



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA CON
POTENCIAL ACTIVIDAD CITOTÓXICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA:

VALERIA ABIGAIL ROSALES ZARIÑANA

México, D. F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profa. María Alicia Hernández Campos
VOCAL	Prof. Francisco Hernández Luis
SECRETARIO	Profa. Nayeli López Balbiaux
1er. SUPLENTE	Profa. Paola Malinalli Hernández Hernández
2do. SUPLENTE	Prof. Octavio Fuentes Ramírez

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, conjunto E, Facultad de Química,
de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Francisco Hernández Luis
Asesor

M. en C. Audifás Salvador Matus Meza
Supervisor técnico

Valeria Abigail Rosales Zariñana
Sustentante



DEDICATORIAS

A mis padres, María Norma Zariñana y Luis Martín Rosales.

A mis hermanos, Eduardo y Diego.

A Mauricio Campuzano.

Con cariño para ustedes



AGRADECIMIENTOS

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

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* por ser mi segunda casa y brindarme los recursos materiales y humanos para lograr una mejor preparación profesional y ofrecerme continuar creciendo.

A la *Dirección General del Personal Académico UNAM* por la beca recibida para la realización de esta tesis dentro del proyecto PAPIIT-UNAM IN213914.

Al *CONACyT*, por el apoyo recibido para la compra de insumos que permitieron la preparación de los compuestos considerados dentro del proyecto CB 220664 (2013).

A la *Unidad de Experimentación Animal (Unexa)* de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo en la realización de los estudios de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas; en particular a la M. en C. Isabel Gracia Mora y al M. en C. Francisco Sánchez Bartz.

A la *Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI)* de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales); Espectrometría de Masas (Georgina Artemisa Duarte Lisci); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco).

Asimismo mis más sinceros agradecimientos para las siguientes personas:

A mi asesor el *Dr. Francisco Hernández Luis*, por concederme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por compartir conmigo su conocimiento y brindarme su apoyo incondicional.

Al *Dr. Rafael Castillo* y la *Dra. María Alicia Hernández* por sus enseñanzas y aportaciones a este trabajo, pero sobre todo, por todas las vivencias compartidas.



Al *M. en C. Audifás Matus Meza* por toda su ayuda, por su contribución a este trabajo de investigación y su apoyo incondicional en el desarrollo de éste proyecto.

A los *miembros del jurado* por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo de Tesis y por sus valiosas aportaciones al mismo.

A *mi madre, mi padre y hermanos*, por ser los responsables de impulsarme a lograr este gran proyecto y por ser el motor que me impulsa a seguir adelante día a día.

A *Mauricio Campuzano*, por ser mi mejor apoyo, mi mano derecha, por toda su comprensión y apoyo, por todo su amor.

A *mis hermanos sintéticos del laboratorio 122*, por compartir un ambiente de trabajo estupendo y por la amistad brindada.

A *Dios*, por llevarme de la mano en el camino de la vida.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Neoplasias	2
2.1.1 Cáncer	3
2.1.2 Carcinogénesis	3
2.1.3 Importancia del Cáncer	4
2.1.3.1 El cáncer en México	5
2.1.3.1.1 Morbilidad	5
2.1.3.1.2 Mortalidad	6
2.1.4 Tratamiento	7
2.1.4.1 Cirugía	8
2.1.4.2 Radioterapia	8
2.1.4.3 Quimioterapia	9
2.1.4.3.1 Efectos adversos de quimioterapia antineoplásica	12
2.2 Dihidrofolato reductasa humana	13
2.2.1 Dihidrofolato reductasa humana como diana para la búsqueda de antineoplásicos	15
2.2.2 Metotrexato como compuesto quimioterapéutico antineoplásico	16
2.2.3 Diseño de moléculas análogas	16
2.2.4 Importancia de los halógenos en la relación estructura-actividad biológica	18



2.2.4.1 Efectos de resonancia o electrónicos	18
2.2.4.2 Efectos hidrofóbicos	18
2.2.4.3 Efectos estéricos	19
2.2.4.4 Efectos de halogenación obstructiva	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	20
5.1 Objetivos específicos	20
6. METODOLOGÍA	20
6.1 Revisión bibliográfica y Diseño de moléculas a sintetizar	21
6.2 Síntesis de moléculas propuestas	23
6.2.1 Síntesis del fragmento quinazolina	23
6.2.1.1 Síntesis de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (VR-1)	23
6.2.1.2 Síntesis de 2, 4, 6-triaminoquinazolina (VR2)	24
6.2.2 Síntesis de los compuestos VR1-3, VR2-3, VR3-3. Técnica general	24
6.2.2.1 Síntesis de 2,4-diamino-6- $\{(E)\text{-}[4\text{-}$ $(\text{trifluorometoxi})\text{benzilideno}]\text{amino}\}$ quinazolina (VR1-3)	25
6.2.2.2 Síntesis de 2,4-diamino-6- $[(E)\text{-}(2,4\text{-difluorobenzilideno})\text{amino}]\text{quinazolina}$ (VR2-3)	26
6.2.2.3 Síntesis de 2,4-diamino-6- $[(E)\text{-}(4\text{-fluorobenzilideno})\text{amino}]\text{quinazolina}$ (VR3-3)	26
6.2.3 Síntesis de los compuestos VR1-4,	



VR2-4, VR3-4. Técnica general	27
6.2.3.1 Síntesis de 2,4,6-triamino- N^6 -[4-(trifluorometoxi)benzil] quinazolina (VR1-4)	28
6.2.3.2 Síntesis de 2,4,6-triamino- N^6 -(2,4-difluorobenzil) quinazolina (VR2-4).....	28
6.2.3.3 Síntesis de 2,4,6-triamino- N^6 -(4-fluorobenzil) quinazolina (VR3-4)	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 Mapas de potencial electrostático de compuestos finales	30
7.1.1 Mapas de potencial electrostático de VR1-3, VR2-3 y VR3-3	30
7.1.2 Mapas de potencial electrostático de VR1-4, VR2-4 y VR3-4	32
7.2 Síntesis y caracterización de los compuestos planteados	34
7.2.1 Síntesis y caracterización de VR-1	38
7.2.2 Síntesis y caracterización de VR-2	38
7.1.3 Caracterización de VR1-3	39
7.1.4 Caracterización de VR1-4	41
7.1.5 Caracterización de VR2-3	42
7.1.6 Caracterización de VR2-4	43
7.1.7 Caracterización de VR3-3	45
7.1.8 Caracterización de VR3-4	46
7.3 Evaluación biológica	47



8. CONCLUSIONES	51
APÉNDICE 1. Instrumentación	52
APÉNDICE 2. Colección de espectros de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EM	54
BIBLIOGRAFÍA	66



1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que el cáncer es una enfermedad cuya existencia es conocida desde hace muchos años, recientemente ha ganado una importancia crítica dentro del sector salud debido a que ha alcanzado elevadas cifras de incidencia y grandes tasas de mortalidad en el mundo.

Los principales objetivos de un programa de tratamiento del cáncer son curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes, además de garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad. Dentro de dichos tratamientos se encuentran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. De éstas, a nuestro grupo de trabajo le concierne la última.

A pesar de que en la actualidad los nuevos fármacos antineoplásicos han ido en aumento, y que se tiene una amplia clasificación de éstos, no se ha encontrado una molécula que sea capaz de presentar la selectividad hacia las células neoplásicas necesaria para evitar la aparición de efectos adversos generados por la afección de células sanas.

En este contexto se ubica el presente trabajo de investigación, debido a que se ha observado que es necesario identificar moléculas diana dentro de las células tumorales que permitan la síntesis de nuevos prototipos que las ataquen selectivamente para aminorar la presencia de efectos tóxicos en los pacientes. En este informe de tesis se planteó a la dihidrofolato reductasa (DHFR) como dicha diana.

Por lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue el diseño, síntesis y evaluación biológica en líneas celulares tumorales humanas de moléculas derivadas de quinazolina, con el propósito de contar con compuestos activos contra dichas células. Además, para fines de este trabajo, es fundamental contribuir al conocimiento de los requerimientos estructurales de los derivados de quinazolina con relación a la actividad citotóxica que presenten.



2. ANTECEDENTES

Este apartado contiene la información documental que sustenta el problema planteado y la hipótesis del presente informe de tesis; dicha información se presenta en dos partes. La primera de estas aborda los aspectos generales de la enfermedad en cuestión, el cáncer. En la segunda se aborda la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) como diana terapéutica para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos y la estrategia empleada en el diseño de las moléculas sintetizadas.

2.1 Neoplasias

Una neoplasia es un crecimiento tisular relativamente autónomo. Dentro de esta definición, se entiende por *crecimiento* a la velocidad de las divisiones celulares o de los procesos intracelulares implicados en la síntesis de macromoléculas que serán utilizados dentro de la célula o que serán excretados. Dicha velocidad puede ser lenta o extremadamente rápida. El concepto *autonomía relativa* indica que el tumor no está sujeto a las regulaciones que gobiernan células individuales e interacciones celulares en el organismo y que dicha autonomía solo es manifiesta en relación al tejido a partir del cual se ha originado.

Las neoplasias pueden ser clasificadas como benignas o malignas dependiendo de las características celulares que tengan. Dicha distinción resulta muy útil para el diagnóstico de cáncer en un determinado paciente.¹

Las células que forman parte de una neoplasia benigna crecen más lentamente debido a que presentan mitosis poco frecuentes y en general no presentan disturbios en el funcionamiento normal del tejido, este tipo de neoplasmas son encapsulados, no invasivos, diferenciados, presentan anaplasia escasa o nula y además no producen metástasis. Las células que constituyen una neoplasia maligna proliferan automáticamente, realizan mitosis relativamente frecuentes, son poco diferenciadas, logran evadir apoptosis, este tipo de neoplasmas no son encapsulados, pueden invadir tejidos adyacentes y realizar metástasis, y además inducir a la angiogénesis.^{1,2}



2.1.1 Cáncer

El término cáncer, utilizado de manera genérica, se refiere a los tumores malignos. La palabra cáncer proviene del latín <cangrejo> y surge de las observaciones de Hipócrates de un tumor alimentado por vasos sanguíneos que se asemeja a las pinzas de un cangrejo.¹

Actualmente la palabra cáncer es el nombre general para un grupo de aproximadamente 200 enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal de células, y que se manifiestan por una reducción en el control del crecimiento y la función celular.³

Un cáncer está construido por billones de células, todas originadas a partir de una célula inicial que tiene clonaciones múltiples, escapa de la apoptosis y acumula alteraciones genéticas (y/o epigenéticas) que la convierten en una célula neoplásica. El bloqueo de la apoptosis durante un daño genético significativo puede facilitar la acumulación de células aberrantes y esto puede convertirse en un punto crítico de una patogénesis maligna.⁴

Los factores responsables del cáncer son clasificados como exógenos y endógenos. El primer grupo incluye hábitos nutricionales, estatus socioeconómico, estilo de vida, agentes físicos, químicos y biológicos. El segundo incluye daños en el sistema inmune, inflamación, composición genética, edad, balance endócrino y condición fisiológica.

2.1.2 Carcinogénesis

Desde un punto de vista experimental, un carcinógeno es aquella sustancia que induce un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de uno o más tipos histológicos de neoplasia, comparados con el grupo de animales control que no son expuestos.



Los agentes que tienen capacidad para inducir un proceso carcinógeno pueden ser del tipo: radiaciones, agentes biológicos y xenobióticos que llegan al organismo, procedentes del medio ambiente o son suministrados por la alimentación o la medicación.⁵

Estudios realizados en modelos animales, estudios *in vitro* y ensayos epidemiológicos han demostrado que el cáncer se desarrolla como un proceso microevolutivo (Teoría de la carcinogénesis multietapas) que requiere de la acumulación de múltiples eventos que tienen lugar en un clon de células y comprenden 3 estadios:^{2,6}

1. Inducción de mutación en el ADN de una célula somática (iniciación).
2. Estimulación de la expansión tumoral del clon mutado (promoción).
3. “Malignización” del tumor (progresión)

2.1.3 Importancia del Cáncer

El cáncer es una enfermedad cuya existencia es conocida desde hace muchos años; sin embargo, a partir del siglo XX comenzó a ganar importancia debido a sus cifras de incidencia y a los elevados niveles de mortalidad que se han alcanzado por su causa en todo el mundo: alrededor de 8.2 millones de defunciones en el 2012.^{3,7}

Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.⁷

Los tipos de cáncer con mayor incidencia y con mayores tasas de mortalidad son distintos entre hombres y mujeres. Dentro de la población masculina el cáncer colorrectal, de pulmón y de próstata tienen mayor tasa de incidencia y de mortalidad, mientras que en la población femenil este papel lo cubren el cáncer de mama, el colorrectal y el cervicouterino.⁸



2.1.3.1 El cáncer en México

Desde hace dos décadas México atraviesa por una transición epidemiológica relacionada con la disminución de las enfermedades infecciosas y el aumento en la frecuencia de enfermedades crónico-degenerativas, en dicha transición contribuye el cambio en el estilo de vida de los ciudadanos. Entre este último tipo de enfermedades se encuentra el cáncer, el cual representa la tercera causa de muerte en México, solo superado por enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.^{9,10}

2.1.3.1.1 Morbilidad

La morbilidad hospitalaria permite observar el número total de egresos en los hospitales en un periodo analizado, basado en la selección de una sola causa: la afección principal. En 2011 se observó que para la población mexicana menor de 20 años, los porcentajes más altos de morbilidad hospitalaria por tumores malignos los ocupan los tumores de órganos hematopoyéticos, seguidos por otros tipos de tumores malignos dependiendo del sexo de la población (Fig. 1).^{11,12}

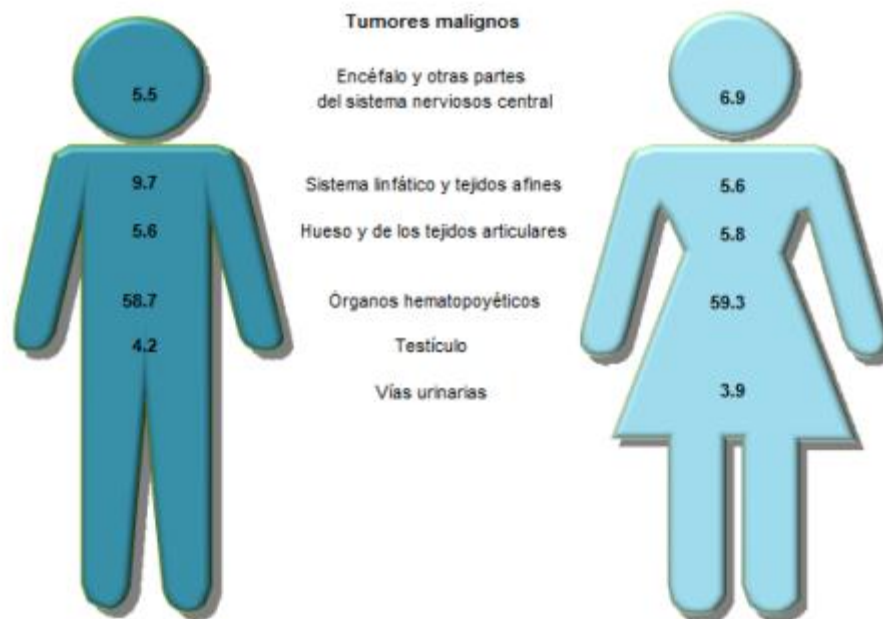


Fig. 1. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población mexicana menor de 20 años, por principales tumores malignos según sexo¹²



Por otro lado, se ha observado que el tipo de neoplasias que más afectan a la población adulta (mayor de 20 años) son las de epitelio; sin embargo, los tipos de tumores que padece ésta población son diferentes dependiendo el sexo (Tabla 1).^{12,13}

Tabla 1. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más por principales tumores malignos según grupo de edad y sexo

Principales tumores malignos	Grupos de edades							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Órganos digestivos	3.1	6.0	13.2	22.3	14.1	24.1	8.9	8.3
Órganos genitales masculinos	1.1	1.4	4.6	12.7	12.6	35.0	14.7	17.9
Órganos hematopoyéticos	20	15.4	14.1	18.1	7.9	14.4	5.8	4.4
Órganos respiratorios e intratorácicos	2.8	3.4	9.0	18.3	13.4	30.7	11.9	10.5
Tejido linfático y afines	12.4	11.3	17.1	19.9	9.8	18.4	6.4	4.7
Mujeres								
Mama	1.9	10.7	28.0	29.2	11.6	13.4	3.0	2.2
Órganos genitales femeninos	4.1	16.6	25.2	23.6	10.0	13.7	3.7	3.1
Órganos digestivos	2.4	6.9	14.6	23.5	13.4	22.1	8.3	8.8
Ovario	7.1	13.2	24.1	26.2	10.3	13.2	3.6	2.2
Órganos hematopoyéticos	19.0	15.7	18.3	19.8	6.7	12.7	3.7	4.1

2.1.3.1.2 Mortalidad

Los datos de mortalidad indican el número de defunciones por lugar, intervalo de tiempo y causas básicas; entendiéndose por causa básica a "la enfermedad o lesión que desencadenó la sucesión de eventos patológicos que condujeron directamente a la muerte".¹⁵



Entre los jóvenes menores de 20 años se observa que 5.1% fallecieron por algún tumor, de los cuales 86% eran cancerosos. Dichos tumores fueron desarrollados principalmente en órganos hematopoyéticos, siendo más alta la incidencia en los hombres que en las mujeres. La segunda causa de muerte en esta población es por cáncer en encéfalo y otras partes del sistema nervioso central.¹²

En 2012, los principales tumores malignos causantes de defunciones de la población mayor de 20 años, fueron de órganos digestivos, seguidos por los de órganos genitales, órganos respiratorios e intratorácicos y de mama. El comportamiento de estas estadísticas es diferente entre hombres y mujeres (Tabla 2)¹².

Tabla 2. Tasa de mortalidad en población mexicana de 20 años y más por principales tumores malignos según sexo

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	33.18	35.04	31.49
Órganos genitales	15.08	18.42	13.43
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.72	15.16	6.68
Mama	8.13	0.15	15.38
Órganos hematopoyéticos	5.79	6.29	5.34
Vías urinarias	4.07	5.42	2.85
Ovario	5.43	-	5.43

2.1.4 Tratamiento

Los principales objetivos de un programa de tratamiento del cáncer son: curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes y garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad.¹⁵

Cuando el tumor está localizado y es pequeño, es probable que la cirugía, y a veces la radioterapia, alcancen muy buenos resultados por sí solas. La quimioterapia por sí sola puede ser eficaz para algunos tipos de cáncer, como las neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas).¹⁶



Una modalidad de tratamiento combinado requiere la estrecha colaboración de todo el equipo de atención oncológica.

2.1.4.1 Cirugía

La cirugía oncológica es el tipo más antiguo de terapia contra el cáncer y actualmente sigue siendo un tratamiento efectivo para muchos tipos de dicha enfermedad.^{17,18}

La cirugía es la primera y más importante arma diagnóstica y terapéutica en el manejo del cáncer, que consiste en la extirpación del tumor y el tejido circundante. Alrededor de un 70% de todos los tumores malignos requieren algún tipo de intervención quirúrgica, alcanzando un mayor número de curaciones que con cualquier otra de las armas terapéuticas disponibles.¹⁸

Los objetivos de la cirugía son diversos. Puede usarse para diagnosticar cáncer; determinar dónde está alojado; visualizar si se ha diseminado, y si está afectando las funciones de otros órganos del cuerpo; extirpar el tejido canceroso en parte o en su totalidad; restablecer la función del cuerpo o aliviar los efectos secundarios; rehabilitar, mantener la integridad anatómica, e incluso intentar conservar la estética.^{17,18}

La cirugía es útil sólo en algunos tipos de cáncer, por ejemplo, ha alcanzado altas tasas de curación en cáncer de piel, en cáncer de colon y cáncer de mama. Sin embargo, en casos como el cáncer pulmonar, el cáncer esofágico y otros la tasa de curación sigue siendo muy baja, por lo que se requieren otro tipo de alternativas.¹⁹

2.1.4.2 Radioterapia

La radioterapia es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. Es un tratamiento localizado ya que lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hace imposible que crezcan y se dividan. Aunque la radiación daña las células cancerosas así como las normales,



muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente.^{18,20}

La radiación puede administrarse de dos maneras: a partir de una máquina colocada fuera del cuerpo (radiación externa), muy cerca del tumor o dentro del mismo (radiación interna); o mediante la administración intravenosa de materiales radiactivos como el yodo 131 y el estroncio 89 (radioterapia sistémica). El tipo de radiación que se administre depende del tipo de cáncer, de su ubicación, de la profundidad en el cuerpo a donde se necesita que llegue la radiación, la salud en general del paciente y su historial médico, y si el paciente recibirá otros tipos de tratamiento para el cáncer, entre otros factores.²⁰

Los objetivos de la radioterapia incluyen disminuir el tamaño del tumor antes de la cirugía, evitar que el tumor reaparezca después de la cirugía, eliminar las células cancerosas en otras partes del cuerpo y aliviar el dolor.²¹

La radioterapia puede usarse para tratar casi toda clase de cáncer. La radioterapia externa casi siempre se administra a pacientes ambulatorios y se usa para tratar cáncer de vejiga, cerebro, seno, cérvix, laringe, pulmón, próstata y vagina. Además, puede usarse radiación externa para aliviar el dolor o aligerar otros problemas que se presentan cuando el cáncer se disemina a otras partes del cuerpo desde el sitio primario. La radioterapia sistémica puede usarse para tratar el cáncer de glándula tiroides y linfoma No Hodgkin en adultos.¹⁷

2.1.4.3 Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, generalmente al inhibir su capacidad para proliferar y dividirse. Esta alternativa representa uno de los pilares fundamentales en el tratamiento contra el cáncer.^{18,21} Actualmente se emplea de forma combinada con el tratamiento quirúrgico y radioterapia, de forma secuencial, aumentando los resultados exitosos o incluso como tratamiento paliativo en tumores recurrentes o bien en metástasis.²²



Los primeros agentes utilizados como quimioterapéuticos antineoplásicos fueron los agentes alquilantes, descubiertos a raíz de una explosión de gas tóxico durante la Segunda Guerra Mundial. Adicionalmente se descubrió que los agentes alquilantes provocaban hipoplasia medular y linfoides en marineros expuestos a gas mostaza. Desde entonces se han desarrollado muchos fármacos con actividad antineoplásica.¹⁸

Un régimen de quimioterapia normalmente consiste en una cantidad específica de ciclos que se administran en un plazo de tiempo determinado. Un paciente puede recibir un fármaco por vez o combinaciones de diferentes fármacos al mismo tiempo. La quimioterapia sistémica se administra a través del torrente sanguíneo para que alcance las células cancerosas de todo el cuerpo; no obstante, el resto de las células sanas no quedan exentas de ser atacadas por estas moléculas.¹⁹⁻²¹

Los agentes quimioterapéuticos clásicos descubiertos inicialmente, basan su actividad en interrumpir los procesos metabólicos para ADN, ARN y la biosíntesis de proteínas. En la actualidad, estos agentes se clasifican como se muestra en la Tabla 3.²³⁻²⁶

Tabla 3. Clasificación de fármacos quimioterapéuticos

Categoría	Descripción	Tipos	Subtipos	Actividad	Ejemplos
Activos sobre la fase S del ciclo celular	Sustancias que actúan como anti-metabolitos	Antagonizan los precursores del ADN en biosíntesis	Análogos del ácido fólico	Agentes que se fijan firmemente a la dihidrofolato reductasa y así impiden la conversión del dihidrofolato en tetrahidrofolato, el cual actúa como donante de grupos monocarbonados para la síntesis de purinas, pirimidinas y ácidos nucleicos.	Metotrexato y Trimetrexato
			Análogos de bases púricas	Se incorporan al ADN en forma de desoxirribósidos y al RNA en forma de ribósidos interviniendo con la replicación de material genético. Además inhiben síntesis de bases purínicas mediante sistemas alostéricos de retroalimentación.	Fludarabina, Tioguanina, 6-mercaptopurina, Azatioprina



FACULTAD DE QUÍMICA

Activos sobre la fase S del ciclo celular	Sustancias que actúan como anti-metabolitos	Antagonizan los precursores del ADN en biosíntesis	Análogos de bases pirimídicas	Inhiben enzimas de la vía biosintética de los ribósidos y desoxirribósidos pirimidínicos. Inhiben la timidilato sintasa, ácido morótico descarboxilasa, DNA polimerasa.	5-fluorouracilo, Citarabina, Tegafur
		Bloqueo de la topoisomerasa I	N/A	Inhiben síntesis de nuevas moléculas de ADN	Campotecinas: Irinotecan, Topotecan
Activos sobre la fase M del ciclo celular	Son tóxicos del uso meiótico, por lo que detienen la mitosis en la metafase	N/A	Alcaloides de la Vinca	Se unen específicamente a la tubulina formadora del uso mitótico y alteran el movimiento del uso celular ocasionando su destrucción y la dispersión de los cromosomas impidiendo la mitosis.	Vindesina, vinblastina, vincristina y vinorelbina
			Taxoides	Se unen a la fracción beta de los microtúbulos impidiendo su despolimerización originando enlaces estables y por tanto, túbulos no funcionantes. Esto genera intervención en la división celular y produce la destrucción de la célula.	Docetaxel, Paclitaxel
Activos independientes de la fase del ciclo celular	N/A	Agentes alquilantes	Mostazas nitrogenadas	Agentes que pueden reaccionar en forma covalente con las bases de ADN. Si tienen dos grupos reactivos se producen entrecruzamientos intra e intermoleculares en la doble hélice del ADN, además inhiben la separación de material genético necesariamente previa a la división celular.	Ciclofosfamida, Clorambucilo, Isofosfamida
			Nitrosoureas		Carmustina, Estramustina
			Etilenoínas		Tiotepa, Altretamina
			Alquisulfonas		Busulfa
			Triazenos		Dacarbazina, Procarbazina
		Complejos de platino	N/A		Cisplatino, Carboplatino
Fármacos que son factores extracelulares de estímulo o inhibición de la división celular	Las hormonas esteroides son transportadas hasta el núcleo de la célula, en donde se une a la cromatina, en general estimulan la transcripción y en consecuencia la síntesis proteica, pero también pueden inhibir la transcripción y mitosis de células normales. Los glucocorticoides suprimen la mitosis en los linfocitos y los fibroblastos, debido a que en apariencia inhiben la transcripción.	Hormonales	Antagonistas de estrógenos	Dado que la glándula prostática normal es suprimida por los estrógenos, al parecer debido a un mecanismo competitivo con los andrógenos, los estrógenos se utilizan para el tratamiento del cáncer de próstata.	Tamoxifeno, Aminoglutetimida
			Antagonistas de andrógenos	Ejercen un efecto antiestrogénico y son usualmente empleados en ciertos tumores mamarios (aquellos que sí presentan receptores estrogénicos).	Fosfestrol, Flutamida
			Progestágenos	Se comportan como antiestrógenos en el endometrio y pueden utilizarse en la quimioterapia del cáncer endometrial.	Medroxiprogesterona, Megestrol
			Análogos de la hormona LH-RH	Ejercen efectos centrales para inhibir la síntesis de andrógenos y estrógenos.	Buserelina, Goserelina, Leuprorelina
			Glucocorticoides	Suprime la angiogénesis tumoral sin ejercer la actividad glucocorticoide ni mineralocorticoide.	Tetrahidrodesoxicorticosterona



2.1.4.3.1 Efectos adversos de quimioterapia antineoplásica

Si bien no existe un consenso uniforme respecto a los efectos secundarios de la quimioterapia sobre los tejidos normales, éstos se han subdividido tradicional y arbitrariamente en agudos y tardíos, según su aparición durante el tratamiento. Hoy en día se considera que la toxicidad secundaria a la quimioterapia es un fenómeno continuo que se inicia desde el mismo momento en que comienza la terapia y que se prolonga a lo largo del tiempo de seguimiento del paciente, y cuya expresión dependerá de factores celulares, tisulares, ambientales e intrínsecos de cada individuo.²⁷

Muchos de los efectos adversos reflejan la acción del fármaco en poblaciones celulares de proliferación rápida, dentro de las cuales no sólo se encuentran células neoplásicas si no también células sanas que se dividen rápidamente como las de folículos pilosos, médula ósea, epitelio intestinal, y células sexuales, principalmente (Tabla 4). Dichas células son especialmente sensibles a la quimioterapia antineoplásica y deben a ésta muchos de los efectos adversos.²⁷

Tabla 4. Principales efectos adversos de los fármacos antineoplásicos en humanos

Tejido	Efectos adversos
Médula ósea	Leucopenia, inmunosupresión, trombocitopenia, anemia
Tracto gastrointestinal	Ulceraciones orales o intestinales
Folículos pilosos	Alopecia
Gónadas	Irregularidades menstruales, disminución de espermatogénesis
Feto	Teratogénesis (especialmente en el primer trimestre)

Los efectos adversos de la quimioterapia son debidos a la poca selectividad que presentan los fármacos hacia las células cancerosas. Es por esto que los fármacos empleados en esta modalidad actúan, por un lado contra células tumorales teniendo efectos citotóxicos, y por el otro, contra tejidos sanos produciendo efectos tóxicos al paciente.^{19,21}



2.2 Dihidrofolato reductasa humana (DHFR)

La DHFR es una enzima clave en el metabolismo del folato, y por lo tanto, en la producción de timidina. Esto lo logra con la reducción de 7,8-dihidrofolato(DHF) a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) mediante una transferencia de hidruro estereoespecífica del cofactor NADPH al átomo C6 del anillo pterina con una protonación concomitante del N5 (Fig. 2). Seguido de esta reducción, el tetrahidrofolato es metilado para formar metilentetrahidrofolato, quien luego metila la deoxiuridinmonofosfato (dUMP) para formar timidinmonofostato (TMP) en una reacción catalizada por la timidilato sintasa (TS). Durante esta reacción, el metileno-tetrahidrofolato es reconvertido a dihidrofolato, y así se completa el ciclo. En este aspecto, se puede deducir que esta enzima es de vital importancia para el crecimiento celular, evento que es crucial en el desarrollo del cáncer.^{28,29,30}

Por lo anterior, la inhibición de la DHFR previene la biosíntesis de timidina y como consecuencia, la biosíntesis de ADN. En adición a esto, la inhibición de dicha enzima puede dar lugar a un incremento de deoxiuridintrifosfato, con lo que se propicia la incorporación de uracilo al ADN en niveles más allá de lo que las enzimas reparadoras de ADN (uracil-DNA-glicosilasa) pueden hacer frente, llevando así a la muerte celular.²⁹

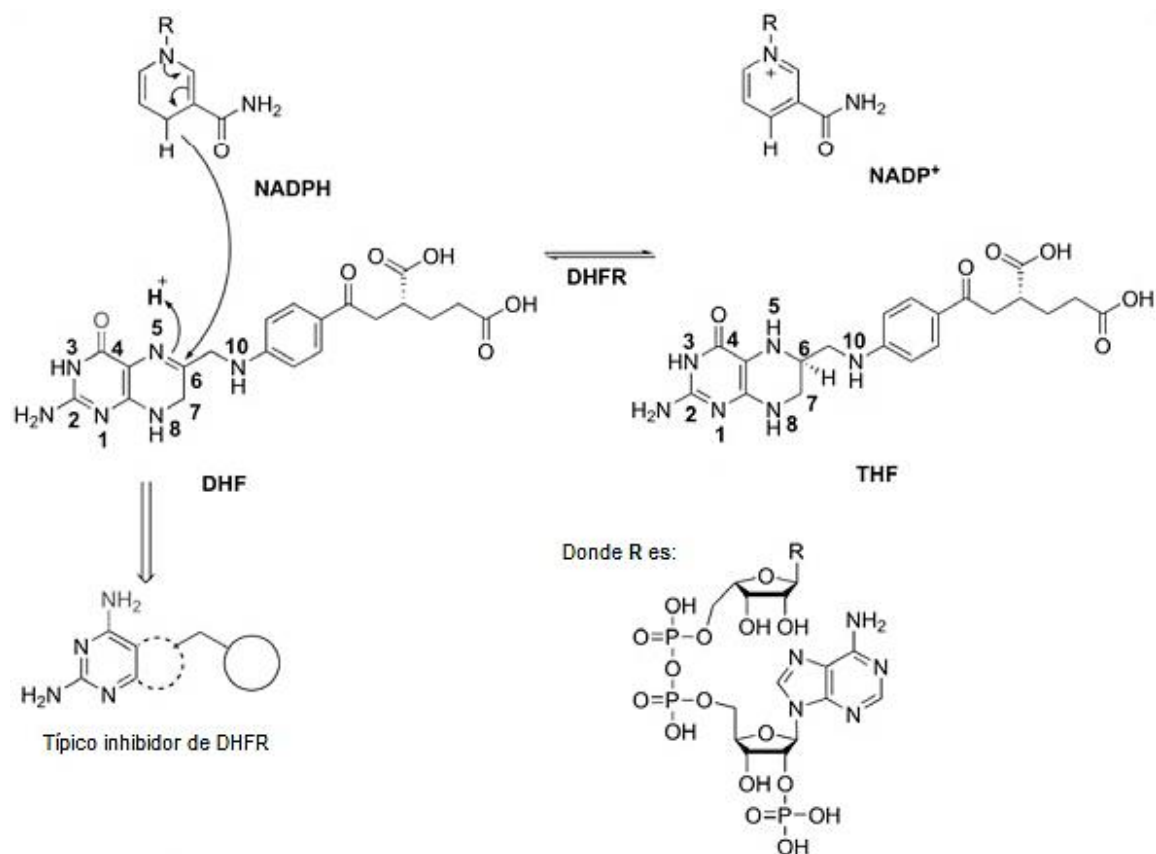


Fig. 2. Reacción catalizada por dihidrofolato reductasa³¹

Los inhibidores de la DHFR han estado en uso clínico durante más de cincuenta años como anticancerígenos, antibacterianos y antiprotozoarios.

En un inhibidor clásico de DHFR, el sistema 2-amino-4-oxo del folato se cambia al sistema 2,4-diamino, lo que aumenta la basicidad de los nitrógenos del anillo 1,3-diazina (Fig. 2). Esta modificación resulta en una protonación aberrante en la posición 1 en lugar de la posición 8 del DHF y por lo tanto, este intermediario no puede aceptar el hidruro y llegar al producto THF. Consecuentemente, el producto final es un intermediario unido a través de un puente de sal al residuo ácido conservado de la enzima.³¹



2.2.1 Dihidrofolato reductasa humana como diana para la búsqueda de antineoplásicos

Es necesario identificar moléculas diana dentro de las células tumorales que permitan la síntesis de nuevos prototipos que ataquen selectivamente a las células malignas logrando aminorar efectos tóxicos en los pacientes y así dar lugar a la terapia dirigida.

Un ejemplo de dicha terapia es el uso de moléculas acopladas a anticuerpos cuyos costos resultan ser muy elevados. Por esta razón se ha buscado sintetizar análogos de sustratos naturales de enzimas y receptores sobreexpresados por células malignas, logrando llevar a la terapia antineoplásica fármacos conjugados con ácido fólico, antimetabolitos inhibidores de la dihidrofolato reductasa (Fig. 3), oligonucleótidos antisentido, toxinas, etc. En este sentido, un ejemplo de antineoplásicos del tipo antimetabolito es el metotrexato, el cual es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR).³²⁻³⁴

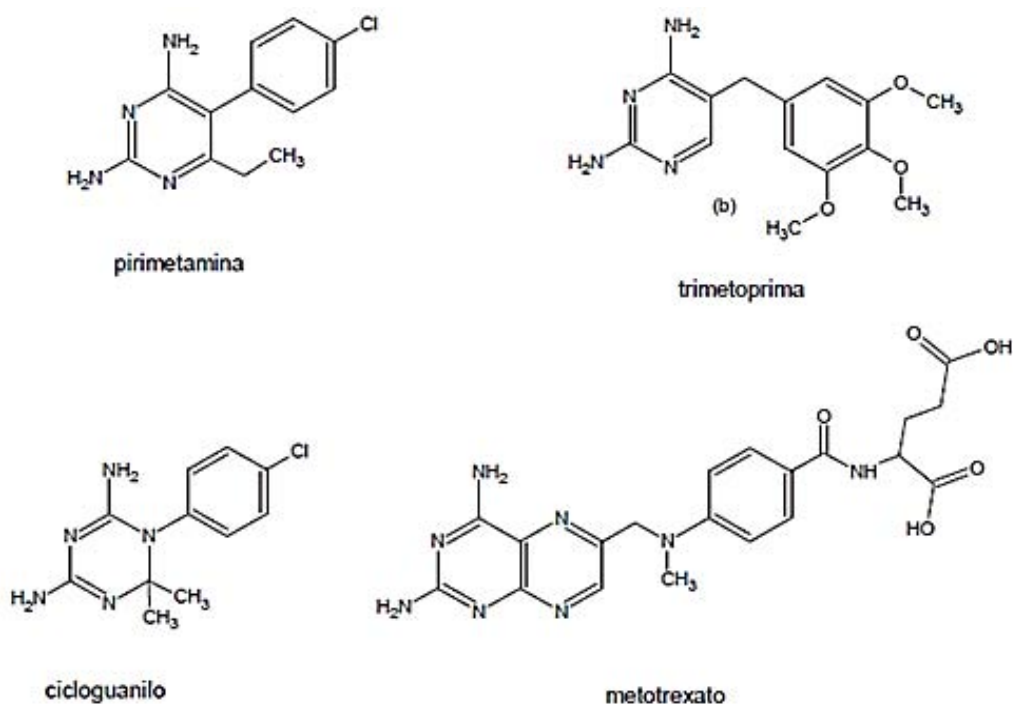


Fig. 3. Fármacos inhibidores de la dihidrofolato reductasa (DHFR)



2.2.2 Metotrexato como compuesto quimioterapéutico antineoplásico

El metotrexato o ácido (2S)-2-[(4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino}benzoil)amino]pentanedioico, es un análogo de la aminopterina o ácido 2-[4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil]amino}benzoil]amino]pentanodioico, un antagonista del ácido fólico, introducido en 1948 para el tratamiento de la leucemia aguda pediátrica, al que sustituyó por su perfil de toxicidad más favorable.³⁴

Este fármaco es llevado al interior de las células mediante transporte activo, posteriormente al interactuar con el sitio activo de la DHFR inhibe la proliferación de las células neoplásicas impidiendo la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas como consecuencia de la inhibición irreversible de la dihidrofolato reductasa, además tiene otros mecanismos de acción que lo convierten en un compuesto de amplio uso en el tratamiento de la psoriasis, artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias.³⁴

Por otro lado, el metotrexato tiene problemas de resistencia en algunas tipos de tumores, poca selectividad a la DHFR hacia las células malignas, y además presenta problemas de inmunosupresión. Por lo anterior se ha llegado a la necesidad de encontrar moléculas cuyo blanco terapéutico sea el mismo pero que presente menos efectos adversos.^{35,36}

2.2.3 Diseño de moléculas análogas

En la actualidad se ha encontrado que el proceso de uso de estructuras de medicamentos comercializados como una base para la investigación de nuevos prototipos resulta en el incremento de la eficacia y la seguridad de los agentes terapéuticos. Por lo anterior, surgen los denominados prototipos análogos. Estas moléculas se dividen en tres categorías:³⁷

- Análogos estructurales: poseen similitudes químicas respecto al fármaco de referencia. En este caso se emplean ligeras modificaciones estructurales



conservando el núcleo de la estructura original con ligeras modificaciones estructurales como es el uso de isómeros, homólogos, isómeros ópticos, homodímeros, etc.

- Análogos funcionales: El grado de relación entre estos y la estructura original es sólo una identificación farmacofórica y por ende la respuesta biológica generada es la misma.
- Análogos directos: Estos poseen similitud estructural y funcional con respecto a la molécula original.

En ciertos trabajos de investigación se han diseñado numerosos inhibidores de DHFR con la intención de contar con moléculas de mayor selectividad, encontrando que algunos análogos de ácido fólico han generado considerable interés como potenciales agentes contra el tratamiento de tumores sólidos resistentes a metotrexato. De los grupos con mayor éxito en este sentido se han encontrado aquellos cuyos núcleos están compuestos por 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ) (Fig. 4).^{28,38,39}

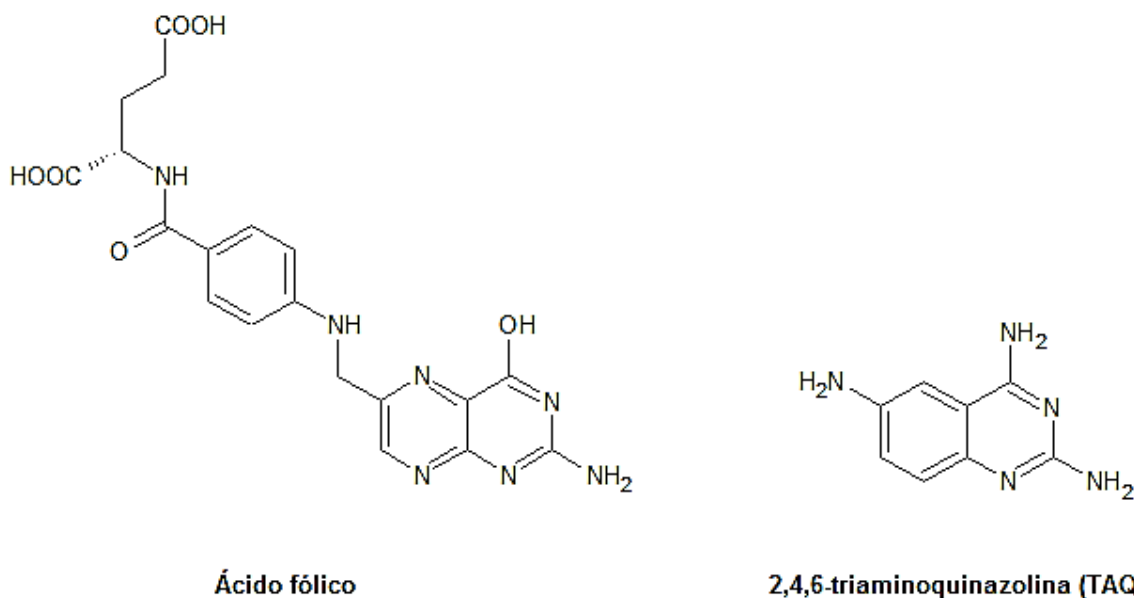


Fig. 4. Comparación estructural entre el ácido fólico y la 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ)



Aunado a lo anterior, se ha demostrado que en la enzima DHFR humana, el canal de unión entre el folato y el sitio de unión NADPH contiene la secuencia Glu20–Asp21, lo que provoca una carga parcial negativa en éste sitio.^{40,41}

Tomando en cuenta esto, se sugiere que si se toma como núcleo análogo del scaffold pteridin del dihidrofolato a la TAQ y se realiza una sustitución que provoque una carga parcial positiva en su posición 6 de la quinazolina, se puede obtener una molécula afín al sitio activo de la DHFR humana.

2.2.4 Importancia de los halógenos en la relación estructura-actividad biológica

El efecto de los halógenos en anillos aromáticos aporta 4 características principales: efectos electrónicos, efectos hidrofóbicos, efectos estéricos y efectos de halogenación obstructiva.

2.2.4.1 Efectos de resonancia o electrónicos

Los efectos electrónicos ejercidos por los halógenos son de resonancia como consecuencia de sus tres pares de electrones libres (Fig. 5).

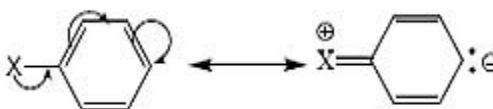


Fig. 5 Efectos de resonancia de halógenos en anillos aromáticos

2.2.4.2 Efectos hidrofóbicos

Es reconocido que uno de los factores que influyen en el comportamiento biológico de un fármaco es la liposolubilidad, la cual es indispensable para que el compuesto atraviese la membrana celular y alcance su sitio de acción a concentraciones terapéuticas efectivas.

Dicho carácter lipofílico está expresado por el coeficiente de partición (P) e indica la relación entre la solubilidad de un compuesto en la fase orgánica (n-octanol) y la fase acuosa.



De acuerdo con lo anterior, la inserción de un átomo de halógeno en la molécula le imparte características hidrofóbicas que aumentan la solubilidad en lípidos y por lo tanto mejoran la absorción del compuesto.

2.2.4.3 Efectos estéricos

Otro aspecto es que en muchos derivados halogenados, el efecto biológico del compuesto es resultado del efecto estérico que ejerce el halógeno. Si se compara el radio atómico de los halógenos, la sustitución de alguno de ellos por el hidrógeno, podría imponer ciertas conformaciones a la molécula lo cual se reflejaría en el desempeño biológico.

2.2.4.4 Efectos de halogenación obstructiva

En general el proceso metabólico que experimentan los anillos aromáticos en el organismo comprenden la hidroxilación (reacción de fase 1) y posteriormente la conjugación con el ácido glucurónico (reacción de fase 2) para formar el correspondiente glucurónido. La presencia de un halógeno en la posición *para* en el anillo aromático previene este proceso (Fig. 6).⁴²

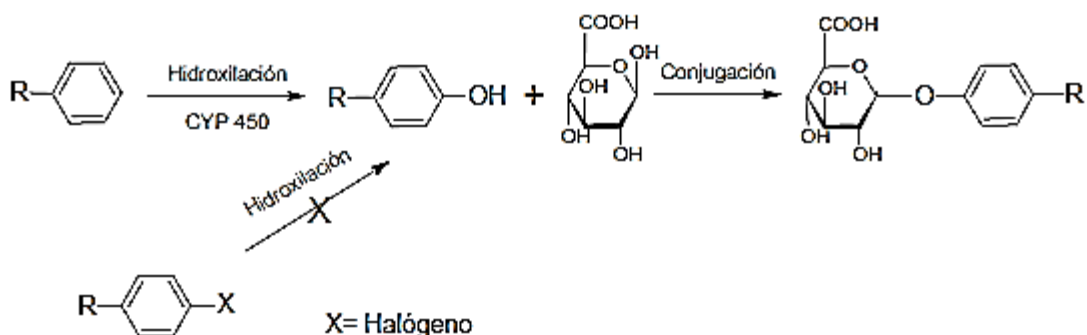


Fig. 6 Efecto de halogenación obstructiva en anillos aromáticos

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad que representa una preocupación para la población mundial debido a sus altas tasas de mortalidad y morbilidad. Si bien, en la actualidad existen compuestos quimioterapéuticos para el tratamiento de la patología en cuestión, estos suelen generar resistencia celular y múltiples efectos adversos. Por lo anterior, ¿existe la posibilidad de encontrar nuevas moléculas con



acción quimioterapéutica que actúen en una diana biológica conocida en las células tumorales de manera selectiva para aminorar el problema de resistencia y además provocar una menor cantidad de efectos adversos?

4. HIPÓTESIS

Si se tienen derivados de la 2,4,6-triaminoquinazolina como análogos de los sustratos naturales de la enzima dihidrofolato reductasa humana y se acoplan en la posición 6 a bencilos sustituidos por grupos flúor en diferentes posiciones, se obtendrán moléculas con un efecto inductivo de desprotección electrónica en dicha posición convirtiéndolas en compuestos afines al sitio activo de la enzima, y por lo tanto tendrán una significativa actividad citotóxica en células cancerosas. Además, los átomos Flúor presentes en las moléculas aportarán los beneficios que ofrecen los halógenos en la relación estructura-actividad.

5. OBJETIVO GENERAL

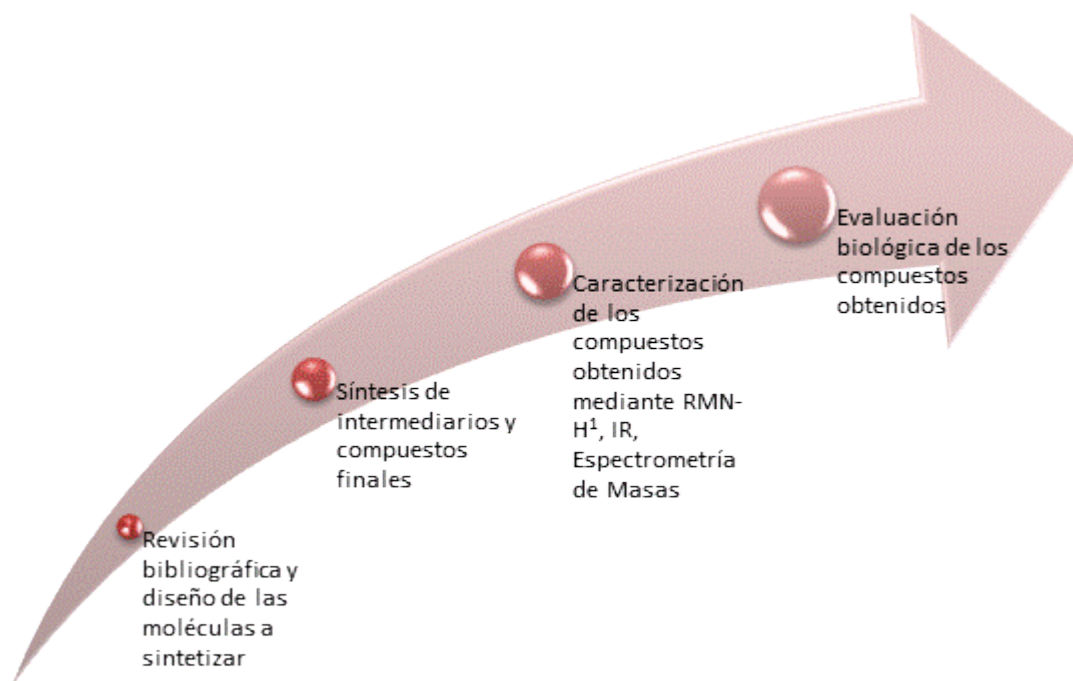
Sintetizar, caracterizar y evaluar *in vitro* moléculas derivadas de 2,4,6-triaminoquinazolina con potencial actividad citotóxica.

5.1 Objetivos específicos

- Sintetizar moléculas análogas al DHF utilizando la 2,4,6-triaminoquinazolina como estructura base (scaffold) y porciones aromáticas fluoradas.
- Purificar las moléculas sintetizadas.
- Elucidar estructuralmente por medio de espectroscopia y espectrometría los compuestos obtenidos y sus intermediarios.
- Enviar a evaluación citotóxica los compuestos finales obtenidos.

6. METODOLOGÍA

Con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados se diseñó una estrategia que consistió en cuatro etapas:



6.1 Revisión bibliográfica y Diseño de moléculas a sintetizar

Dentro de esta etapa se establecieron los objetivos del presente trabajo de investigación.

Posteriormente se establecieron las moléculas finales a obtener (Fig. 7) y se estimó el Log P de éstas con el software Mollinspiration (Tabla 5). Lo anterior fue realizado con la finalidad de estimar teóricamente el carácter hidrofóbico de las moléculas, y su posible distribución en una matriz biológica.

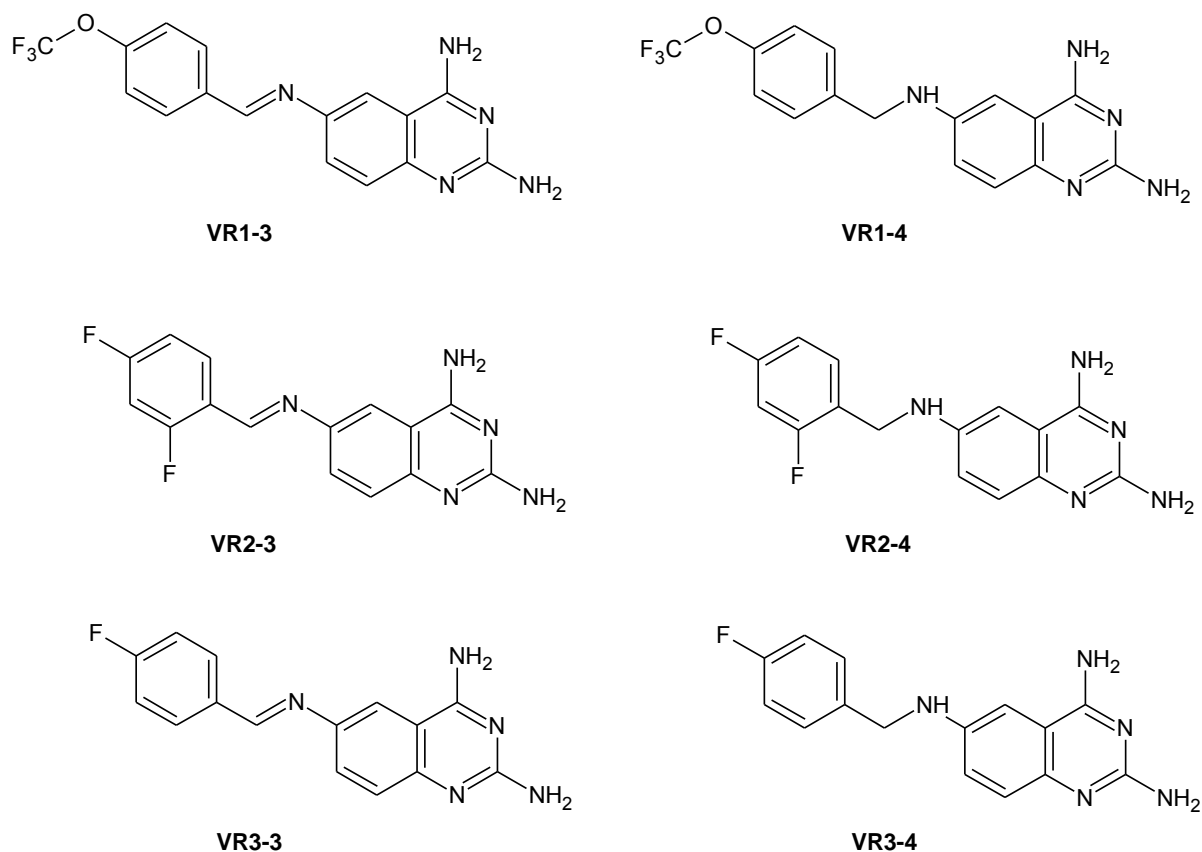


Fig. 7. Moléculas propuestas para síntesis.

Tabla 5. Cálculo del logP de los compuestos a sintetizar (Según software Mollinspiration)

Compuesto final	VR1-3	VR2-3	VR3-3	VR1-4	VR2-4	VR3-4
LogP	3.426	2.712	2.620	3.149	2.435	2.343

Finalmente se utilizó el software Spartan'10 para realizar cálculos teóricos útiles para la obtención de mapas de potencial electrostático de las moléculas a sintetizar, con la finalidad de demostrar que las moléculas propuestas tienen una baja densidad electrónica en el átomo N6.

Los cálculos se realizaron mediante la teoría de Funcionales de la Densidad, utilizando el funcional híbrido B3LYP. Se sabe que los funcionales híbridos son



buenos métodos de cálculo para correlacionar los datos obtenidos de esta forma con los datos experimentales. Esto debido principalmente a que existe una minimización de errores mediante una combinación de métodos de cálculo *ab initio* (basados en la teoría de los primeros principios) y de métodos semi-empíricos (basados en resultados experimentales).⁴³

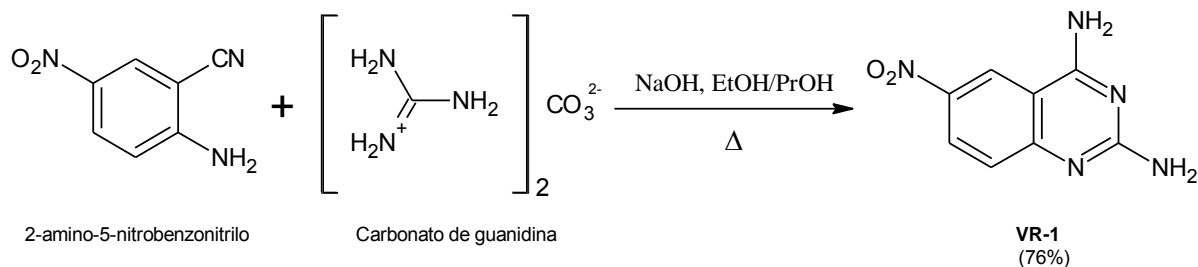
6.2 Síntesis de moléculas propuestas

Para la síntesis de los compuestos presentados en la **Fig. 7**, primero se sintetizó la porción de quinazolina. Posteriormente fueron obtenidos los compuestos iminos, y por último estos fueron reducidos a compuestos aminos.

6.2.1 Síntesis del fragmento quinazolina

La primera parte de la síntesis de esta porción se realizó mediante una ciclocondensación del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo con carbonato de guanidina en medio básico para obtener **VR-1** (**Esquema de reacción 1**), en un proceso previamente estudiado en nuestro grupo de investigación. Posteriormente **VR-1** se sometió a hidrogenación catalítica en fase heterogénea empleando Pd/C (10%) como catalizador, para así dar lugar a **VR-2** (**Esquema de reacción 2**).

6.2.1.1 Síntesis de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (VR-1)



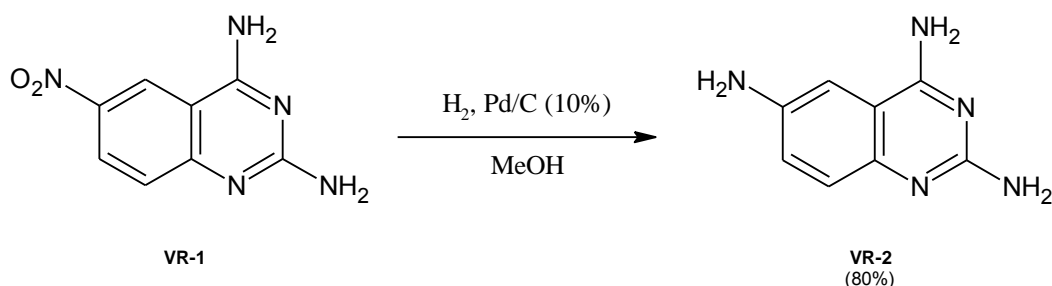
Esquema de reacción 1. Síntesis de VR-1

En un matraz bola de 250 ml se mezclaron 5 g de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (0.031 mol) y 40 ml de propanol con agitación durante 20 min. Por separado, en un vaso de precipitado se disolvieron 2.0635 g de KOH (1.2 eq) en 20 ml de etanol agitando durante 20 min; luego, en este mismo vaso se agregó 4.1414 g de carbonato de guanidina (0.75 eq) y la solución se agitó por 20 min más; después esta solución se añadió al matraz bola y la mezcla se colocó a reflujo en un sistema



provisto con reóstato, canastilla de calentamiento y refrigerante con recirculación de agua por 7 h. Se formó un precipitado naranja, el cual fue filtrado en caliente por vacío. Después, el sólido se lavó repetidas veces con agua hasta que el pH del efluente fuera 7, luego se lavó con etanol hasta obtener un efluente incoloro. Se obtuvieron 4.7790 g de un polvo anaranjado (**VR-1**). Rendimiento: 76%, R.f. 0.4 Sistema I. P.f. 365.8-380.4°C (con descomposición).

6.2.1.2 Síntesis de 2,4,6-triaminoquinazolina (**VR2**)

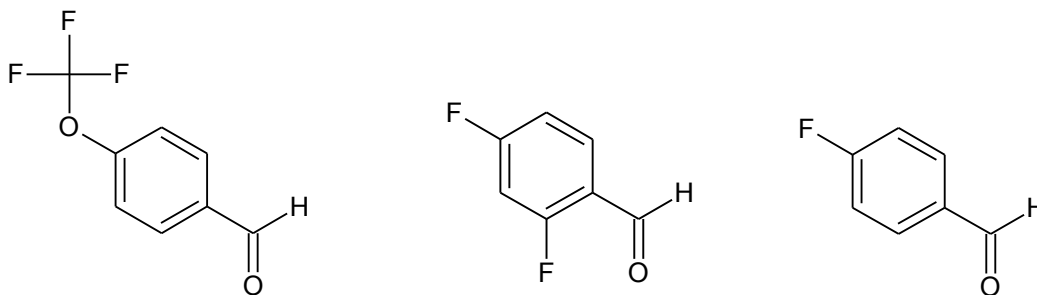


Esquema de reacción 2. Síntesis de **VR-2**

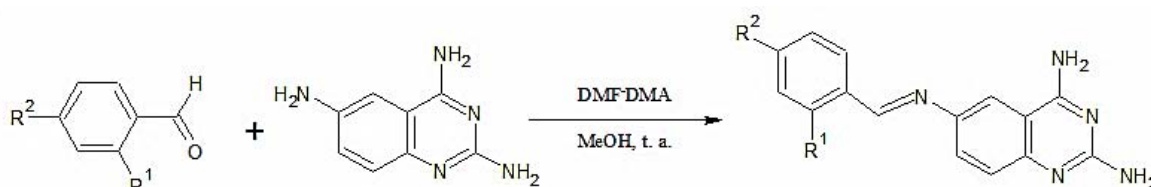
En un frasco de hidrogenación PARR se mezclaron 1 g de **VR-1** (0.006 mol), 100 mg de Pd/C (10%) y 280 ml de metanol; la mezcla se sometió a hidrogenación cargando el sistema con 60 lb/in². La reacción se dejó durante 1 h, consumiéndose 21 lb/in². Posteriormente se filtró a vacío la solución obtenida empleando un embudo de vidrio poroso; la solución amarillo-verdosa obtenida se concentró y se llevó a sequedad obteniéndose 0.8591 g de un polvo amarillo-café (**VR-2**). Rendimiento: 80%, R.f. 0.3-Sistema IV, P.f. 250-252°C (con descomposición).

6.2.2 Síntesis de los compuestos **VR1-3**, **VR2-3**, **VR3-3**. Técnica general

Se utilizó el intermediario **VR-2** y los aldehídos mostrados en la Fig. 8, para obtener las bases de Schiff correspondientes (**Esquema de reacción 3**) obteniendo así los compuestos **VRX-3** (Donde X es el número de benzaldehído empleado y el 3 es el sufijo asignado para los compuestos imínicos).



Aldehído #1. 4-trifluorometoxibenzaldehído Aldehído #2. 2,4-difluorobenzaldehído Aldehído #3. 4-fluorobenzaldehído

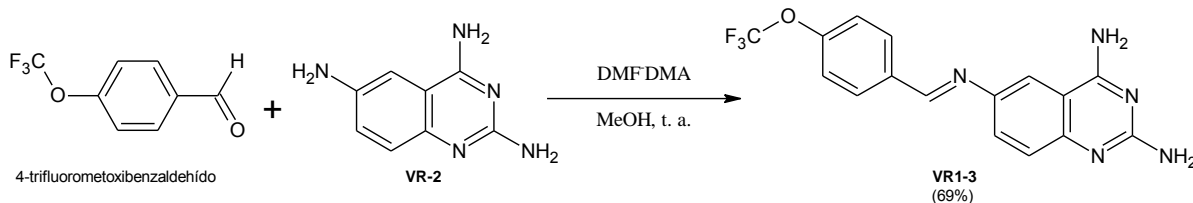
Fig. 8. Aldehídos empleados para la obtención de los compuestos **VRX-3**VR1-3. R1=H, R2=CF₃O

VR2-3. R1=F, R2=F

VR3-3. R1=H, R2=F

Esquema de reacción 3. Síntesis de los compuestos **VRX-3**

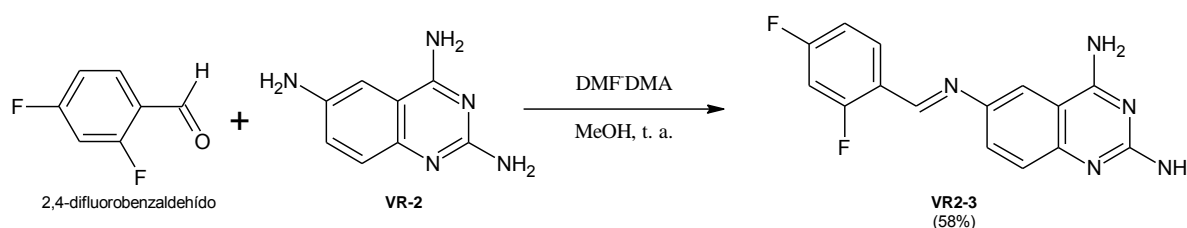
En un matraz bola de 100 ml, se mezclaron 0.5 g de **VR-2** (0.0028 mol) con 5 ml de metanol en agitación por 15 min.; luego de este tiempo se añadió 0.0028 mol del aldehído correspondiente y 8 gotas de Dimetilformamida-Dimetilacetal (DMF-DMA) como agente desecante. La mezcla se mantuvo en agitación provista con atmósfera de nitrógeno durante 24 h. Posteriormente se filtraron por vacío los precipitados formados, para después ser purificados.

6.2.2.1 Síntesis de 2,4-diamino-6-((E)-[4-(trifluorometoxi)enciliden]amino}quinazolina (VR1-3)**Esquema de reacción 4.** Síntesis de **VR1-3**



Se emplearon 0.4 ml de 4-trifluorometoxibenzaldehído y se siguió la técnica general de síntesis de bases de Schiff antes mencionada. Se obtuvieron 683.9 mg de **VR1-3** resultando un rendimiento de 69%. El polvo obtenido amarillo-beige fue purificado mediante recristalización con metanol. El R.f. de este compuesto fue 0.60 empleando Sistema II de elución (Vease Apéndice I) y su P.f. fue 248.0-250.0 °C.

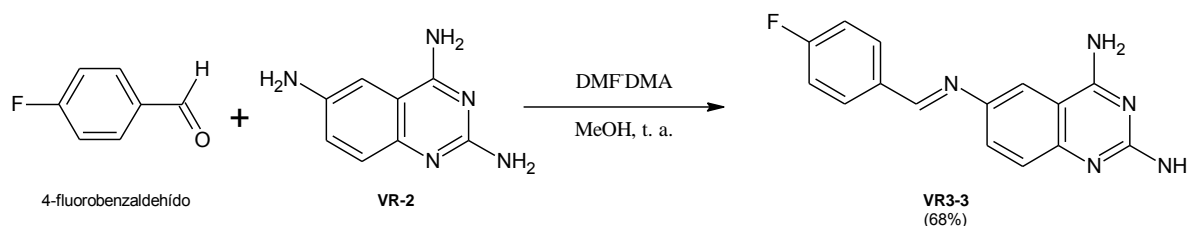
6.2.2.2 Síntesis de 2,4-diamino-6-[(E)-(2,4-difluorobenciliden)amino]quinazolina (VR2-3)



Esquema de reacción 5. Síntesis de VR2-3

Para la obtención de **VR2-3** se siguió la técnica general de síntesis de iminas empleando 0.3 ml de 2,4-difluorobenzaldehído. Se obtuvo un polvo amarillo-naranja con rendimiento de 58%, que se sometió a 5 lavados con metanol frío. El R.f. del compuesto fue 0.58 en el Sistema II de elución (Vease Apéndice I) y su P.f. fue 249.4-250.9°C.

6.2.2.3 Síntesis de 2,4-diamino-6-[(E)-(4-fluorobenciliden)amino]quinazolina (VR3-3)



Esquema de reacción 6. Síntesis de VR3-3

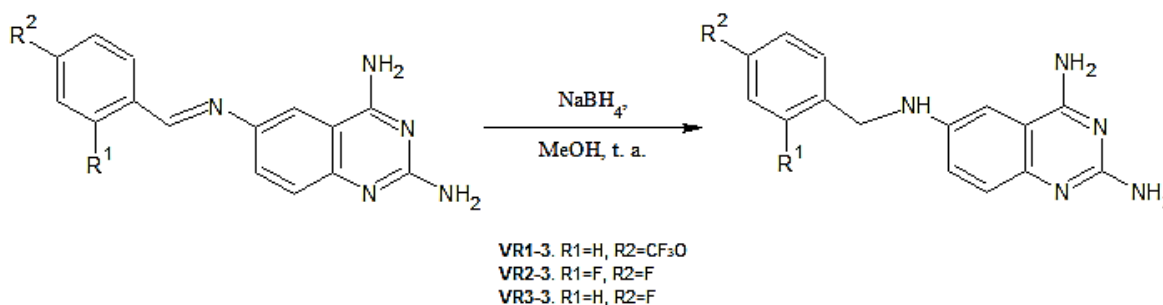
VR3-3 se obtuvo mediante el uso 0.3 ml de 4-fluorobenzaldehído en la técnica general de síntesis de iminas. Se obtuvieron 545.0 mg de un polvo amarillo, el cual fue lavado 3 veces con metanol frío. El rendimiento de ésta reacción fue 68%. El



R.f. de este compuesto fue 0.56 en el Sistema II de elución (Vease Apéndice I) y su P.f. fue 262.3-263.3 °C.

6.2.3 Síntesis de los compuestos VR1-4, VR2-4, VR3-4. Técnica general

Las iminas obtenidas fueron reducidas con borohidruro de sodio en metanol y atmósfera de nitrógeno (Esquema 4) para obtener las aminas secundarias correspondientes: los compuestos **VRX-4** (donde X es el número de benzaldehído empleado y el 4 es el sufijo asignado para los compuestos aminos).

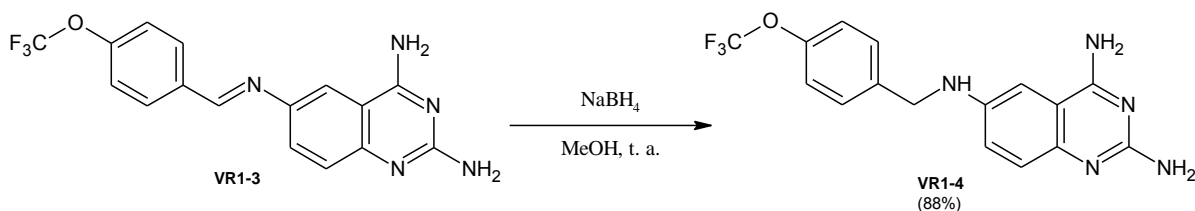


Esquema de reacción 7. Síntesis de los compuestos VRX-4

En un matraz bola de 250 ml, se mezclaron 0.4 g de la imina correspondiente con el volumen de metanol y agitación suficiente para la disolución de la imina. Posteriormente, el matraz se colocó en un baño hielo durante 15 min. Luego se añadió lentamente NaBH₄. Al finalizar la adición del agente reductor, se retiró el baño de hielo y la mezcla se mantuvo en agitación provista con atmósfera de nitrógeno durante 16h. Luego de este tiempo se evaporó el metanol con rotaevaporador y al sólido resultante se le añadió una solución saturada de NaH₂CO₃. Los precipitados obtenidos se filtraron por vacío, para después lavarlos 3 veces con metanol frío.



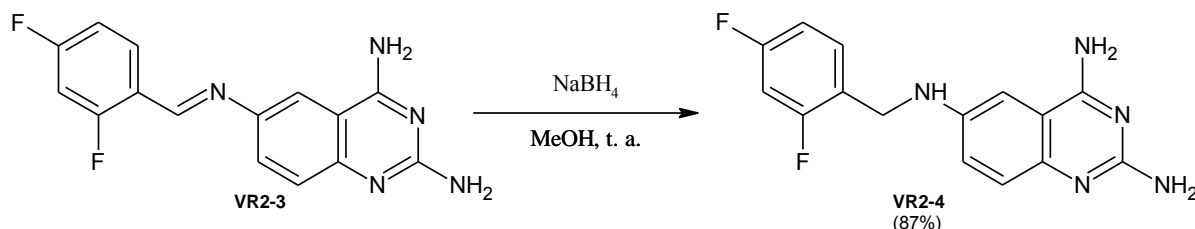
6.2.3.1 Síntesis de 2,4,6-triamino-N⁶-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina (VR1-4)



Esquema de reacción 8. Síntesis de VR1-4

Se emplearon 80 ml de metanol en agitación por 30 min hasta lograr la disolución completa de VR1-3, luego de este tiempo se colocó el matraz en un baño hielo, y se añadió lentamente 0.17 g de NaBH₄ (0.0045 mol) y se siguió la técnica general de síntesis de compuestos aminos. Se obtuvieron 353 mg de un sólido amarillo-verde, con un rendimiento de 88%, R.f. 0.57 en el Sistema II de elución y P.f. 213.0-214.1 °C.

6.2.3.2 Síntesis de 2,4,6-triamino-N⁶-(2,4-difluorobencil)quinazolina (VR2-4)



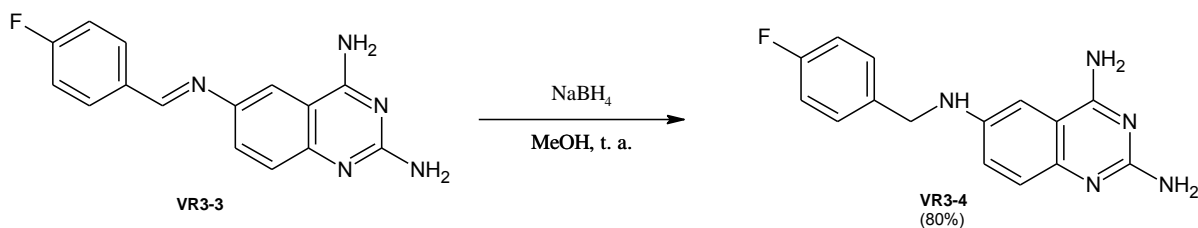
Esquema de reacción 9. Síntesis de VR2-4

Para lograr la disolución completa de VR2-3 se emplearon 120 ml de metanol y agitación por 40 min, luego de este tiempo se colocó el matraz en un baño hielo y posteriormente se añadió lentamente 0.215 g de NaBH₄ (0.0057 mol). Se siguió la técnica general de reducción de iminas, y luego de la evaporación de metanol con rotaevaporador, se obtuvo una sustancia cuya consistencia era similar al del caramelo, a la cual se añadió una solución saturada de NaH₂CO₃ generando un precipitado amarillo-naranja. El precipitado obtenido se filtró por vacío, para después lavarlo 3 veces con metanol frío. Se obtuvieron 350.7 mg de un sólido amarillo. Rendimiento: 87%, R.f. 0.55-Sistema II, P.f. 183.1-184.8°C.



6.2.3.3 Síntesis de 2,4,6-triamino-*N*⁶-(4-fluorobencil)quinazolina

(VR3-4)



Esquema de reacción 10. Síntesis de VR3-4

Se efectuó la técnica general para la obtención de **VR3-4**, en la que fue necesario la mezcla de **VR3-3** correspondiente con 100 mL de metanol en agitación por 30 min hasta lograr la disolución completa de dicha imina, luego de este tiempo se colocó el matraz en un baño hielo, para después añadir lentamente 0.22 g de NaBH_4 (0.0056 mol). Al finalizar la adición del agente reductor se retiró el baño de hielo y la mezcla se mantuvo en agitación provista con atmósfera de nitrógeno durante 16h. Luego de este tiempo se evaporó el metanol con el rotaevaporador y a la pasta resultante se le añadió una solución saturada de NaH_2CO_3 . El precipitado amarillo obtenido se filtró por vacío, para después lavarlo 3 veces con metanol frío. Se obtuvieron 320.5 mg de un sólido amarillo. Rendimiento: 80%, R. f. 0.53-Sistema II, P. f 221.6-222.0°C

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de resultados se divide en tres etapas, esto con la finalidad de ofrecer una mayor comprensión de este trabajo de investigación. La primera sección contempla la obtención de los mapas de potencial electrostático de los compuestos finales sintetizados; la segunda abarca la síntesis y caracterización espectroscópica tanto de los intermediarios como de los 6 productos finales; en ésta se presentan todos los datos fisicoquímicos, espectroscópicos y espectrométricos de dichos compuestos. En la tercera parte se realiza el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación biológica.



7.1 Mapas de potencial electrostático de compuestos finales

Un Potencial Electrostático Molecular (MEP) en un punto químico cuántico es la energía de interacción eléctrica molar entre la molécula y una carga de cierta magnitud situada en tal punto. Por lo tanto, el MEP nos dice la energía de interacción entre una carga no polarizada y la distribución en la molécula de las cargas nucleares y cargas electrónicas.⁴⁴

Los MEP se representan comúnmente mediante un mapa de contorno (mapas de potencial electrostáticos) que muestra las curvas de potencial electrostático constante en un plano particular a través de la molécula o en un plano tridimensional. Los mapas de potencial electrostático de una molécula, suelen mostrar los MEP fuera de la molécula debido a que se consideran solo los orbitales moleculares del último nivel energético; lo anterior ayuda a visualizar tanto las zonas ricas en electrones, como las deficientes de ellos.

Los MEP intervienen en procesos de reconocimiento molecular tales como las interacciones enzima-sustrato y receptor-fármaco.

7.1.1 Mapas de potencial electrostático de VR1-3, VR2-3 y VR3-3

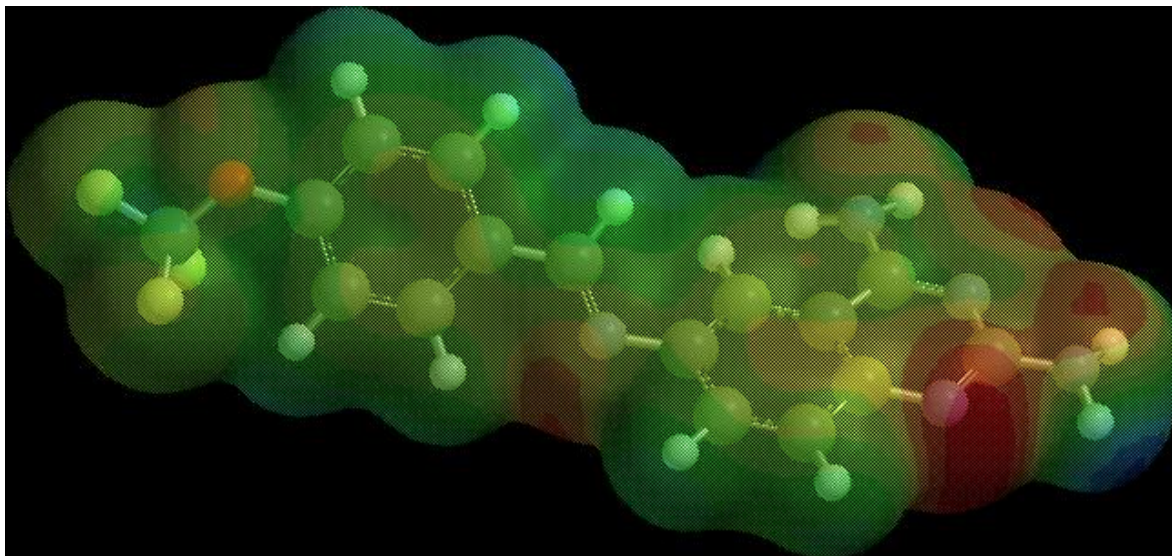


Fig 9. Mapa de potencial electrostático de VR1-3

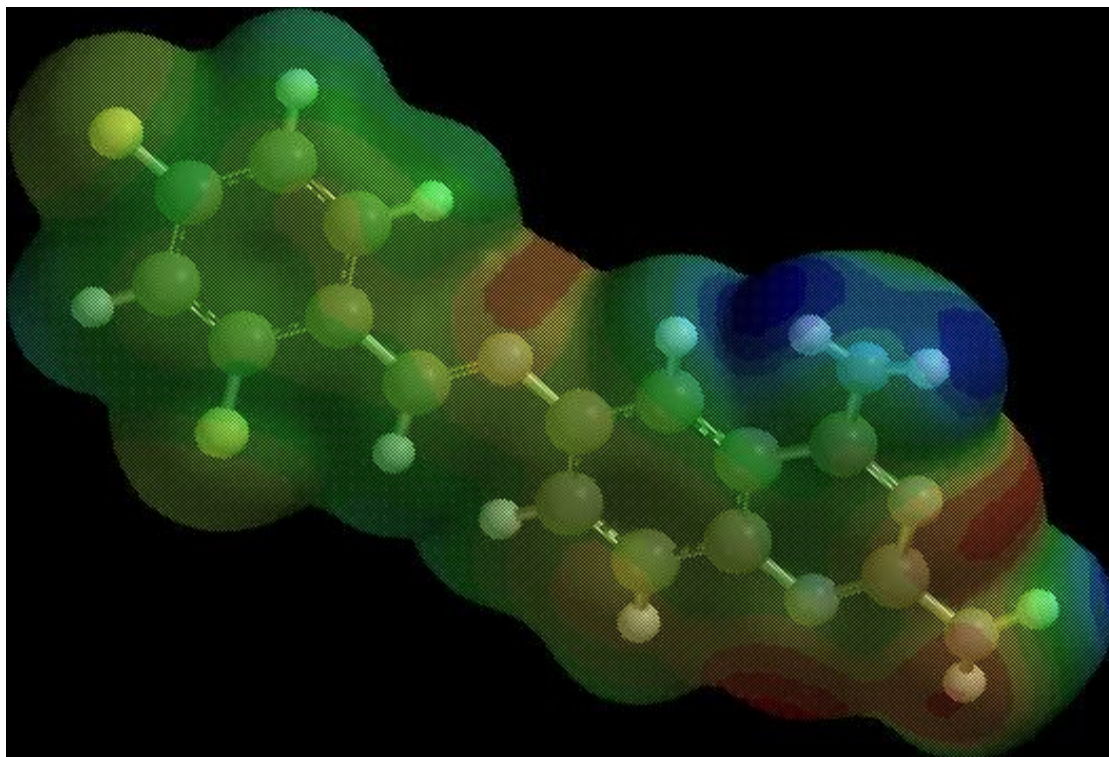


Fig 10. Mapa de potencial electrostático de VR2-3

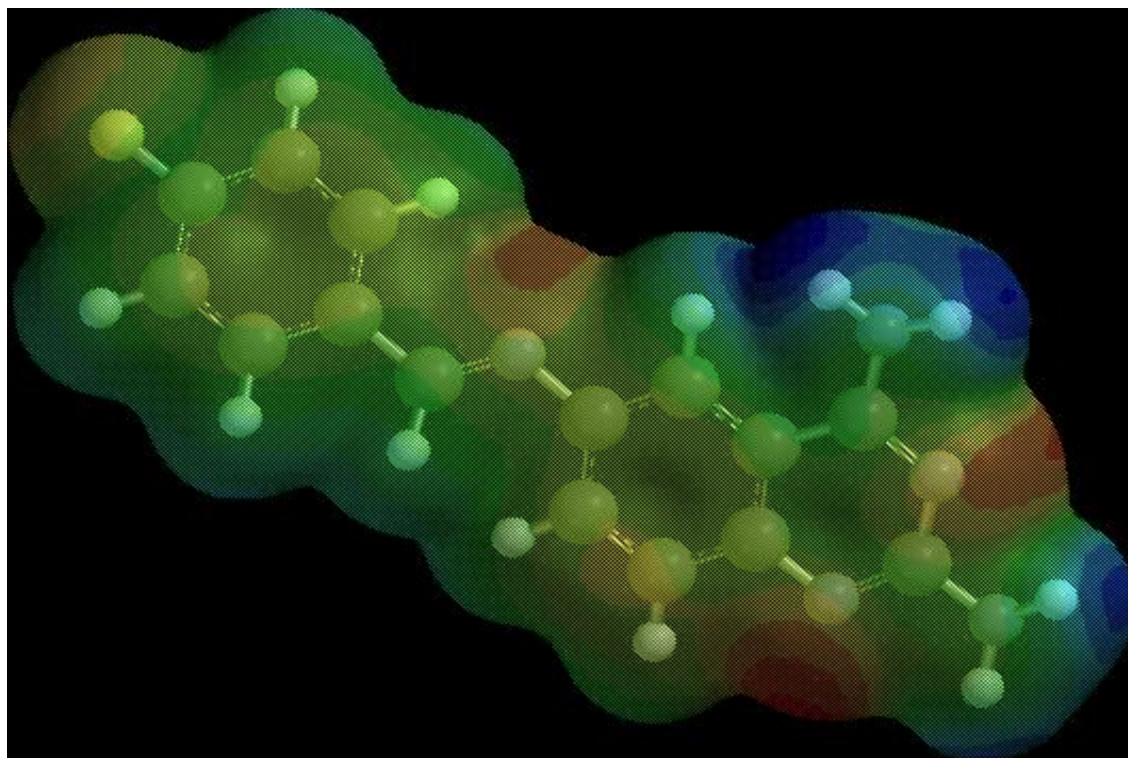


Fig 11. Mapa de potencial electrostático de VR3-3



En un mapa de potencial electrostático la población de electrones decrece en sentido del rojo al azul, pasando por naranja, amarillo y verde. Como se puede observar en las Fig. 9, 10 y 11, los mapas de potencial electrostático de los compuestos **VR1-3**, **VR2-3**, **VR3-3** muestran que los átomos de Nitrógeno de la posición 6 del núcleo de quinazolina presentan una coloración de amarilla a roja, lo que indica que dicha zona tiene una elevada densidad electrónica.

Lo anterior puede justificarse tomando en cuenta que las moléculas en cuestión tienen todos sus enlaces conjugados, desde el núcleo de quinazolina hasta el anillo bencenoide. Por lo que las únicas zonas desprotegidas de electrones son los grupos aminos de las posiciones 2 y 4 del núcleo de quinazolina.

Es probable que las moléculas iminas sintetizadas, las cuales no presentan la característica de tener desprotección electrónica en la región del N6, tengan una baja interacción con el sitio activo de la enzima DHFR.

7.1.2 Mapas de potencial electrostático de VR1-4, VR2-4 y VR3-4

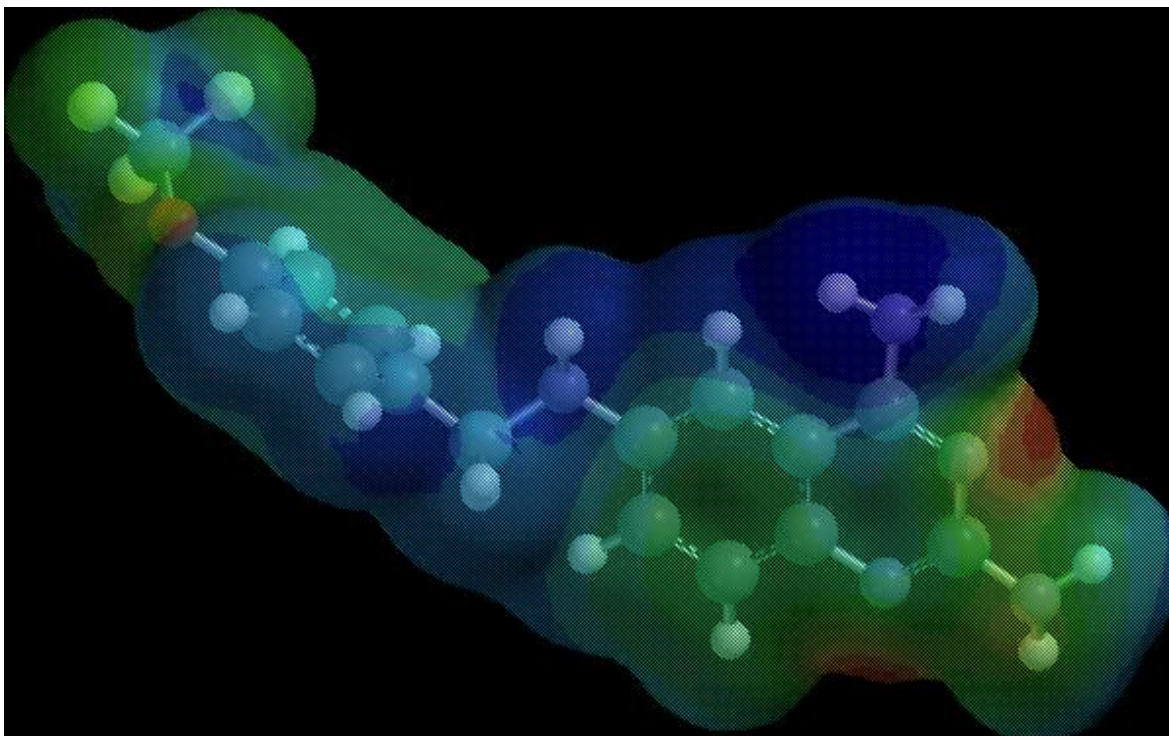


Fig 12. Mapa de potencial electrostático de **VR1-4**

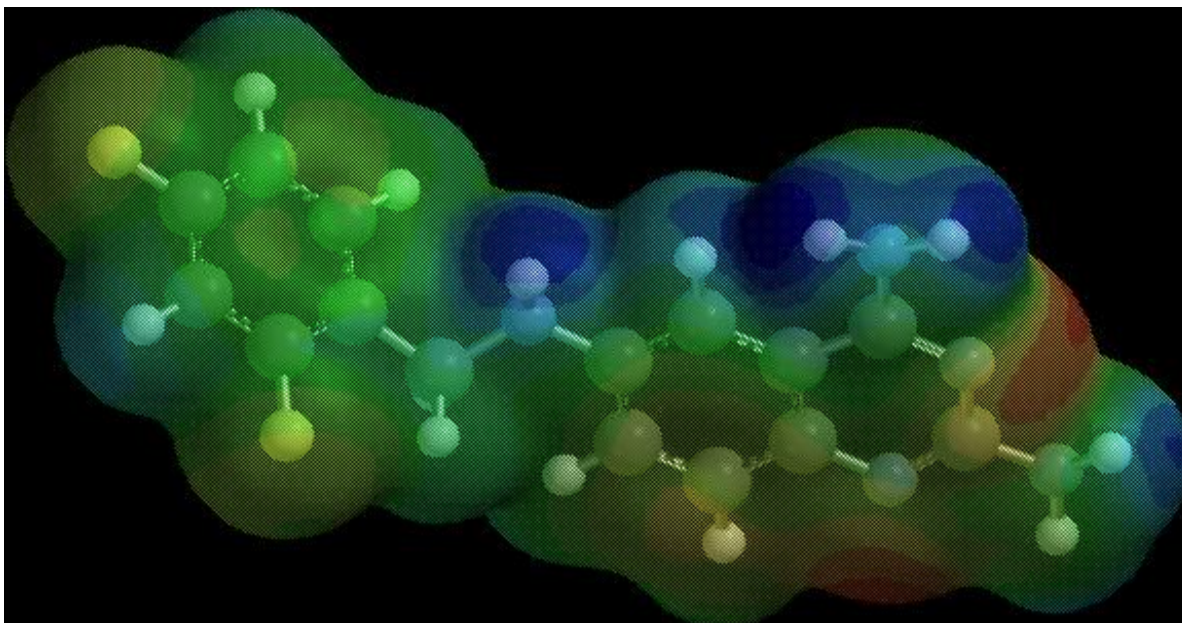


Fig 13. Mapa de potencial electrostático de VR2-4

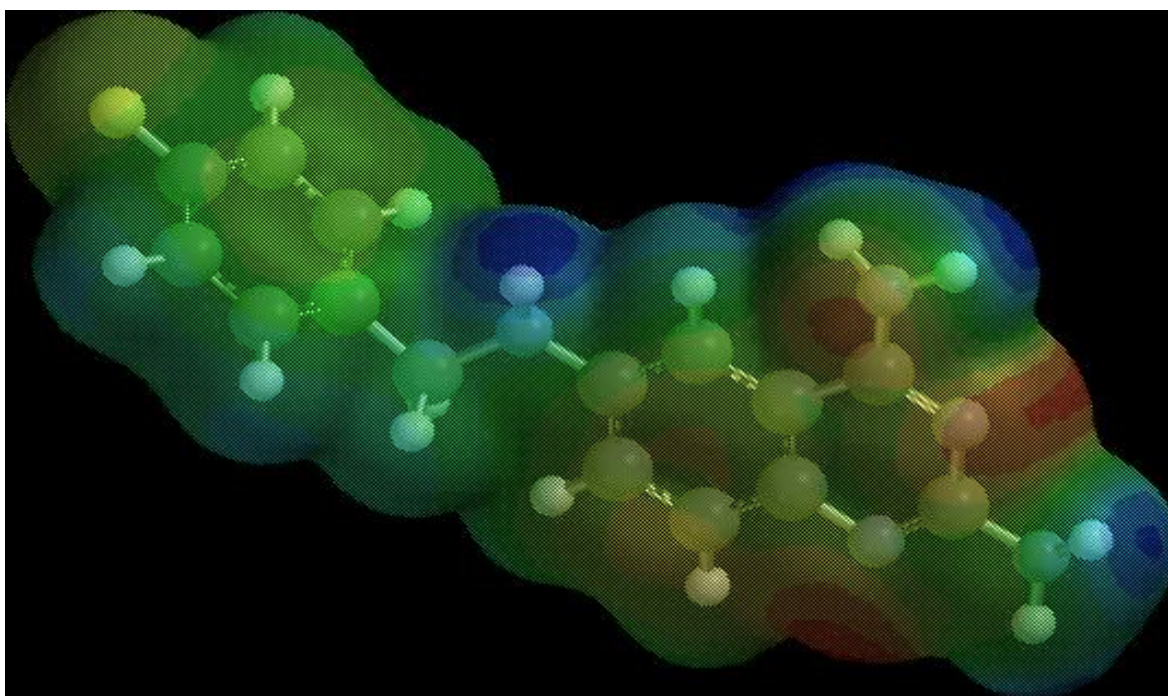


Fig 14. Mapa de potencial electrostático de VR3-4

En las Fig. 12, 13 y 14 se muestra que los compuestos VR1-4, VR2-4 y VR3-4 presentan una baja densidad electrónica en el átomo N6 que aumenta ligeramente en el mismo orden en el que se mencionan las moléculas. Esto debido a que el



grupo trifluorometoxilo en la posición *para* del anillo bencenoide acoplado al núcleo de quinazolina ejerce un mayor efecto inductivo sobre el átomo de nitrógeno en cuestión que los átomos de flúor.

Se debe hacer énfasis al hecho de que en este tipo de moléculas, en las que el conector entre la porción bencenoide y la quinazolina es un metileno, presentan un comportamiento electrónico distinto a aquellas en las que dicho conector es un enlace imínico (serie VRX-3); lo anterior es debido a que el átomo N6 no goza de efectos de resonancia en las moléculas de la serie VRX-4 y por lo tanto, el efecto inductivo generado por los grupos fluorados de la molécula no es afectado, dejando así una carga parcial positiva en el átomo N6.

Asumiendo que las moléculas fueran capaces de llegar al sitio activo de la DHFR, esta baja densidad electrónica en el átomo N6 podría ser favorable para la interacción con los aminoácidos Glu20 y Asp21 del sitio activo de la enzima.

7.2 Síntesis y caracterización de los compuestos planteados

En la Tabla 7 se muestran algunos datos generales de los intermediarios **VR-1** y **VR-2** y de los compuestos finales **VRX-3** y **VRX-4**, donde X es el número de benzaldehído empleado (Tabla 6) y los números 3 o 4 son los sufijos asignados para los compuestos imínicos o aminos, respectivamente.

Tabla 6. Propiedades físicas de los compuestos sintetizados

Compuesto	Sistema de elución*	R. f.	P. f. (°C)	Aspecto y color	Rendimiento (%)
VR-1	I	0.4	365.8-380.4	Polvo anaranjado	76
VR-2	IV	0.3	250.0-252.0	Polvo amarillo-café	80
VR1-3	II	0.6	248.0-250.0	Polvo amarillo	69
VR1-4	II	0.57	213.0-214.1	Polvo amarillo-verde	88
VR2-3	II	0.58	249.4-250.9	Polvo amarillo-naranja	58
VR2-4	II	0.55	183.1-184.8	Polvo amarillo	87
VR3-3	II	0.56	262.3-263.3	Polvo amarillo	68
VR3-4	II	0.53	221.6-222.0	Polvo amarillo	80

P.f.:Punto de fusión/R.f.:Factor de Retención/*La composición de cada sistema de elución se muestra en el Apéndice I

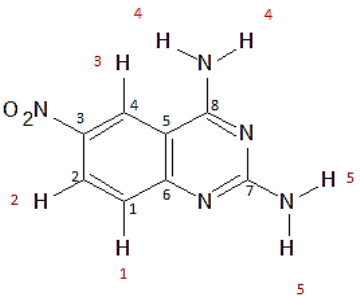
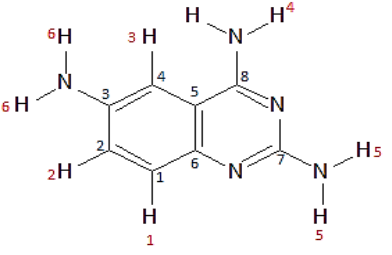


La caracterización de los compuestos sintetizados se realizó mediante espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, IR y EM.

Para fines prácticos de la interpretación de datos, cada uno de los átomos del núcleo de quinazolina fueron etiquetados en la misma secuencia, tanto para el hidrógeno como para el carbono. Esta numeración no fue asignada en base a la de la nomenclatura química de los compuestos.

Los datos espectroscópicos obtenidos se muestran en la Tabla 7.

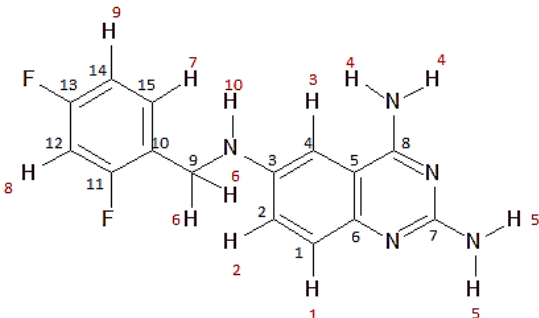
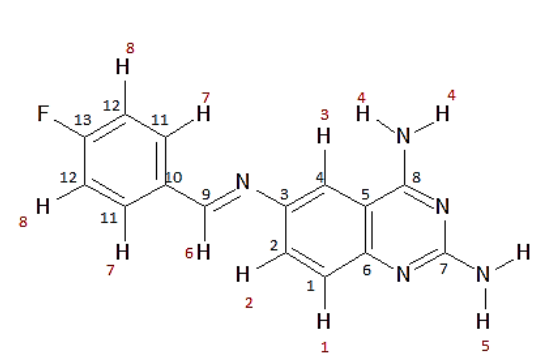
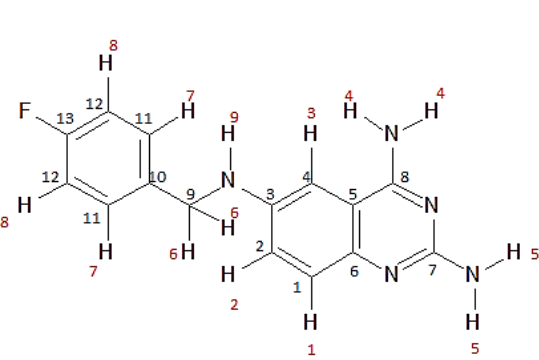
Tabla 7. Caracterización espectroscópica de los compuestos sintetizados.

Estructura	Datos espectroscópicos
 <p>2,4-diamino-6-nitroquinazolina (VR-1)</p> <p>PM= 205.17 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.21 [(H₁)(d, J= 9.2 Hz, 1H)], 8.21 [(H₂)(dd, J= 9.2, 2.5 Hz, 1H)], 9.7 [(H₃)(d, J= 2.5 Hz, 1H)], 7.83 [(H₄)(s, 2H)], 6.76 [(H₅)(s, 2H)].⁴⁰</p> <p>EM[ES(+)] m/z (M+H): 206</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3463, 3440 (N-H), 3106 (C-H_{arom}) 1614 y 1460 (C=C_{arom}), 1661 (C=N), 1325 y 1295 (Ar-NO₂).</p>
 <p>2,4,6-triaminoquinazolina (VR-2)</p> <p>PM= 175.19 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.01 [(H₁)(d, J= 9.2 Hz, 1H)], 6.97 [(H₂)(d, J= 2.2 Hz, 1H)], 6.87 [(H₃)(s, 1H)], 6.95 [(H₄)(d, J= 2.5 Hz, 2H)], 5.48 [(H₅)(s, 2H)], 4.77 [(H₆)(s, 2H)].⁴⁰</p> <p>EM[ES(+)] m/z (M+H): 176</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3399, 3326, (N-H), 3114 (C-H_{arom}), 1559 (C=N), 1559 y 1520 (C=C_{arom}).</p>



<p>2,4-diamino-6-<i>[(E)</i>-[4-(trifluorometoxi)benziliden]amino} quinazolina (VR1-3)</p> <p>PM= 347.29 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.25 [(H₁)(d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H)], 7.61 [(H₂)(dd, <i>J</i> = 8.9, 2.3 Hz, 1H)], 8.01 [(H₃)(d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)], 7.36 [(H₄) (s, 2H)], 6.10 [(H₅)(s, 2H)], 8.77 [(H₆)(s, 1H)], 8.05 [(H₇)(d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H)], 7.51 [(H₈) (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 348</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3444, 3353, (N-H), 3107, 1910, 833 (C=C_{arom}), 1672 (N=C), 1308-1103 (CF₃), 1280 (C-O)</p>
<p>2,4,6-triamino-<i>N</i>⁶-[4-(trifluorometoxi)benzil]quinazolina (VR1-4)</p> <p>PM= 349.31 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 6.93-7.06 [(H₁, H₂, H₃, H₄) (m, 5H)], 5.54 [(H₅)(s, 2H)], 4.32 [(H₆)(d, 2H)], 7.54 [(H₇)(d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H)], 7.31 [(H₈)(d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)], 6.03 [(H₉)(t, 1H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 350</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3445, 3351 (N-H), 3109, 822 (C=C_{arom}), 2852 (CH₂), 1158 (C-O).</p>
<p>2,4-diamino-6-<i>[(E)</i>-(2,4-difluorobenziliden)amino]quinazolina (VR2-3)</p> <p>PM= 299.28 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.47 – 7.20 [(H₁, H₄, H₈, H₉)(m, 5H)], 7.60 [(H₂)(dd, <i>J</i> = 8.9, 2.3 Hz, 1H)], 8.03 [(H₃)(d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H)], 6.11 [(H₅)(s, 2H)], 8.85 [(H₆)(s, 1H)], 8.16 [(H₇)(m, 1H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 300</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3459, 3319 (N-H), 3125, 894, 840 (C=C_{arom}), 1663 (C=N).</p>



 <p>2,4,6-triamino-<i>N</i>⁶-(2,4-difluorobencil)quinazolina (VR2-4)</p> <p>PM= 301.29 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.15 – 6.90 [(H₁, H₂, H₃, H₄, H₇) (m, 6H)], 5.54 [(H₅)(s, 2H)], 4.31 [(H₆)(d, 2H)], 7.22 [(H₈)(m, 1H)], 7.48 [(H₉)(m, 1H)], 5.87 [(H₁₀)(t, 1H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 302</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3479, 3423, 3319 (N-H), 3105, 842, 822 (C=C_{arom}), 1470 (CH₂)</p>
 <p>2,4-diamino-6-[(<i>E</i>)-(4-fluorobenciliden)amino]quinazolina (VR3-3)</p> <p>PM= 281.29 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.25 [(H₁)(d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H)], 7.58[(H₂)(dd, <i>J</i> = 8.9, 2.3 Hz, 1H)], 8.04 – 7.93 [(H₃, H₇)(m, 3H)], 6.10 [(H₅ (s, 2H)], 8.72 [(H₆)(s, 1H)], 7.46 – 7.29 [(H₄, H₈)(m, 4H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 282</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3487, 3441 (N-H), 3112, 830 (C=C_{arom}), 1667 (C=N)</p>
 <p>2,4,6-triamino-<i>N</i>⁶-(4-fluorobencil)quinazolina (VR3-4)</p> <p>PM= 283.30 g/mol</p>	<p>RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 7.08 – 6.94 [H₁, H₂, H₃, H₄) (m, 5H)], 5.61 [(H₅)(s, 2H)], 4.28 [(H₆)(d, 2H)], 7.45 [(H₇)(dd, 2H)], 7.14 [(H₈)(t, 2H)], 5.95 [(H₉) (t, 1H)].</p> <p>EM[FAB(+)] m/z (M+H): 282</p> <p>IR, FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): 3351, 3443 (N-H), 3107, 822 (C=C_{arom}), 2887, 2848 (CH₂)</p>



7.2.1 Síntesis y caracterización de VR-1

Para la obtención del intermediario **VR-1** se llevó a cabo la ciclocondensación del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo y el carbonato de guanidina con 1.2 equivalentes de KOH. Dicha reacción fue monitoreada mediante cromatografía de capa fina (CCF). Al término de la reacción se obtuvo una suspensión que se sometió a un proceso de filtración rápida. Del producto obtenido se registraron los espectros de masas e infrarrojo para confirmar que había sido obtenido conforme a lo esperado, puesto que la elucidación estructural del intermediario en cuestión ha sido estudiada previamente por el grupo de trabajo.⁴⁵

En el espectro de masas, obtenido por electrospray, se aprecia el ion 206 m/z (M+1) correspondiente al peso molecular esperado, más 1.

La espectroscopia de infrarrojo arrojó las bandas en 3463 y 3440 cm^{-1} propias de los estiramientos asimétrico y simétrico de aminas primarias (N-H₂); en 3106 cm^{-1} la banda característica del estiramiento C-H del anillo aromático; en 1614 y 1460 cm^{-1} las bandas de estiramiento C=C del anillo aromático; en 1661 cm^{-1} la banda de estiramiento de C=N; en 1325 y 1295 cm^{-1} de los estiramientos asimétrico y simétrico N=O del grupo nitro unido a un anillo aromático.

7.2.2 Síntesis y caracterización de VR-2

Para la obtención de este intermediario, **VR-1** se sometió a hidrogenación catalítica en fase heterogénea. Al término de la reacción se obtuvo una solución metanólica color amarillo, que fue sometida a evaporación hasta llevar a sequedad para obtener el intermediario **VR-2**. De este producto se obtuvieron los espectros de masas e infrarrojo, por la misma razón que para el intermediario anterior.

En el espectro de masas, obtenido por FAB⁺, se aprecia el ion 176 m/z (M+1) correspondiente al peso molecular esperado, más 1.

La espectroscopia de infrarrojo arrojó las bandas en 3399 y 3326 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos asimétrico y simétrico de aminas primarias (N-



H₂); en 3114 cm⁻¹ la banda correspondiente al estiramiento C-H del anillo aromático; en 1559 cm⁻¹ la banda de estiramiento del enlace C=N; en 1559 y 1520 las bandas de estiramiento del C=C del anillo aromático.

7.1.3 Caracterización de VR1-3

El espectro de masas de este compuesto fue obtenido por FAB⁺, lo cual arrojó el ion 348 m/z (M+1), correspondiente al peso molecular esperado más 1.

En el espectro de infrarrojo se apreciaron las bandas correspondientes a la tensión asimétrica y simétrica de los enlaces N-H de las aminas primarias en 3444 y 3353 cm⁻¹; en 3107 cm⁻¹ la banda de estiramiento del enlace C-H del anillo aromático; en 1910 cm⁻¹ se observaron los sobretonos del anillo aromático p-sustituido de la región bencenoide proveniente del aldehído acoplado al núcleo de quinazolina y en 833 cm⁻¹ se observó la banda propia de la torsión fuera del plano de este mismo anillo; en 1672 cm⁻¹ se encontró la banda de estiramiento del enlace N=C; en 1280 cm⁻¹ la banda característica del estiramiento simétrico del enlace C-O del éter vinílico presente en la molécula; propio de éste enlace debería apreciarse una banda intensa y ancha en la región de 1075 a 1020 cm⁻¹ emitida por la torsión de tijera de éste grupo funcional, sin embargo, se cree que dicha banda puede encontrarse traslapada con las bandas múltiples y complejas que genera el enlace de un átomo de carbono a 3 átomos de flúor que aparecen en la región de 1350 a 1120 cm⁻¹.

El espectro de RMN-¹H mostró, para el anillo de quinazolina, las señales que corresponden al protón H₁ como un doblete en un desplazamiento de 7.25 ppm, con una constante de acoplamiento de 8.9 Hz generada por su acoplamiento orto con el protón H₂; para el protón H₂ registró una señal doble de dobles en 7.61 ppm, con una constante de acoplamiento de 8.9 Hz por su acoplamiento en posición orto con el protón H₁ y otra de 2.3 Hz por su acoplamiento en posición meta con el protón H₃; para el H₃ mostró una señal doble en 8.01 ppm con una constante de acoplamiento de 2.3 Hz generada por su acoplamiento con H₂ en posición meta. Cada una de estas señales integraron para un protón. Los protones



de las aminas del núcleo de quinazolina emitieron señales simples que integran para 2 protones cada una, el desplazamiento de éstas señales se asignó por evaluación del entorno químico de los protones involucrados, llegando así a la conclusión de que la señal en 6.10 ppm fue propia del protón H₅ y la que se encuentra en 7.36 para el protón H₄ (Fig. 15).

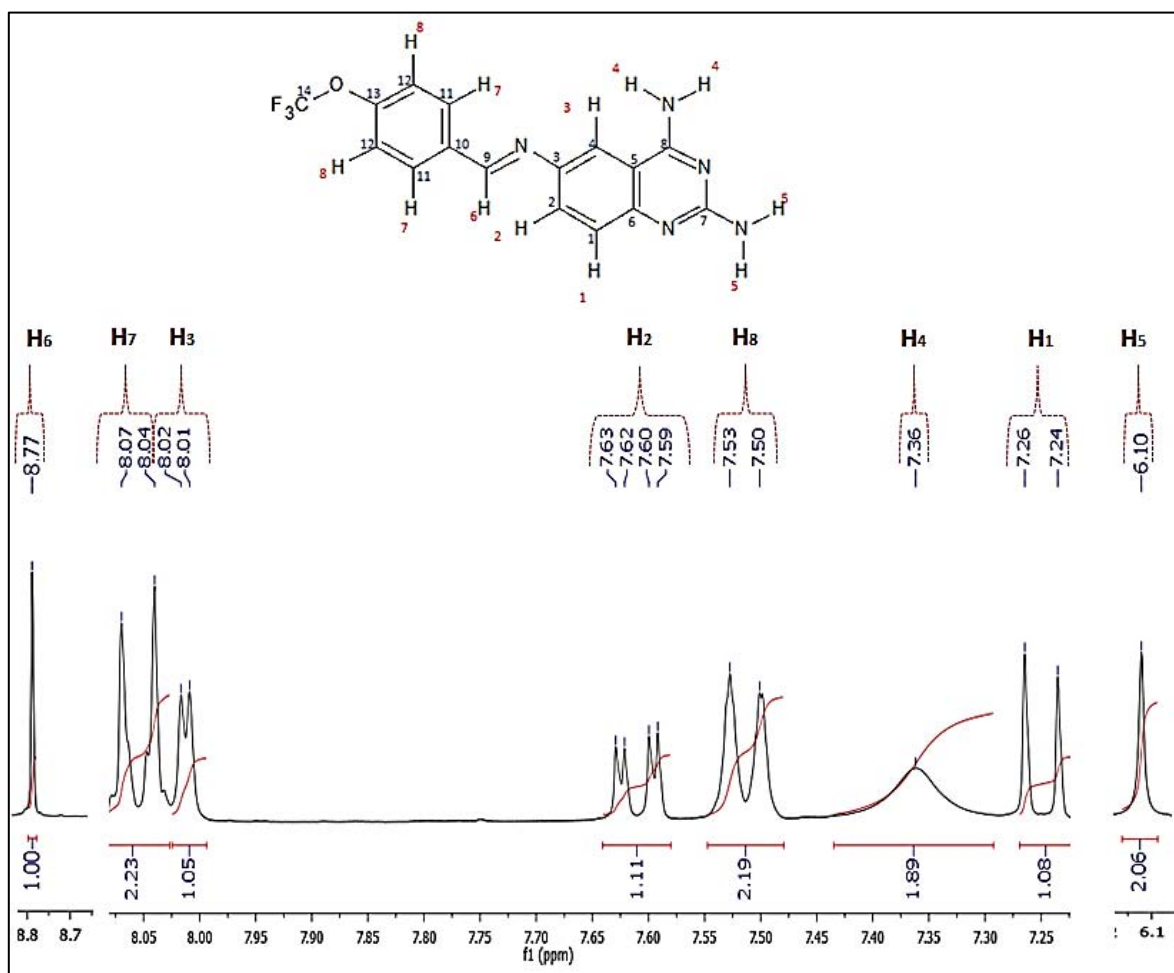


Fig. 15. Ampliación de la región aromática del Espectro RMN-¹H de VR1-3.

Los protones del anillo bencenoide mostraron un doblete para H₇ en 8.05 ppm con una constante de acoplamiento de 8.8 Hz por su acoplamiento en posición orto con el protón H₈, y éste último emitió un doblete en 7.51 ppm con una constante de acoplamiento de 7.9 por efecto del protón H₇ en posición meta.



7.1.4 Caracterización de VR1-4

El espectro de masas por FAB⁺ mostró el ion 350 m/z (M+1), que corresponde al peso molecular esperado más 1.

Los datos espectroscópicos de Infrarrojo mostraron las bandas en 3445 y 3351 cm⁻¹ propias de aminas primarias generadas por la tensión asimétrica y simétrica de los enlaces N-H; en 3109 cm⁻¹ apareció la banda característica del estiramiento C-H del anillo aromático y en 822 cm⁻¹ la banda propia de la torsión fuera del plano de un anillo aromático *para* sustituido que corresponde al bencenoide acoplado al núcleo de quinazolina; en 2852 cm⁻¹ se registró una banda propia del estiramiento asimétrico de los enlaces C-H del metileno conector entre el núcleo de quinazolina y el bencenoide; de las bandas de vibración propias del éter aromático de la molécula, sólo se apreció una en 1158 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento simétrico del enlace C-O, por lo que se asume que la banda esperada entre 1075 y 1020 cm⁻¹ generada por la torsión de tijera del grupo funcional en cuestión se encuentra traslapada con las señales múltiples y complejas entre 1350 y 1120 cm⁻¹ que suelen generar los múltiples enlaces de núcleos de flúor a un átomo de carbono (evento que se observa en el grupo funcional trifluorometoxilo de la molécula).

El espectro de RMN-¹H mostró, para el núcleo de quinazolina, dos señales anchas en 7.04 y 6.96 ppm que integran para 2 y 4 protones, respectivamente; en estas se encuentran traslapadas las señales emitidas por los protones H₁, H₂, H₃ y H₄. Para H₅ se registró una señal simple a 5.54 ppm que integra para dos protones; H₆ generó una señal doble a 4.32 ppm que integra para dos protones; para H₇ se observó un doblete que integra para dos protones con una constante de acoplamiento de 8.6 Hz generada por su acoplamiento con H₈, mientras que para éste último se apreció un doblete que integra para dos protones con una constante de acoplamiento de 8.7 Hz debido a su acoplamiento con H₇; la señal de H₉ se mostró como un triplete que integra para un protón a 6.03 ppm (Fig. 16).

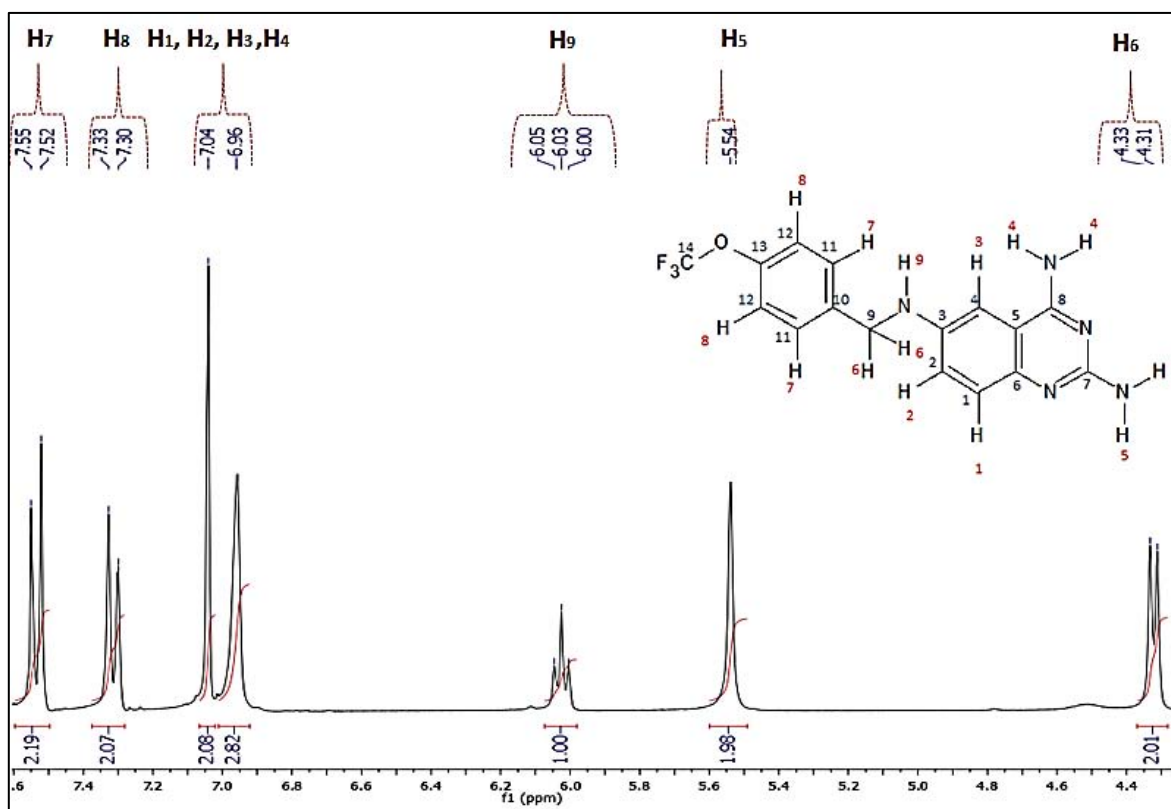


Fig. 16. Ampliación del espectro RMN-¹H de VR1-4

7.1.5 Caracterización de VR2-3

El espectro de masas por FAB⁺ arrojó el ion 300 m/z (M+1), el cual corresponde al peso molecular esperado más 1.

Los datos espectroscópicos de infrarrojo registraron dos bandas correspondientes a aminas primarias en 3459 y 3319 cm⁻¹; la frecuencia de estiramiento del enlace C-H de la región aromática se observó a 3125 cm⁻¹ mientras que a 894 y 840 cm⁻¹ se apreciaron las bandas de torsión fuera del plano propias del anillo bencenoide trisustituido en las posiciones 1, 2, 4 de la molécula; en 1663 cm⁻¹ se encontró la banda generada por el estiramiento del enlace C=N.

El espectro de RMN-¹H mostró para los protones H₁, H₄, H₈ y H₉ del núcleo de quinazolina una señal múltiple que integra para 5 protones que va de 7.47 a 7.20 ppm; para el protón H₂, se observó una señal doble de dobles



a 7.60 ppm que integra para 1 protón y con constantes de acoplamiento de 8.9 y 2.3 Hz debido a su acoplamiento con el protón H₁ en posición para y al H₃ en meta; en 8.03 ppm se presentó la señal generada por H₃ como un doblete cuya constante de acoplamiento es 2.3 Hz debido al acoplamiento meta del protón en cuestión con el H₂; la señal de H₅ apareció en 6.11 ppm como un singulete que integra para dos protones; la señal de H₆, ubicado en el grupo imino, se mostró como un singulete a 8.85 ppm, mientras que la de H₇ lo hizo como una señal múltiple a 8.16 ppm (Fig. 17).

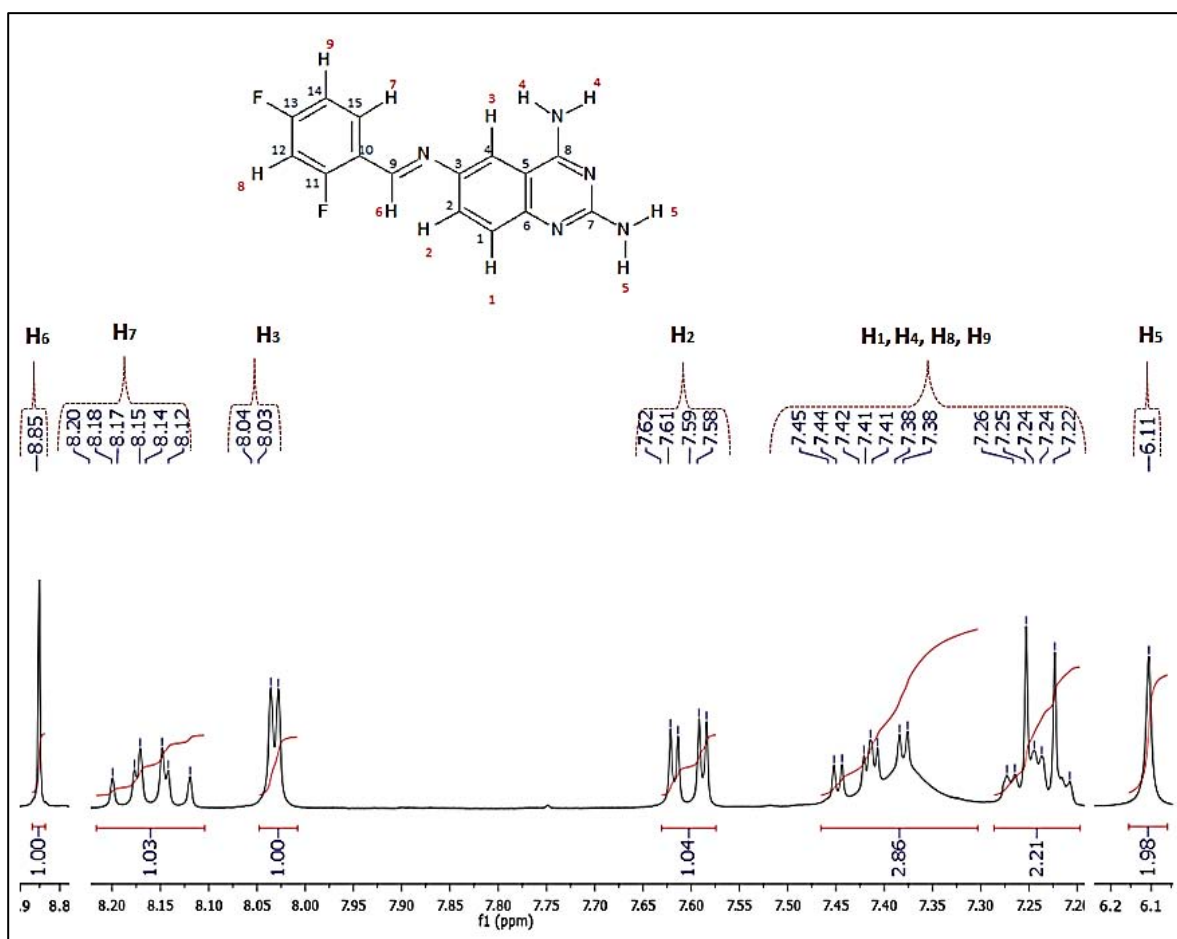


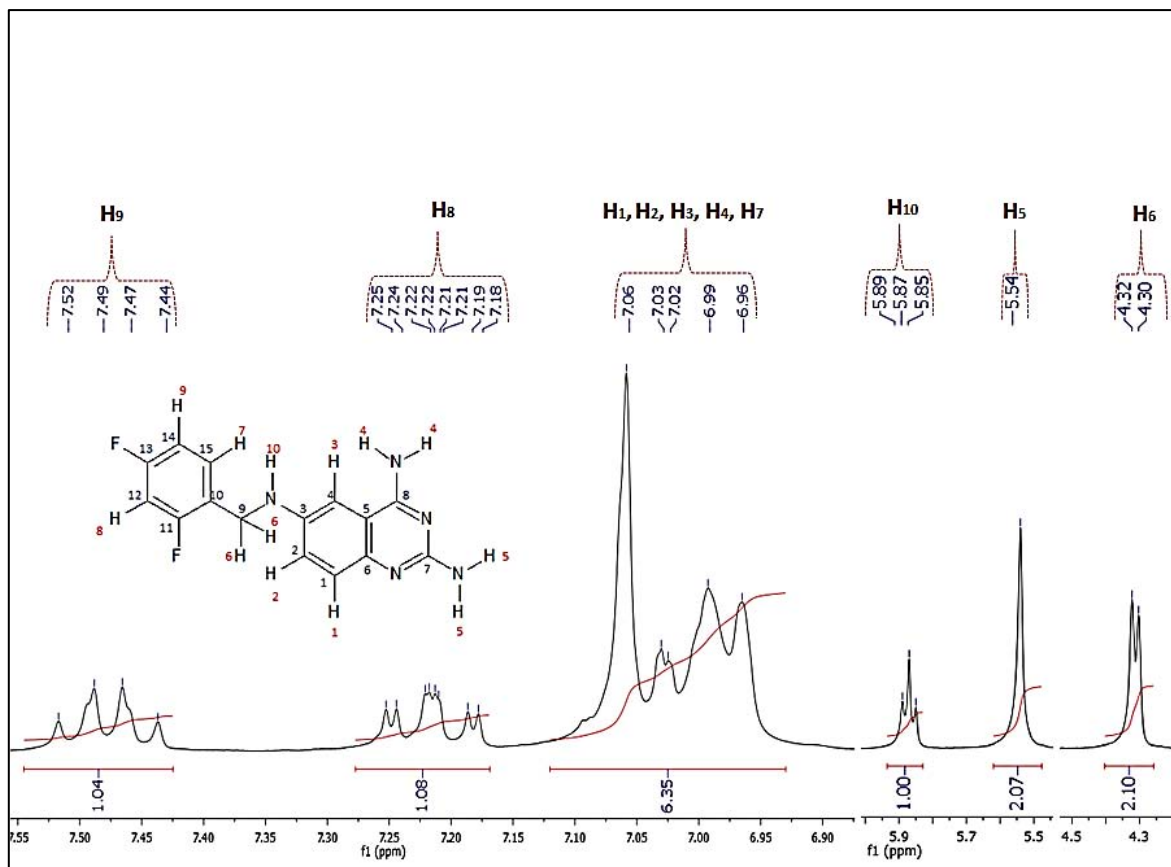
Fig. 17. Ampliación de la región aromática del Espectro RMN-¹H de VR2-3.

7.1.6 Caracterización de VR2-4

El espectro de masas obtenido por FAB⁺ mostró el ion 302 m/z (M+1) que concuerda con el peso molecular esperado más 1.



Por otro lado, el espectro de infrarrojo registró bandas en 3479, 3423 y 3319 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace N-H de las aminas primarias presentes en la molécula; una banda en 3105 cm^{-1} generada por el estiramiento C-H del anillo aromático y bandas en 842 y 822 cm^{-1} indicadores de torsión fuera del plano del anillo aromático 1, 2, 4 trisustituido; la frecuencia de estiramiento C-H del metileno de la molécula se observó a 1470 cm^{-1} .



El espectro de RMN-¹H mostró para los protones H₁, H₂ y H₃ del núcleo de quinazolina una señal que se traslapa con la emitida por el protón H₄ de la amina en posición 4 de dicho núcleo y con el protón H₇ del anillo bencenoide, éstas señales aparecieron de 7.15 a 6.90 ppm; H₅ mostró un singulete a 5.54 ppm que integra para dos protones; la señal de H₆ se determinó como un doblete a 4.31 ppm; en la región del anillo bencenoide, H₈ mostró un multiplete a 7.22 ppm,

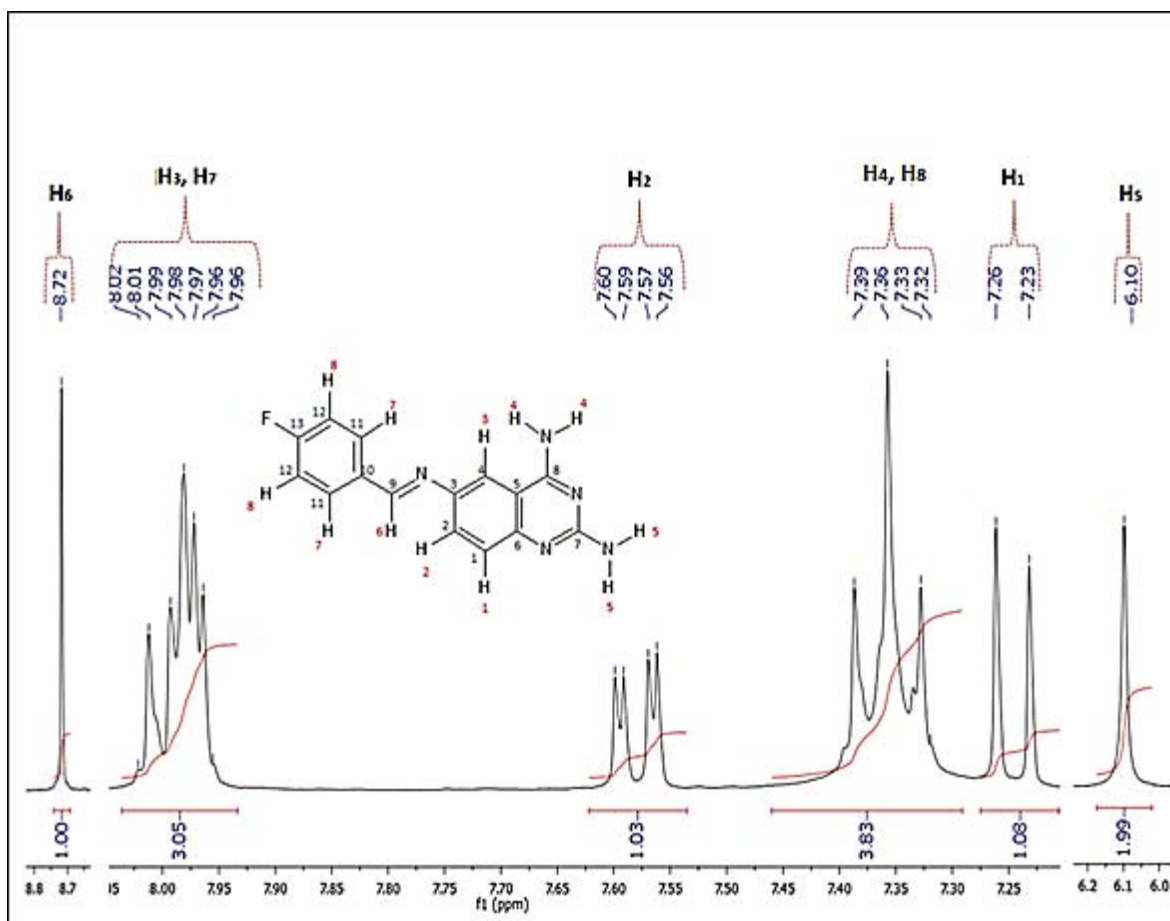


mientras que H₉, a 7.48 ppm, produjo una señal múltiple. La señal triple que se presentó en 5.87 ppm es propia del protón H₁₀ (Fig. 18).

7.1.7 Caracterización de VR3-3

Para el compuesto VR3-3, el espectro de masas por FAB⁺ mostró el ion 282 m/z (M+1), el cual corresponde al peso molecular esperado más 1.

Los datos espectroscópicos de infrarrojo registraron bandas a 3487 y 3441 cm⁻¹ correspondientes a los enlaces de estiramiento simétrico y asimétrico de las aminas primarias; en 3112 cm⁻¹ se apreció una banda correspondiente al enlace de estiramiento del enlace C-H del anillo aromático, mientras que en 830 cm⁻¹ se observó una banda intensa propia de la torsión fuera del plano del anillo aromático 1,4 disustituido de la porción bencenoide de la molécula; la frecuencia de tensión a 1667 cm⁻¹ correspondió al estiramiento del enlace C=N.





El espectro de RMN-¹H mostró para la quinazolina las siguientes señales: para el protón marcado como H₁ un doblete a 7.25 ppm con una constante de acoplamiento de 8.9 Hz debido a su acoplamiento en posición orto con el H₂; para éste último un doble de dobles a 7.58 ppm con constantes de acoplamiento de 8.9 y 2.3 Hz por su acoplamiento en posición orto con H₁ y en posición meta con H₃; para H₃ una señal que se traslapa con la del protón marcado como H₇, dicha señal se encuentra de 8.04 a 7.93 ppm. H₄ se observó como una señal traslapada con la de H₈ a de 7.46 a 7.29, mientras que H₅ se observó como una señal simple ligeramente ancha a 6.10 ppm. A 8.72 ppm se observó H₆ como un singulete, característico del grupo funcional imino (Fig. 19).

7.1.8 Caracterización de VR3-4

El espectro de masas por FAB⁺ mostró el ion 282 m/z (M+1), correspondiente al peso molecular esperado más 1.

Los datos espectroscópicos de infrarrojo registraron dos bandas a 3351 y 3443 cm⁻¹ típicas de aminas primarias correspondientes a las frecuencias de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-H; en 3107 cm⁻¹ se apreció la banda correspondiente al estiramiento del enlace C-H del anillo bencenoide, mientras que a 822 cm⁻¹ se observó la banda intensa característica del anillo aromático p-sustituido de la molécula. A 2887 cm⁻¹ se pudo apreciar la banda de estiramiento asimétrico del enlace C-H del metileno conector entre el núcleo de quinazolina y el anillo bencenoide; de este mismo grupo funcional se apreció la banda a 2848 cm⁻¹ del estiramiento asimétrico.

El espectro de RMN-¹H mostró para H₁, H₂ y H₃ una señal múltiple que se traslapa con la de H₄ y que va de 7.08 a 6.94 ppm; H₅ se mostró como un singulete a 5.61 ppm; en 4.28 ppm se detectó H₆ como un doblete. La señal característica del protón H₇ se presentó a 7.45 ppm como un doble de dobles cuya constante de acoplamiento no resulta exacta debido a que éste protón no solo se acopla a los protones vecinos, sino también al flúor presente en la región bencenoide, lo que



ocurre también con la señal de H₈ que se mostró como una señal ancha triple. La señal perteneciente a H₉ se observó como un triplete a 5.95 ppm (Fig. 20).

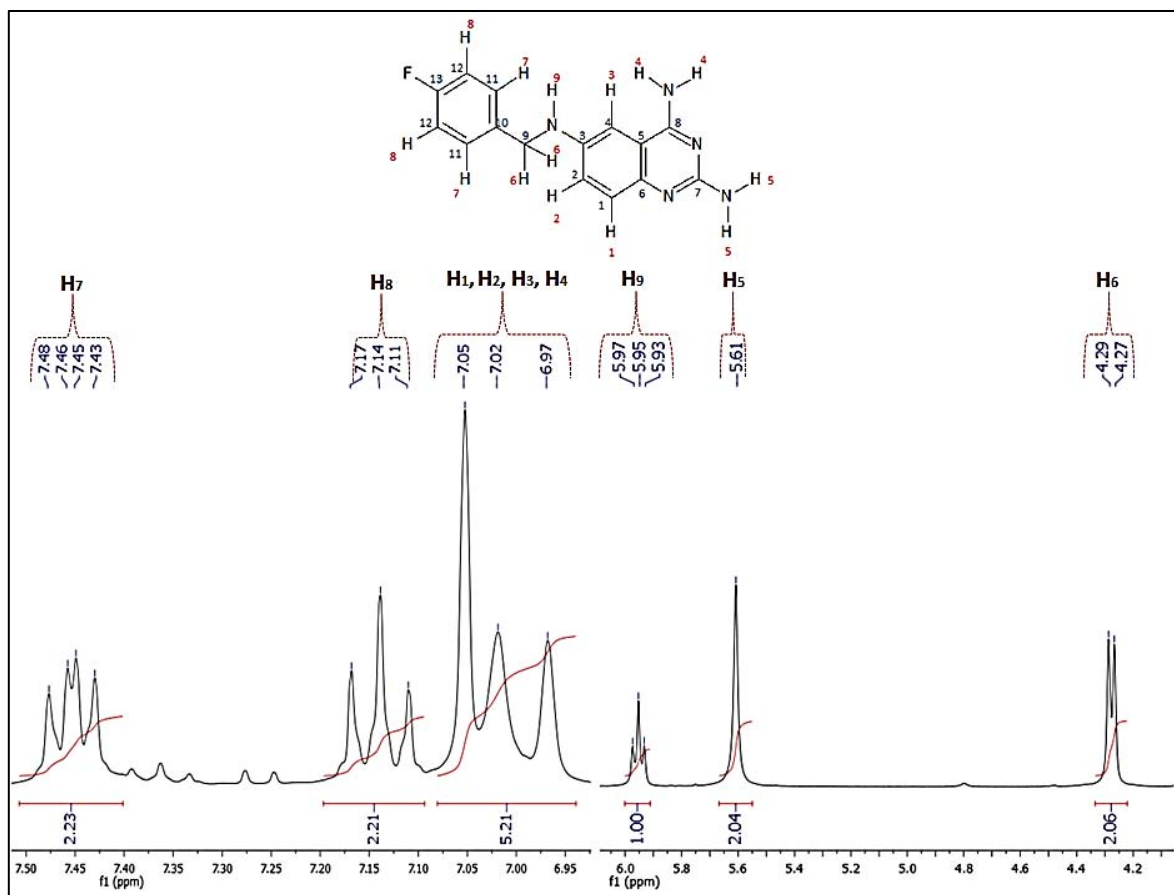


Fig. 20. Ampliación del Espectro RMN-¹H de VR3-4.

7.3 Evaluación biológica

La valoración de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos permite explorar la actividad biológica de productos aislados de diferentes fuentes como primer tamiz en búsqueda de moléculas con potencial actividad anticancerígena.

Se evaluó la sensibilidad de las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cérvico uterino), MCF-7 (adenocarcinoma epitelial mamario) y HCT-15 (adenocarcinoma epitelial colorrectal) a los compuestos sintetizados usando como referencia de actividad al Cisplatino.



El bioensayo se realizó utilizando el método de tinción sulforrodamina B (SRB). Éste es un colorante aniónico de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfonatos $-SO_3^-$ cargados negativamente que le permiten unirse electrostáticamente a cationes.

La técnica general de éste método consiste en que las células deben ser previamente fijadas con ácido tricloroacético, posteriormente se tiñen con SRB, luego se elimina el colorante no fijado y el colorante unido a células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10.5) para leer la absorbancia de dicha solución a 564 nm.⁴⁶ En condiciones ácidas (en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y se fija selectivamente a éstos, por lo que la extracción del colorante unido a células proporciona un índice del contenido de proteína celular.

A partir de los valores obtenidos se calcularon las CI_{50} (Concentración Inhibitoria 50), y se halló que los compuestos no causaron una disminución notoria en la supervivencia celular en las líneas celulares HeLa y HCT-15, sin embargo, lo habían logrado en las MCF-7. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 8. CI_{50} de los compuestos sintetizados en células MCF-7.

Compuesto	CI_{50} (μM)
VR1-3	241.08
VR1-4	8.99
VR2-3	541.04
VR2-4	10.70
VR3-3	208.65
VR3-4	14.65
Cisplatino	15.41

Las Fig. 21 y 22 muestran de manera gráfica los resultados de la Tabla 9, en donde se aprecia el comportamiento de los compuestos iminos y aminos, respectivamente.

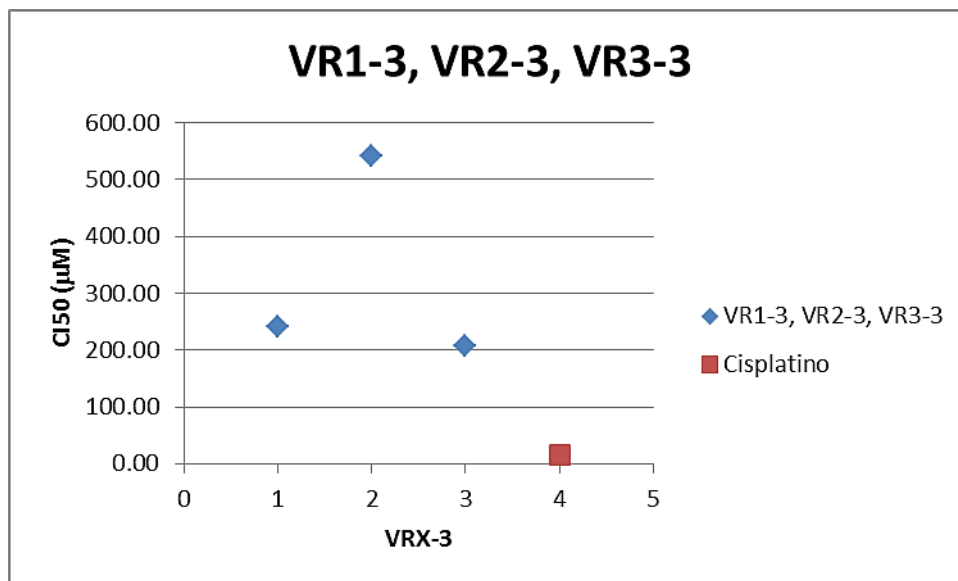


Fig. 21. CI₅₀ de los compuestos imínicos y de cisplatino en células MCF-7

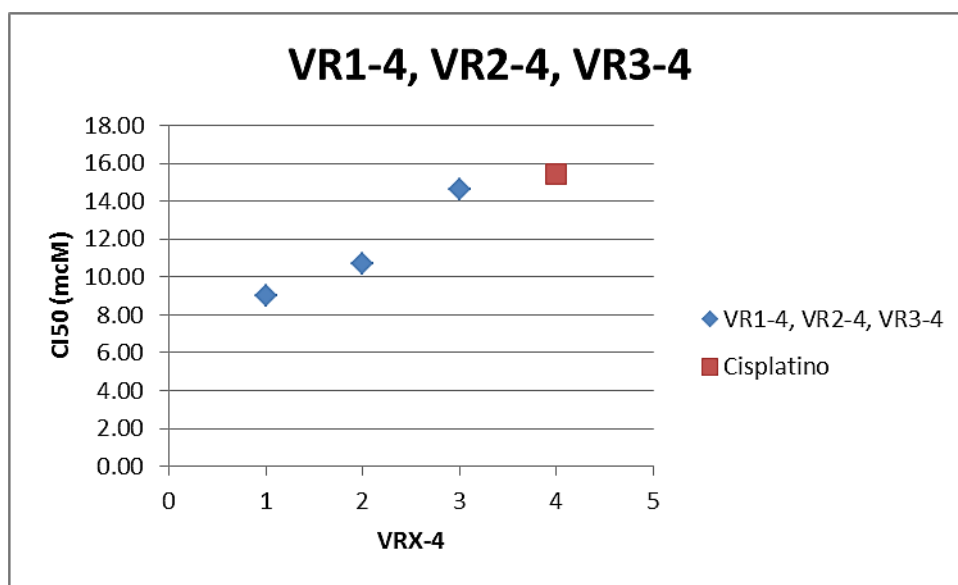


Fig. 22. CI₅₀ de los compuestos aminos y de cisplatino en células MCF-7

Las tres líneas celulares en las que se evaluaron los compuestos sintetizados provienen de humano y son epiteliales, sin embargo se originan en adenocarcinomas de distintos tejidos y por lo tanto poseen características membranales distintas, presentan diferentes contenidos de receptores, y en sí



diferentes características propias del tejido del que provienen.⁴⁷ Lo anterior justifica la selectividad marcada en la línea celular MCF-7.

Es importante resaltar la diferencia de actividad entre los compuestos de la serie VRX-3 y los de la VRX-4, debido a que sólo los segundos mostraron actividades citotóxicas significativas comparadas con la del Cisplatino. Esto nos arrojó la pauta para vislumbrar la posible interacción que logran tener los compuestos como inhibidores de la DHFR, permitiéndonos sugerir que los grupos aminos en la posición 6 de la quinazolina son necesarios para un buen anclaje de la molécula al blanco terapéutico debido a que éstas presentan la desprotección electrónica del átomo N6 necesaria para la interacción de los ligandos con los aminoácidos Glu20-Asp21 del sitio activo de la enzima. Otro factor a considerar es que quizá el enlace amino en la posición 6 del núcleo de quinazolina ofrece la posibilidad de libre giro de la región bencenoide de las moléculas, para un mejor acoplamiento al sitio activo de la enzima en cuestión.

Finalmente se analizó la posible influencia del logP de las moléculas con sus actividades biológicas. Se notó que ninguno de los compuestos presenta excepción a la regla de Lipinski dado que todas tienen un logP similar y menor a 5, lo cual podría sugerir que todas las moléculas presentan un carácter lipofílico similar y por tanto una distribución en matrices biológicas semejante. Dado que la actividad de los compuestos de las series VRX-3 y VRX-4 fue significativamente distinta, se puede inferir que si bien el coeficiente de partición de las moléculas las ayuda a llegar al interior celular, la interacción de éstos con su diana biológica no es la misma.

Por todo lo anterior, resulta necesario efectuar ensayos biológicos que permitan definir la farmacocinética y farmacodinamia de las moléculas evaluadas para definir la razón exacta por la cual se observó este comportamiento en la evaluación biológica de los compuestos.



8. CONCLUSIONES

En este proyecto de tesis se logró la síntesis de 6 compuestos derivados de la 2,4,6-triaminoquinazolina, con rendimientos en general aceptables, y cuyas condiciones de reacción fueron suaves.

Todos los compuestos sintetizados para la realización de este trabajo de investigación fueron caracterizados mediante espectrometría de masas, espectroscopia Infrarrojo, y solo los compuestos finales fueron sometidos a RMN-¹H y RMN-¹³C.

Se observó que de las 6 moléculas sintetizadas, aquellas cuyo conector entre la región bencenoide y el núcleo quinazolina es un metileno, presentaron una actividad citotóxica significativa comparada con la del cisplatino. Esto en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario, para la que presentaron selectividad entre las tres líneas celulares evaluadas.

Fue posible comprobar que la desprotección electrónica del átomo N6 de las moléculas sintetizadas se ve ligada a una significativa actividad citotóxica en células MCF-7.

Los compuestos sintetizados servirán para establecer los requerimientos estructurales de los derivados de 2,4,6-triaminoquinazolina para sentar las bases que desencadenan la actividad biológica citotóxica.

Se adquirieron conocimiento y experiencia en química orgánica para obtener compuestos de interés farmacéutico, cuya relación estructura-actividad fue analizada poniendo en práctica conocimientos adquiridos a lo largo de mi desarrollo profesional.



APÉNDICE 1. Instrumentación

Este apartado detalla la instrumentación utilizada para la obtención de los compuestos sintetizados.

- ❖ Las materias primas (reactivos sólidos) se pesaron mediante el uso de una balanza analítica SARTORIUS, Inventario 167840
- ❖ Para la evaporación de solvente a presión reducida se empleó un rotaevaporador marca BÜCHI modelo R-215, acoplado a bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador CVC2, a un baño BÜCHI modelo B-491y a un enfriador marca VWR Wscientific modelo 1107.
- ❖ Para la determinación de puntos de fusión se utilizó un aparato BÜCHI modelo B-540 con capilares de vidrio.
- ❖ La hidrogenación catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación marca PARR, modelo 3916 EG, adaptado a un tanque de hidrógeno de la casa INFRA.
- ❖ Determinación de espectros IR: Espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Pekin Elmer.
- ❖ Determinación de espectros de masas: Espectrómetro de masas Waters, Synapt 2GS.
- ❖ Determinación de espectros Resonancia Magnética Nuclear: Espectrómetro de RMN de 7.2 T, marca Varran, modelo Unity Inova.

CROMATOGRAFÍA

Para el monitoreo del progreso de las reacciones, así como para la determinación de la pureza de los compuestos sintetizados se utilizó cromatografía en placa fina en donde se emplearon cromatoplasmas de la casa Analtech-Uniplate recubiertas con gel sílice GF 250 y los siguientes sistemas de elución:



Sistema	Composición
I	Cloroformo/Metanol (8:2)
II	Cloroformo/Metanol (6:4)
III	Cloroformo/Metanol (6:4)
IV	Cloroformo/Metanol/NH ₄ OH (8:2:1)
V	Cloroformo/Metanol/NH ₄ OH (6:4:1)

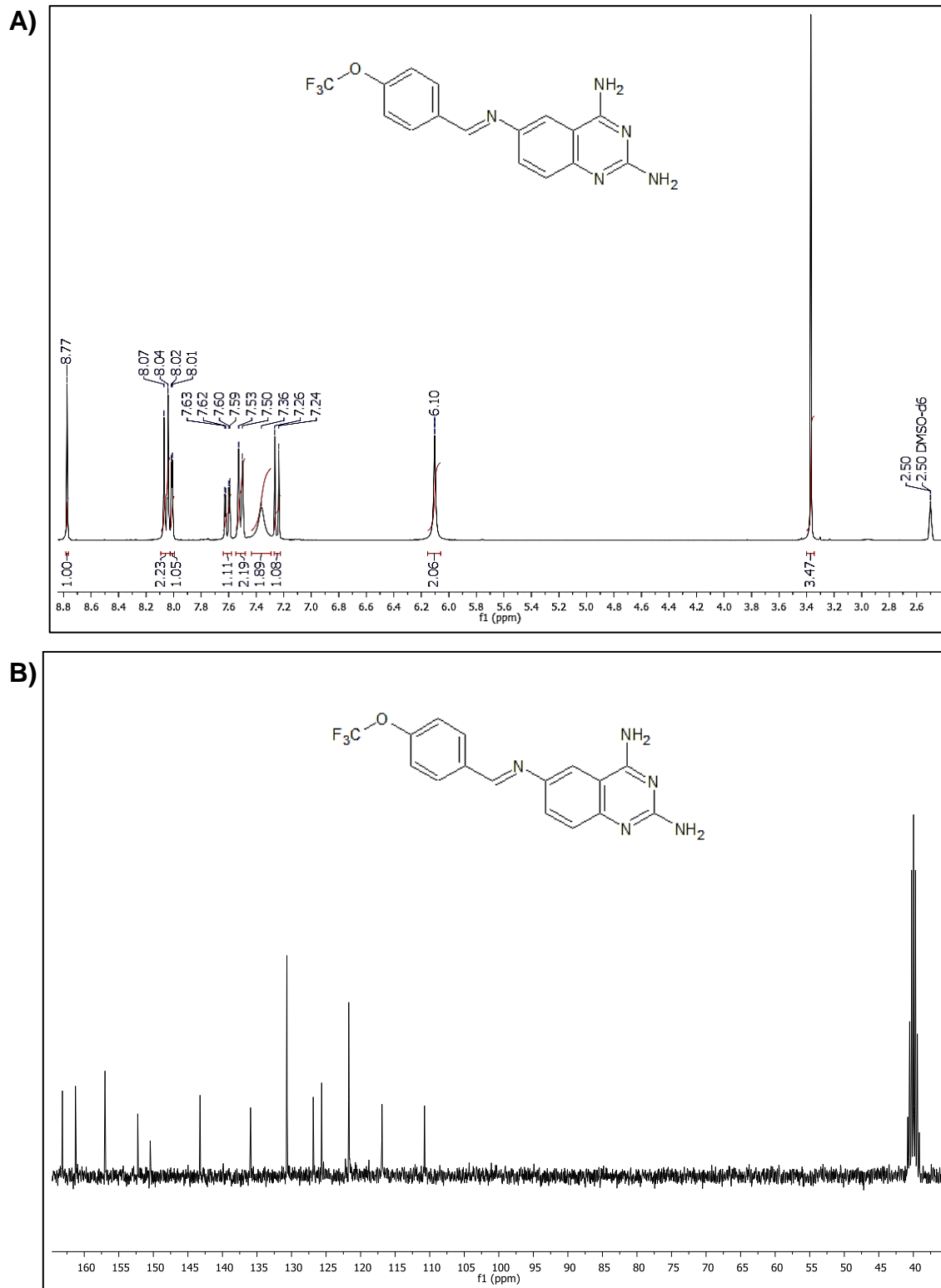
APÉNDICE 2. Colección de espectros de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EM

Fig. 23. Espectro de A) RMN-¹H y B) RMN-¹³C de la 2,4-diamino-6-((E)-[4-(trifluorometoxi)benzylidene]amino)quinazolina (VR1-3)



A)

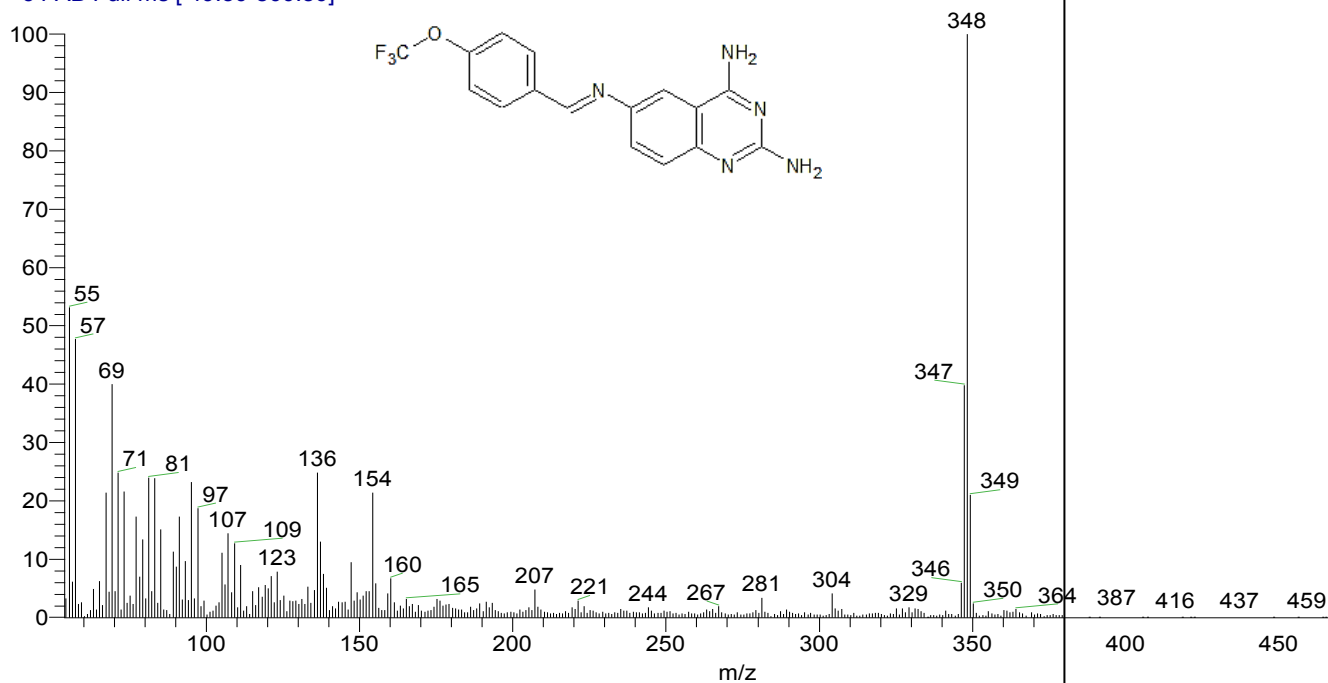
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\VR1-3__1_1

12/3/2014 11:10:35 AM

szComment

VR1-3__1_1 #2-3 RT: 0.11-0.21 AV: 2 NL: 4.17

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



B)

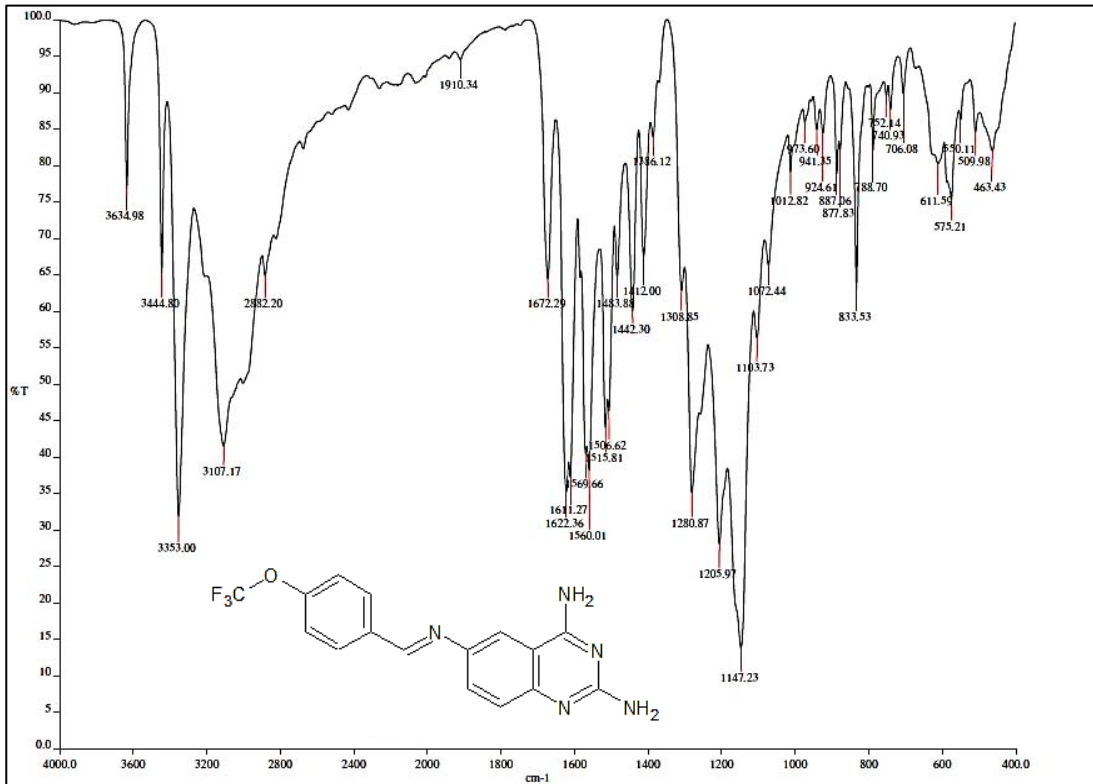


Fig. 24. Espectro de A) Masas y de B) Infrarrojo de la 2,4-diamino-6-((E)-[4-(trifluorometoxi)benzylidene]amino)quinazolina (VR1-3)

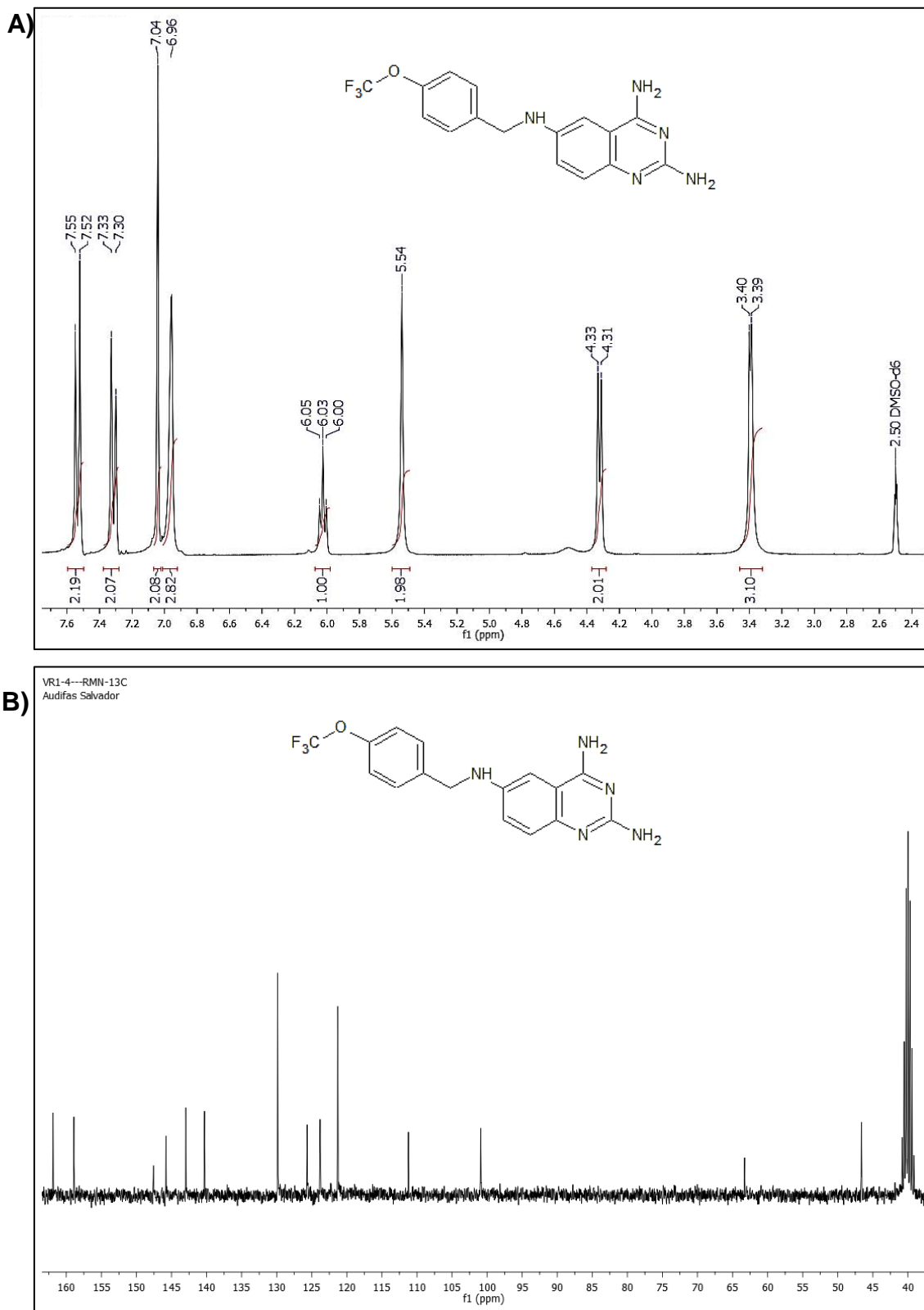


Fig. 25. Espectro de A) RMN-¹H y B) RMN-¹³C de la 2,4,6-triamino-N⁶-[4-(trifluorometoxi)bencil]quinazolina (VR1-4)

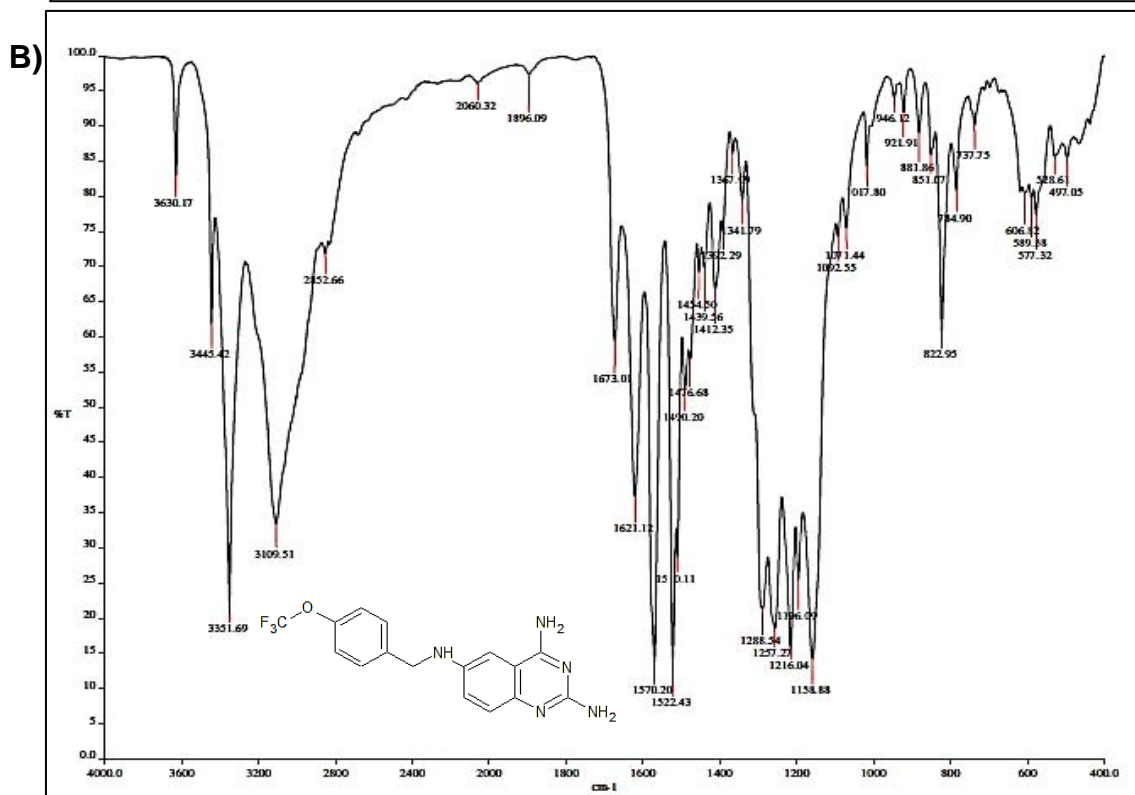
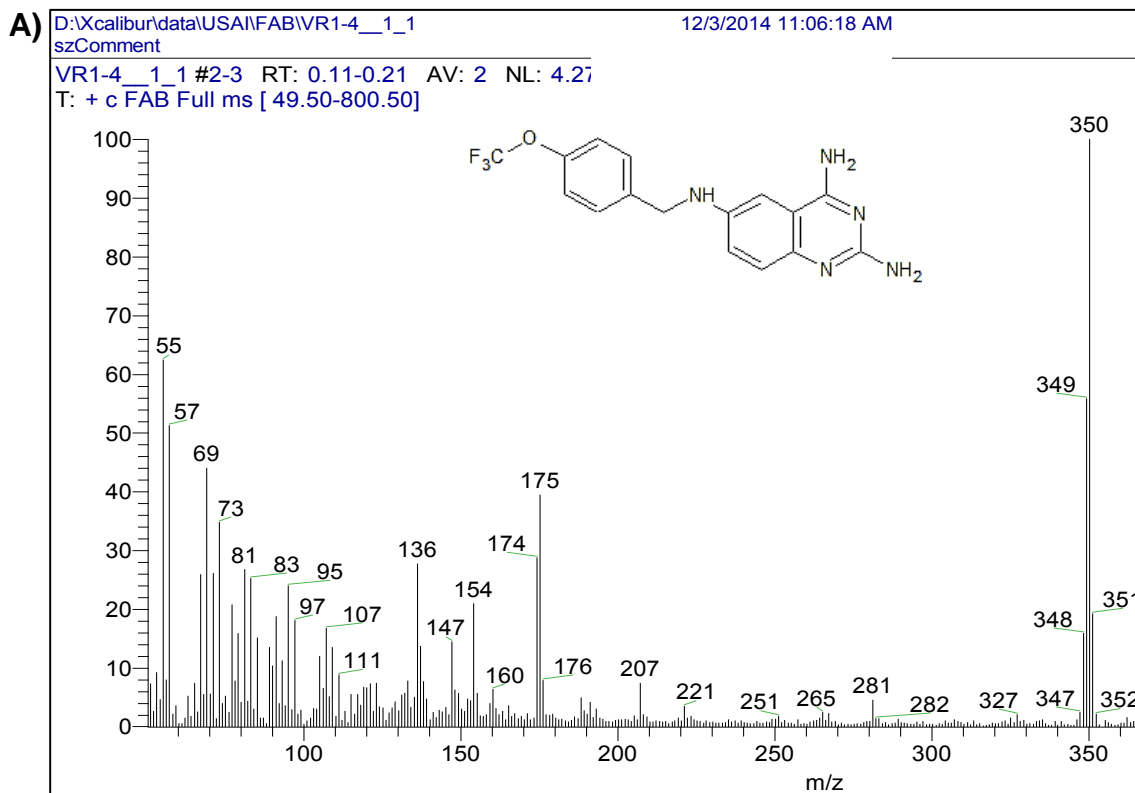


Fig. 26. Espectro de A) Masas y de B) Infrarrojo de la 2,4,6-triamino- N^6 -[4-(trifluorometoxi)benzyl]quinazolina (VR1-4)

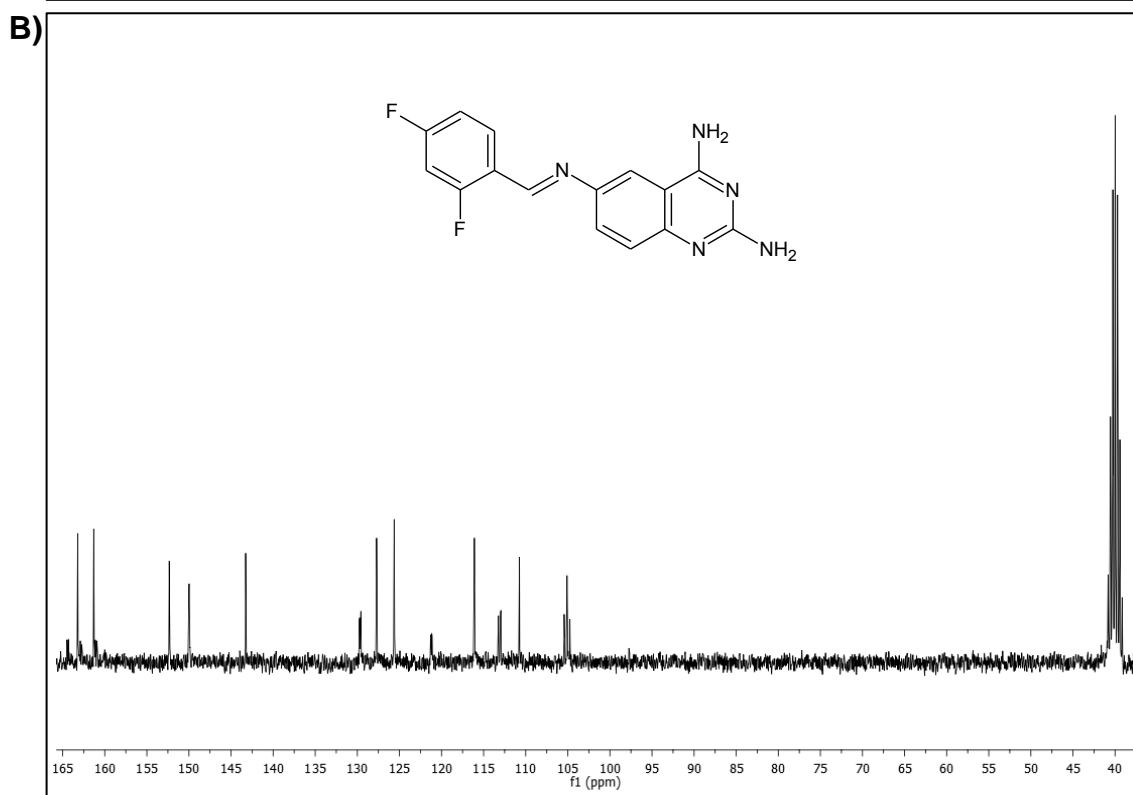
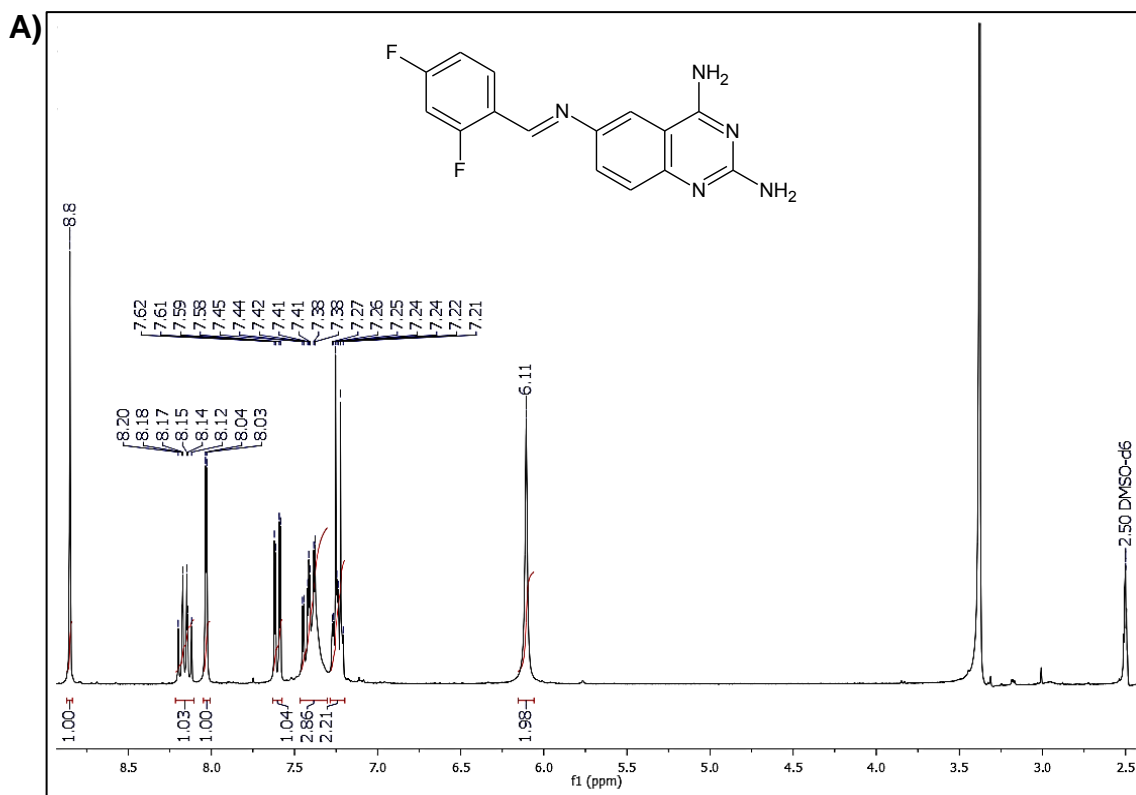
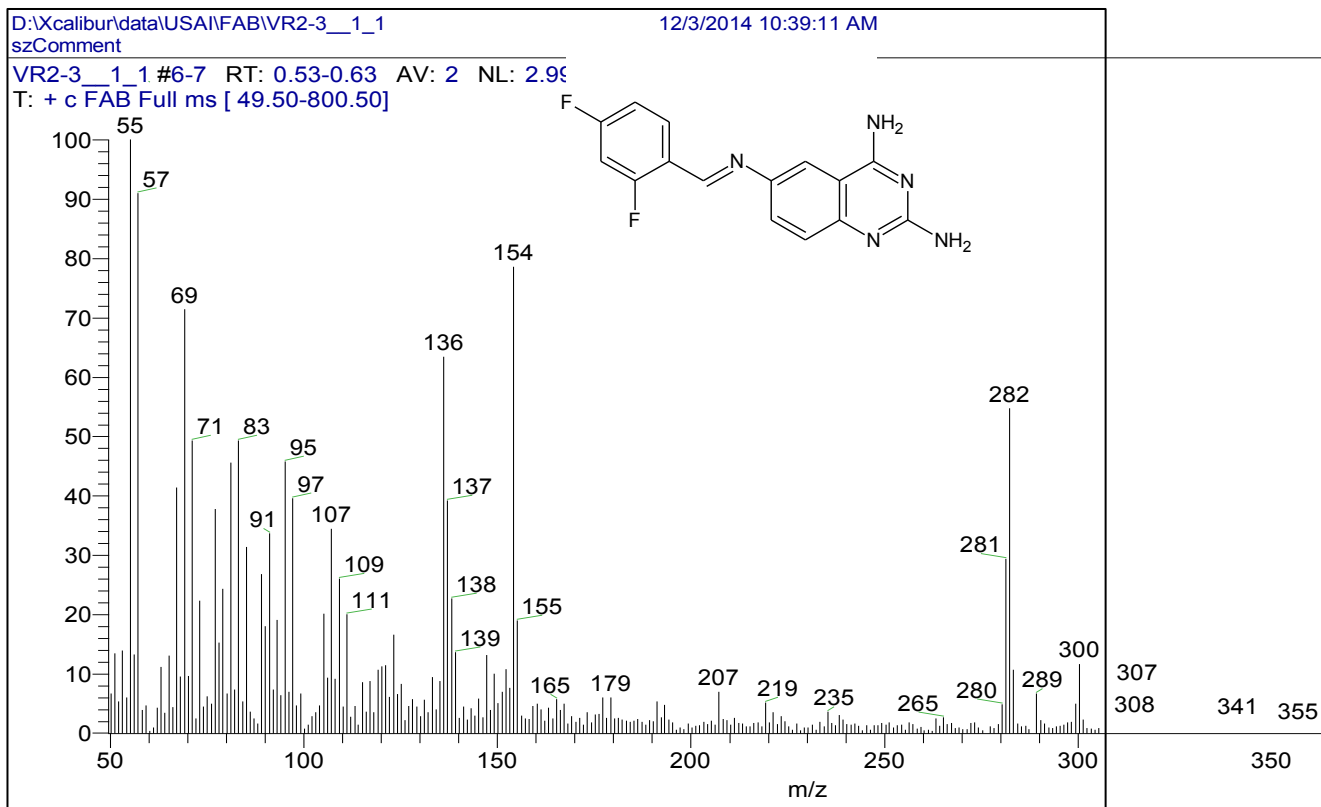


Fig. 27. Espectro de A) RMN-¹H y B) RMN-¹³C de la 2,4-diamino-6-[(E)-(2,4-difluorobencilideno)amino]quinazolina (VR2-3)



A)



B)

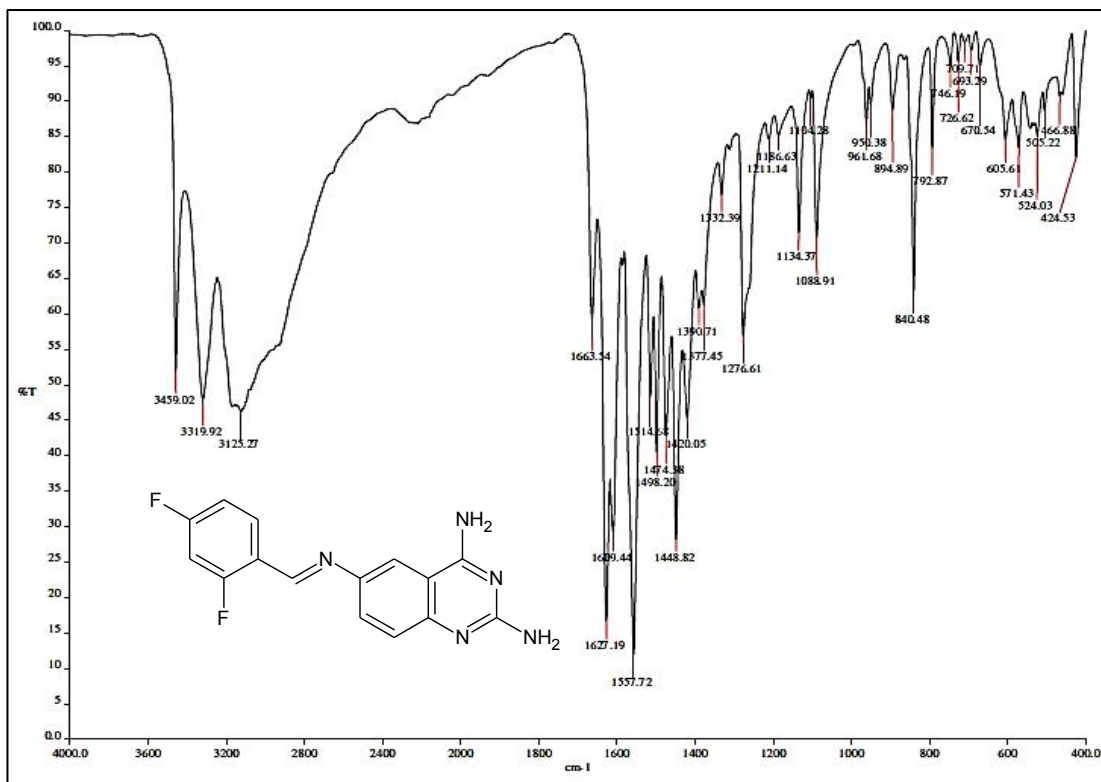


Fig. 28. Espectro de A) Masas y de B) Infrarrojo de la 2,4-diamino-6-[(E)-(2,4-difluorobenciliden)amino]quinazolina (VR2-3)

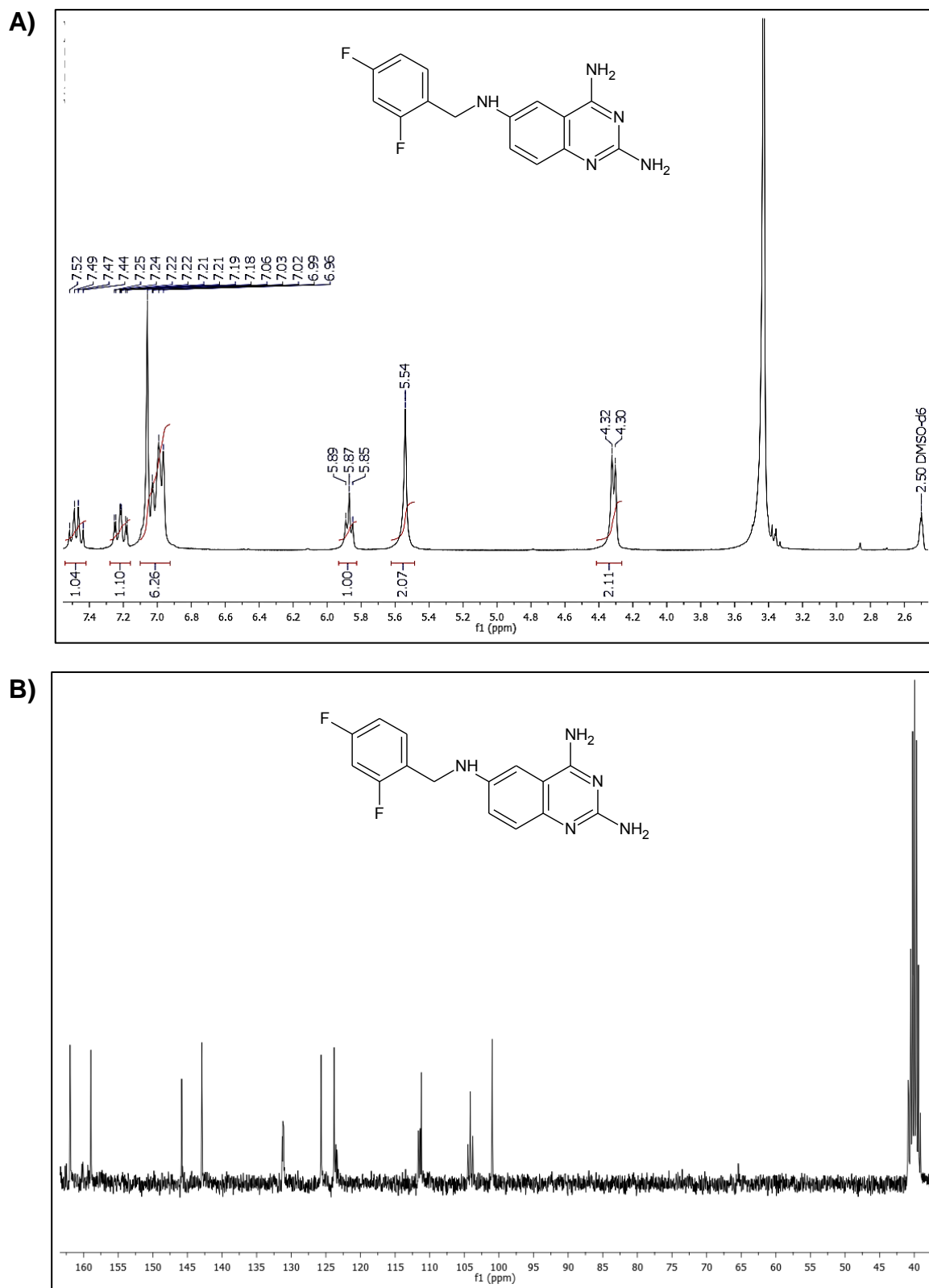
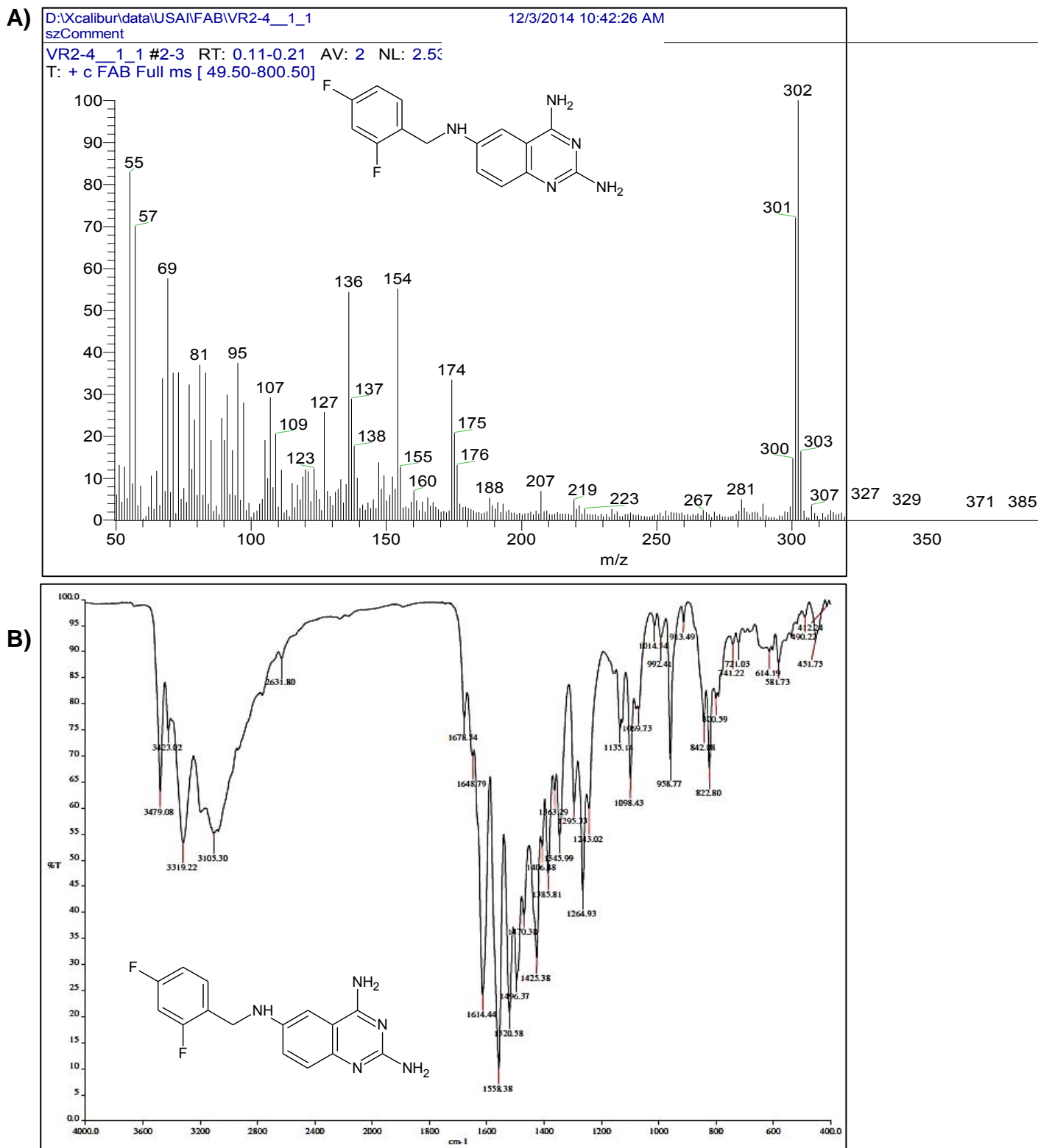


Fig. 29. Espectro de A) RMN-¹H y B) RMN-¹³C de la 2,4,6-triamino-*N*⁶-(2,4-difluorobencil)quinazolina (VR2-4)



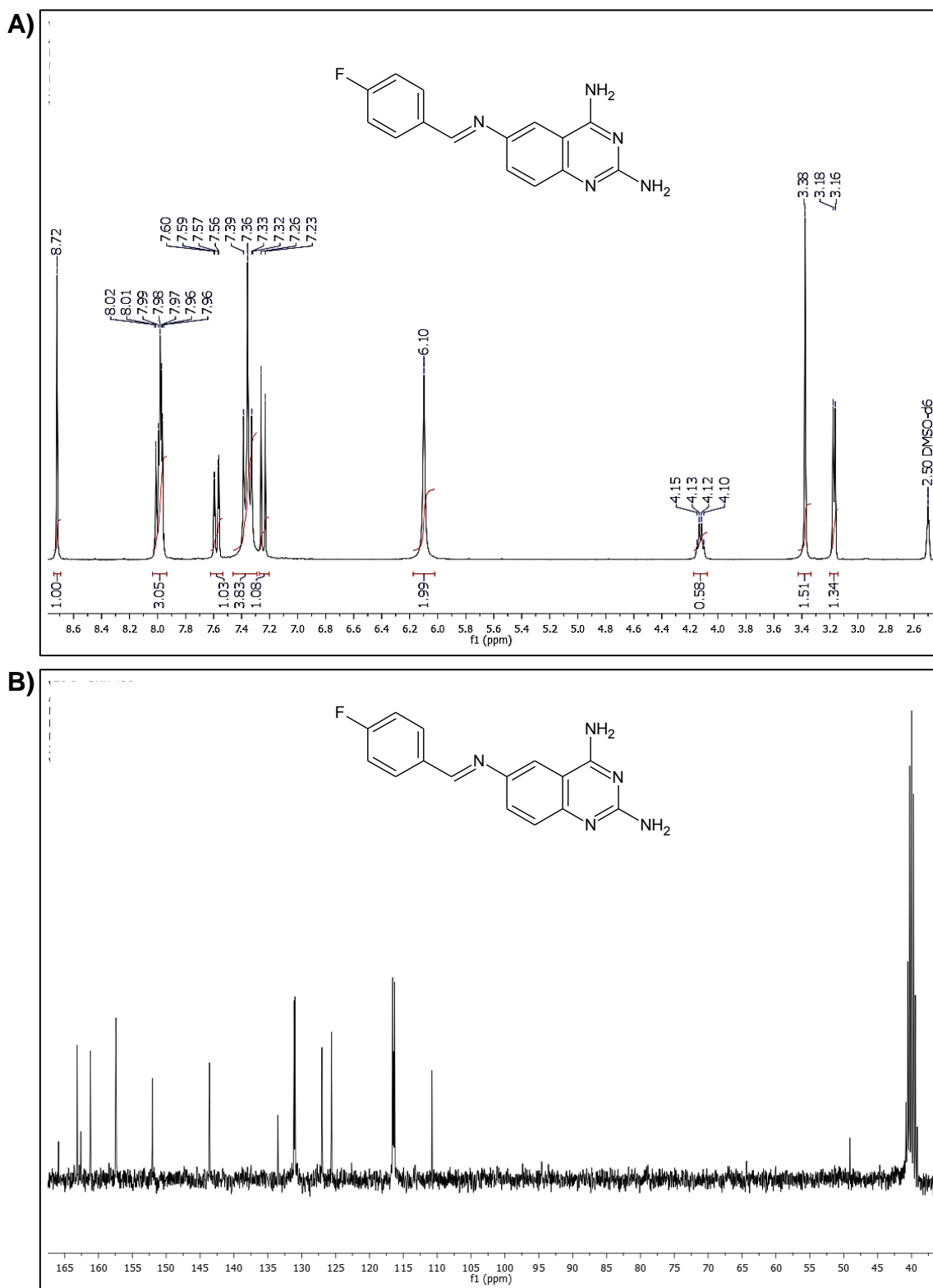


Fig. 31. Espectro de A) RMN- ^1H y B) RMN- ^{13}C de la 2,4-diamino-6-[(*E*)-(4-fluorobencilideno)amino]quinazolina (VR3-3)

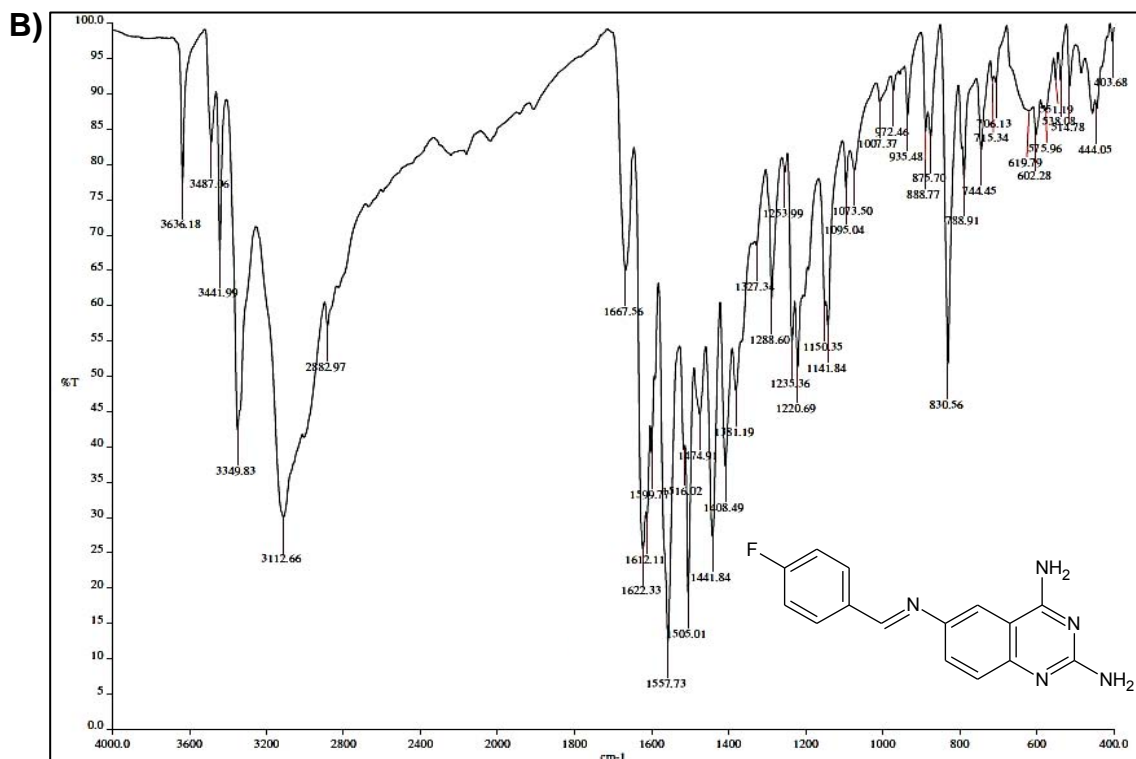
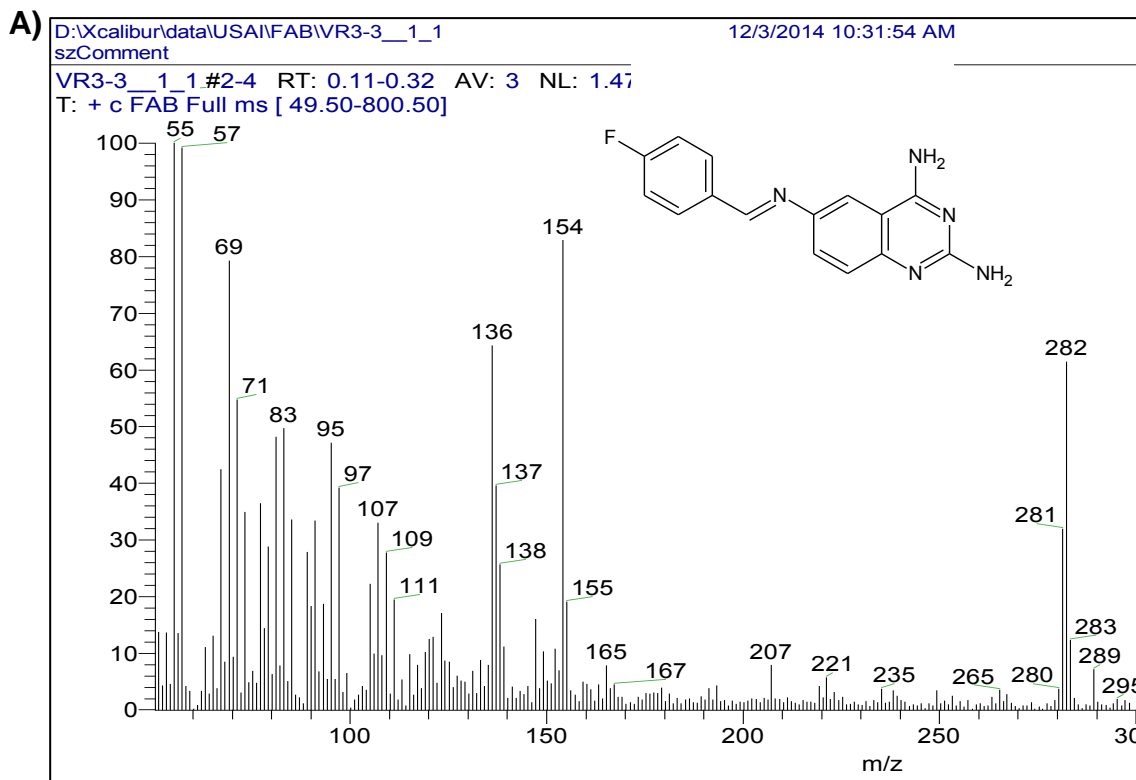


Fig. 32. Espectro de A) Masas y de B) Infrarrojo de la 2,4-diamino-6-[(E)-(4-fluorobenciliden)amino]quinazolina (VR3-3)

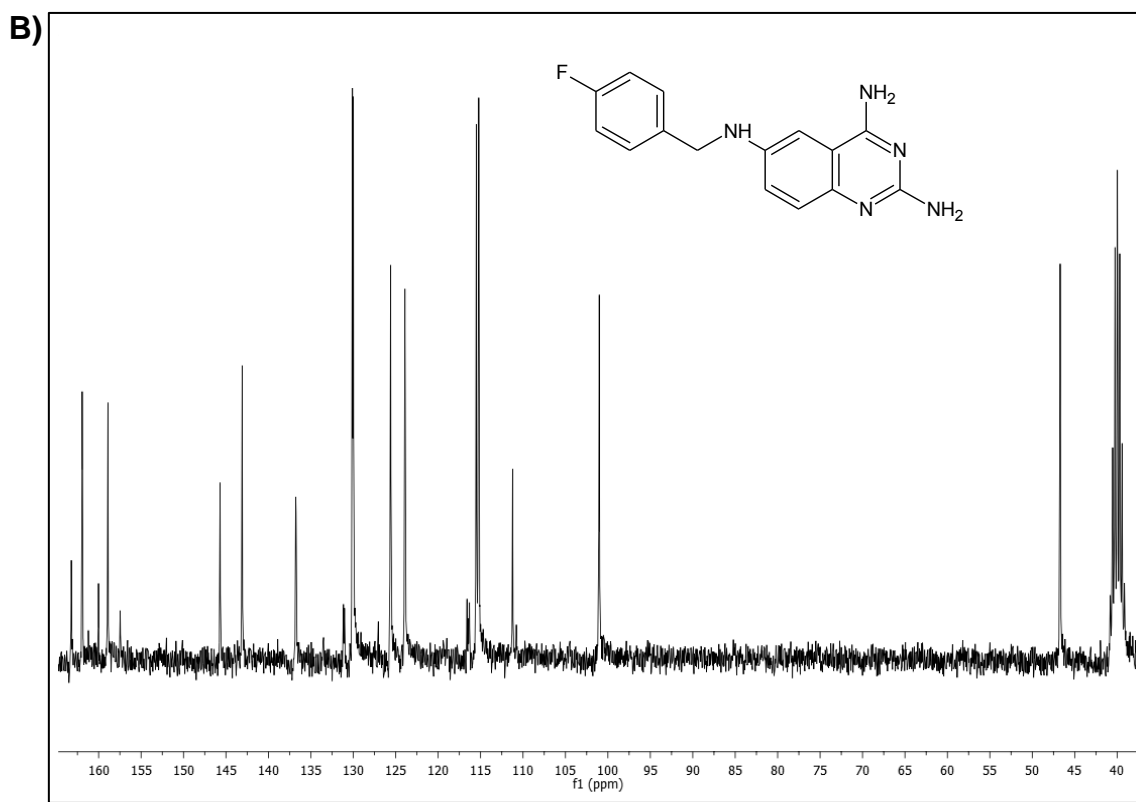
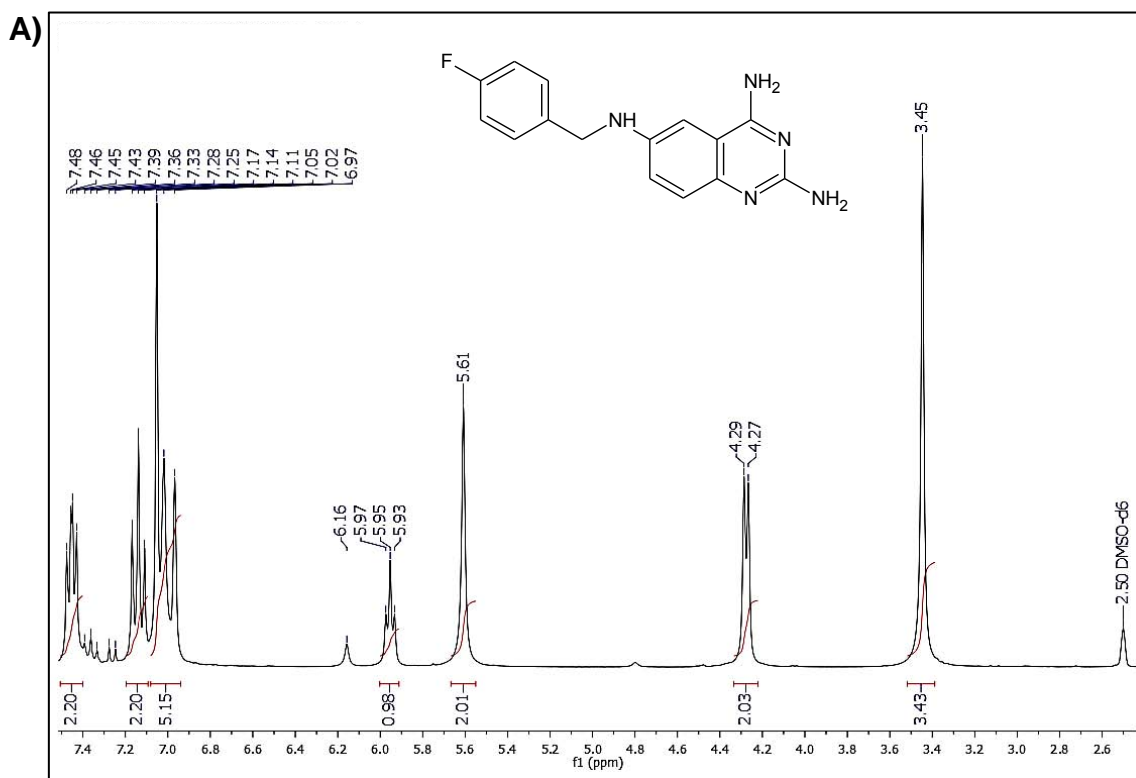


Fig. 33. Espectro de A) RMN-¹H y B) RMN-¹³C de la 2,4,6-triamine-*N*⁶-(4-fluorobencil)quinazolina (VR3-4)

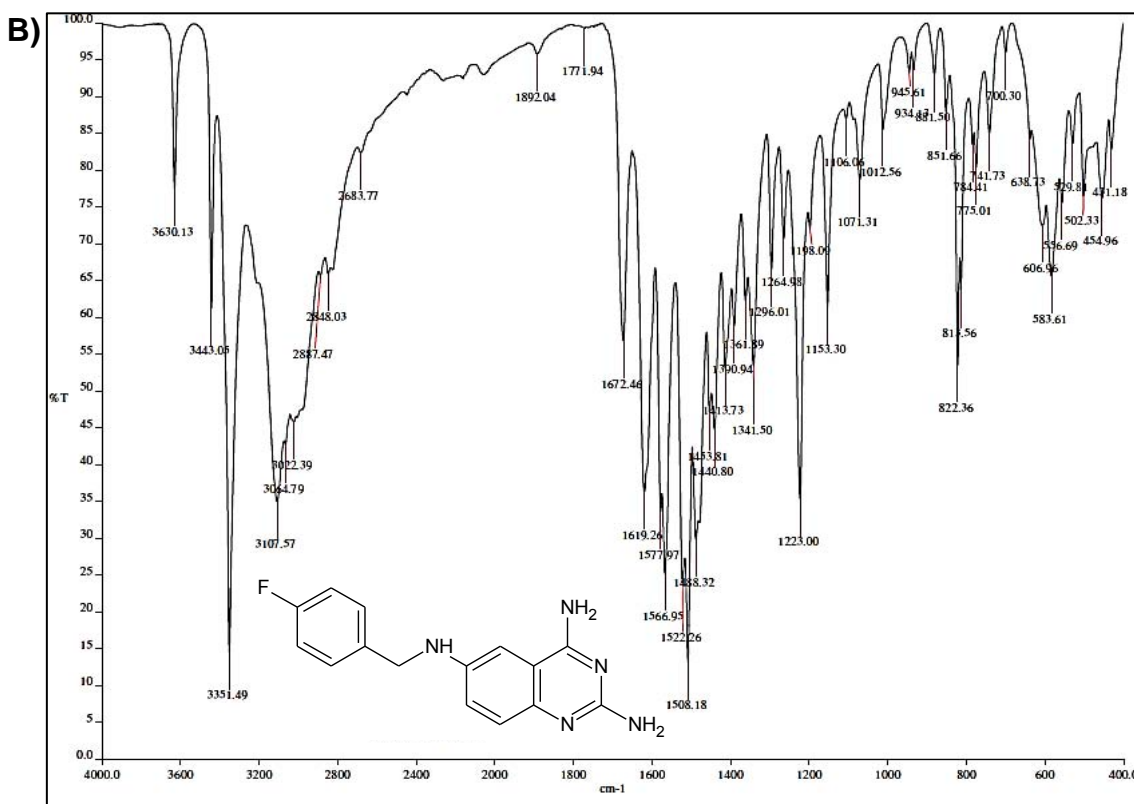
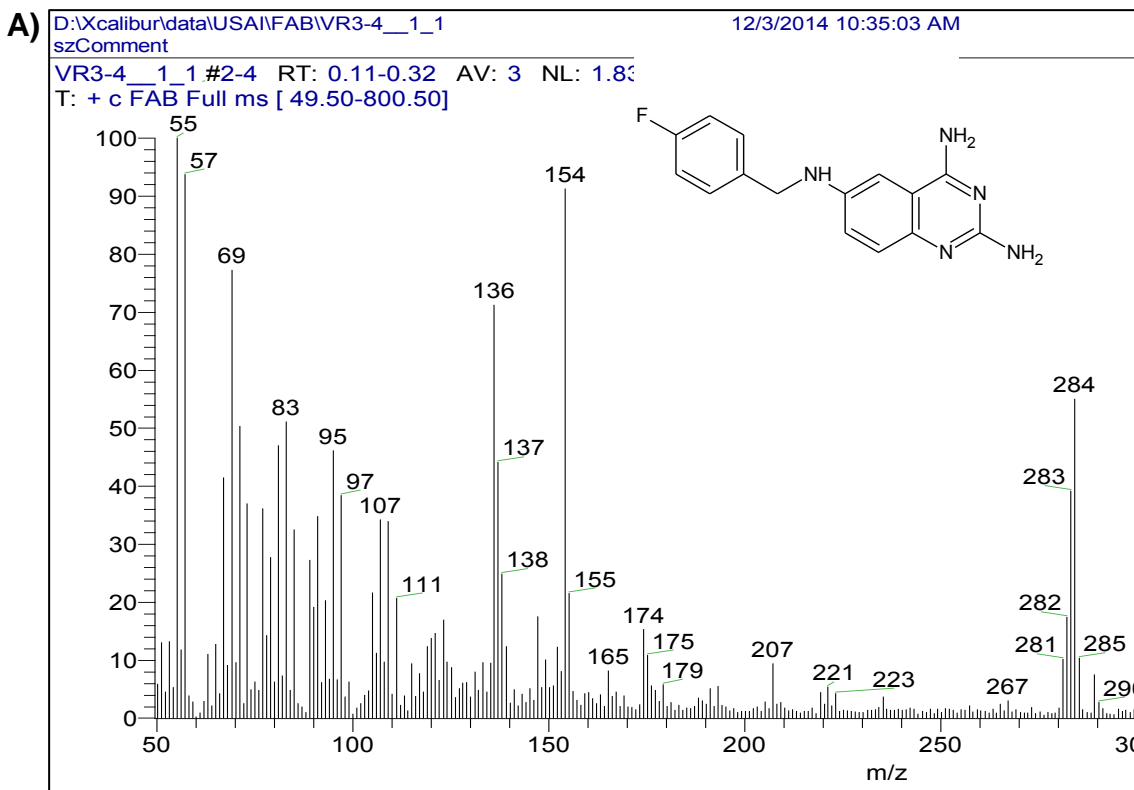


Fig. 34. Espectro de A) Masas y de B) Infrarrojo de la 2,4,6-triamine- N^6 -(4-fluorobencil)quinazolina (VR3-4)



BIBLIOGRAFÍA

1. Pitot, H. C., *Fundamentos de Oncología*; Editorial Reverté: España, 1981; pp 15-2
2. Oliveira, P. A.; et. al. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* [On line] **2007**, 79, pp 593-616
3. Varela, S. A. El cáncer. Etiología, epidemiología, diagnóstico y prevención; Ediciones Harcout: Madrid, España, 2002 ; Pp. 15
4. Definition of Neoplasma.
<http://library.med.utah.edu/WebPath/NEOHTML/NEOPL102.html>
(Consultada en Octubre 13, 2014)
5. Gutiérrez, J. B., Salsamendi, A. L. *Fundamentos de ciencia Toxicológica*; Diaz de Santos: Madrid, 2001; pp 155-163
6. Zorrilla, A.E., M. E. Izquierdo, M. Izquierdo. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cubana Invest Bioméd*[On line] **2004**, 23.
7. World Health Organization. Cancer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
(Consultada en Octubre 10, 2014)
8. GLOBALCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
(Consultada en Octubre 21, 2014)
9. Meneses, A., et al. Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica. *Rev. Invest. Clin.*[Online] **2012**, 64, pp 322-329
10. Subsecretaría de prevención y promoción a la salud. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos.
<http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
(Consultada en Octubre 21, 2014)



11. Morbilidad hospitalaria
<http://salud.edomex.gob.mx/html/doctos/estadisticas/saeh/morbhospsaeh2007.pdf> (Consultada en Octubre 25, 2014)
12. "Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)"
Datos nacionales.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
(Consultada en Octubre 21, 2014)
13. Mejía, J., Flores, H., Juárez, I., Vásquez, J., Games, J., Pérez, M. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos de la infancia. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **2005**, 43 (1), pp 25-37.
14. Organización Mundial de la Salud. Mortality
<http://www.who.int/topics/mortality/es/>
(Consultada en Octubre 27, 2014)
15. Organización Mundial de la Salud. Tratamiento del cáncer
<http://www.who.int/cancer/treatment/es/>
(Consultada en Octubre 28, 2014)
16. Cancer.Net, Tipos de tratamiento.
<http://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/tipos-de-tratamiento>
(Consultada en Octubre 28, 2014)
17. Qué es la cirugía Oncológica.
<http://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/tipos-de-tratamiento/qu%C3%A9-es-la-cirug%C3%ADa-oncol%C3%B3gica>
(Consultada en Octubre 28, 2014)
18. Díaz, E., García, J. Oncología clínica básica; ARÁN Ediciones S. A.: España, 2000; Pp. 269, 270, 290, 291
19. William, J., Kolb, D. Química para el nuevo milenio; Octava edición, Prentice Hall Hispanoamericana S. A.: México, 1999; Pp. 548



20. Instituto Nacional del Cáncer. Radioterapia para el cáncer
<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/tratamiento-radioterapia>
(Consultada en Octubre 28, 2014)
21. Cancer.Net, Qué es la quimioterapia.
<http://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/tipos-de-tratamiento/qu%C3%A9-es-la-quimioterapia>
(Consultada en Octubre 28, 2014)
22. Silvestre-Donat, F.J., Puente, A., Efectos Adversos del tratamiento de cáncer oral, *Avances en Odontoestomatología* **2008**, 24 (1), pp 111-121
23. Tanaka, H., Matsushima, H., Mizumoto, N., Takashima, A., Classification of Chemotherapeutic Agents Based on Their Differential *In vitro* Effects on Dendritic Cells. *Cancer Res* **2009**, 69, pp 6978-6986
24. Genaro, A., *Remington Farmacia*; Editorial Medica Panamericana: Argentina, 2003; pp. 1759, 1760
25. Betés, M., *et. al.*, *Farmacología para Fisioterapeutas*, Editorial Medica Panamericana: Madrid, 2008 Pp 216-220
26. Lorenzo, P., *et. al.*, *Velázquez. Farmacología básica y clínica*; Editorial Médica Panamericana: China, 2009; pp. 982, 983
27. Mendoza, N., *Farmacología médica*; Editorial Medica Panamericana: México, 2008; pp 581-582
28. Gilbert, H. I. Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes. *Biochimica Biophysica Acta* [Online] , **2002**, 1587, pp 249-257
29. Zuccotto, F, *et. al.* Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 36, pp 395-405
30. Schnell, Jason R., Dyson, H., Wright, P. Structure, Dynamics, and Catalytic Function of Dihydrofolate Reductase. *Annu. Biophys. Biomol. Struct.*, **2004**, 33, pp 119-140
31. Tawari, N., Seema B., Degani M. A Review of Molecular Modeling Studies of Dihydrofolate Reductase Inhibitors Against Opportunistic Microorganisms



- and Comprehensive Evaluation of New Models. *Current Pharmaceutical Design*, **2011**, *17*, pp 712-751
32. Huang, Y., *et. al.* Molecular Assembly of an Aptamer–Drug Conjugate for Targeted Drug Delivery to Tumor Cells. *ChemBioChem* [Online], **2009**, *10*, pp 862 – 868
33. Quintana, A. *et al.* Design and Function of a Dendrimer-Based Therapeutic Nanodevice Targeted to Tumor Cells Through the Folate Receptor. *Pharma Research* [Online], **2002**, *19*, pp 1310-1316
34. Puig, L. Metotrexato: Novedades Terapéuticas. *Actas Dermosifiliogr.* **2014** , *105* (6), pp 583-589
35. Drug Bank, Methotrexate <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00563> (consultado 06-08-13)
36. Vademecum, Metotrexato <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m035.htm> (consultado 06-08-13)
37. Wermuth, C. G. Similarity in drugs: reflections on analogue desing . *Drug Discov. Today* [Online], **2006**, *11*, pp 348-354.
38. Hynes, J. B. et al. Synthesis of 5-Chloro-5, 8-dideaza Analogues of Folic Acid and Aminopterin Targeted for Colon Adenocarcinoma. *J. Med. Chem.* [Online], **1987**, *30*, pp 1515-1519
39. Marzano, G., Guiotto, A., Chilin, A. Quinazoline derivatives as potential anticancer agents: A patent review (2007-2010); *Expert Opin. Ther. Patents* [Online] **2012**, pp 223-252
40. Zuccotto, F, *et. al.* The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, pp 1463-1468
41. Estudio de modelado molecular de inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa humana. <http://www.aqa.org.ar/pdf99/cd/Qca.Medicinal/13.pdf> (Consultada en Noviembre 25, 2014)
42. Mendoza, M. E. Obtención de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona con potencial actividad biológica. Tesis, UNAM, México, D. F., **2012**.



43. Mendoza, C. Síntesis, evaluación biológica y estudios *in silico* de moléculas diseñadas como híbridos contra *Trypanosoma cruzi*. Tesis, UNAM, México, D. F., **2009**.
44. Levine, I., *Química cuántica*; Editorial Pearson: España, 2005; pp494
45. Matus, M. A. Síntesis de derivados de la 2,4,6-triaminoquinazolina como posibles agentes antiparasitarios, Tesis, UNAM, México, D. F., **2013**.
46. Escobar, L., Alfonso, P., Aristizábal, A. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Grupo de Farmacogenética del Cáncer. Bogotá, Colombia, 2009*
47. ATCC.
http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx
(Consultada en Marzo 30, 2015)