrio talle corto
Embudo Hirsh de porcelana
Columna para cromatografía
Tubos de vidrio para RMN
Tubos capilares
Agitador magnético
Espátulas de acero inoxidable
Placas cromatográficas
Soporte universal
Cámara de vacío

▲ Sustancias

Hidróxido de sodio
Ácido clorhídrico
Cianuro de níquel
Cianuro de potasio
Monóxido de carbono
 α -alquilcetonas
6-amino-1,3-dimetiluracilo
Sulfato de sodio anhidro
Silica gel para CCF
Silica gel para columna

^ Disolventes

Acetato de etilo
Hexano
Acetona
Etanol

^ Equipo

Balanza analítica (Sartorius BL 1205)
Balanza granataria (OHAUS)
Espectrómetro de masas (Jeol JMs-AX505HA)
Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (Jeol Eclipse LA300)
Estufa (WTB-BINDER GOES ONLINE)
Lámpara UV 254/365 nm (Spectroline ENF-240C)
Parrilla de agitación (Cimarec 2)
Rotaevaporador (ESEVE D402-2)

5.2. EVALUACIONES BIOLÓGICAS

^ Vidrio y otros

Placas de ELISA de 96 pozos
Celdas de cuarzo de 1 cm
Pipetas graduadas (5 y 10 mL)
Vasos de precipitados (30, 50 y 100 mL)
Reservorios de polipropileno
Puntas para micropipetas (20, 200, 1000 y 2500 μ L)
Instrumentos para disección
Tubos Eppendorf (1.5 mL)
Gradilla para tubos Eppendorf
Cajas de acrílico transparentes
Jeringas para insulina
Microjeringas Hamilton (10 μ L)
Sacabocados de 7mm de diámetro

^ Material biológico

Ratas macho *Winstar* (200-250g)
Ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g)
Ratones hembra *Switter taconi*
Líneas celulares cancerosas

▲ Sustancias

1,1-difenil-2-picrilhidracilo
Buffer de fosfato salina
Sulfato ferroso
Hidroxitolueno butilado
Quercetina
Acetato de 12-*o*-tetradecanoilforbol
Pentobarbital sódico
Ácido tiobarbitúrico
Ácido tricloroacético

▲ Disolventes

Etanol
Acetona
Dimetilsulfóxido

▲ Equipo

Balanza analítica (Sartorius BP 615)
Balanza granataria (OHAUSE)
Centrífuga clínica (Fisher Scientific Centrifug Model 228)
Espectrómetro UV-Vis (Shimadzu UV 160U y Spectronic Genesis 5)
Incubadora (Estufa de cultivo E-41)
Lector de ELISA (ELx808)
Microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
Micropipetas Eppendorf (20, 200, 1000 y 2500 μ L)
Pipeta multicanal Eppendorf
Agitador de placas
Homogenizador de teflón
Sonicador

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. γ -LACTAMAS (5-HIDROXI-3-PIRROLIN-2-ONAS)

6.1.1. Sistema catalítico

A 50 mL de una solución acuosa de NaOH 5N se le burbujeó monóxido de carbono (CO) por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 2 mmol de $\text{Ni}(\text{CN})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (366 mg), y se mantuvo en agitación bajo atmósfera de CO por 20 horas o hasta que resultó una solución color amarillo claro. Pasado este tiempo se adicionaron 15 mmoles de KCN (975 mg), resultando una solución naranja que se mantuvo en agitación y atmósfera de CO por 30 min.

6.1.2. Síntesis de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas

A la solución anterior se adicionaron 8 mmoles de la α -alquinilcetona correspondiente. El avance de la reacción se siguió por CCF y al final de esta, el producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). El extracto se concentró después de secar con sulfato de sodio anhidro y se purificó en placas preparativas utilizando como sistema de elución una mezcla de hexano-acetato de etilo en proporción 60:40. Finalmente el producto se recrystalizó en hexano y se caracterizó por EM, IR, y RMN.

6.2. PIRIDOPIRIMIDINAS (1,3-DIMETILPIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDIN-2,4-DIONAS-5,7-DISUSTITUIDAS)

Para realizar esta reacción se utilizó el mismo sistema catalítico descrito en la sección 6.1.1, al cual, pasado el tiempo especificado, se le agregaron 2 mmol de 6-amino-1,3-dimetiluracilo y posteriormente 2 mmol de la correspondiente α -alquinilcetona. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF y al finalizar la misma se neutralizó con HCl concentrado. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 X 30 mL) y el extracto se secó con sulfato de sodio anhidro. Se purificó por

cromatografía en columna utilizando como sistema de elución una mezcla de hexano- acetato de etilo en proporción 90:10. Por último se recristalizó en hexano y se caracterizó por EM, IR y RMN.

6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.3.1. Reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracilo

La actividad antioxidante de los compuestos puros se realizó de manera indirecta midiendo la reducción del radical libre DPPH mediante una técnica espectrofotométrica, siguiendo la metodología descrita a continuación:

Se tomaron 50 μL de la solución problema a diferentes concentraciones (μM) y se depositaron por cuatuplicado en una placa de ELISA de 96 pozos, posteriormente se agregaron 150 μL de una solución etanólica de DPPH 133.33 μM (concentración final de 100 μM). La mezcla se protegió de la luz y se agitó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se tomo lectura de la densidad óptica (DO) a 515 nm en un lector de ELISA. La actividad sobre el DPPH se expresó como porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = (C - E / C)100$$

donde C es la DO del control (DPPH 100 μM) y E es la DO experimental (mezcla de DPPH 100 μM más el compuesto problema).

6.3.2. Lipoperoxidación

Se empleó una rata macho Winstar (200-250g), la cual se colocó en una caja de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con libre acceso al agua y alimento. El animal se sacrificó por dislocación cervical para extraer el cerebro completo, el cual se colocó en PBS fría. Posteriormente se lavó con agua destilada, se pesó y se homogenizó durante 60 seg. adicionando 10 mL de PBS por cada gramo de cerebro para producir un homogenado 1/10 p/v. El homogenado se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. para recuperar el sobrenadante y medir el contenido de proteínas a 280 y 205 nm, el cual se ajustó a 2.5 mg proteínas/mL con PBS.

Se incubó con agitación por 30 min. y a 37°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL, 400 μ L (1 mg de proteína) del sobrenadante en presencia de 50 μ L del compuesto a probar. La lipoperoxidación se indujo adicionando 50 μ L de una solución recién preparada de FeSO₄ 100 μ M (concentración final de 10 μ M) y de nuevo se incubó a 37°C con agitación durante 60 minutos. Para determinar los TBARS se adicionaron 500 μ L del reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético en proporción 1:1 en NaOH 0.05N), se agitó y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. para sumergirlos posteriormente en un baño de agua a 92 °C durante 30 min. Finalmente los tubos se enfriaron en un baño de hielo, se destaparon para liberar la presión remanente y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm.

El BHT se usó como control positivo. La concentración de TBARS se calculó por interpolación en la curva estándar de TMP y el resultado final se expresó en nmoles de TBARS por mg de proteína.

El rango de inhibición (%) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Rango de inhibición (\%)} = (A - A_1) / A \times 100\%$$

Donde A es la absorbancia del control y A₁ es la absorbancia de la muestra.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnet para aislar los grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

6.4. PRUEBA DE INFLAMACIÓN (EDEMA EN LA OREJA DE RATÓN)

El ensayo de edema inducido con TPA se realizó empleando ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con acceso libre al agua y alimento. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/Kg, IP), en la oreja derecha se aplicaron 10 µL de la solución etanólica de TPA (0.25 mg/mL). Diez minutos después, en la misma oreja se aplican 0.31 µmoles del compuesto a probar en acetona o etanol. En la oreja izquierda (control) sólo se aplican 10 µL de etanol y 20 µL del vehículo con el que se disolvió el compuesto a probar. Cuatro horas después a la aplicación del TPA, los animales se sacrificaron por dislocación cervical para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E)/ C]100$$

en donde C representa el edema del grupo control (tratado con TPA) y E el edema del grupo experimental (TPA más el compuesto a probar).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnett para aislar los grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

6.5. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y VIABILIDAD CELULAR

6.5.1. Aislamiento de macrófagos de ratón

Se usaron ratones hembra *Switter taconi* de peso entre 25-30 g a los que se les inyectó por vía intraperitoneal 1 mL de una solución de tioglicolato al 3%, tres días después de su administración, los animales se sacrificaron en condiciones asépticas y se les inyectó 10 mL de DMEN (medio de cultivo suplementado con 50 µg/mL de penicilina, 50 U/mL de estreptomina y 5% FBS) frío en la cavidad peritoneal, enseguida se le dió un ligero masaje en la parte abdominal por 30 segundos y se extrajo el fluido peritoneal. Este último se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos, se desechó el sobrenadante (en caso necesario se lisan los eritrocitos con agua desionizada en un volumen 1:10 y nuevamente se centrifuga) y el botón de las células se resuspendió en medio para realizar la cuenta de células en una cámara de Neubaver. Se sembraron 1×10^6 células/mL en placas de 24 pozos. Las placas de cultivo se incubaron durante 24 horas en una incubadora con CO₂ al 5% y una temperatura de 37°C para permitir que los macrófagos se adhirieran al fondo de las placas. Al término de este periodo se desechó el sobrenadante y se lavó cuidadosamente tres veces con PBS.

Las células adheridas se cultivaron por 24 horas en presencia de medio que contenía 50 µg/mL de LPS (lipopolisacárido de *E. coli*) con y sin compuesto de prueba a diferentes concentraciones.

6.5.2. Producción de nitritos

Para la determinación de la cantidad de nitritos se mezcló un volumen de 100µL del sobrenadante de cultivo con 100µL de reactivo de Griess (1% sulfanilamida en 5% de H₃PO₄/0.1% de dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina en agua) en una placas de 96 pozos y se dejó en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente, después del cual se determinó la DO del cromóforo formado a 515 nm en un lector de ELISA.

La concentración de nitritos se determinó interpolando la DO obtenida en una curva estándar de nitrito de sodio.

El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en lecturas de absorbancia absoluta en el cual un decremento de esta indica una reducción en la acumulación de nitritos. La inhibición de la producción de nitritos (%) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$I (\%) = 100 - [B \times 100 / A]$$

donde A es la concentración de nitritos (μM) solo con LPS y B es la concentración de nitritos (μM) con LPS más la muestra.

6.5.3. Viabilidad celular (Ensayo de MTT)

Después de haber incubado 24 horas las placas de cultivo con el compuesto de prueba se les retiró el sobrenadante restante, se lavaron con PBS y se les adicionó 450 μL de DMEN fresco y 50 μL de una solución de MTT a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 4 horas de incubación, el metabolito colorido (formazan) se disolvió en 500 μL DMSO y se transfirieron 100 μL del formazan a placas de 96 pozos para determinar DO a 515 nm en un lector de ELISA.

Los resultados se expresaron como lecturas de absorbancia absoluta (% citotoxicidad) y un decremento en la absorbancia indica una reducción en la viabilidad celular.

6.6. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Las líneas celulares que se utilizaron pertenecen al panel del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (5%), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina. A estas líneas se les caracterizó el tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Líneas celulares cancerosas utilizadas

Línea celular	Órgano de origen	Tiempo de duplicación (hr)	Células/pozo	Concentración TCA (%)
K562	CML	19	5000	80
HCT-15	Colon	18.1	10000	50
MCF-7	Mama	25.6	5000	50
PC-3	Próstata	28.7	7500	50
U251	SNC	25.4	7500	50

(TCA: ácido tricloroacético, CML: leucemia mieloblástica crónica, SNC: sistema nervioso central)

Con excepción de la línea K562, las líneas restantes se adhirieron a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1 mL de 0.05% de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo se adicionaron 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugaron por 3 minutos, ya formado el paquete celular se le adicionó medio de cultivo para resuspenderlo. De esta suspensión se tomó 0.05 mL del inóculo y se resuspendió en 0.45 mL de azul de tripano, colorante que permite contar las células vivas. Una vez que se determinó el número de células por mL, se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100 μ L/pozo a la densidad antes mencionada. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubaron por 24 hr a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de estos antes de adicionar las sustancias a probar.

Para el cernimiento primario (o análisis para determinar si los compuestos poseen actividad y son posibles candidatos para realizar estudios posteriores) de los compuestos puros se probó la concentración más alta permitida de 100 μ M. Todas las muestras se solubilizaron en DMSO 400 veces más concentradas que la concentración a probar. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución se agregó 100 μ L, quedando en el pozo un volumen final de 200 μ L. Nuevamente la placa se incubó por 48 horas bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el período de incubación de los compuestos con las células, éstas se fijaron *in situ* añadiendo 50 μ L de una solución de TCA fría al 50% o al 80% para células adheridas y en suspensión, respectivamente, y se incubaron a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y se secaron al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se realizó con 100 μ L de una solución al 0.4% de SRB y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió por tres lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar al ambiente. A las placas teñidas se les agregó 100 μ L un buffer de tris y se agitó por 10 minutos para favorecer la solubilización del complejo; posteriormente se midió la DO en un lector de microplacas de ELISA a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO_t), los tres pozos tratados con DMSO (DO_c) y dos pozos de testigo (DO_b). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%IC = 100 - (DO_t - DO_b / DO_c - DO_b) 100$$

NOTA. La prueba de citotoxicidad, determinación de nitritos y viabilidad celular se realizaron por la M en C Ma. Teresa Ramirez Apan del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7. RESULTADOS

7.1. RESULTADOS DE LA SÍNTESIS QUÍMICA

En la tabla 4 se presenta la correspondiente α -alquiniacetona utilizada para la síntesis y el rendimiento obtenido para cada uno de los compuestos.

Tabla 4. Productos de la reacción de α -alquiniacetonas con 6-amino-1,3-dimetiluracilo en medio acuoso alcalino y $\text{Ni}(\text{CN})_2\cdot\text{CO}\cdot\text{KCN}$

$\text{R}-\text{C}\equiv\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}_1$ α -alquiniacetona		Producto	Rendimiento	No. de compuesto
R	R ₁			
Ph	Me		62%	I
Ph	t-Bu		56%	II
Ph	Et		74%	III
Ph	Pr		67%	IV

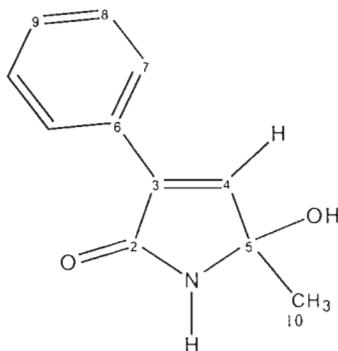
7.1.1. Análisis espectroscópico de los productos

El análisis espectroscópico de los compuestos sintetizados se realizó a partir de los espectros incluidos en el anexo.

7.1.1.1. 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas

3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona (I)

Sólido blanco, PM 189.21, C₁₄H₁₁NO₂



IRv (cm⁻¹): 3202 (-OH), 3370.30 (-N-H), 1695(C=O) (Figura A1).

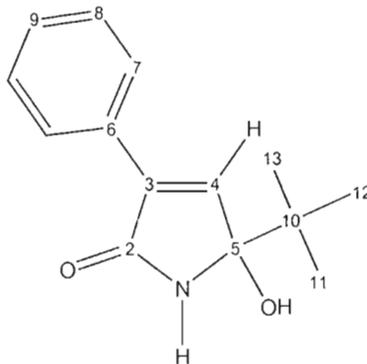
EM (IE), m/z (%): 189 (M⁺ 100), 174 (38) (Figura A3).

RMN ¹H δ (ppm): 8.63 (1H,s,N-H), 7.27-7.91 (5H,m,Ph), 5.86 (1H,s,H₄), 3.36 (1H,s,OH), 1.47 (3H, s, H₁₀) (Figura A5).

RMN ¹³C δ (ppm): 170.3 (C₂), 146.45 (C₉), 133.16 (C₃ y C₆), 131.94 (C₄), 128.90-128.81 (C₈), 127.65 (C₇), 84.14 (C₅), 26.08 (C₁₀) (Figura A6).

3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona (II)

Sólido blanco, PM 231.29, C₁₄H₁₇NO₂



IRv (cm⁻¹): 3226 (-OH), 1673(C=O) (Figura A2).

EM (IE), m/z (%): 231 (M⁺, 5), 175 (100) (Figura A4).

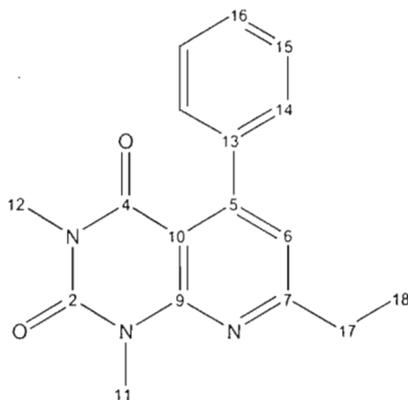
RMN ¹H δ (ppm): 8.52 (1H,s,N-H), 7.94-7.34 (5H,m,Ph), 5.78 (1H,s,H₄), 3.36 (1H,s,OH), 0.98 (9H, s,H_{11,12,13}) (Figura A7).

RMN ¹³C δ (ppm): 171.27 (C₂), 144.40 (C₉), 134.46 (C₃ y C₆), 132.09 (C₄), 128.83-128.77 (C₈), 127.68 (C₇), 90.78 (C₅), 39.50 (C₁₀), 25.70 (C_{11,12,13}) (Figura A8).

7.1.1.2. 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas

7-etil-1,3-dimetil-5-fenilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona (III)

Sólido blanco, PM 295.34, C₁₇H₁₇O₂ N₃



IRv (cm⁻¹): 1707 y 1662 (C=O), 1588 (C=C), 1553 (C=N) (Figura A9).

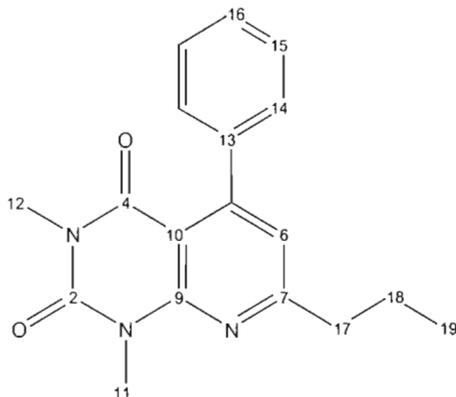
EM (IE), m/z (%): 295 (M⁺88), 294 (100) (Figura A11).

RMN ¹H δ (ppm): 7.44-7.41 (5H,m,Ph), 6.86 (1H,s,H₆), 3.77 (3H,s,H₁₂), 3.35 (3H,s,H₁₁), 2.83-2.90 (2H,m,H₁₇), 1.35 (3H,t,H₁₈) (Figura A13).

RMN ¹³C δ (ppm): 167.5 (C₉), 160.8 (C₂), 154.5 (C₄), 151.6 (C₅ y C₇), 139.6 (C₁₃), 128.0 (C₁₄), 127.8 (C₁₅ y C₁₆), 120.7 (C₆), 105.8 (C₁₀), 31.6 (C₁₇), 30.0 (C₁₁), 28.4 (C₁₂), 13.0 (C₁₈) (Figura A14).

1,3-dimetil-5-fenil-7-propilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona (IV)

Sólido blanco, PM 309.36, C₁₇H₁₇O₂ N₃



IRv (cm⁻¹): 1705 y 1661 (C=O), 1588 (C=C), 1553 (C=N) (Figura A10).

EM (IE), m/z (%): 309 (M⁺31), 281 (100) (Figura A12).

RMN ¹H δ (ppm): 7.43-7.40 (5H,m,Ph), 6.84 (1H,s,H₆), 3.76 (3H,s,H₁₂), 3.35 (3H,s,H₁₁), 2.83-2.78 (2H, t,H₁₇), 1.88-1.76 (2H,sex,H₁₈), 1.0-0.97 (3H,t,H₁₉) (Figura A15).

RMN ¹³C δ (ppm): 166.4 (C₉), 160.7 (C₂), 154.3 (C₄), 151.6 (C₅ y C₇), 139.5 (C₁₃), 128.0 (C₁₄), 127.8 (C₁₅ y C₁₆), 121.3 (C₆), 105.7 (C₁₀), 40.4 (C₁₇), 30.0 (C₁₁), 28.4 (C₁₂), 22.2 (C₁₈), 13.9 (C₁₉) (Figura A16).

7.2. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizaron dos pruebas para determinar la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados, cuyos resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las pruebas de actividad antioxidante (DPPH y lipoperoxidación)

Compuesto	Pruebas de actividad antioxidante			
	% de reducción del DPPH			% de inhibición de la Lipoperoxidación
	1 μ M	10 μ M	100 μ M	100 μ M
I	6.250 \pm 0.0071	25.12 \pm 0.0019	89.490\pm0.0007	2.090 \pm 0.0690
II	0.637 \pm 0.0067	0.371 \pm 0.0055	1.485 \pm 0.0014	10.710 \pm 0.1405
III	-3.640 \pm 0.0014	0.430 \pm 0.0012	3.160 \pm 0.0016	8.040 \pm 0.0505
IV	-1.040 \pm 0.0029	0.820 \pm 0.0100	-0.490 \pm 0.0073	3.390 \pm 0.0415

Los resultados representan el promedio de tres repeticiones \pm ES.

El compuesto I fue el único que presentó actividad antioxidante en DPPH por lo que se le realizó una curva (tabla 6).

Tabla 6. Reducción del DPPH por el compuesto I

Concentración (μM) del compuesto I	% de reducción del DPPH	Cl_{50}
3.16	15.1646 \pm 1.1860	
5.62	25.5796 \pm 2.4636*	
10	39.0263 \pm 3.4536*	
17.78	55.17967 \pm 3.5584*	14.69 \pm 2.06 μM
31.62	74.7557 \pm 3.8946*	
56.23	83.7883 \pm 4.9043*	
100	91.0023 \pm 1.2828*	

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

* Grupos significativos, $p < 0.01$ comparado contra el grupo control mediante un análisis de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett

En esta prueba se usó como referencia el α -tocoferol cuyos resultados se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Reducción del DPPH por el α -tocoferol

Concentración (μM) del compuesto I	% de reducción del DPPH	Cl_{50}
3.16	9.9310 \pm 5.6752	
5.62	11.2960 \pm 1.4922	
10	20.0086 \pm 0.5822*	
17.78	29.7023 \pm 1.3428*	28.40 \pm 2.62 μM
31.62	52.3176 \pm 2.6316*	
56.23	81.5090 \pm 6.2928*	
100	92.2343 \pm 0.9463*	

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

* Grupos significativos, $p < 0.01$ comparado contra el grupo control mediante un análisis de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett

En la figura 29 se muestra una gráfica en donde se compara la curva del compuesto I y el α -tocoferol.

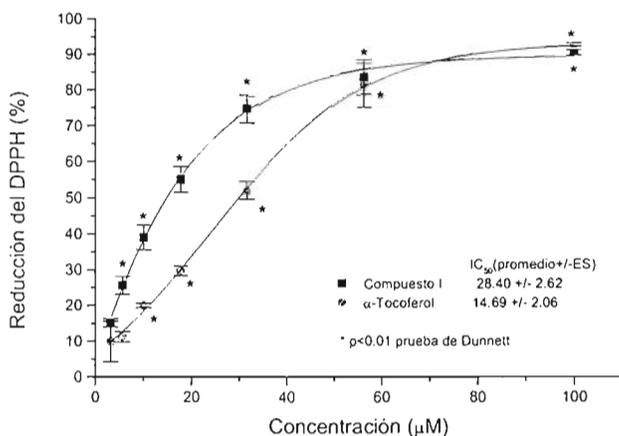


Figura 29. Comparación de la reducción del DPPH por el compuesto I y el α -tocoferol

Para la prueba de lipoperoxidación se usó como referencia el BHT. En la tabla 8 se muestra el por ciento de inhibición de la lipoperoxidación a diferentes concentraciones.

Tabla 8. Inhibición de la lipoperoxidación por el BHT

Concentración de BHT (μM)	Inhibición de la lipoperoxidación (%)	CI ₅₀
3.16	0.45 ± 2.75	
4.22	0.98 ± 2.04	
5.62	4.51 ± 1.18	
7.50	8.16 ± 1.78	12.86 ± 0.64
10.00	23.98 ± 6.41*	μM
13.34	54.99 ± 7.25*	
17.78	82.15 ± 6.98*	
23.71	90.27 ± 2.51*	
31.62	91.56 ± 1.93*	

Los datos representan el promedio de cuatro experimentos independiente \pm ES

* $p \leq 0.05$ comparado contra el grupo control mediante una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett.

7.3. RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Para determinar si los compuestos poseían actividad antiinflamatoria, se realizó un cernimiento de éstos a una concentración de 1 $\mu\text{mol/oreja}$ como se muestra en la tabla 9

Tabla 9. Inhibición del edema inducido por TPA (Cernimiento)

Compuesto (1 $\mu\text{mol/oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)
I	11.15 \pm 1.129	26.26
II	4.10 \pm 0.864	52.55
III	4.93 \pm 0.978	63.52
IV	14.20 \pm 1.856	7.94

Los datos representan el promedio de 4 ratones \pm ES del edema.

Los resultados se sometieron a un análisis de ANDEVA seguido de una prueba de Dunnett para determinar la diferencia significativa con respecto al control, $p \leq 0.05$. Todos resultaron significativos.

Dos de los compuestos analizados, el I y el IV, resultaron tener una actividad antiinflamatoria considerable a 1 μM por oreja, por lo que se les realizó una curva estándar utilizando concentraciones por arriba y por debajo de esta para determinar la CI_{50} como se muestra en la tabla 10 y 11.

Tabla 10. Curva dosis-respuesta de la inhibición del edema por el compuesto II

Compuesto	Concentración ($\mu\text{mol/oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)	CI_{50}
	0	14.36 \pm 0.54	--	
	0.1	14.07 \pm 1.07	2.00	
II	0.31	12.58 \pm 1.11	12.39	0.693 $\mu\text{mol/oreja}$
	0.56	7.97 \pm 1.91**	44.47	
	1	6.31 \pm 0.86**	56.03	
	1.78	2.9 \pm 0.55**	79.80	

Los valores representan el promedio de cuatro animales \pm ES. Los datos se analizaron mediante una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Tabla 11. Curva dosis-respuesta de la inhibición del edema por el compuesto III

Compuesto	Concentración ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)	CI ₅₀
	0	14.62 \pm 1.11	--	
	0.1	11.10 \pm 0.66	24.10	
III	0.31	8.33 \pm 0.97*	43.02	0.6084 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$
	1	7.25 \pm 1.42**	50.43	
	1.78	4.60 \pm 1.63**	68.55	

Los valores representan el promedio de cuatro animales \pm ES. Los datos se analizaron mediante una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Para complementar la prueba de actividad antiinflamatoria se evaluó la capacidad de los compuestos para inhibir la producción de nitritos en macrófagos murinos a una concentración de 100 μM . Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Inhibición de la producción de nitritos y de crecimiento de macrófagos murinos.

Compuesto	[NO ₂]	Inhibición de NO ₂ (%)	Inhibición del crecimiento (%)
I	25.88 \pm 0.56	10.16 \pm 3.23	-27.01 \pm 1.90
II	24.36 \pm 0.75	21.53 \pm 3.71	-24.80 \pm 0.73
III	25.55 \pm 3.01	37.63 \pm 0.99	27.14 \pm 1.06
IV	20.54 \pm 0.06	24.42 \pm 5.52	63.50 \pm 5.37

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm ES. El porcentaje de inhibición de la producción de nitritos está dado con base al máximo porcentaje de inhibición que produce la aminoguanidina (33.84 \pm 3.5, $p < 0.05$)

7.4. RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD

Se determinó la actividad citotóxica de los compuestos en cinco líneas celulares a una concentración de 50 μ M, usando como control positivo el 5-fluorouracilo, los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Actividad citotóxica en cinco líneas celulares cancerosas y en células normales

Compuesto (50 μ M)	Línea celular					Linfocitos normales
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	
I	NA	NA	NA	NA	NA	-2.01
II	NA	NA	22.39 \pm 0.2	NA	7.90 \pm 1.8	10.56
III	12.86 \pm 2.2	NA	NA	11.85 \pm 2.1	42.17 \pm 1.1	-6.05
IV	25.09 \pm 0.6	NA	NA	3.13 \pm 0.6	34.02 \pm 3.5	12.76
5-fluorouracilo	40.61 \pm 2.1	28.62 \pm 2.5	68.70 \pm 1.8	62.58 \pm 6.4	63.96 \pm 3.0	ND

Los valores representan el promedio del porcentaje de inhibición de tres repeticiones independientes \pm ES. U251: SNC, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-7: colón, MCF-7: mama.

NA: no activo

ND: no determinado

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Según lo analizado en la literatura, las rutas sintéticas de los compuestos del tipo 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y de los derivados de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas, son difíciles de obtener, ya que la mayor parte son procedimientos que utilizan temperaturas y presiones elevadas, usan catalizadores de altos costos, disolventes orgánicos tóxicos, sustratos de partida más difíciles y laboriosos de obtener, además de que presentan diversas etapas de reacción con largos periodos de tiempo y aunado a esto, los rendimientos de producción son bajos.

Es por lo anterior que el método implementado para la obtención de 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas resulta ser novedoso, debido a que estos productos se obtuvieron de manera rápida, directa y con rendimientos por encima del 50% como se muestra en la tabla 4. La reacción para obtener este tipo de productos procede a temperatura ambiente, presión atmosférica y utilizando un sistema catalítico de níquel en medio acuoso, además de que las reacciones proceden en una sola etapa, es decir, que todas las transformaciones químicas se realizan *in situ*.

El mecanismo de reacción que se propone para las 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas comprende la adición de HCN, dado por la especie activa del catalizador de níquel $[\text{Ni}^0(\text{CN})_4]^{4-}$ (1), al triple enlace de las α -alquilcetonas (2), con una posterior hidrólisis del grupo nitrilo hasta la amida, generando de esta manera, el correspondiente compuesto 1,4- dicarbonílico insaturado(3), el cual finalmente cicliza a la 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas (4) como se muestra en la figura 30; todo esto se lleva a cabo en el mismo medio de reacción.

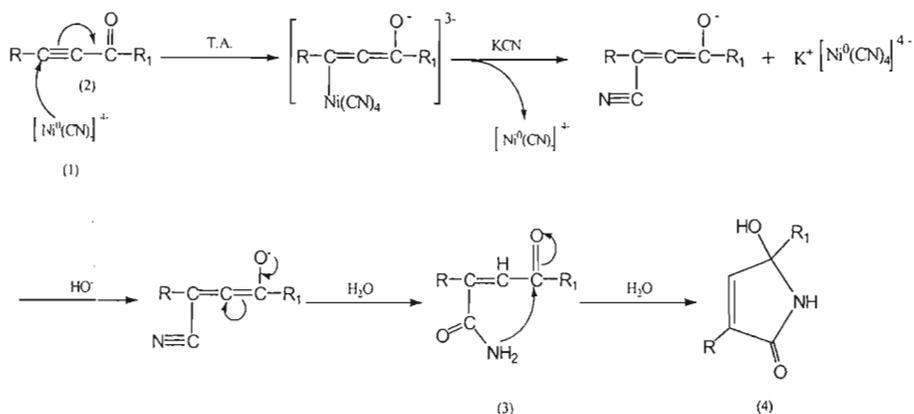


Figura 30. Reacción de una α -alquinilcetona con el complejo de níquel para producir 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas

Para la síntesis de las 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas se propone un mecanismo de reacción (Figura 31) que comprende en primer paso una adición tipo Michael de la especie aniónica de Ni^0 (1), sobre el triple enlace de la α -alquinilcetona⁵² (2), promoviendo así la activación del doble enlace conjugado remanente, el cual es seguido de un ataque por el grupo enamina (4) por una secuencia de adición-eliminación, regenerando el catalizador y generando una cetoamina. Finalmente, hay un ataque al carbonilo (6) por el grupo amino de la enamina presente y una subsecuente deshidratación y aromatización (7).

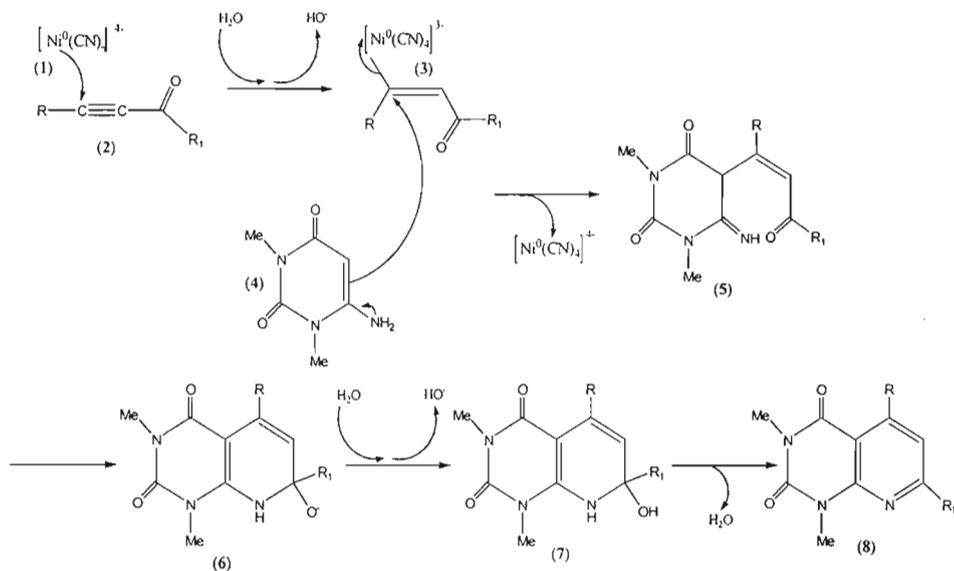


Figura 31. Mecanismo de reacción de la síntesis de 2,4-dioxipirido[2,3-d]pirimidinas-5,7-disustituidas

Es importante mencionar que una de las desventajas de esta metodología, es la reacción de competencia de la carbonilación de las α -alquínilcetona que producen las correspondientes lactamas. Esto fue disminuído, asegurando la adición primaria del 6-amino-1,3-dimetiluracilo seguida de la adición de la α -alquínilcetona, además, para obtener buenos rendimientos es fundamental que el 6-amino-1,3-dimetiluracilo se disuelva totalmente en el medio de reacción

La pureza de los compuestos se identificó, primero, de la manera más simple mediante el uso de CCF, en cuya revelación al UV a 254 nm aparece una sola mancha. Posteriormente se realizaron pruebas espectrométricas y espectroscópicas para caracterizar cada uno de los compuestos y verificar su pureza.

Los espectros de masas para cada uno de los compuestos muestran un pico a m/z 189 (I), 231 (II), 295 (III) y 309 (IV), los cuales indican el peso molecular esperado mediante la asignación del ión molecular.

Los espectro de IR para los compuestos I y II muestran, respectivamente, una banda intensa en 1695 y 1673 cm^{-1} que se asignó a la absorción de los enlaces C=O y una banda en 3202 y 3226 cm^{-1} que corresponde a la absorción de los enlaces -OH.

Para los compuestos III y IV se observan, respectivamente, una banda intensa en 1707 y 1705 cm^{-1} que se le asigno a la absorción de los enlaces C=O, una en 1588 cm^{-1} asignada los enlaces C=C y una banda en 1553 cm^{-1} para los enlaces C=N.

En los espectros de RMN ^1H , para los compuestos I y II, presentan respectivamente, una señal simple en 8.63 y 8.52 ppm que integran para un protón y se asignaron al hidrógeno del nitrógeno; una señal múltiple en 7.27-7.91 y 7.94-7.34 ppm que integran para 5 protones del grupo fenilo; una señal simple en 5.86 y 5.78 ppm que integra para un hidrógeno correspondiente al C_4 ; una señal simple en 3.36 ppm que integra para un protón asignada al hidrógeno unido al oxígeno; finalmente, para el compuesto I, una señal simple en 1.47 ppm que integra para 3 protones correspondientes a los hidrógenos del C_{10} , y para el compuestos II una señal simple en 0.98 ppm que integra para 9 protones correspondientes a los hidrógenos de los $\text{C}_{11,12,13}$.

Para los compuestos III y IV, presentan respectivamente, una señal múltiple en 7.44-7.41 y 7.43-7.40 ppm que integran para 5 protones del grupo fenilo; una señal simple en 6.8 ppm que integran para un protón correspondiente al hidrógeno del C_6 ; una señal simple en 3.7 ppm que integra para 3 protones correspondientes a los hidrógenos del C_{12} ; una señal simple en 3.35 ppm que integra para 3 protones correspondientes a los hidrógenos del C_{11} ; una señal

múltiple en 2.83-2.9 ppm que integra para 2 protones correspondientes a los hidrógenos del C₁₇; para el compuesto III, una señal triple en 1.35 ppm que integra para 3 protones correspondientes a los hidrógenos del C₁₈ y para el compuesto IV, un sextuplete en 1.88-1.76 ppm que integra para 2 hidrógenos correspondientes a los hidrógenos del C₁₈ y un triplete en 1.0-0.97 ppm que integra 3 protones correspondientes a los hidrógenos del C₁₉.

Los espectros de RMN ¹³C para los compuestos I y II muestran señales características. A campo bajo, entre 170.3 y 171.2 ppm, respectivamente, aparecen señales que corresponden al carbono del grupo carbonilo que se encuentra en la posición dos; la señal en 133.16 y 134.46 ppm se asignaron a los carbonos en la posición 3 y 6; la señal que aparece en 131.94 y 132.09 ppm se asigno al C₄. El conjunto de señales que aparecen entre 144 Y 127 ppm se les asignaron a los carbonos del grupo fenilo, C_{7,8,9} y al C₅ se le asignó la señal que aparece en 84.14 y 90.78 ppm. Los carbonos de los grupos alquilo aparecen desplazados a campos altos.

Para los compuestos III y IV las señales que aparecen en campos bajos, entre 160.7 y 167.5 ppm, corresponden a los carbonos de los grupos carbonilo que se encuentran en las posiciones 2 y 4. Otras señales características son las que corresponden a los grupos metilo que están unidos a los nitrógenos uno y tres y aparecen entre 30.0 y 28.4 ppm respectivamente. Los carbonos del fenilo, aparecen entre 127.8 y 139.5 ppm, el carbono en la posición 9 aparece en 167.5 y 166.4 ppm y el carbono de la posición 10 aparece en 105.7 ppm. Finalmente, los carbonos de los grupos alquilo aparecen desplazados hacia campos más altos.

Con respecto a los estudios biológicos, los resultados muestran que en la prueba antioxidante con DPPH, únicamente el compuesto I resultó tener una actividad antioxidante considerable a una concentración de 100 μM, por lo que a este compuesto se le realizó una curva dosis-respuesta para determinar la CI₅₀, cuyo valor fue de 14.69 μM. Para esta prueba se utilizó como control positivo el α-

tocofeol o vitamina E, que es un antioxidante muy conocido y cuya CI_{50} es de 28.40 μM . La comparación de las curvas dosis-respuesta y del CI_{50} del compuesto I contra el control, revelan que el compuesto I presenta mayor poder antioxidante que el control, ya que se necesita prácticamente la mitad de este producto para reducir a un mismo porcentaje el DPPH.

La capacidad como atrapador de radicales libres del compuesto I, se plantea que esta dado por el nitrógeno. Para que pueda ocurrir la donación de un electrón de este compuesto, el grupo hidroxilo toma el hidrógeno que esta formando enlace con el nitrógeno y sale como agua, formándose un doble enlace entre el nitrógeno y el carbono 9.

Los compuestos II, III y IV no muestran valores de importancia significativa, por lo que se descartan como posibles captadores de radicales libres.

Por otra parte, en la prueba de lipoperoxidación ninguno de los cuatro compuestos resultó tener actividad antioxidante, ya que el porcentaje de inhibición a 100 μM fue menor al 15% , lo cual, al compararlo con el control positivo, BHT, la actividad de estos compuestos fue insignificante porque el control presenta una CI_{50} de 12.26 μM obtenida de una curva estándar cuyas concentraciones fueron desde 3.16 a 31.62 μM .

Con estas dos pruebas para determinar actividad antioxidante, se comprueba, en el caso del compuesto I, que las moléculas no interaccionan de la misma manera en un sistema químico (DPPH) que en un sistema biológico (lipoperoxidación).

En lo que respecta a la prueba de inflamación, al realizar el cernimiento para los dos grupos de compuestos a un μmol por oreja, resultaron tener actividad los compuestos II y III con un porcentaje de inhibición del edema mayor al 50%, es por ello que a estos compuestos se les realizó una curva dosis-respuesta para

determinar su CI_{50} , cuyos valores fueron $0.693 \mu\text{mol/oreja}$ y $0.6084 \mu\text{mol/oreja}$ respectivamente. Se sabe que la acción del TPA en la inducción de la inflamación por aplicación tópica no esta bien definida, pero hay evidencias de que incrementa los niveles de prostanoïdes formados a partir del ácido araquidónico, los cuales están asociados con el edema. Por lo anterior, se piensa que estos compuestos actúan inhibiendo la producción de prostanoïdes, disminuyendo así, el edema producido por el TPA en la oreja del ratón; aunque este modelo es inespecífico debido a que solo da información acerca de si un compuesto posee o no actividad antiinflamatoria y no da información acerca del mecanismo por el cual actúa la molécula, por lo cual se recomienda realizar estudios, a los compuestos activos, para conocer el tipo de mecanismo que está involucrado en la inhibición del edema.

En la prueba de inhibición de la producción de óxido nítrico, los compuestos II, III y IV presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 20%, pero III y IV inhiben el crecimiento de los linfocitos normales al 27.14 y 63.50 % respectivamente, por lo que no se puede decir que inhiben la producción de óxido nítrico ya que matan a las células provocando la disminución de este. Sin embargo, el compuesto II, que inhibe la producción de nitritos en un 21.53%, permite el crecimiento de las células en un 24.80%, por lo que se dice que este compuesto es ligeramente activo en la inhibición del óxido nítrico, a una concentración de $100 \mu\text{M}$. Esto indica que la actividad puede estar relacionada con la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (SONi), pero probablemente también con la producción de prostanoïdes por su actividad en la inhibición del edema por TPA.

En lo que respecta a la prueba de citotoxicidad, el compuesto I, resultó no activo en las cinco líneas celulares cancerosas. El compuesto II es ligeramente citotóxico para la línea K592 y MCF-7, ya que inhibió el crecimiento en un 22.39 y 7.9 % respectivamente, pero es tóxico en un 10% para los linfocitos normales.

Los compuestos III y IV presentan los porcentajes más elevados de citotoxicidad en dos líneas celulares cancerosas. En la línea U251 estos compuestos muestran un porcentaje de citotoxicidad del 12.86 y 25.09 % y en la línea MCF-7 y 42.17 y 34.02 % respectivamente, pero en este caso el compuesto III se considera que posee una mayor selectividad puesto que no es tóxico para las células normales, en cambio, el compuesto IV es tóxico en un 12.76% para estas células.

Para esta prueba se utilizó como control positivo el 5-fluorouracilo, que al comparar sus porcentajes de citotoxicidad en las diferentes líneas celulares con los resultados obtenidos de los compuestos, ninguno se acercó lo suficiente como para considerarlos potencialmente activo, además de que no se obtuvo ni el 50% de actividad por lo que no se pudo calcular CI_{50} .

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron con rendimientos cuantitativos y bajo condiciones suaves de reacción 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas y 1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4-dionas 5,7-disustituidas empleando un sistema catalítico homogéneo de níquel en medio acuoso, las cuales presentaron actividad biológica interesante como antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica.

El compuesto que presentó actividad antioxidante en DPPH fue el 3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona, cuyo poder antioxidante fue mayor comparado con el α -tocoferol. En la prueba de lipoperoxidación ninguno de los compuestos analizados presentaron actividad.

La 3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona y la 7-etil-1,3-dimetil-5-fenilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona resultaron tener actividad antiinflamatoria en la prueba con TPA, además de que la segunda resultó ser ligeramente citotóxica para células cancerosas de mama, pero no para células sanas, lo que resulta interesante para desarrollar estudios posteriores en busca de la síntesis de moléculas semejantes, que puedan tener mayor actividad biológica y, por tanto, transformarse en nuevos fármacos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fox R., Powell W.. Nomenclature of organic compounds: principles and practice. 2^a ed. USA: American Chemical Society, 2001: 187-188.
2. Robertts J., Caserio M. Basic principles of organic chemistry. Benjamin Inc: New York, 1964: 546-547, 712-713.
3. Glasby J. Enciclopedia of antibiotics. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1992: 27, 171, 391.
4. Fariña F., Martín M., Paredes M. Pseudoesters and derivatives; VI. Synthesis of 5-hidroxy- and 5-methoxy-3-pyrrolin-2-ones. *Synthesis* 1973; 167.
5. Beltaief I., Besbes R., Amor F., Amri H. (Z)-dimehyl α -(Bromomethy)fumarate, an efficient intermediate for the selective synthesis of dimethyl 3-alkyl itaconates and 2-alkyl 3-carbomethoxy- γ -lactams. *Tetrahedron* 1999; 55: 3949.
6. Pearsons A. Free radical cyclisation of enamides leading to biologically important γ -lactams. *Aca. Sci. Paris* 2001; 4: 391.
7. Ghelfi F., Stevens V., Laureyn I. et al. Synthesis of 5-methoxylated 3-pyrrolin-2-ones via the rearrangement of chlorinated pyrrolidin-2-ones. *Tetrahedron* 2003; 59: 1147.
8. Rosas N., Cabrera A., Sharman P., et al. Catalytic hydrocyanation of α -ketoalkynes by Ni(CN)₂/CO/KCN system alkaline aqueous media: identification of the active species. *J. of Molecular Catalysis* 2000; 156: 103.
9. Arzoumanian H., Jean M., Nuel D., García J., Rosas N. Cyanation of α -ketoalkynes catalized by nickel in water. *Organometallics* 1997; 16: 2726.

-
-
10. Bagley M., Hughes D., Lloyd R., Powers V. A new and highly expedient synthesis of pyrido-[2,3-*d*]pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* 2001; 42: 6585.
 11. Metzler D. *Biochemistry: the chemical reactions of living cell.* 2nd ed. USA: Academic Press, 2001: 199.
 12. Pfeleiderer M., Pfeleiderer W. Pyrimidines, XXXII: synthesis and properties of pyrido-[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diones (5-deazalumazines). *Heterocycles* 1992; 33: 905.
 13. Kattab F., Kappe T. Pyrido[2,3-*d*]pyrimidines, II. One step synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines and pyrimido[4,5-*b*]quinolines from 6-amino uracils. *Monatshefte für Chemie* 1996; 127: 917.
 14. Woo J., Hwan S., Jin Y., Hwang H., et al. Synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines via palladium-catalyzed reaction of iodouracil with acetylenes. *Tetrahedron Lett.* 2000; 41: 5899.
 15. Rosas N., Sharman P., Alvarez C., Cabrera A., et al. Novel and facile catalytic sintesis of 2,4-dioxopyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives in water. *J. Chem. Soc* 2001; 1: 2341.
 16. Cornils B., Herrmann W. Concepts in homogeneous catalysis: the industrial view. *J. Catal.* 2003; 216: 23-31.
 17. Martín A. *Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences.* 4^a ed. Filadelfia: Lea and Febiger, 1993: 301.
 18. Bodner G., Pardue H. *Chemistry: an experimental science.* 2nd ed. USA: John Wiley & Sons, 1995: 824-825.

-
19. Zamaraev K. Perspectives in catalysis: via studies on molecular level to new industrial catalysts and processes. En Thomas J., Zamaraev K. Perspectives in catalysis. Oxford: Advisory Board, 1992: 35-37.
20. Flores G. (Maestria) Síntesis de 1,3-dimetilpirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4-dionas sustituidas empleando un sistema catalítico acuoso. UNAM (Posgrado). México, 2003.
21. Rodríguez J., Menéndez L., Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit 2001; 30: 36.
22. Cea B., Del Arenal M., Riveros R., Vázquez C. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, DF. (2002).
23. Polachira K., Jayalekshmy A., Arumughan C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH system. J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 912.
24. Roberfroid M., Calderon P. Free radicals and oxidation phenomena in biological system. U.S.A.: Marcel Dekker, 1995: 159-162.
25. Saha K., Lajis N., Israf D., Hamzah A., Khozirah S. et al. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. J. of Ethnopharmacology 2004; 92: 263.
26. Jin Z., Chen X. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by 1,1-difenil-2-picilhidracil (DPPH), J. Pharm. and Toxic. Methods 1998; 39: 63.

-
-
27. Vondet V., Brand W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, 1997; 30: 609.
 28. Sánchez C., Larrauri J. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric* 1998; 76: 270.
 29. Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 200.
 30. Murray R., Granner D., Mayer P., Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. 15ª ed. México: Manual Moderno, 2001: 196.
 31. Dahle L., Hill E., Holman R. The thiobarbituric acid reaction and the autooxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 1962; 98: 253.
 32. Browman W., Rand M. *Farmacología, bases bioquímicas y patológicas*. 2ª ed. Interamericana: México, 1984: 420-423.
 33. Rojas M. *Inmunología*. 12ª ed. Colombia: Corporación para la Investigación Científica, 2001: 81.
 34. Kumar V., Cotran R., Robbin S. *Patología humana*. 5ª ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1995: 8-10.
 35. Florez J., Armijo J., Mediavilla A. *Farmacología humana*. 2ª ed. España: Ediciones Científicas y Técnicas, 1994: 315- 322.
 36. Cirino G.. Multiple controls in inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 1998; 55: 105-111.

-
-
37. Puignero V., Queralt J. Effect of topically applied cyclosporin a on arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation in mouse ear. *Inflammation* 1997; 21: 357.
 38. Nims R., Cook J., Krishna M. Christodoulou D., Poore C. and cols. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods in Enzymology* 1996; 268: 12-31.
 39. Wink D., Grisham M., Mitchell J., Ford P. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods in Enzymology* 1996; 268: 56-62.
 40. Green L., Wagner D., Glogowski J., Skipper P., and cols. [¹⁵N] Nitrate in biological fluid. *Analytical Biochemistry* 1982; 126: 131-138.
 41. King R.J. *Cancer biology*. Singapore: Longman, 1997: 3-6.
 42. Rubin E; Farber J. *Patología: fundamentos*. México: Médica Panamericana, 1992: 85-86.
 43. Murray R. *Bioquímica de Harper*. 13ª ed. México: El Manual Moderno, 1994: 568-869.
 44. Goodman G., Hardman J., Limbird L., Molinoff P. and col. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. México: Mc Graw-Hill-Interamericana, 2000: 1325-1326.
 45. Malich G., Markovic B., Winder C. The selectivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997; 124: 179-192.

-
-
46. Monks A., Scudiero D., Skehan P. and col. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. of the National Cancer Institute* 1991; 83: 757-766.
47. Skehan P., Storeng R., Scudiero D. and col. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. of the National Cancer Institute* 1990; 82: 1107-1112.
48. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63.
49. Rosas N., Chavez J., García L., Sharma P. and cols. ^1H and ^{13}C 2D NMR studies on substitutes Δ^3 -pyrrolin-2-ones, *Analytical Sciences* 1998; 14: 585-588.
50. Cuiper A., Brzostowska M., Gawronski J., Smeets W. and cols. Determination of the absolute configuration of 3-pyrrolin-2-ones, *J. Org. Chem.* 1999; 64: 2567-2570.
51. Dieter R., Lu K. A-(N-carbamoyl)alkylcuprate chemistry in the synthesis of nitrogen heterocycles, *J. Org. Chem.* 2002; 67: 847-855.
52. Arzomanian H., Jean M., Nuel D., Cabrera A., García J., Rosas N. Nickel catalyzed carbonylation of α -keto alkynes under phase transfer conditions. *Organometallics*, 1995; 14: 5438..

ANEXO

ESPECTROS DE γ -LACTAMAS

ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO

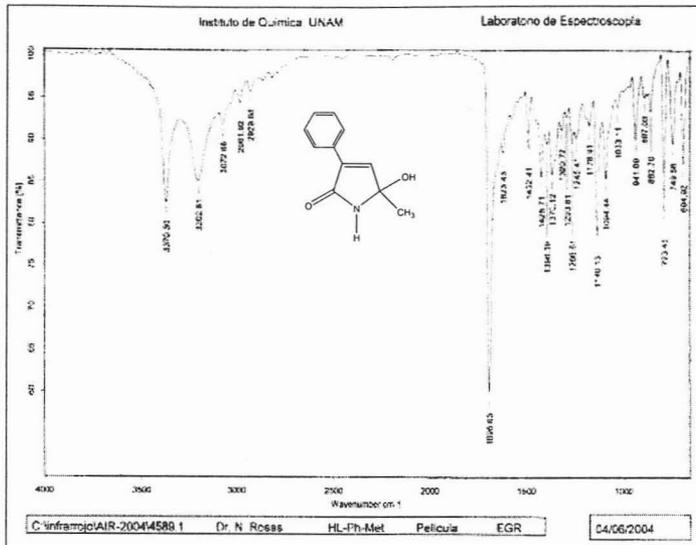


Figura A1. Espectro de IR de 3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona

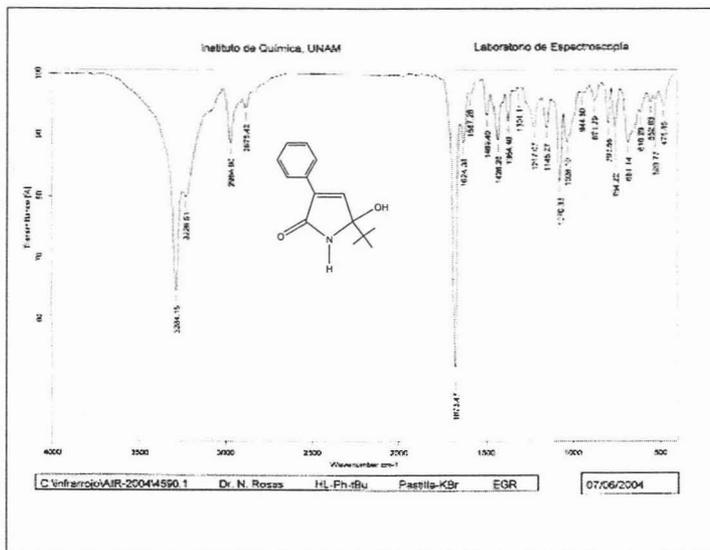


Figura A2. Espectro de IR de 3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

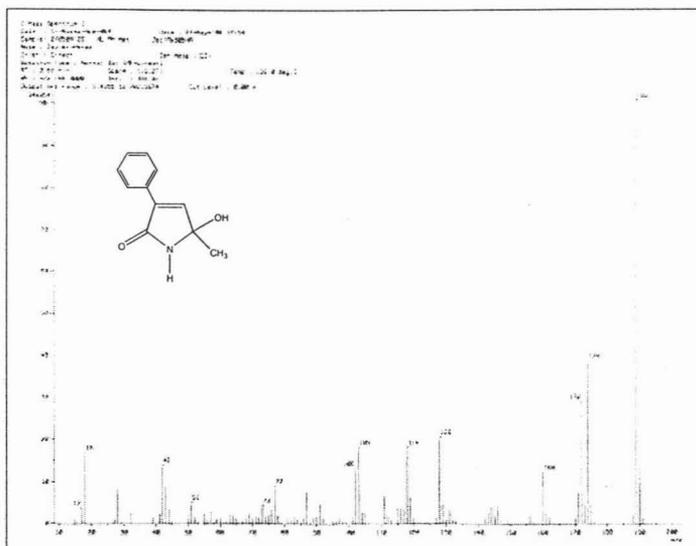


Figura A3. Espectro de masas de 3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona

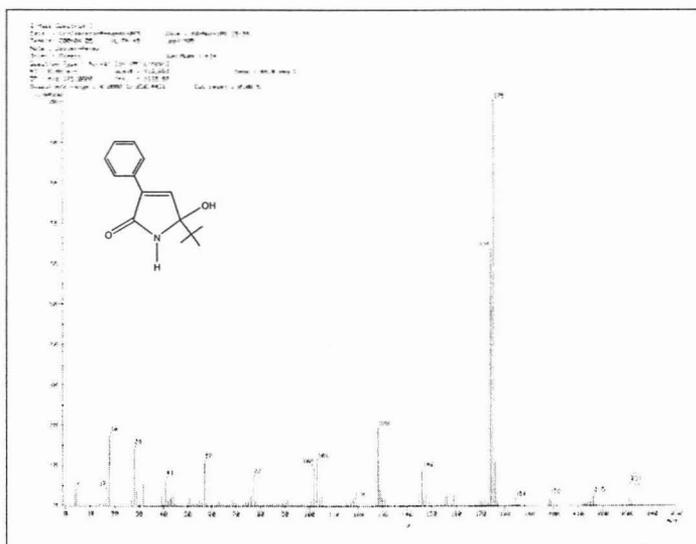


Figura A4. Espectro de masas de 3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona

ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, ^1H Y ^{13}C

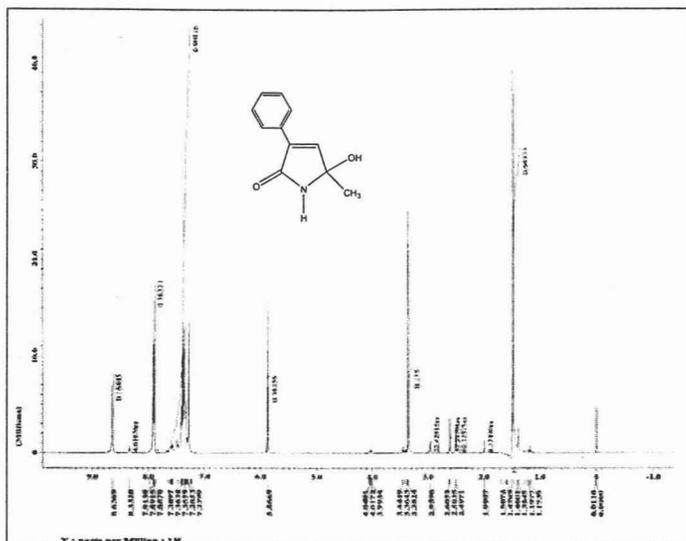


Figura A5. Espectro de RMN ^1H de 3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona

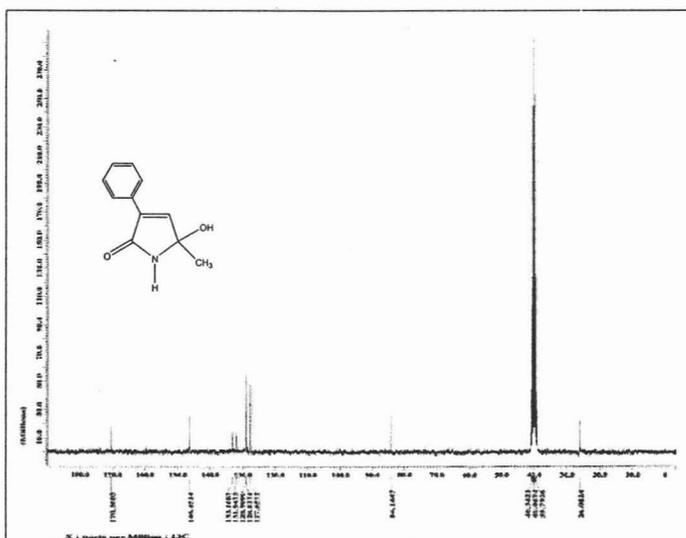


Figura A6. Espectro de RMN ^{13}C de 3-fenil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidropirrol-2-ona

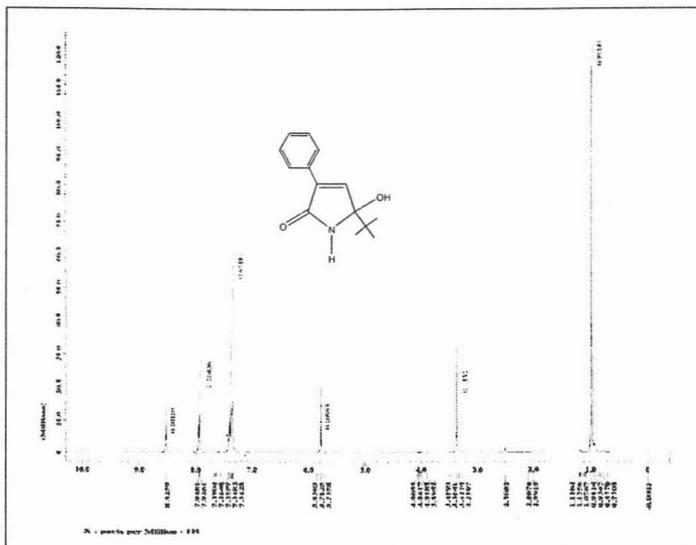


Figura A7. Espectro de RMN ^1H de 3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona

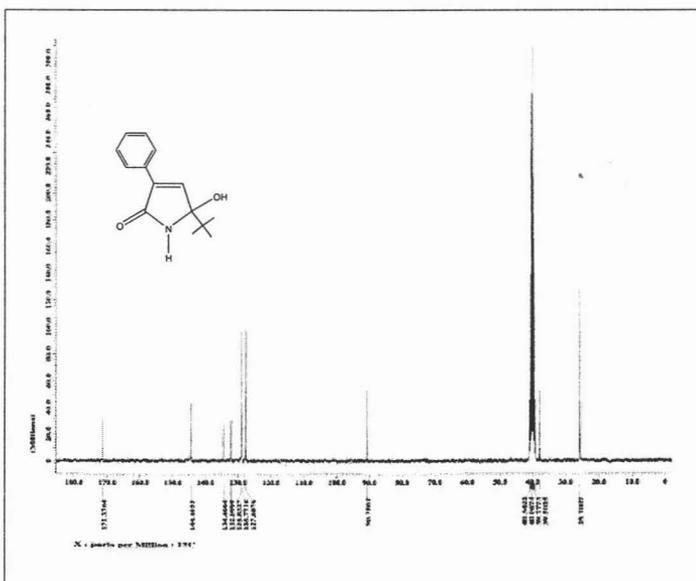


Figura A8. Espectro de RMN ^{13}C de 3-fenil-5-hidroxi-5-terbutil-1,5-dihidropirrol-2-ona

ESPECTROS DE
PIRIDOPIRIMIDINAS

ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO

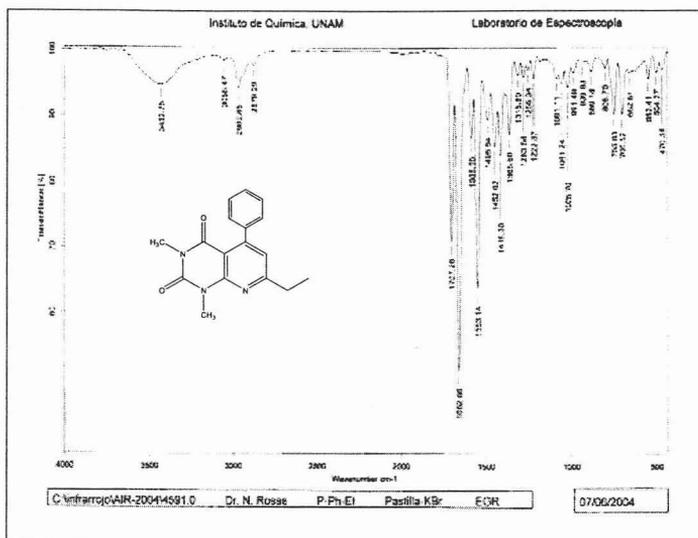


Figura A9. Espectro de IR de 7-etil-1,3-dimetil-5-fenilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona

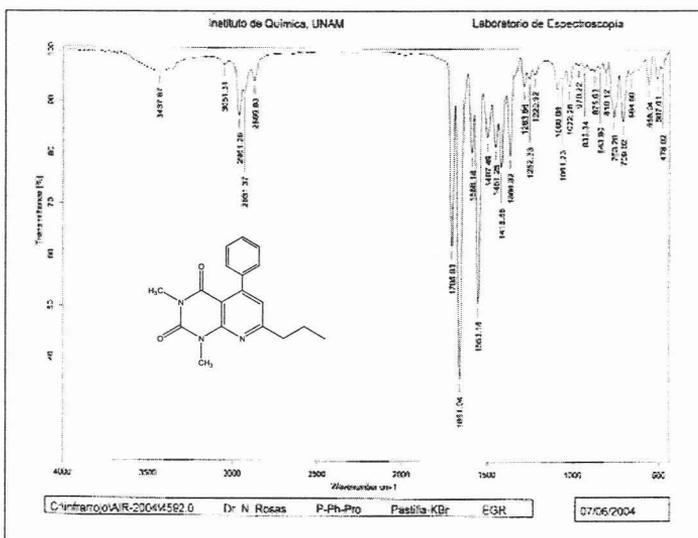


Figura A10. Espectro de IR de 1,3-dimetil-5-fenil-7-propilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

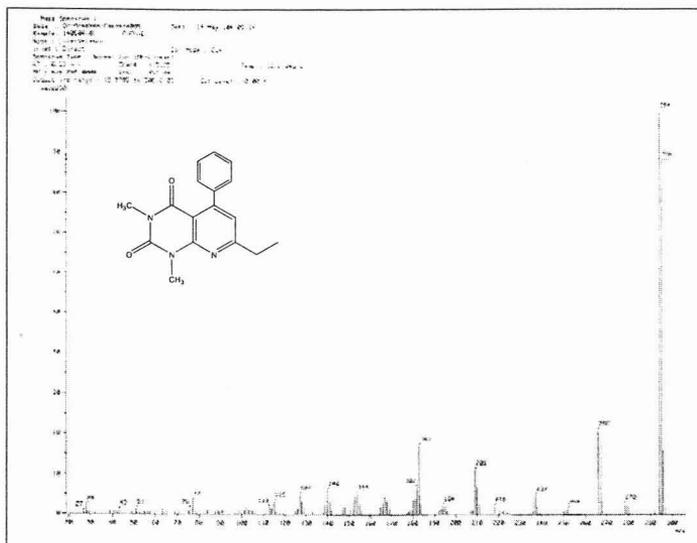


Figura A11. Espectro de masas de 7-etil-1,3-dimetil-5-fenilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona

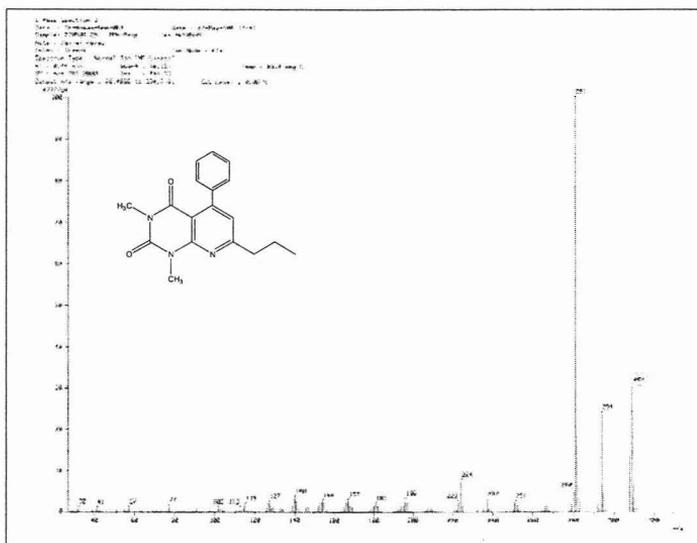


Figura A12. Espectro de masas de 1,3-dimetil-5-fenil-7-propilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona

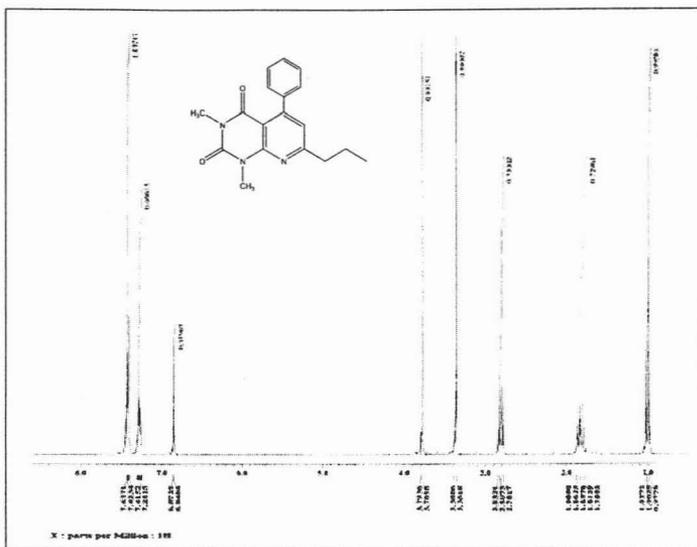


Figura A15. Espectro de RMN ^1H de 1,3-dimetil-5-fenil-7-propilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona

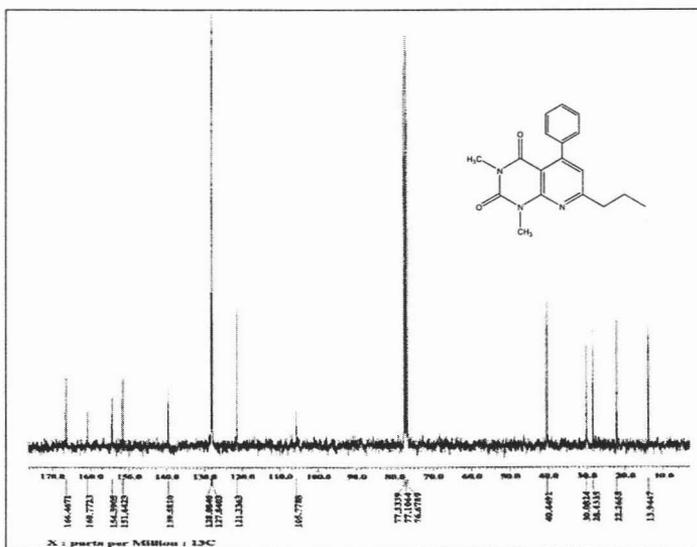


Figura A16. Espectro de RMN ^{13}C de 1,3-dimetil-5-fenil-7-propilpirido[2,3d]pirimidin-2,4-diona