



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**"DISEÑO, SÍNTESIS, EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ESTUDIO DE
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE NUEVOS DERIVADOS DE 9-[(4'-
AMINO)ANILINO]TIAZOLO[5,4-*b*]QUINOLINA COMO POTENCIALES
ANTITUMORALES"**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. VERÓNICA TINAJERO DELGADO



Ciudad de México

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

Dr. Francisco Hernández Luis	Presidente
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	Vocal
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Vocal
Dr. José Luis Medina Franco	Vocal
Dr. Luis Ángel Polindara García	Secretario

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:

Laboratorio 121, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR

Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

SUSTENTANTE

Q.F.B. Verónica Tinajero Delgado

Durante de la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de los siguientes proyectos:

CONACyT (No. de Becario: 576744)

DGAPA PAPIIT-IN 221816

Parte de los resultados de esta tesis se presentaron en el 51° Congreso Mexicano de Química & 35° Congreso Nacional de Educación Química. Celebrado del 28 de septiembre al 1° de octubre del 2016, en la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo, México. Trabajo: "Síntesis, actividad citotóxica y acoplamiento molecular de nuevos derivados de 9-anilinoiazolo[5,4-*b*]quinolina con sustituyentes de dietilaminoalquilamino como potenciales antitumorales". Verónica Tinajero-Delgado, José Solano-Becerra, Alfonso Lira-Rocha. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Presentación oral de trabajos a nivel profesional en el área de Química Medicinal.

**ÍNDICE**

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IIV
ÍNDICE DE GRÁFICOS	V
ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Generalidades del cáncer	2
2.2. Tratamiento del cáncer	2
2.3. Quimioterapia	2
2.4. El ADN como diana biológica.....	3
2.5. Agentes intercalantes del ADN	4
2.6. ADN-topoisomerasas	4
2.7. ADN-topoisomerasas II	5
2.8. <i>m</i> -AMSA	8
2.9. Derivados de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina	11
2.10. Derivados de 9-anilino[5,4- <i>b</i>]quinolina	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1. Síntesis química	20
6.2 Caracterización espectroscópica y espectrométrica.....	27
6.3. Espectroscopía de resonancia magnética homonuclear (NOESY).....	28
6.4. Espectrometría de masas.....	36
6.5. Evaluación de la actividad citotóxica.....	37
6.6. Modelado molecular	40
6.7. Análisis de las propiedades electrónicas y descriptores QSAR.....	44
6.8. Relación cuantitativa estructura química-actividad biológica (QSAR)	51
6.9. Estudios de acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	56



ÍNDICE

7. CONCLUSIONES	60
8. PARTE EXPERIMENTAL	61
8.1. Reactivos y equipo	61
8.2 Síntesis química	62
8.3. Citotoxicidad en líneas celulares ^{32, 36}	73
8.4. Modelado molecular ³⁷	73
8.5. Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) ³⁸	74
8.6. Estudio de acoplamiento molecular (Docking) ³⁹	74
9. PERSPECTIVAS	76
10. REFERENCIAS	77
ANEXO I	80
ANEXO II	104



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Valores de citotoxicidad y constantes aparentes de desplazamiento de bromuro de etidio de compuestos de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina.	13
2	Actividad inhibitoria (CI ₅₀ , μM) sobre ADN-topoisomerasa II de derivados de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina y <i>m</i> -AMSA como referencia.	14
3	Actividad citotóxica de los derivados de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina reportados por Martínez-Vázquez y la amsacrina (CI ₅₀ , μM) a 48 h de tratamiento.	16
4	Propiedades físicas de los compuestos 1a-1ñ .	22-23
5	Propiedades físicas de los compuestos 2a-2ñ .	24
6	Espectrometría de masas de los derivados IVa-IVñ .	36
7	Actividad citotóxica (CI ₅₀ , μM) de los compuestos sintetizados a 48 h de tratamiento.	37
8	Valores de los ángulos diedros τ ₁ y τ ₂	42
9	Descriptores moleculares calculados mediante el método cuántico DFT RB3LYP 6-31G*.	45
10	Energía libre de unión y tamaño de clúster para los derivados de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina.	57
11	Interacciones polares de los compuestos de la serie IV y V .	59
12	Sistemas de elución empleados en CCF.	62



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Ejemplos de modos de unión covalente (A) y no covalente (B y C) con el ADN.	3
2	Interacciones no covalentes con el ADN. A) Intercalación paralela de la Proflavina. B) Intercalación perpendicular de la Duanomicina.	4
3	Clasificación de enzimas ADN-topoisomerasas de acuerdo a su mecanismo de acción.	5
4	Dominios de ADN-topoisomerasa II.	6
5	Ciclo catalítico de la enzima ADN-topoisomerasa II.	6
6	Mecanismo de acción de la enzimaADN-topoisomerasa II.	7
7	Compuestos inhibidores de topoisomerasa II.	8
8	Esquema de las interacciones intermoleculares entre la <i>m</i> -AMSA y el complejo topoisomerasa II β -ADN.	9
9	Análisis conformacional de los derivados <i>o</i> -AMSA y <i>m</i> -AMSA. Confórmeros de menor energía ± 5 kcal/mol	10
10	Análogos de <i>m</i> -AMSA que inhiben la actividad de ADN-topoisomerasa II.	11
11	Reemplazo isostérico para la obtención del sistema de tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolina.	11
12	Derivados con buena actividad citotóxica (CI ₅₀ < 6 μ M) reportados por Álvarez-Ibarra.	12
13	Detección de aductos de topoisomerasa II-ADN en células HeLa. (A) Vehículo, (B) Etóposido, (C) <i>m</i> -AMSA, (D) D3CLP, (E) D4CLP, (F) 16g.	15
14	Zonas susceptibles a un ataque nucleofílico de acuerdo a la teoría de HSAB.	25
15	Numeración empleada para la asignación de las señales del sistema 9-anilino[5,4- <i>b</i>]quinolina.	27
16	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVc . Ampliación zona aromática (400 MHz, CDCl ₃).	29
17	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVc . Ampliación zona alifática (400 MHz, CDCl ₃).	30
18	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVi . Ampliación zona aromática (400 MHz, CDCl ₃).	31
19	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVi . Ampliación zona alifática (400 MHz, CDCl ₃).	32
20	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVi . Ampliación zona aromática (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	33
21	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) del compuesto IVi . Espectro 1: intercambio con D ₂ O. Espectro 2: sin intercambio con D ₂ O.	34
22	Espectro de correlación NOESY del compuesto IVi . Ampliación zona alifática (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	35



ÍNDICE DE FIGURAS

23	Diagrama de abundancia (%) vs. pH para el compuesto IVc .	40
24	Compuestos analizados computacionalmente. IVa-IVñ son compuestos sintetizados en el presente trabajo, Va-Vd son compuestos previamente reportados.	41
25	Ángulos diedros para el análisis conformacional.	42
26	Conformación del anillo de anilina y de la cadena de la posición 4' de los derivados IVa, IVc, IVe y IVg .	43
27	Ángulos diedros τ_3 y τ_4 , de la cadena alifática etil para los derivados IVa, IVc, IVe y IVg .	43
28	Conformación del anillo de anilina y de la cadena de la posición 4' de los derivados IVd y IVf	44
29	Orientación del vector de momento dipolar del compuesto IVc .	46
30	Distribución del orbital HOMO del compuesto IVc .	47
31	Distribución del orbital HOMO del compuesto IVl .	47
32	Distribución del orbital LUMO del compuesto IVc .	48
33	Mapas del potencial molecular electrostático a un isovalor de -20 Å/Bohr para algunos de los compuestos estudiados.	50
34	Modos de unión de <i>m</i> -AMSA co-cristalizada (verde) y del estudio de <i>docking</i> (amarillo), RMSD igual a 0.0 Å. Interacciones polares con Arg503 y Glu522 se indican con líneas discontinuas.	56
35	Modos de unión de los compuestos IVd y IVm en el sistema Topo II β -ADN.	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico	Descripción	Página
1	Número de compuestos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer durante el periodo 1971-2004.	2
2	Índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina de los compuestos sintetizados.	38
3	Relación entre el valor del pKa y el índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina en la línea celular HeLa.	39
4	Actividad pronosticada vs., actividad observada en la línea HeLa, obtenida de la ecuación 1.	54
5	Actividad pronosticada vs., actividad observada en la línea K562, obtenida de la ecuación 2.	54
6	Actividad pronosticada vs., actividad observada en la línea SW480, obtenida de la ecuación 3.	55
7	Actividad pronosticada vs., actividad observada en la línea SW620, obtenida de la ecuación 4.	55



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADT	<i>AutoDockTools</i>
% AR	Porcentaje de abundancia relativa
B3LYP	Aproximación del intercambio de la energía en la Teoría de Funcionales de la Densidad
CCF	Cromatografía en Capa Fina
δ	Desplazamiento Químico
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
FAB	Bombardeo de átomos rápidos
IR-ATR	Infrarrojo por reflectancia total atenuada
J	Constante de acoplamiento
m/z	Relación masa/carga
m-AMSA	Amsacrina
MMFF	Campo de Fuerza Merck Molecular
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
R_f	Factor de retención
RMN-¹H	Resonancia Magnética de Protón
RMN-¹³C	Resonancia Magnética de Carbono 13



1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial con 8.2 millones de decesos en el 2012.¹ A pesar de los diversos avances en áreas como la bioquímica y la medicina, que han permitido el conocimiento de la patología a un nivel molecular, aún no se cuenta con un tratamiento de tipo quimioterapéutico que logre erradicar la enfermedad sin la presencia de efectos secundarios y el desarrollo de quimiorresistencia.

La escasa selectividad y alta toxicidad de los actuales tratamientos quimioterapéuticos se debe a que, generalmente, estos actúan en algún punto del ciclo celular, por lo que células con alta tasa de proliferación son susceptibles a la acción de estos agentes externos. Por este motivo, la búsqueda de nuevas moléculas, más efectivas y seguras, se ha enfocado preferentemente en modificaciones estructurales de fármacos en actual uso clínico, es decir, modificaciones racionales en la estructura molecular de dichos compuestos y su posterior evaluación biológica. Un ejemplo de ello es la amsacrina o *m*-AMSA, la 9-anilinoacridina mejor conocida en el tratamiento del cáncer, que estabiliza el complejo de ruptura ADN-Topoisomerasa II, pero cuyo uso clínico se ha limitado por la presencia de efectos secundarios y problemas de quimiorresistencia.² Recientemente, se han diseñado moléculas bioisósteras de la amsacrina, tal es el caso de los derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina reportados por Lira-Rocha y colaboradores,³ los cuales han mostrado valores de citotoxicidad incluso mejores que el compuesto de referencia. Sin embargo, reportes recientes indican que el mecanismo de acción de esta clase de derivados no es común, a pesar de su capacidad de intercalación al ADN.⁴

En vista de lo anterior y considerando que actualmente son conocidos los elementos estructurales de la amsacrina que inhiben la acción de esta enzima y que son capaces de conducir a apoptosis,⁵ surgió el interés por diseñar nuevos agentes citotóxicos basados en el núcleo de [5,4-*b*]quinolina que podrían compartir dicho mecanismo de acción. Para lo cual, el presente trabajo se enfoca al diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina con diversos sustituyentes de naturaleza polar unidos al grupo 4'-amino de la anilina, los cuales carezcan de restricciones conformacionales, incrementen el parámetro de logP y la solubilidad acuosa con grupos amino terciarios terminales susceptibles de ionización. Lo anterior a fin de conocer los requerimientos estructurales que mejoren la actividad citotóxica. Aunado a lo anterior, los estudios de acoplamiento molecular permitirán conocer los requerimientos estructurales que mejoren la actividad biológica de este tipo compuestos con la posible diana farmacológica.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo a las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 14 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer y alrededor de 8.2 millones murieron de este padecimiento en el 2012. En México, el cáncer constituye la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus.⁶

El cáncer es el resultado de mutaciones en el ADN cromosómico, las cuales pueden ser propiciadas por factores externos (tabaco, alcohol, agentes químicos, agentes infecciosos y radiaciones) así como por factores internos (hormonas, mutaciones heredables y mutaciones que ocurren en el metabolismo).⁷ La patología se caracteriza por la proliferación descontrolada de células neoplásicas, las cuales tienden a migrar a tejidos circundantes.

2.2. Tratamiento del cáncer

El tratamiento del cáncer depende de la naturaleza de éste y de su estado de proliferación. En la actualidad se emplean, principalmente, la cirugía, terapia de radiación y quimioterapia, en combinación o de forma independiente.

2.3. Quimioterapia

Desde su introducción en los años 40 hasta nuestros días, en la actualidad hay más de 100 fármacos autorizados para el tratamiento del cáncer (Gráfico 1).⁸

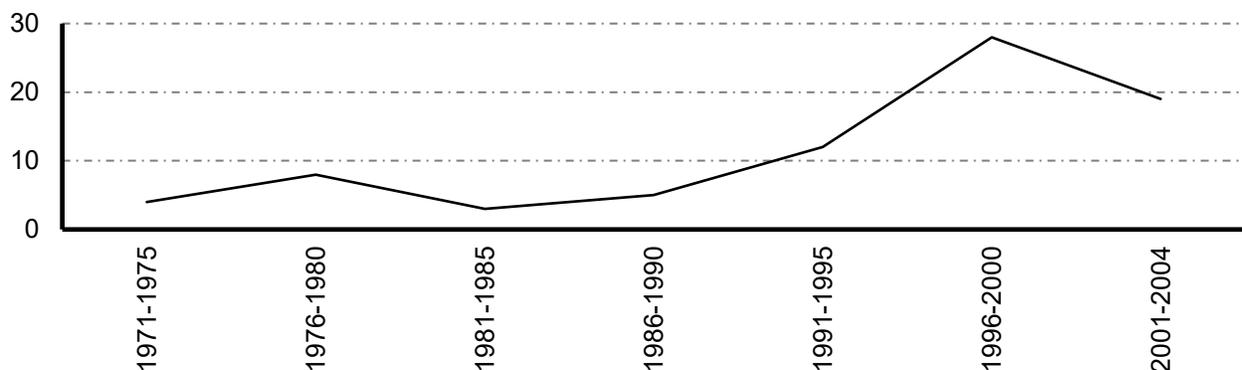


Gráfico 1. Número de compuestos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer durante el periodo 1971-2004.



La quimioterapia involucra el uso de compuestos que matan a las células tumorales, inhibiendo algunos de los mecanismos implicados en la división celular.⁹ Sin embargo, uno de los principales problemas asociados es la toxicidad no específica, dado que los procesos que controlan la proliferación celular son comunes en células normales como en células cancerosas. A pesar de esto, se puede observar una mayor selectividad hacia las células con cáncer, debido a su alta tasa de proliferación celular y a su capacidad defectuosa para reparar los daños del ADN después del daño infligido.^{10, 11}

Entre los blancos moleculares principales para el tratamiento del cáncer se encuentran el ADN y las enzimas relacionadas con el ciclo celular como las ADN-topoisomerasas.¹²

2.4. El ADN como diana biológica

La interacción del ADN con algún agente químico afecta el reconocimiento de enzimas nucleares como las polimerasas, factores de transcripción y topoisomerasas, lo que generalmente tiene repercusiones a nivel del ciclo celular.

Los modos de unión de moléculas con el ADN pueden ser de forma covalente o no covalente. Un ejemplo de la unión covalente es la unión cruzada ADN-ADN (**A**), mientras que la interacción con el surco mayor o menor de la doble hélice (**B**) y la intercalación (**C**), son ejemplos de uniones no covalentes (Figura 1).^{12, 13}

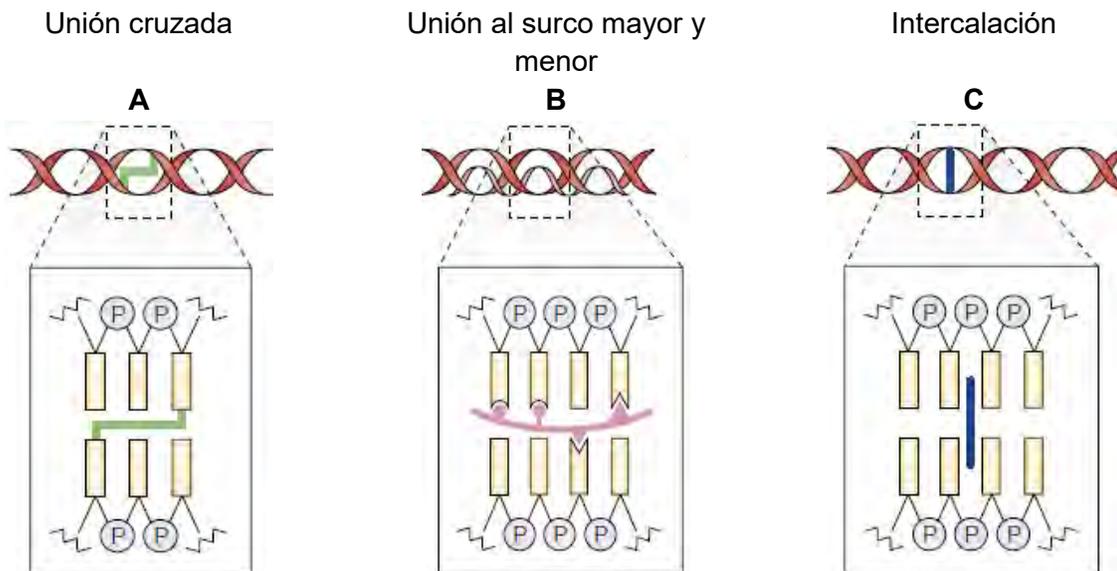


Figura 1. Ejemplos de modos de unión covalente (A) y no covalente (B y C) con el ADN.



2.5. Agentes intercalantes del ADN

La intercalación en el ADN se puede definir como el proceso por el cual aquellos compuestos, que contengan sistemas policíclicos aromáticos o heteroaromáticos, se insertan entre los pares de bases adyacentes, de forma paralela o perpendicular al eje de la doble hélice, con el incremento de distancia entre las bases de 3.4 a 6.8 Å.¹⁴ Un ejemplo de compuestos intercalantes se presenta en la Figura 2.

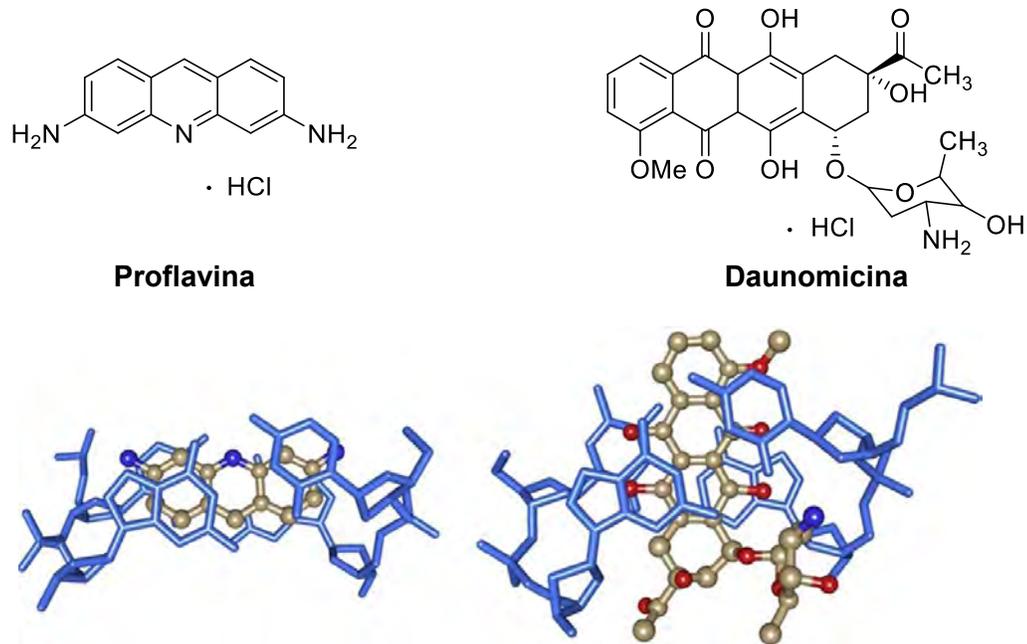


Figura 2. Interacciones no covalentes con el ADN. **A)** Intercalación paralela de la proflavina. **B)** Intercalación perpendicular de la duanomicina.

La estabilidad del compuesto intercalante está mediada por interacciones no covalentes como fuerzas de van der Waals, interacciones π - π y puentes de hidrógeno. Al respecto, las cadenas laterales de las moléculas intercalantes juegan un papel importante en la estabilización y especificidad en los surcos del ADN y en otros casos mantienen una interacción con alguna enzima nuclear, como es el caso de las ADN-topoisomerasas.¹⁵

2.6. ADN-topoisomerasas

La viabilidad del material genético en términos de organización, empaquetamiento y accesibilidad, es crucial para las células. Durante los procesos del ADN (replicación, transcripción, recombinación, reparación, segregación de los cromosomas, etc.), su topología cambia considerablemente e inevitablemente pueden formarse nudos debido al súper-enrollamiento de la cromatina.



La topología del ADN es modulada por enzimas conocidas como ADN-topoisomerasas, mediante la ruptura transitoria de la cadena de desoxirribosa-fosfato de una o ambas hebras. Existen dos tipos generales de estas enzimas (I y II), que se han clasificado en al menos 5 subtipos, dependiendo del modo en que realizan su actividad catalítica (Figura 3):^{16, 17}

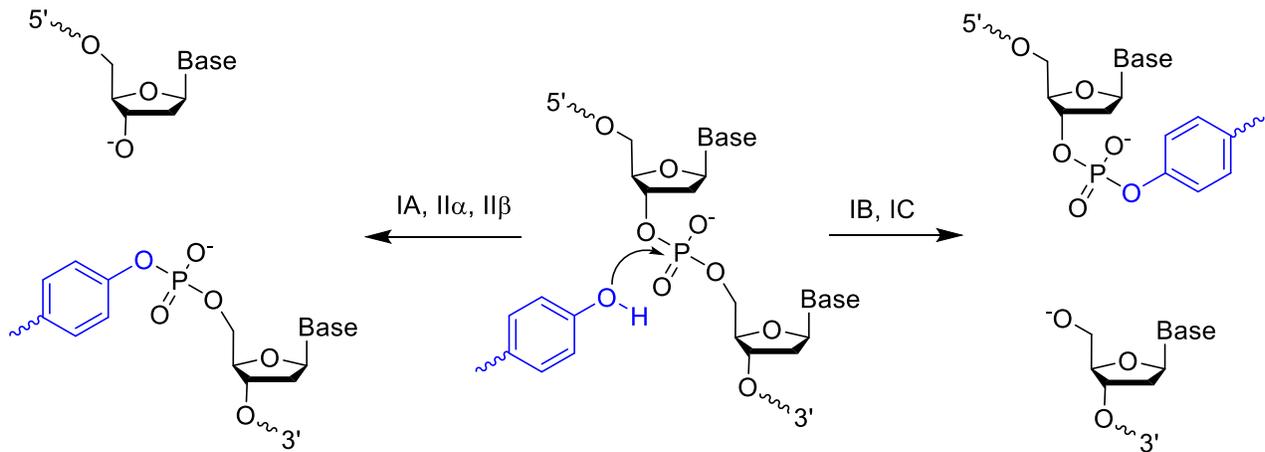


Figura 3. Clasificación de enzimas ADN-topoisomerasas de acuerdo a su mecanismo de acción.

2.7. ADN-topoisomerasas II

En los organismos vertebrados existen dos tipos de topoisomerasas II, α y β , que presentan un 70% de homología. Las enzimas topoisomerasas II están constituidas por dos homodímeros en los que se reconocen tres dominios; en el primero se encuentra una región de unión al ATP, en el segundo se localiza el residuo activo de tirosina y el tercero (Dominio C), es una región variable entre las diferentes especies, cuya función no ha sido esclarecida, aunque se ha sugerido que participa en el reconocimiento de la topología del ADN (Figura 4).³

A pesar de la similitud estructural, estas enzimas presentan patrones de expresión y funciones celulares diferentes; la isoenzima II α es esencial para las células en proliferación, donde su concentración aumenta dramáticamente durante la fase G₂ y M del ciclo celular, por lo cual se cree que es indispensable en los procesos de replicación del ADN y en la segregación de los cromosomas.

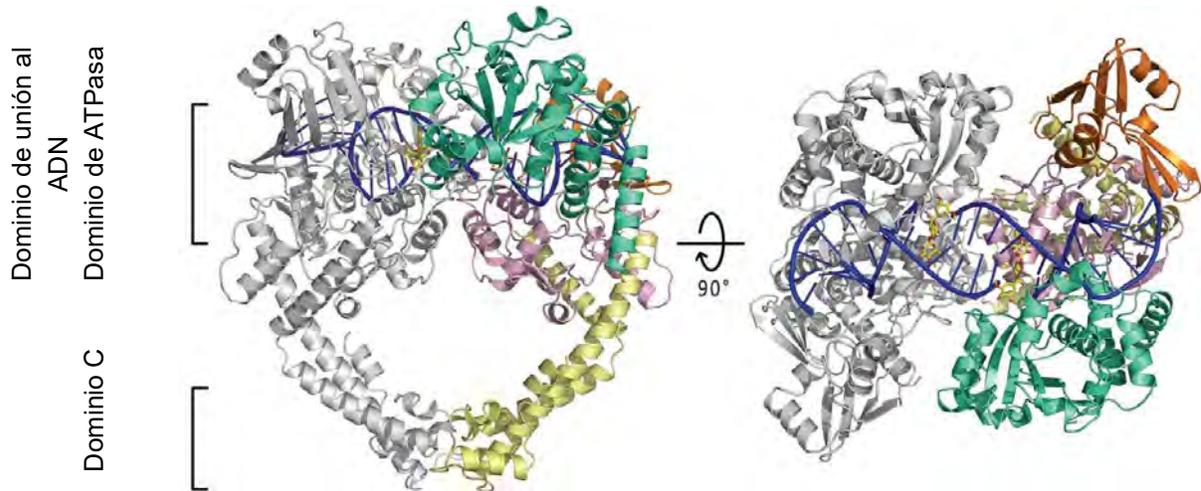


Figura 4. Dominios de ADN-topoisomerasa II.

La concentración de la isoforma II β es independiente el estado proliferativo y el ciclo celular, aunque evidencia reciente sugiere un papel importante en el desarrollo neuronal. Además, la enzima II β no puede compensar la pérdida de la enzima II α , lo que sugiere roles celulares únicos e independientes.³

El ciclo catalítico de la enzima puede ser descrito en cinco pasos y se ilustra en la Figura 5:

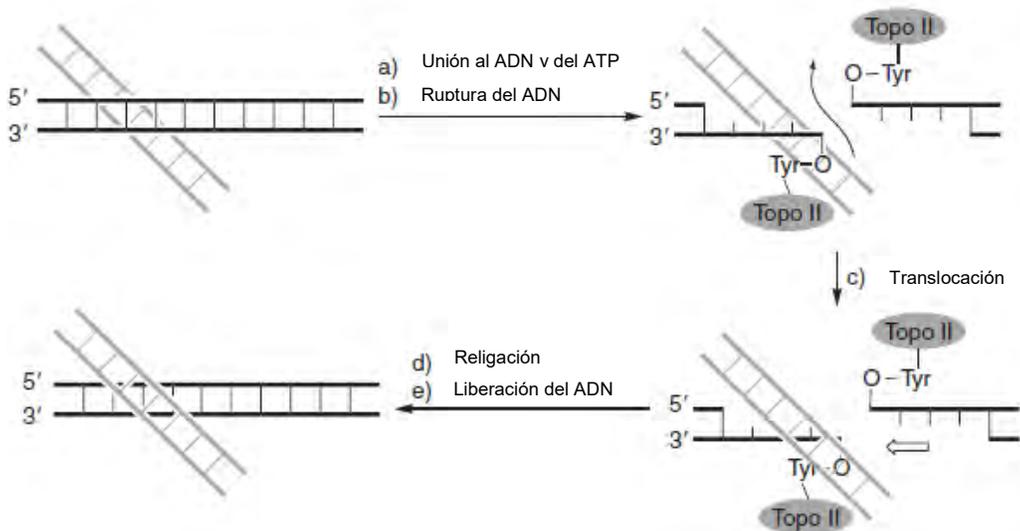


Figura 5. Ciclo catalítico de la enzima ADN-topoisomerasa II.

- a) Unión al ADN y del ATP.** La afinidad y la actividad catalítica está dada por el estado topológico del ADN, ya que la enzima reconoce preferentemente regiones enrolladas (Segmento G). Dos moléculas de ATP se unen a los dominios de unión de ATP al igual que una segunda hebra de ADN (segmento T).



b) **Ruptura del ADN.** En dicho proceso participan dos iones de Mg^{2+} que mantienen interacciones con residuos conservados en el sitio activo de la proteína. La base y el ácido son desconocidos, pero se ha postulado que son moléculas de agua asociadas al ion Mg^{2+} . Los residuos de tirosina que forman el enlace covalente con el ADN son Y805 y Y821 para la isoenzima II α y II β , respectivamente (Figura 6).

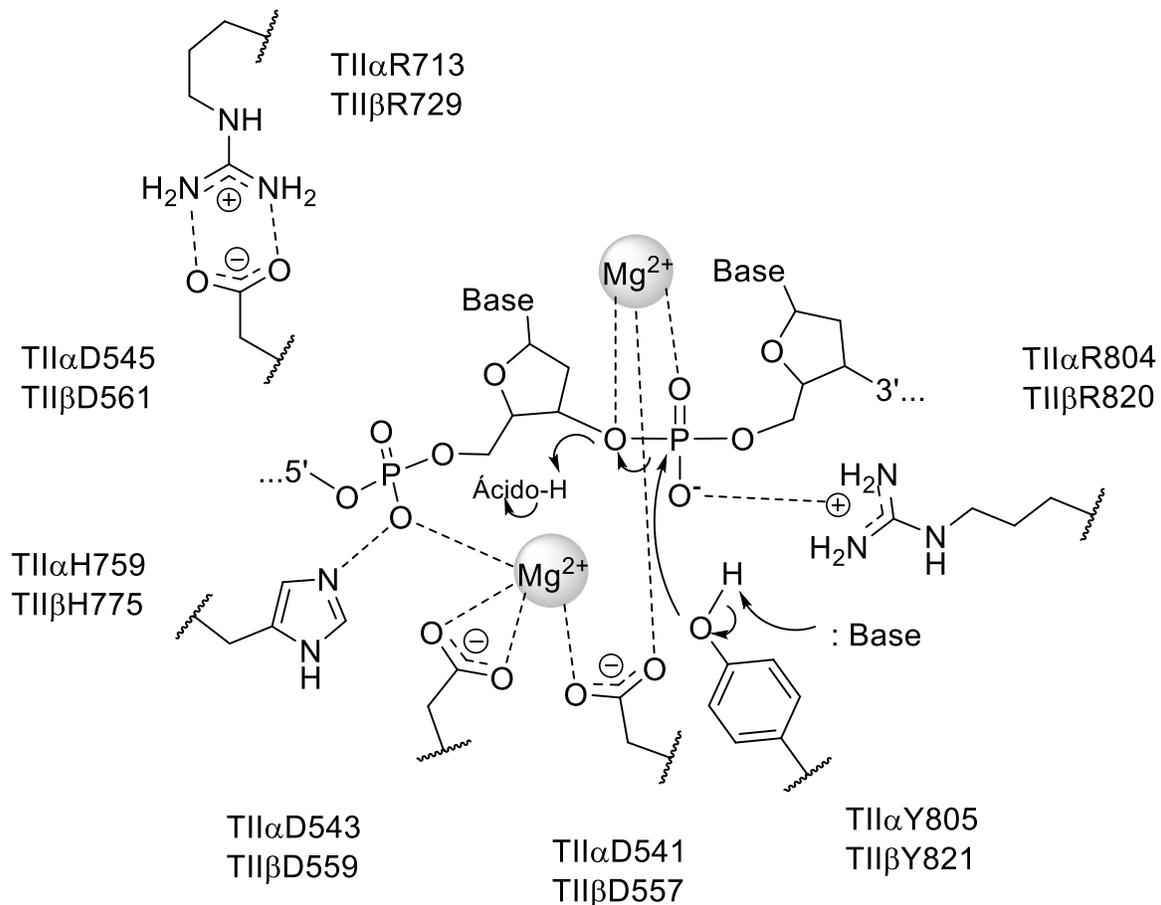


Figura 6. Mecanismo de acción de la enzima ADN-topoisomerasa II humana.

- c) **Translocación.** En este paso una molécula de ATP es hidrolizada, lo cual provoca la translocación del segmento T a través del segmento G roto.
- d) **Religación.** En este paso se establece un equilibrio ruptura-unión de las hebras.
- e) **Liberación del ADN.** La hidrólisis de la segunda molécula de ATP permite la liberación del ácido nucleico.



Las condiciones que incrementan la concentración de estos complejos topoisomerasa y ADN conduce a eventos mutagénicos que culminan en muerte celular. Varios fármacos en el mercado actúan por dicho mecanismo, incrementando los complejos de ruptura ADN-topoisomerasa, y son conocidos como venenos de topoisomerasa II (*Topo II poisons*).¹⁸

Las interacciones que median la actividad de estos compuestos con la enzima engloban interacciones polares, hidrofóbicas y de tipo π - π con el ADN.^{19, 20} Ejemplos de estos fármacos se muestran en la Figura 7.

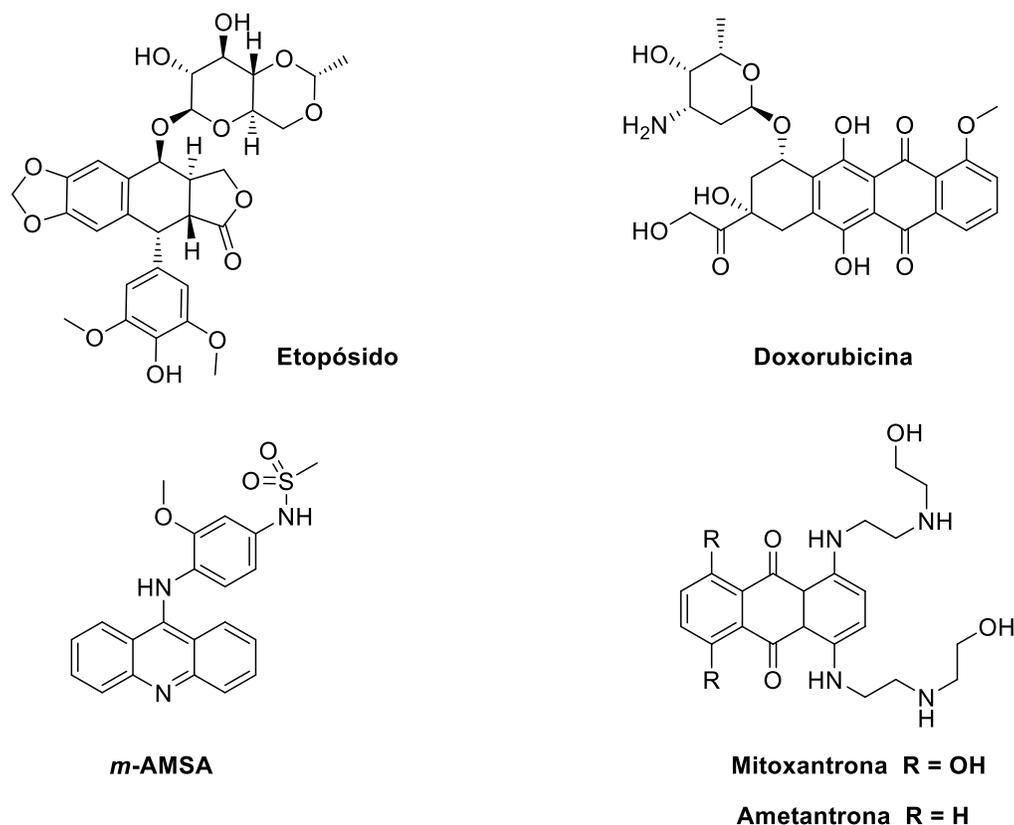


Figura 7. Compuestos inhibidores de topoisomerasa II.

2.8. m-AMSA

La *m*-AMSA o amsacrina es la 9-anilinoacridina más conocida en el tratamiento del cáncer. Clínicamente es empleada en el tratamiento de la leucemia aguda, así como en el linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin, que incrementa la concentración de los complejos de ruptura ADN-topoisomerasa II promoviendo el desacoplamiento entre los residuos catalíticos clave (extremo 3'-OH y enlace fosfotirosilo) por al menos 6.9 Å y que posteriormente induce muerte celular por apoptosis.²⁰



Estructuralmente, la amsacrina está compuesta por una acridina que se intercala entre los pares de bases del ADN y un sustituyente anilino con un grupo metoxilo en posición 3 y una sulfonamida en posición 1, que se proyectan hacia el surco menor del ADN e interaccionan con la enzima, como lo confirma la estructura cristalográfica del complejo ternario (Figura 8).³

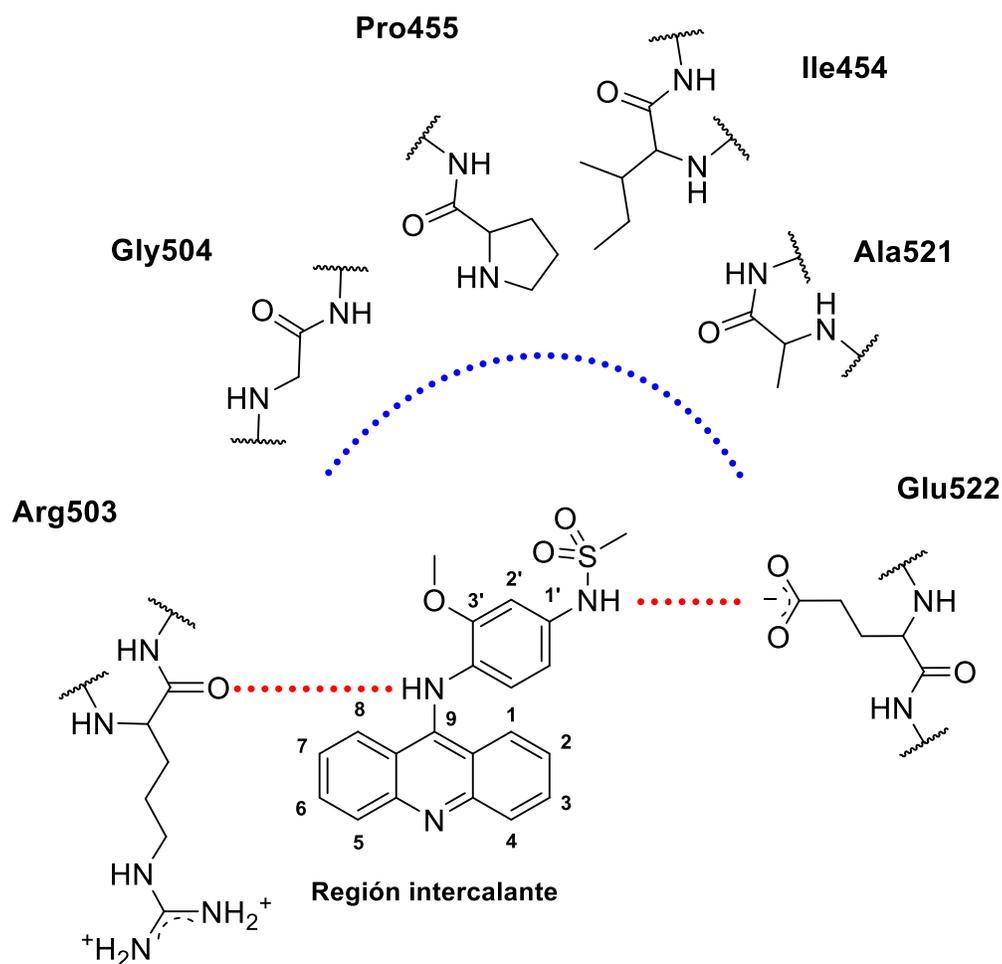


Figura 8. Esquema de las interacciones intermoleculares entre la *m*-AMSA y el complejo ADN-topoisomerasa IIβ.

En un estudio conformacional se observó que el grupo 3'-metoxilo restringe la rotación del anillo de anilino en una orientación favorable, ya que la presencia de dicho sustituyente en la posición 2' respecto a la sulfonamida (*o*-AMSA) incrementa el número de conformeros y disminuye la actividad antitumoral, aunque incrementa la capacidad de intercalación en el ADN (Figura 9). Además, la remoción del anillo de anilino de la acridina provoca una disminución en la afinidad por el complejo ADN-topoisomerasa II en un rango de 100 veces.²⁰

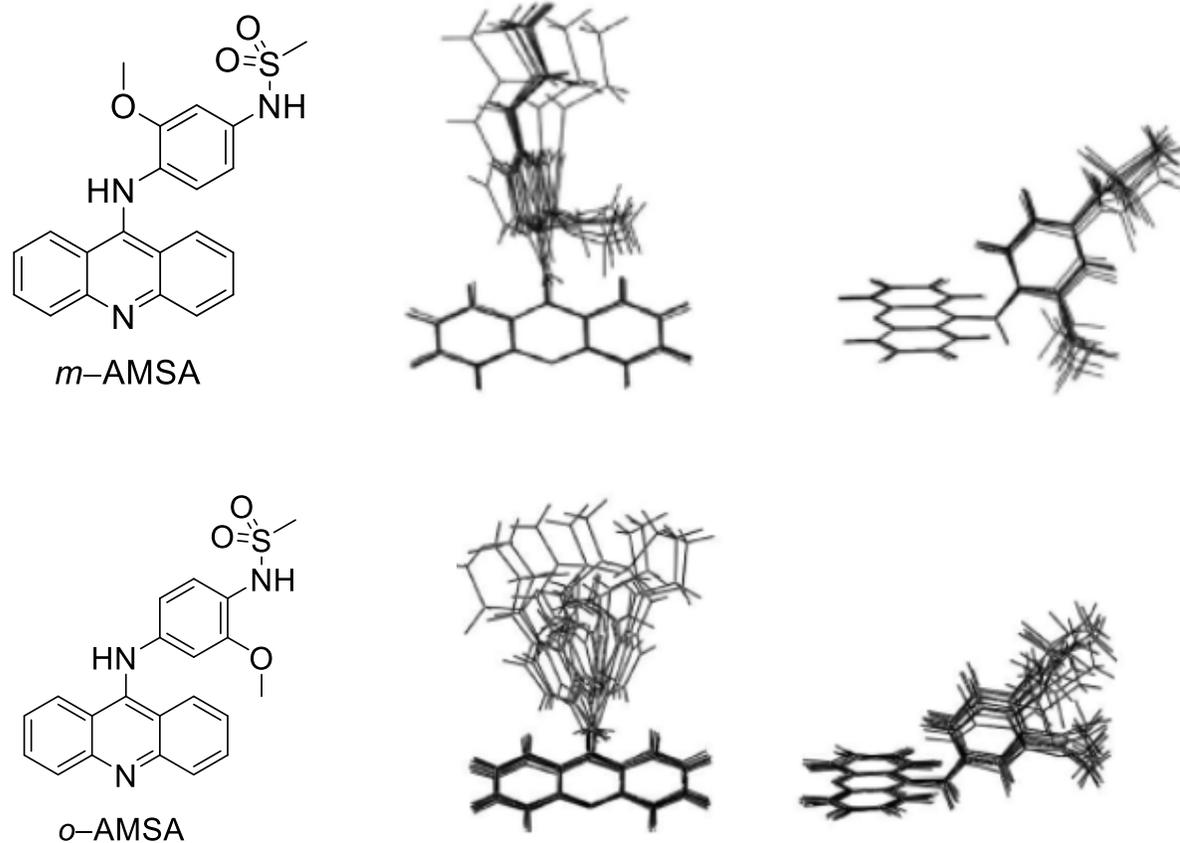


Figura 9. Análisis conformacional de los derivados *m*-AMSA y *o*-AMSA. Confórmeros de menor energía ± 5 kcal/mol.

Con esto se postula que la afinidad y especificidad de análogos de amsacrina, como un agente inhibidor de la enzima topoisomerasas II, están centradas en la sustitución del anillo de anilina, mientras que la capacidad de intercalación en el ADN se aprovecha para aumentar la afinidad por el complejo de ruptura ADN-Topo II.

En vista del éxito de esta molécula, se han preparado una larga serie de análogos (Figura 10), cuyos objetivos principales son aumentar la afinidad por el ADN, mejorar la solubilidad acuosa, aumentar el valor de pKa del átomo de nitrógeno de la acridina con grupos electrodonadores en el anillo de anilino, que mejoren las propiedades de biodisponibilidad y aumenten el tiempo de vida media.³ Adicionalmente, se han reportado otros problemas del tratamiento con amsacrina como la iniciación de cánceres secundarios, debido a la inducción de la ruptura del ADN por la interacción con cobre, produciendo radicales libres, formación de aductos con péptidos y proteínas con grupos sulfuro y recientemente, problemas de quimiorresistencia a la amsacrina.²¹



MARCO TEÓRICO

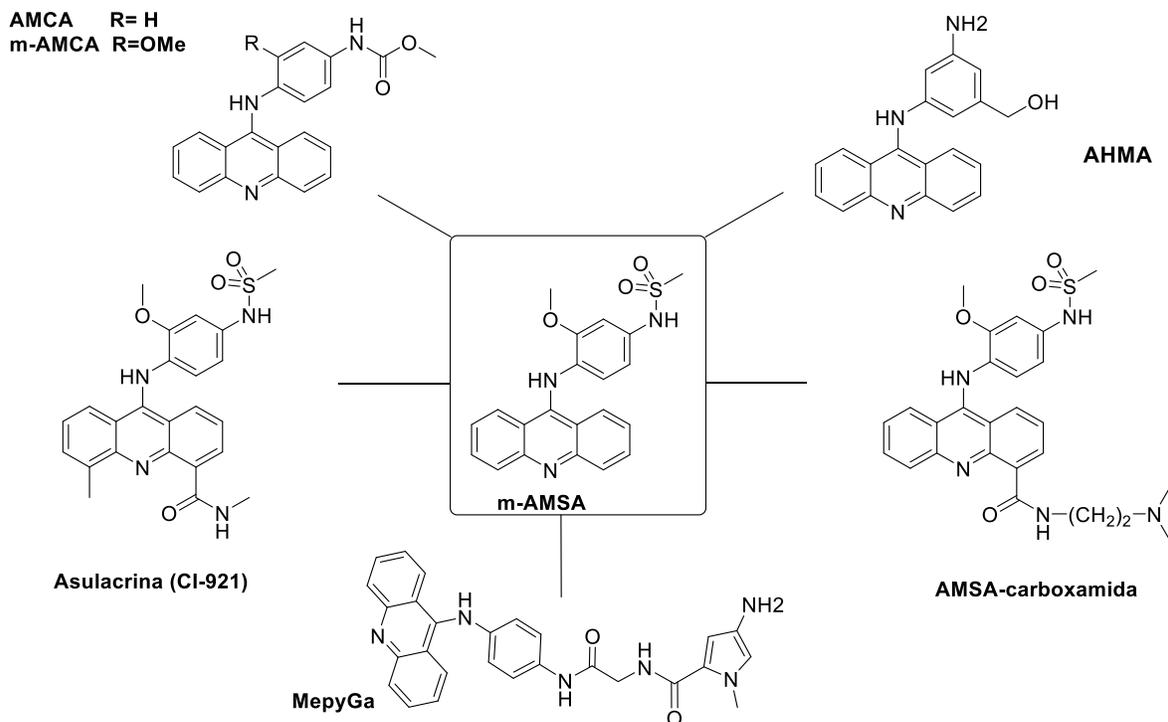


Figura 10. Análogos de *m*-AMSA que inhiben la actividad de ADN-topoisomerasa II.

Como alternativa, recientemente han surgido análogos bioisostéricos a las 9-anilinoacridinas en los que se reemplaza el núcleo de acridina por un nuevo sistema tricíclico, por ejemplo, los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, los cuales han mostrado resultados prometedores.^{22, 23}

2.9. Derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina

El primer reemplazo isostérico de un anillo de benceno por un anillo de tiazol en la acridina para generar el sistema de tiazolo[5,4-*b*]quinolina fue inicialmente descrito para la obtención de potenciales agentes antiespasmódicos, precursores de cianinas simétricas, antiinflamatorios y pruebas de fluorescencia (Figura 11).²⁴⁻²⁶

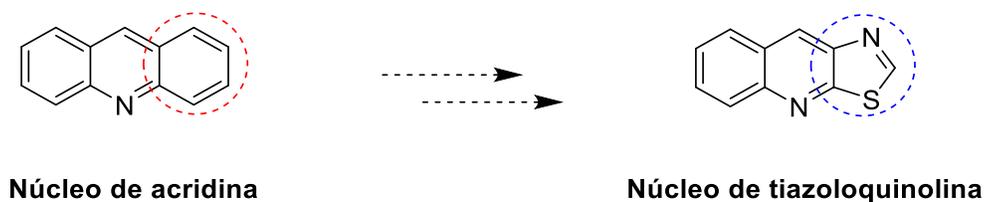


Figura 11. Reemplazo isostérico para la obtención del sistema de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.



En 1997 Álvarez-Ibarra describió la síntesis y evaluación *in vitro* de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina como potenciales agentes antitumorales. De este estudio se derivaron tres características que deben cumplirse para asegurar una buena actividad citotóxica: una densidad de carga positiva en posición 7, un sustituyente de dialquilaminoalquilamino con un valor de pKa entre 7.5-10 en el amino terciario y flexibilidad conformacional en la cadena (Figura 12).²⁷

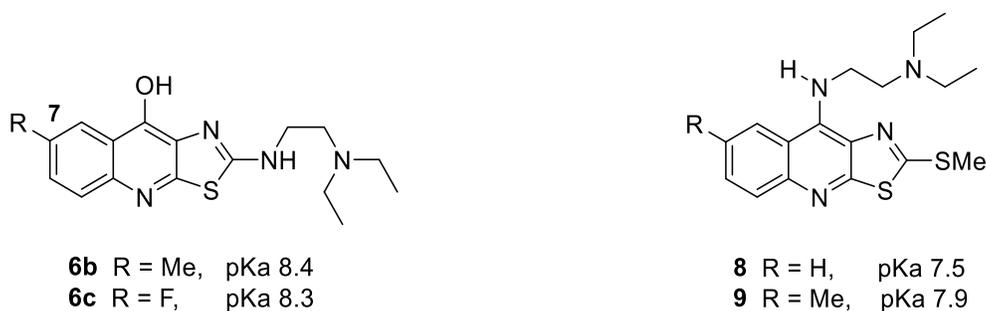


Figura 12. Derivados con buena actividad citotóxica ($Cl_{50} < 6 \mu M$) reportados por Álvarez-Ibarra.

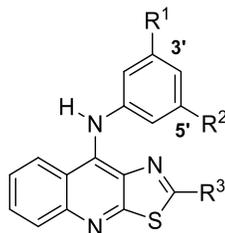
2.10. Derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina

Recientemente, en el grupo de trabajo de Lira-Rocha se han preparado compuestos híbridos de las 9-anilinoacridinas y los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, generando un gran número de derivados, algunos de los cuales han mostrado citotoxicidad en líneas tumorales humanas.^{4, 28}

La hipótesis de que los derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina son compuestos bioisómeros de la *m*-AMSA ha sido ampliamente estudiada. Los estudios conducidos al respecto son la capacidad de intercalación en el ADN e inhibición de Topo II *in vitro* e *in vivo*.

2.10.1. Ensayo de intercalación en el ADN.

En los derivados de acridina, la intercalación al ADN es el primer acontecimiento para la serie de eventos que desencadenan la citotoxicidad de estos compuestos. En el caso de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, el ensayo de intercalación en el ADN, por desplazamiento de bromuro de etidio, demostró la capacidad intercalante de estos compuestos, como previamente lo había indicado su estudio *in silico*.²⁹ Los resultados se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores de citotoxicidad y constantes aparentes de desplazamiento de bromuro de etidio de compuestos de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.

	R ¹	R ²	R ³	Act. Citotóxica (CI ₅₀ , μM)				Intercalación ADN	
				HeLa	SW480	SW620	K-562	Q ₅₀ ^a	Q _{max} ^b
7i	H	H	SMe	> 80	> 80	> 80	79.45	13.62 ± 4.64	0.2987 ± 0.03
10g	H	H	E	15.96	37.7	21.6	16.8	52.46 ± 14.08	1.7428 ± 0.1769
7t	NH ₂	H	SMe	> 80	> 80	> 80	> 80	6.96 ± 2.095	0.5861 ± 0.04
7v	NHAc	H	SMe	> 80	> 80	> 80	> 80	18.447 ± 8.97	1.0781 ± 0.1982
7u	NH ₂	CH ₂ OH	SMe	> 80	> 80	> 80	> 80	22.64 ± 6.207	1.2804 ± 0.1418
	m-AMSA			9.5	27.7	16.7	19.9	N.D.	N.D.

IC₅₀ (μM), concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular determinado con el ensayo de MTT a 48 h. E = NH(CH₂)₂NEt₂. ^a Concentración para disminuir el 50% de la fluorescencia del bromuro de etidio (nM). ^b Unión máxima al ADN. ± Desviación estándar. N.D. No determinada.

De manera general, los resultados de intercalación muestran que los derivados con un grupo metiltilio en posición 2 del núcleo tricíclico presentan los valores más bajos de Q₅₀, es decir, tienen mayor afinidad por el ADN, aunque esto no correlaciona con su actividad citotóxica.³⁰

En el caso del derivado con una cadena de dietilaminoetilamino en posición 2 (**10g**), compuesto con mejor actividad citotóxica, éste se une a más sitios del ADN pero con menor especificidad y afinidad. Se ha propuesto que la buena actividad citotóxica de este derivado es debido a la intercalación en el ADN y a la interacción de un oxígeno del grupo fosfato del ADN con el hidrógeno del amino terciario de la cadena alifática, al encontrarse ionizado a pH fisiológico, a través de la formación de un puente salino.²⁸

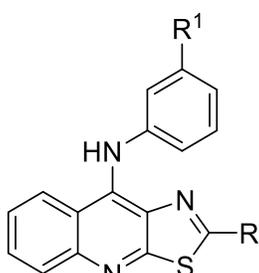
2.10.2. Inhibición de la actividad de ADN-Topoisomerasa II (ensayo *in vitro*).

Este ensayo consiste en la decatenación de ADN circular (kDNA) por la enzima Topo II en presencia de algún agente inhibidor. Las moléculas de ADN resultantes son analizadas a través de una electroforesis en gel de agarosa, y la actividad se calcula como el porcentaje de kDNA convertidas a moléculas individuales,³¹ confirmando de esta manera la capacidad de inhibición de la enzima por estos compuestos. En el caso de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina los resultados de esta evaluación se presentan en la Tabla 2.



Tabla 2. Actividad inhibitoria (CI_{50} , μM) sobre ADN-topoisomerasa II de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina y *m*-AMSA como referencia.

Compuesto	CI_{50} (μM)
7p	12.27 ± 0.28
7t	16.74 ± 0.14
7v	29.56 ± 6.21
7u	18.04 ± 1.66
10g	168.90 ± 6.07
11c	40.95 ± 8.66
<i>m</i>-AMSA	9.94 ± 0.51



7p
 $R^1 = \text{---NMe}$
 $R^2 = \text{---SMe}$

11c
 $R^1 = \text{---Cl}$
 $R^2 = \text{---NH---N---}$

Citotoxicidad 7p (CI_{50} , células HeLa) = 46.22 μM , **11c** (CI_{50} , células HeLa) = 7.46 μM . \pm Desviación estándar.

La conclusión de este estudio es que los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina pueden no presentar el mismo mecanismo de acción que la *m*-AMSA, o su capacidad para ingresar al interior de la célula es limitada. Lo anterior debido a que el compuesto **7p** presentó un valor de inhibición cercano al compuesto de referencia, sin embargo, presenta baja citotoxicidad; mientras que el compuesto **11c**, más citotóxico que **7p**, fue cuatro veces menos potente que la *m*-AMSA como inhibidor de la Topo II.

2.10.3. Inhibición de la actividad de ADN-topoisomerasa II en células HeLa (ensayo *in vivo*).

Debido a que no se observó una correlación entre los resultados del ensayo *in vitro* y la citotoxicidad de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, posiblemente por la presencia de otras variables como permeabilidad y metabolismo de los compuestos, a fin de descartar el mecanismo de acción propuesto para este grupo de compuestos, se realizó la evaluación de la inhibición ADN-topo II *in vivo* (línea celular HeLa).

Este ensayo mide la estabilización de complejos de ruptura entre el ADN genómico y las ADN-Topoisomerasas inducido por fármacos como el etopósido y la *m*-AMSA *in vivo*. El método implica la separación física de los complejos ADN/enzima de la proteína libre, seguido de la utilización de anticuerpos para detectar DTi unida al ADN, permitiendo de esta forma la cuantificación de los complejos covalentes (Figura 13).³²

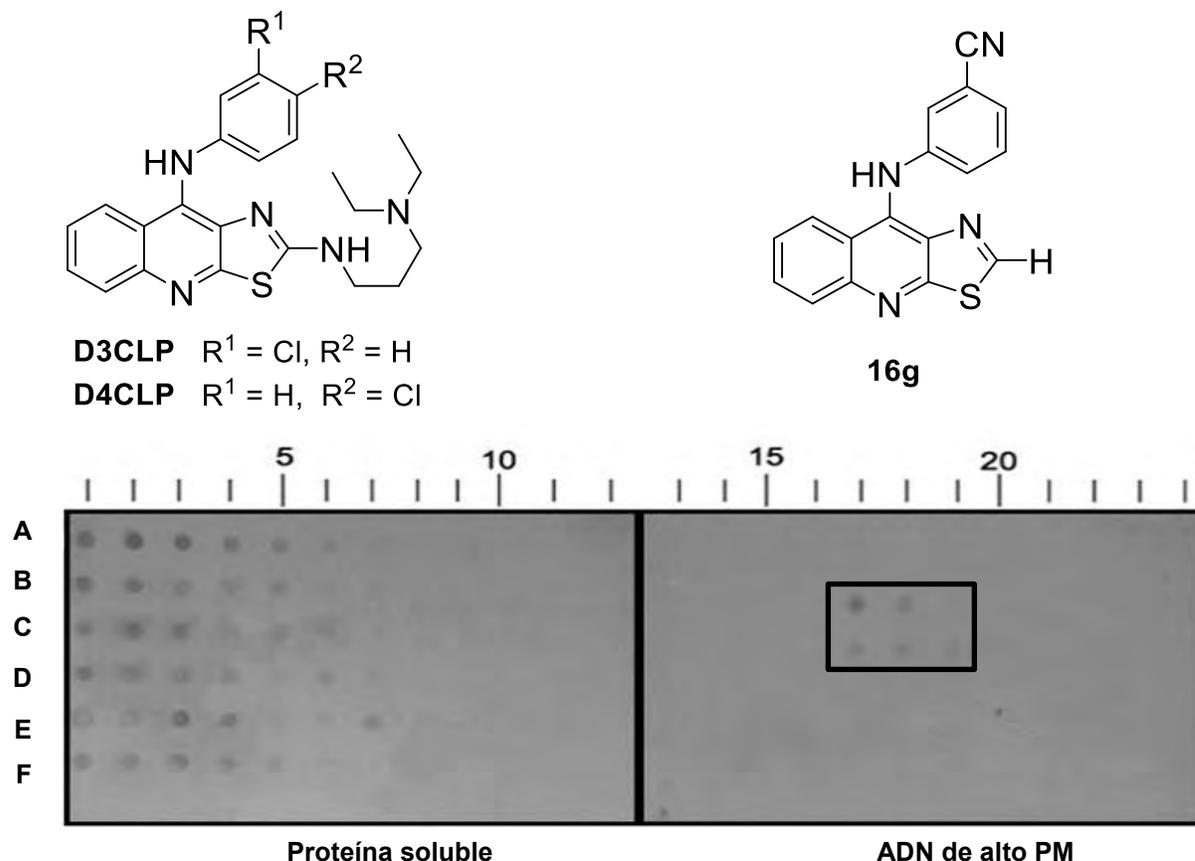


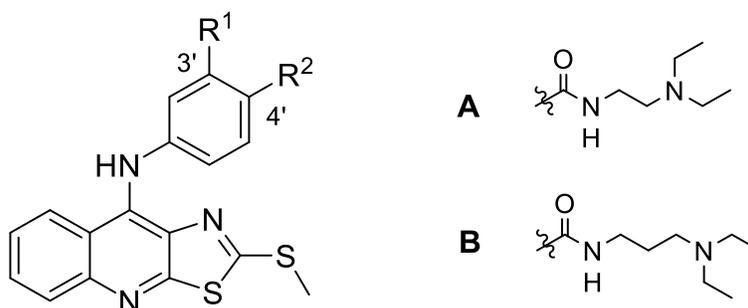
Figura 13. Detección de aductos de topoisomerasa II-ADN en células HeLa. (A) Vehículo, (B) etóposido, (C) *m*-AMSA, (D) D3CLP, (E) D4CLP, (F) 16g.

Mientras que los compuestos empleados como controles positivos, el etóposido y la amsacrina, carriles B y C, respectivamente, estabilizan los complejos ternarios ADN-topoisomerasa II-inhibidor, los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina no forman estos aductos, carriles D, E y F, por lo que aparentemente éstos no actúan por dicho mecanismo [32]. Estos resultados complementan los hallazgos realizados por González-Sánchez, I., et al, en los que se encontró que el análogo D3CLP induce muerte celular por apoptosis sin arresto del ciclo celular, vía la activación de efectores de caspasas.³³

En un intento por diseñar sustancias que compartan el mismo mecanismo de acción, Martínez-Vázquez sintetizó un nuevo grupo de compuestos, los cuales presentan una cadena de dialquilaminoalquilamino, sustituyente que al encontrarse en posición 2 o 9 del sistema de tiazolo[5,4-*b*]quinolina ha conducido a compuestos con buena citotoxicidad, pero enlazado al anillo de anilino a través de un grupo carbonilo, como grupo espaciador.³⁴ La actividad citotóxica de estos derivados fue de buena a moderada y se presenta en la Tabla 3.



Tabla 3. Actividad citotóxica de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina reportados por Martínez-Vázquez y la amsacrina (Cl_{50} , μM) a 48 h de tratamiento.



Compuesto	R ¹	R ²	HeLa	SW480	SW620	K-562
Va	A	H	17.41 ± 3.99	12.84 ± 3.25	12.72 ± 1.93	11.39 ± 2.06
Vb	H	A	13.1 ± 3.74	8.47 ± 2.08	16.4 ± 4.04	8.05 ± 1.99
Vc	B	H	12.09 ± 2.98	11.84 ± 2.85	16.56 ± 3.41	10.99 ± 2.74
Vd	H	B	9.78 ± 2.45	13.94 ± 2.08	15.73 ± 4.61	10.17 ± 3.91
Amsacrina			9.84 ± 2.62	19.75 ± 3.66	16.73 ± 3.75	14.63 ± 4.20

± Desviación estándar

Se debe considerando que en esta serie de compuestos el grupo amino en la sustitución R¹ y R² no se encuentra directamente unido al anillo de anilino, requerimiento que podría ser importante para la generación de buenos agentes inhibidores de esta enzima, aunado a la capacidad de intercalación, como se ha propuesto recientemente.³

Los resultados de los estudios de relación estructura química-actividad biológica y los ensayos farmacodinámicos de los derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina han conducido a la formulación de una nueva interrogante: ¿cuáles son los requerimientos estructurales del anillo de anilino que permiten la inhibición de la enzima ADN-Topo II?, para lo cual primero se tienen que sintetizar los compuestos y evaluar su citotoxicidad, lo cual constituye el tema central del presente proyecto y que se discute con mayor detalle en el apartado siguiente. De resultar activos los nuevos compuestos, en otra etapa de la investigación, se determinará si son capaces de inhibir *in vivo* la ADN-topoisomerasa II.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, sin embargo, los actuales tratamientos quimioterapéuticos presentan dos problemas principales: efectos adversos y quimiorresistencia. Una de las estrategias más empleadas para la obtención de moléculas con mayor selectividad y potencia hacia células tumorales, es la modificación de una molécula patrón. Bajo esta perspectiva se diseñaron los derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina, bioisómeros de la amsacrina. Esta estrategia involucra que los derivados obtenidos comparten el mismo mecanismo de acción, sin embargo, los estudios farmacodinámicos indican que esto no es así.^{32, 33}

En un intento por diseñar sustancias que compartan el mismo mecanismo de acción, intercalación en el ADN e inhibición de la enzima topoisomerasa II, el presente trabajo se describe el diseño, la síntesis, el estudio de acoplamiento molecular y la evaluación citotóxica *in vitro* de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina con un sustituyente (dialquilamino)alquilamino, (azacicloalquil)alquilamino, hidroxialquilamino o 2-(dietilamino)alcoxi en posiciones 3' o 4' del anillo de anilina, lo que permitirá conocer los requerimientos estructurales para la generación de buenos agentes citotóxicos bajo la hipótesis de actuar como agentes inhibidores de la enzima ADN-topoisomerasa II.



4. HIPÓTESIS

- Si al igual que en la amsacrina, la presencia de un grupo amino secundario en posición 4' en los derivados de 9-anilino-2-metil-5,4-b-quinolina es importante para la actividad citotóxica, entonces los compuestos presentarán actividad citotóxica similar al compuesto de referencia.
- Si al realizar un reemplazo isostérico del grupo amino α por un átomo de oxígeno la actividad citotóxica disminuye, entonces, la presencia de un grupo donador de puente de hidrógeno en dicha posición es un requisito farmacofórico para la actividad citotóxica de este grupo de sustancias.
- La generación de la serie homóloga superior de derivados de 4'-N,N-dialquilaminoetilamino y 4'-[2-(1-azacicloalquil)etilamino]-9-anilino-2-metil-5,4-b-quinolina, esto es, a derivados de 4'-N,N-alquilaminopropilamino y 4'-[2-(1-azacicloalquil)propilamino]-9-anilino-2-metil-5,4-b-quinolina, brindará compuestos con mayor actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales.
- Si la basicidad del grupo amino terciario (nitrógeno β) es importante como punto farmacofórico en la actividad citotóxica de este tipo de compuestos, entonces, la reducción de la basicidad o la eliminación de dicho grupo funcional disminuirá la actividad citotóxica de este tipo de compuestos, lo cual se evaluará preparando la correspondiente amida y los derivados con el grupo hidroxialquilamino.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la influencia de diversos sustituyentes en el anillo de anilina sobre la actividad citotóxica de derivados de 9-anilino**ti**azolo[5,4-*b*]quinolina.

5.2. Objetivos particulares

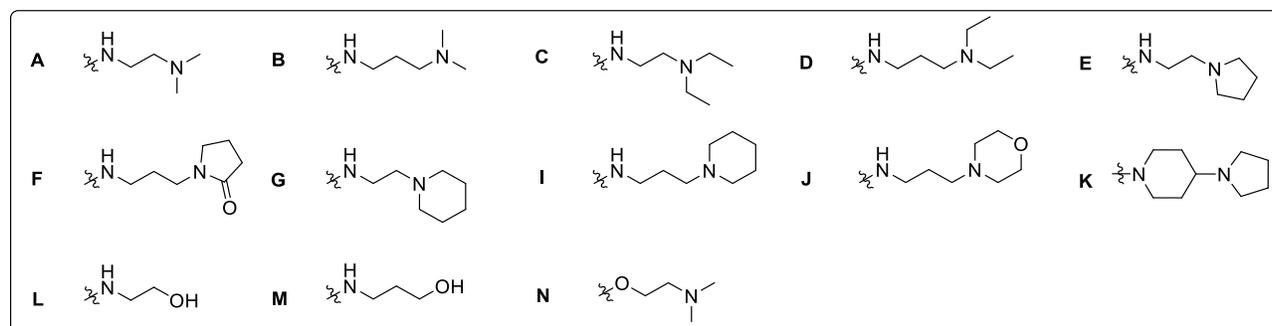
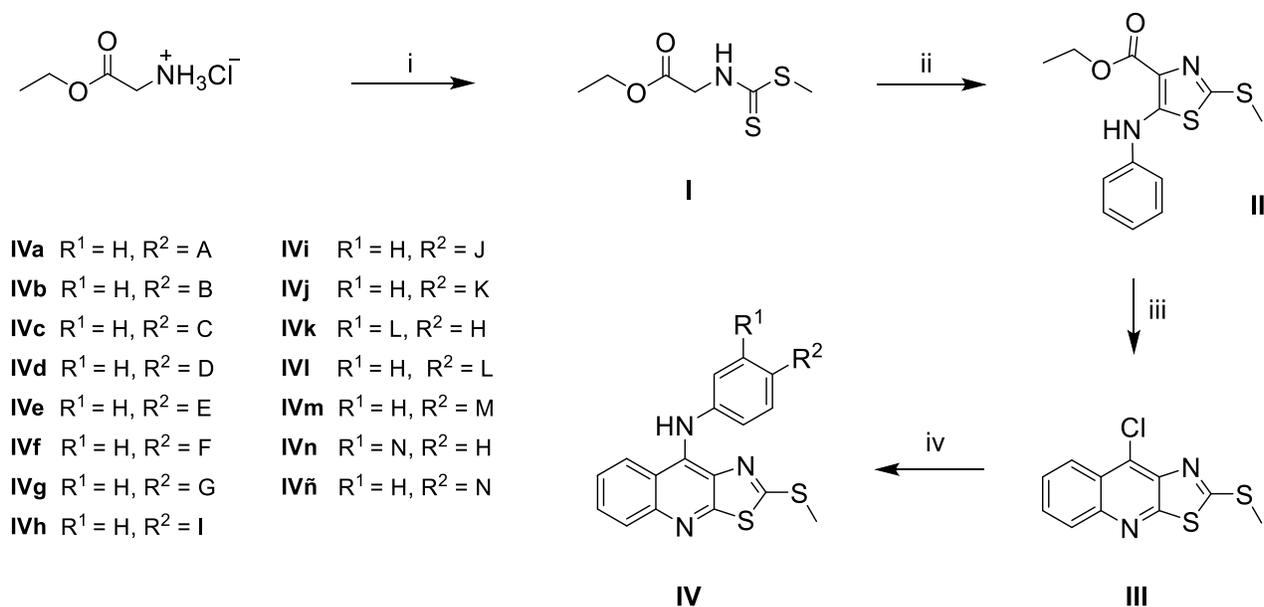
- Sintetizar 15 nuevos derivados de 9-anilino**ti**azolo[5,4-*b*]quinolina con sustituyentes de (dialquilamino)alquilamino, (azacicloalquil)alquilamino, hidroxialquilamino y 2-(dietilamino)etoxi en las posiciones 3' o 4' del anillo de anilina.
- Determinar la actividad citotóxica de los derivados propuestos en cuatro líneas celulares tumorales.
- Realizar estudios de modelado molecular de derivados de 9-anilino**ti**azolo[5,4-*b*]quinolina como entidades aisladas, las cuales incluyen: obtención del confórmero más estable, descriptores QSAR y superficies de propiedades electrónicas, empleando métodos semiempíricos y funcionales de la densidad.
- Establecer modelos matemáticos de la relación estructura química-actividad citotóxica para este tipo de compuestos.
- Proponer un modo de unión de los compuestos obtenidos con la posible diana biológica (topoisomerasa II β -ADN) realizando estudios de acoplamiento molecular.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis química

La ruta general de síntesis para la obtención de nuevos derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina (**IVa-IVñ**) se muestra en el Esquema 1.



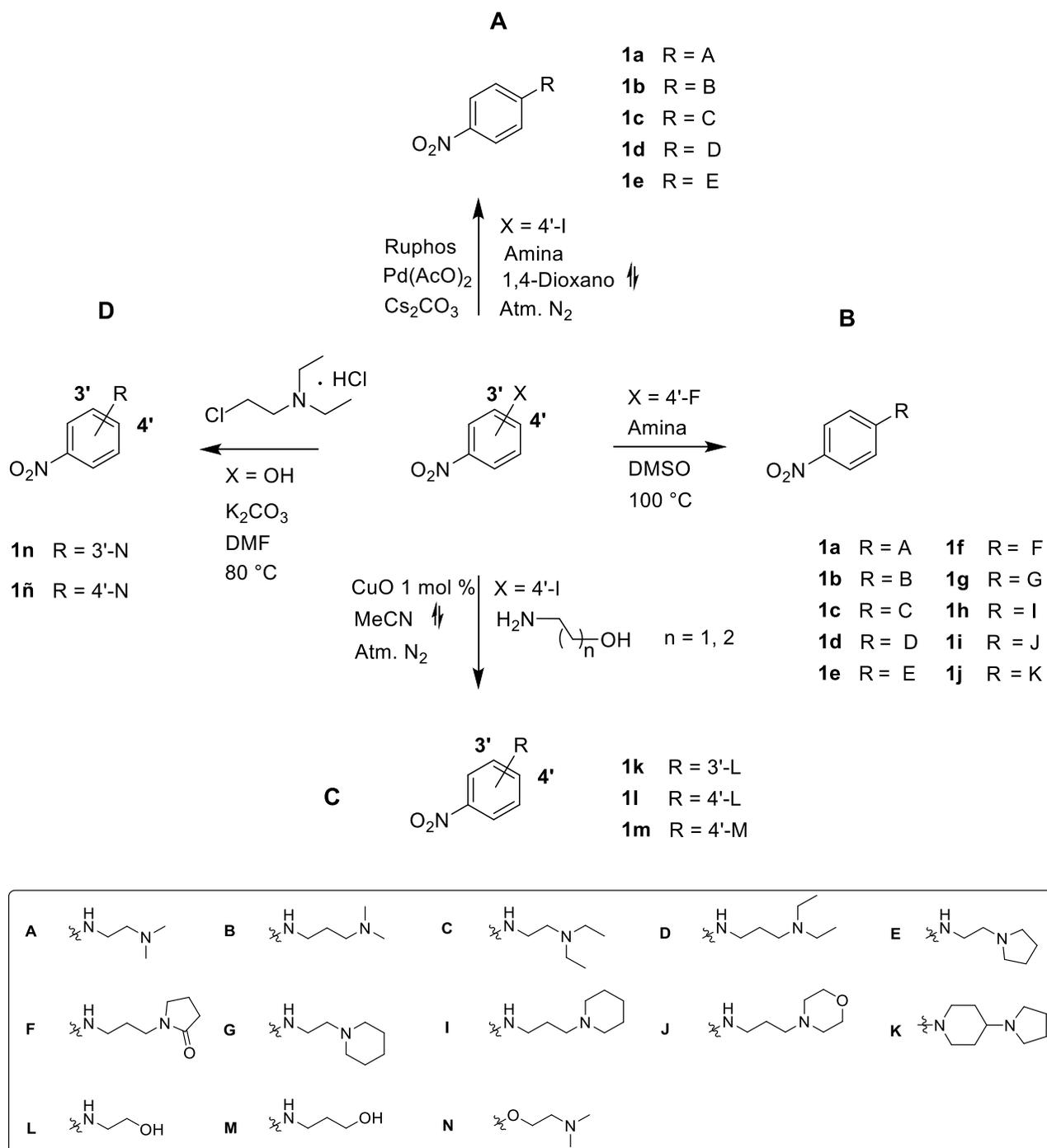
Esquema 1. Ruta general de síntesis. Reactivos y condiciones de reacción: **(i)** 1a. TEA/CS₂, CHCl₃, 1b. Me₂SO₄, t.a. 2a. K₂CO₃, acetona, 2b. MeI. **(ii)** *t*-BuOK/THF anhidro, -75 °C; C₆H₅-NCS, -75 °C → T. amb. **(iii)** PPA/POCl₃, 130-135 °C. **(iv)** Anilina/AcOH, 120 °C, 8h o Anilina/*n*-BuOH/H⁺ cat., 6-8 h.

La preparación del sistema tricíclico (**III**) se llevó a cabo siguiendo la metodología previamente reportada, a partir del clorhidrato de glicinato de etilo y sin modificaciones.⁴¹



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que las anilinas de interés no son compuestos comerciales fue necesaria su preparación, para lo cual inicialmente se preparó el correspondiente compuesto nitrado, donde se evaluaron cuatro metodologías, debido a la naturaleza de los sustituyentes de interés (Esquema 2).



Esquema 2. Ruta general de síntesis de los compuestos **1a-1ñ**.



Inicialmente se ensayaron condiciones organometálicas (**A**), empleando paladio y un ligante orgánico, el compuesto 2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenil (RuPhos), con rendimientos de reacción superiores al 90 %, aunque únicamente se logró la obtención de los intermediarios **1a-1e**.

Posteriormente, se decidió emplear una reacción de sustitución nucleofílica aromática (**B**) para la obtención de **1a-1j**, debido a que las condiciones de reacción son menos sensibles al ambiente, y los tiempos de reacción más cortos, comparadas con las condiciones **A**. Dicha reacción se realizó empleando el compuesto *p*-fluronitrobenzoceno y la amina correspondiente en sulfúrico de dimetilo, en tiempos de reacción de 1-2 horas y con excelentes rendimientos (80–98%), debido al efecto desactivante del grupo nitro en posición *para*.

La obtención de los intermediarios con un sustituyente hidroxialquilamino (**1k-1m**), se llevó a cabo a través de una reacción tipo Ullmann (**C**) con el derivado *m*- ó *p*-yodonitrobenzoceno y el aminoalcohol correspondiente en acetonitrilo, catalizada por CuO, en tiempos de reacción de 4–8 horas y con rendimientos de reacción excelentes (95–98%).

Finalmente, la obtención de los intermediarios con un sustituyente 2-(dietilamino)etoxi (**1n** y **1ñ**) se llevó a cabo a través de una reacción tipo Williamson (**D**) con el *p*- ó *m*-nitrofenol y el cloruro de alquilo correspondiente, K₂CO₃ y DMF a 100°C, en tiempos de reacción de 4–6 horas y con buenos rendimientos de reacción (93–95).

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **1a-1ñ** se reportan en las referencias descritas,⁴²⁻⁴⁴ por lo que a continuación solo se presenta su caracterización física (Tabla 4):

Tabla 4. Propiedades físicas de los compuestos **1a-1ñ**.

Clave	Nombre	Apariencia	% R	R _f	P.F. (°C)
1a	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Dimetil- <i>N</i> ² -(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina	Líquido amarillo	80	0.22	-
1b	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Dimetil- <i>N</i> ² -(4-nitrofenil)propano-1,3-diamina	Sólido amarillo	98	0.26	40-45
1c	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Dietil- <i>N</i> ² -(4-nitrofenil)etano-1,2-diamina	Líquido amarillo	88	0.67	-
1d	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Dietil- <i>N</i> ² -(4-nitrofenil)propano-1,3-diamina	Líquido amarillo	92	0.40	-



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clave	Nombre	Apariencia	% R	R _f	P.F. (°C)
1e	4--Nitro- <i>N</i> -[2-(pirrolidin-1-il)etil]anilina	Líquido amarillo	95	0.42	-
1f	1-[3-((4-Nitrofenil)amino)propil]pirrolidin-2-ona	Sólido amarillo	85	0.63	106-107
1g	4-Nitro- <i>N</i> -[2-(piperidin-1-il)etil]anilina	Líquido amarillo	93	0.31	-
1h	4-Nitro- <i>N</i> -[2-(piperidin-1-il)propil]anilina	Líquido amarillo	95	0.34	-
1i	<i>N</i> -(3-Morfolinopropil)-4-nitroanilina	Sólido amarillo	88	0.53	63-64
1j	1-(4-Nitrofenil)-4-(pirrolidin-1-il)piperidina	Sólido amarillo	80	0.27	116-117
1k	2-[(3-Nitrofenil)amino]etanol	Líquido amarillo	95	0.42	-
1l	2-[(4-Nitrofenil)amino]etanol	Líquido amarillo	98	0.53	110-111
1m	3-[(4-Nitrofenil)amino]propan-1-ol	Sólido café	97	0.40	152
1n	<i>N,N</i> -Dietil-2-(3-nitrofenoxi)etan-1-amina	Líquido naranja	95	0.49	-
1ñ	<i>N,N</i> -Dietil-2-(4-nitrofenoxi)etan-1-amina	Líquido amarillo	93	0.47	-

R_f: sistema IV, Tabla 12.

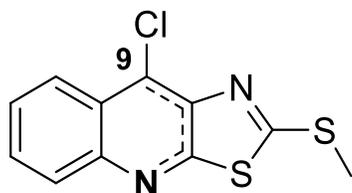
Por otro lado, la reducción de los intermediarios nitrados al amino derivado correspondiente se llevó a cabo con H₂, Pd/C, y metanol como medio de reacción, a temperatura ambiente para los derivados *meta* sustituidos durante 0.5–1 h y a 60°C para los análogos *para* sustituidos por 1 h. Los rendimientos de reacción obtenidos son de buenos a excelentes (85–98%), sin embargo, las anilinas preparadas se emplearon inmediatamente, ya que son compuestos inestables. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **2a-2ñ** se reportan en las referencias descritas,⁴²⁻⁴⁴ por lo que a continuación sólo se presenta su caracterización física:

Tabla 5. Propiedades físicas de los compuestos **2a-2ñ**.

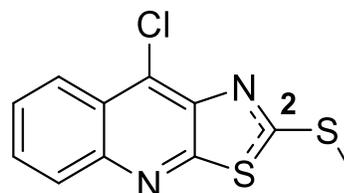
Clave	Nombre	Apariencia	% R	R _f
2a	<i>N</i> ¹ -[2-(Dimetilamino)etil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	94	0.37 ^a
2b	<i>N</i> ¹ -[3-(Dimetilamino)propil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	98	0.20 ^a
2c	<i>N</i> ¹ -[2-(Dietilamino)etil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	91	0.20 ^a
2d	<i>N</i> ¹ -[3-(Dietilamino)propil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	85	0.22 ^a
2e	<i>N</i> ¹ -[2-(Pirrolidin-1-il)etil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	93	0.30 ^b
2f	1-[3-((4-Aminofenil)amino)propil]pirrolidin-2-ona	Líquido púrpura	95	0.49 ^c
2g	<i>N</i> ¹ -[2-(Piperidin-1-il)etil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	95	0.40 ^c
2h	<i>N</i> ¹ -[3-(Piperidin-1-il)propil]fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	98	0.42 ^c
2i	<i>N</i> ¹ -(3-Morfolinopropil)fenil-1,4-diamina	Líquido púrpura	95	0.65 ^b
2j	4-[4-(Pirrolidin-1-il)piperidin-1-il]anilina	Líquido púrpura	95	0.41 ^c
2k	2-[(3-Aminofenil)amino]etanol	Líquido púrpura	89	0.26 ^a
2l	2-[(4-Aminofenil)amino]etanol	Líquido púrpura	90	0.19 ^a
2m	3-[(4-Aminofenil)amino]propan-1-ol	Líquido púrpura	93	0.33 ^a
2n	3-[2-(Dietilamino)etoxi]anilina	Líquido amarillo	90	0.55 ^a
2ñ	4-[2-(Dietilamino)etoxi]anilina	Líquido amarillo	97	0.32 ^a

^a Sistema II, ^b Sistema III, ^c Sistema IV (Tabla 12).

Empleando el intermediario **III** y la anilina adecuadamente sustituida (**2a-2ñ**), se obtuvieron los nuevos derivados **IVa-IVñ**, por desplazamiento del átomo de cloro de la posición 9 del sistema tricíclico. A pesar de que el compuesto **III** posee dos sitios susceptibles de sufrir reacciones de sustitución nucleofílica aromática (S_NAr), las posiciones 2 y 9, la monitorización de las reacciones indicó la formación de un solo producto, cuya estructura fue confirmada mediante análisis espectroscópicos y espectrométricos, confirmando la sustitución en la posición 9. Este comportamiento se ha explicado en términos de la teoría de Pearson de ácidos y bases, duros y blandos (HSAB) (Figura 14).⁴⁵

**Zona blanda**

Reacciona con aminas aromáticas

**Zona dura**

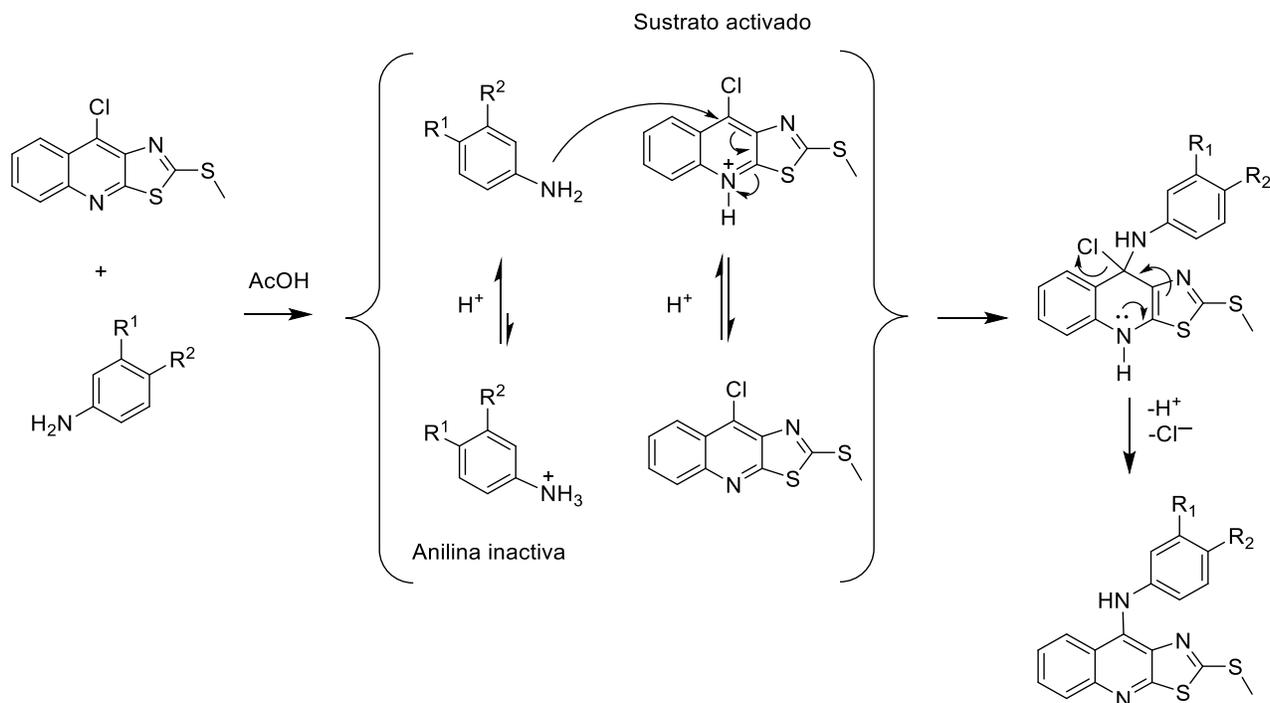
Reacciona con aminas alifáticas

Figura 14. Zonas susceptibles a un ataque nucleofílico de acuerdo a la teoría de HSAB.

La incorporación de las anilinas, previamente sintetizadas, se realizó empleando AcOH glacial como medio de reacción o *n*-BuOH y catálisis ácida en algunos casos. Las condiciones previamente reportadas en nuestro grupo de trabajo [4], *n*-BuOH/H⁺, sólo fueron funcionales para la obtención de los derivados **IVk-IVm**, caracterizados por presentar un sustituyente hidroxialquilamino en posición 3' o 4', con rendimientos de reacción de moderados a buenos (68-92 %).

Sin embargo, para el resto de los derivados, las condiciones de *n*-BuOH/H⁺ no fueron efectivas para la obtención de los compuestos de interés. Después de un estudio de las condiciones de reacción que permitieran la obtención de estos derivados se determinó que el uso de AcOH como medio de reacción favorece la incorporación de las anilinas diversamente sustituidas, en tiempos de reacción cortos y de buenos a excelentes rendimientos de reacción. Este medio de reacción se ha reportado ampliamente para la incorporación de anilinas sustituidas tanto con grupos electrodonadores como electroattractores a sistemas heterocíclicos (purinas y pirimidinas) con buenos rendimientos de reacción y tiempos cortos de reacción.⁴⁶

Una posible explicación a este hecho es que el ácido acético favorece la incorporación de la anilina al promover la protonación del nitrógeno de la quinolina, provocando una mayor deficiencia electrónica sobre el carbono *ipso* al cloro del compuesto **III**, lo que se refleja en una mayor susceptibilidad al ataque del nucleófilo, mediado por un proceso de adición-eliminación.⁴⁷ Aunque en este medio de reacción las anilinas disminuyen su nucleofilia, por protonación del grupo amino, se puede considerar que existe un equilibrio del estado ionizado y neutro de la molécula como se ilustra en el Esquema 3. La formación del derivado de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina desplaza el equilibrio de la anilina a su forma neutra, lo que permite su reacción con el sustrato activado.



Esquema 3. Intermediarios propuestos en la reacción S_NAr en AcOH como medio de reacción.

Esta metodología, a diferencia de las alternativas organometálicas que frecuentemente tienen la desventaja del empleo de reactivos caros, condiciones de reacción más especiales y procesos largos de purificación de los productos [35], ofrece varias ventajas como la fácil eliminación del ácido acético al finalizar la reacción y las condiciones de reacción suaves, no sensibles al ambiente.

El tratamiento de la mezcla de reacción resultante consistió en ajustar el pH de la mezcla de reacción a neutro con una solución de NaOH 10% y posteriores extracciones con EtOAc. La fase orgánica se concentró a presión reducida y el aceite amarillo obtenido se trató con éter isopropílico frío, observándose la formación de sólidos amarillos que se purificaron por recristalización o, en algunos casos, por columna cromatográfica. Por otro lado, el trabajo de reacción para los derivados **IVk-IVm** fue más simple, ya que al finalizar la reacción se observó la presencia de un precipitado en el medio de reacción, el cual se colectó por filtración al vacío y el residuo se lavó con EtOAc caliente. Los productos finales se obtuvieron como sólidos amarillos amorfos, con puntos de fusión por debajo de 185°C. Los rendimientos de reacción exhiben un amplio intervalo debido a que el crudo de la reacción fue muy complejo y, en ocasiones, requirió el uso de cromatografía en columna, siendo éstos de muy buenos (90-98%) a regulares (76-86%), presentándose los más bajos, 42 y 55 %, para los derivados **IVe** y **IVj**, respectivamente, dada la dificultad de su purificación por recristalización.



6.2. Caracterización espectroscópica y espectrométrica.

La elucidación estructural de todos los nuevos compuestos se realizó mediante el análisis de sus espectros de Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H) y Espectrometría de Masas (EM). La presencia de patrones característicos permitió la caracterización estructural de los compuestos y la asignación de las señales encontradas. Los espectros de las estructuras novedosas se encuentran en el Anexo I. La numeración correspondiente al sistema de 9-anilino-2-metiltioazolo[5,4-*b*]quinolina se muestra a continuación (Figura 15):

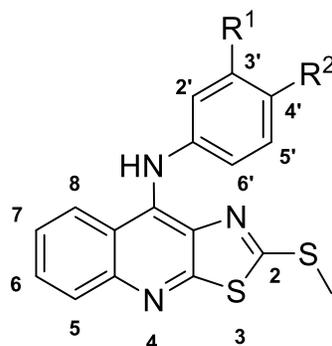


Figura 15. Numeración empleada para la asignación de las señales del sistema 9-anilino-2-metiltioazolo[5,4-*b*]quinolina.

6.2.1. Espectroscopía de infrarrojo

Esta técnica fue de utilidad para confirmar la presencia de los grupos funcionales presentes en las sustancias obtenidas. La incorporación de la anilina en la posición 9 se verificó por la presencia de una banda alrededor de $3400\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a las vibraciones de estiramiento N-H presentes en las aminas secundarias de las moléculas y por la presencia de una banda en 757 cm^{-1} de la vibración C-S del grupo metiltio de la posición 2, además de otras bandas atribuibles a las cadenas incorporadas (vibraciones de estiramiento simétrico y/o asimétrico C-H) en el anillo de anilino entre $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$. Una banda ancha alrededor de 3338 cm^{-1} que indica la presencia de un grupo -OH y a $1115\text{-}1172\text{ cm}^{-1}$ en los derivados **IVk-IVm**. Adicionalmente, se observó la presencia de bandas aromáticas en $1620\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$.

6.2.2. Espectroscopía de RMN- ^1H

La asignación de las señales de los espectros de RMN ^1H se realizó con base en sus desplazamientos químicos, el desdoblamiento de la señal, a la obtención de las constantes de acoplamiento y en algunos casos a la comparación con reportes previos.^{4,28} Se pudo establecer el siguiente patrón de señales para el sistema de 9-anilino-2-metiltioazolo[5,4-*b*]quinolina en CDCl_3 como solvente:



H-7, señal doble de doble de doble ($J = 8.4, 6.8, 1.4$ Hz), entre 7.12-7.18 ppm.
H-6, señal doble de doble de doble ($J = 8.4, 6.8, 1.4$ Hz), entre 7.53-7.58 ppm.
H-8, señal doble de doble ($J = 8.4, 1.4$ Hz), entre 7.72-7.76 ppm.
H-5, señal doble de doble ($J = 8.6, 1.3$ Hz), entre 7.91-7.94 ppm.
La señal del H del grupo amino que une al anillo de anilino con el sistema tricíclico (Ar-HN-Ar) se observa como una señal simple ancha entre 7.40-7.41 ppm.
H-2' y H-6', señal doble de doble (patrón AA'XX'), entre 7.00-7.04 ppm.
H-3' y H-5', señal doble de doble, entre 6.59-6.64 ppm.
Grupo metiltio: señal simple entre 2.73-2.75 ppm.

6.3. Espectroscopia de resonancia magnética homonuclear (NOESY)

Para la asignación inequívoca de los protones de los nuevos compuestos, se realizó el experimento NOESY de los derivados **IVc** y **IVi**. Lo anterior también a reserva de la naturaleza del sustituyente en el anillo de anilina, (dialquilamino)alquilamino y (azacicloalquil)alquilamino, del cual no se cuenta con información previa que auxilie con la caracterización del resto de los derivados. A continuación, se describe la asignación de los protones de acuerdo a las correspondientes correlaciones a través del espacio $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY para los derivados **IVc** y **IVi**.

6.3.1. 9-[4-(2-(*N,N*-Dietilamino)etilamino)anilino]-2-metiltiofiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVc**)

Para el derivado **IVc** en su espectro NOESY (Figura 16) se observa una señal amplia a 7.41 ppm, característica de un protón unido a heteroátomo, que fue asignada a Ar-NH-Ar, la cual correlaciona con una señal a 7.72 ppm que corresponde al protón H-8 del núcleo tricíclico. También se observa una interacción del protón Ar-NH-Ar con una señal a 7.02 ppm, la que a su vez muestra interacción con la señal a 6.60 ppm de los protones 3' y 5', por lo que dicha señal corresponde a los protones 2' y 6' del anillo de anilina. Los protones 2' y 6' muestran una interacción con las señales a 7.72 del protón 8, lo cual está en concordancia con lo observado en el estudio de modelado molecular, es decir, el fenilo está en una relación oblicua respecto al sistema tricíclico orientado hacia el anillo bencenoide ($\tau_1 = 77.49^\circ$). La asignación del protón H-5 a 7.93 ppm es correcta, ya que dicha señal interacciona con el protón H-6 a 7.54 ppm, misma que interacciona con el protón H-7 a 7.14 ppm, y observándose en el espectro de protón como una señal doble de doble con una constante de acoplamiento *orto* y *meta*.

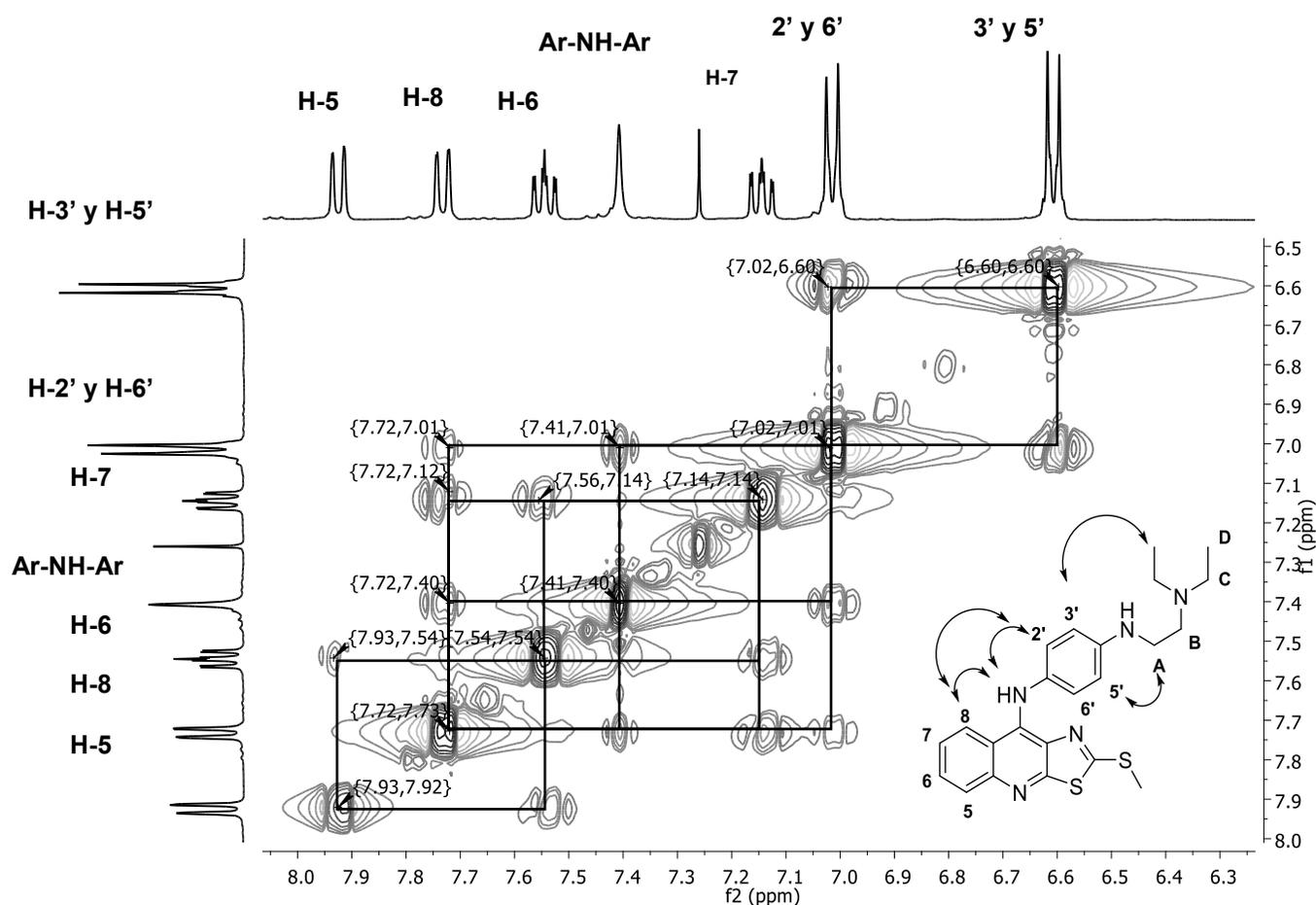


Figura 16. Espectro de correlación NOESY del compuesto **IVc**. Ampliación zona aromática (400 MHz, CDCl₃).

Por lo tanto, la asignación de los protones del sistema tricíclico de campo bajo a campo alto en CDCl₃ como disolvente, se observa en el siguiente orden: H-5, H-8, H-6 y H-7. Es importante mencionar que esta asignación difiere con lo previamente reportado de H-8, H-5, H-6 y H-7 en DMSO-*d*₆ [4, 41]. Lo anterior se puede atribuir a un efecto de protección del anillo de la anilina sobre H-8, debido a la orientación oblicua que guarda aquel con respecto al sistema tricíclico.

La asignación de los protones de la zona alifática (Figura 17) es la siguiente: la señal a 3.18 ppm, que se observa como una señal triple, corresponde a los protones A, ya que es la señal más desprotegida en la zona alifática, además de que interacciona con los protones 3' y 5' del anillo de anilina y con los hidrógenos B, señal ubicada a 2.76 ppm, sin embargo, dicha señal no presenta efecto NOE ni acoplamiento con la señal a 4.57 ppm del hidrógeno de la amina secundaria, como se podría suponer.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La señal a 2.64 ppm interacciona con la señal triple a 1.08 ppm de los grupos metilo, por lo que dicha señal corresponde a los hidrógenos C. Por otra parte, se observa una correlación de los grupos metilo D a 1.08 ppm con la señal a 6.60 ppm de los protones 3' y 5' del anillo de anilina. Los protones A también tienen un efecto NOE con los protones de los grupos metilo.

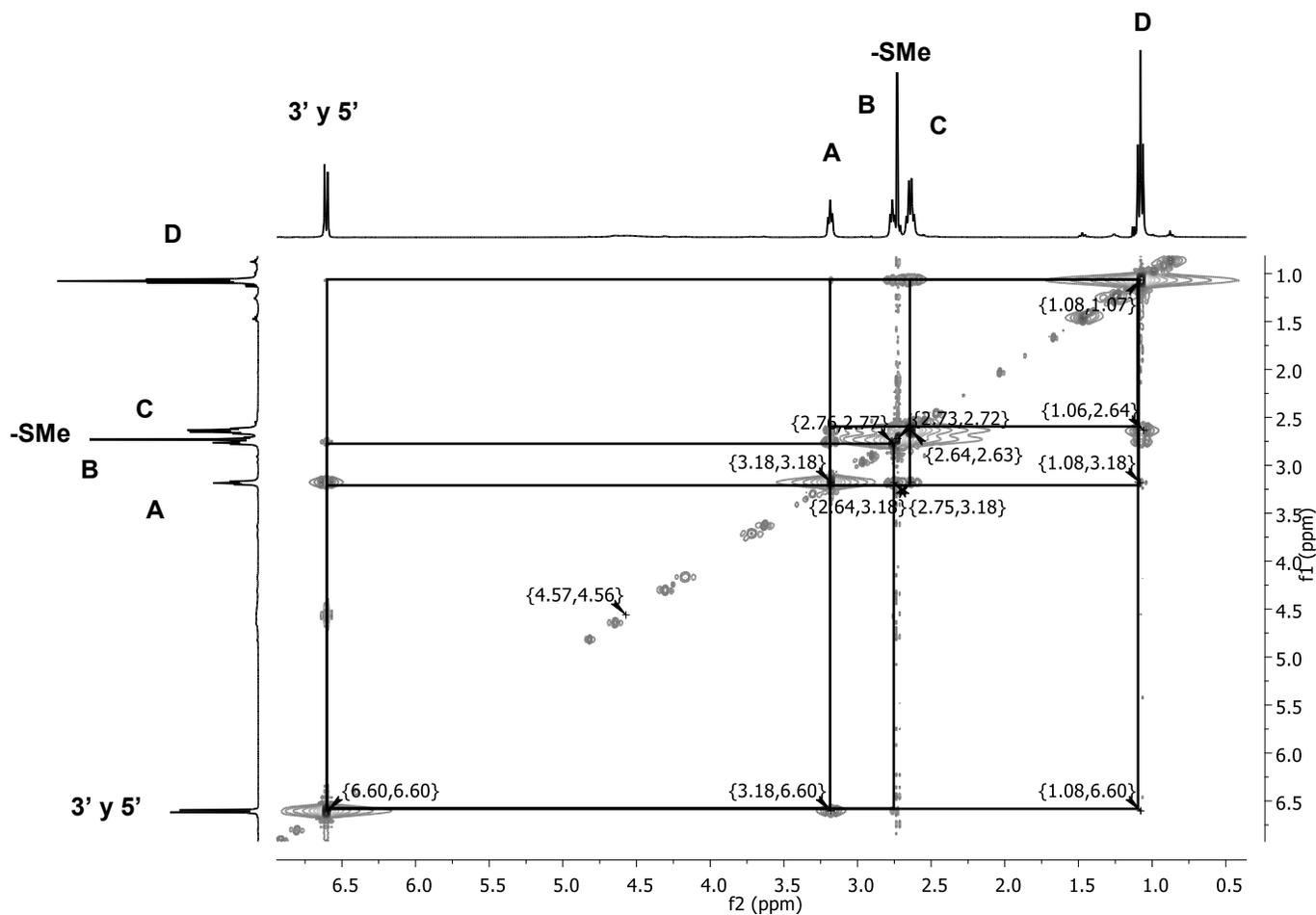


Figura 17. Espectro de correlación NOESY del compuesto **IVc**. Ampliación zona alifática (400 MHz, CDCl₃).

Lo anterior apoya la propuesta de López-Rodríguez para los derivados con un sustituyente *N,N*-(dialquilamino)alquilamino en posición 2 del núcleo tricíclico, en la que se plantea que este tipo de cadenas adoptan una conformación de “escorpión” (ver sección 6.6.1.) mediante un puente de hidrógeno intramolecular entre la amina terciaria y el hidrógeno de la amina secundaria.⁴

6.3.2. 9-[4-(Morfolin-4-il)propilamino]anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVi**)

Para el derivado **IVi** el experimento NOESY (Figura 18) muestra una señal amplia a 7.41 ppm característica de un protón unido a heteroátomo que fue asignada a Ar-NH-Ar, la cual correlaciona con una señal a 7.73 ppm que por su vecindad corresponde al protón H-8 del núcleo tricíclico. También se observa una interacción del protón Ar-NH-Ar con una señal a 7.00 ppm, la que a su vez muestra interacción con la señal a 6.56 ppm de los protones 3' y 5' por lo que dicha señal corresponde a los protones 2' y 6' del anillo de anilina.

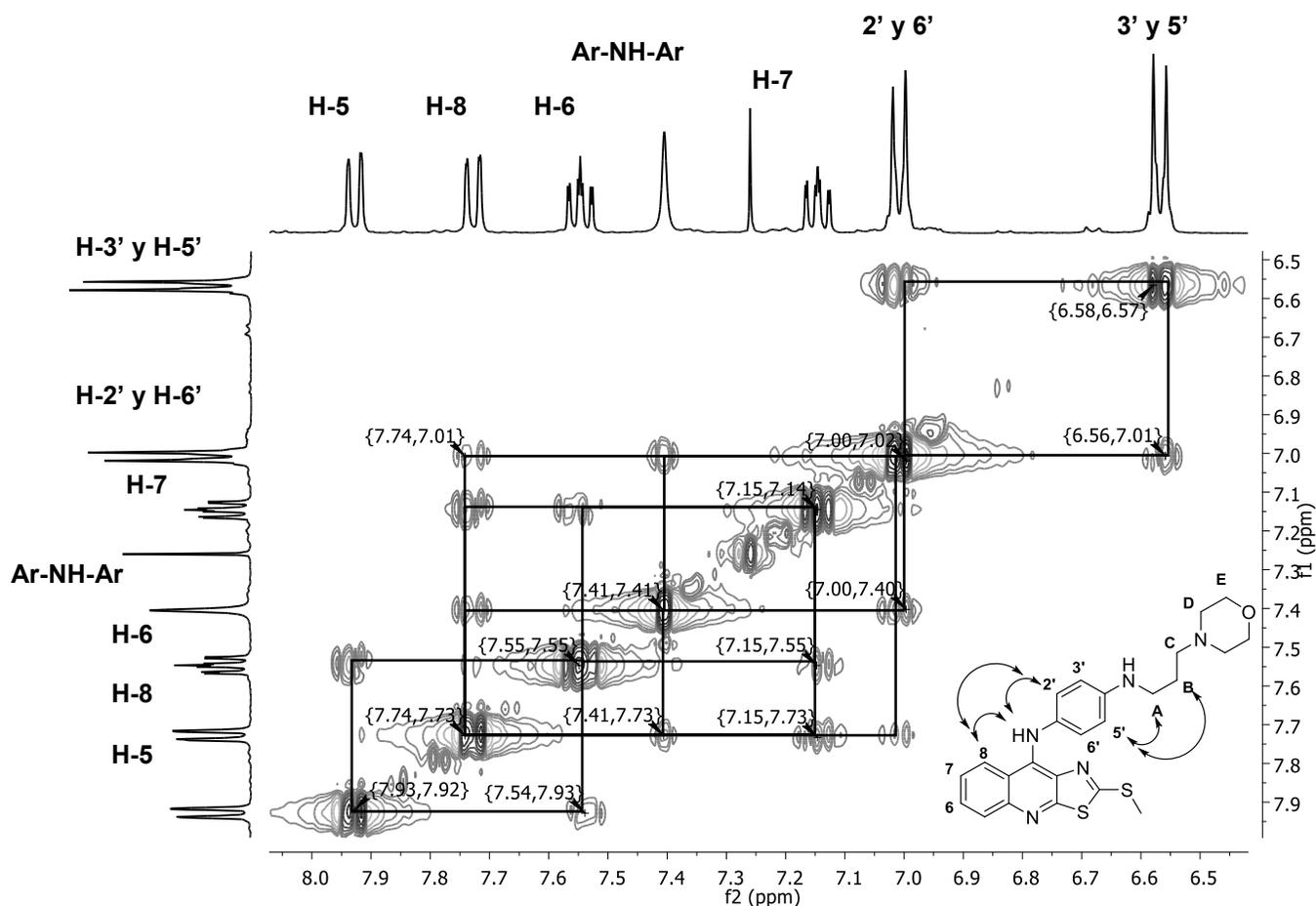


Figura 18. Espectro de correlación NOESY del compuesto **IVi**. Ampliación zona aromática (400 MHz, CDCl_3).

Los protones 2' y 6' muestran una interacción con las señales a 7.73 del protón 8, lo cual está en concordancia con lo observado en el estudio de modelado molecular, es decir, una relación oblicua del anillo de anilina respecto al sistema tricíclico (ver sección **6.6.1.2.**). La asignación del protón H-5 a 7.93 ppm es correcta ya que dicha señal interacciona con el protón 6 a 7.55 ppm, misma que interacciona con el protón 7 a 7.14 ppm, y observándose



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en el espectro de protón como una señal doble de doble con un acoplamiento *orto* y *meta*. Por lo tanto, la asignación de los protones del sistema tricíclico de campo bajo a campo alto en CDCl_3 se observa en el siguiente orden: H-5, H-8, H-6 y H-7, patrón de desplazamiento similar al observado en el derivado **IVi**.

La asignación de los protones de la zona alifática (Figura 19) es la siguiente: la señal a 3.77 ppm, que se observa como una señal triple, corresponde a los hidrógenos E, señal más desprotegida en la zona alifática por encontrarse α al átomo de oxígeno, dicha señal interactúa con la señal múltiple a 2.54 ppm que integra para 6 hidrógenos de los protones C y D.

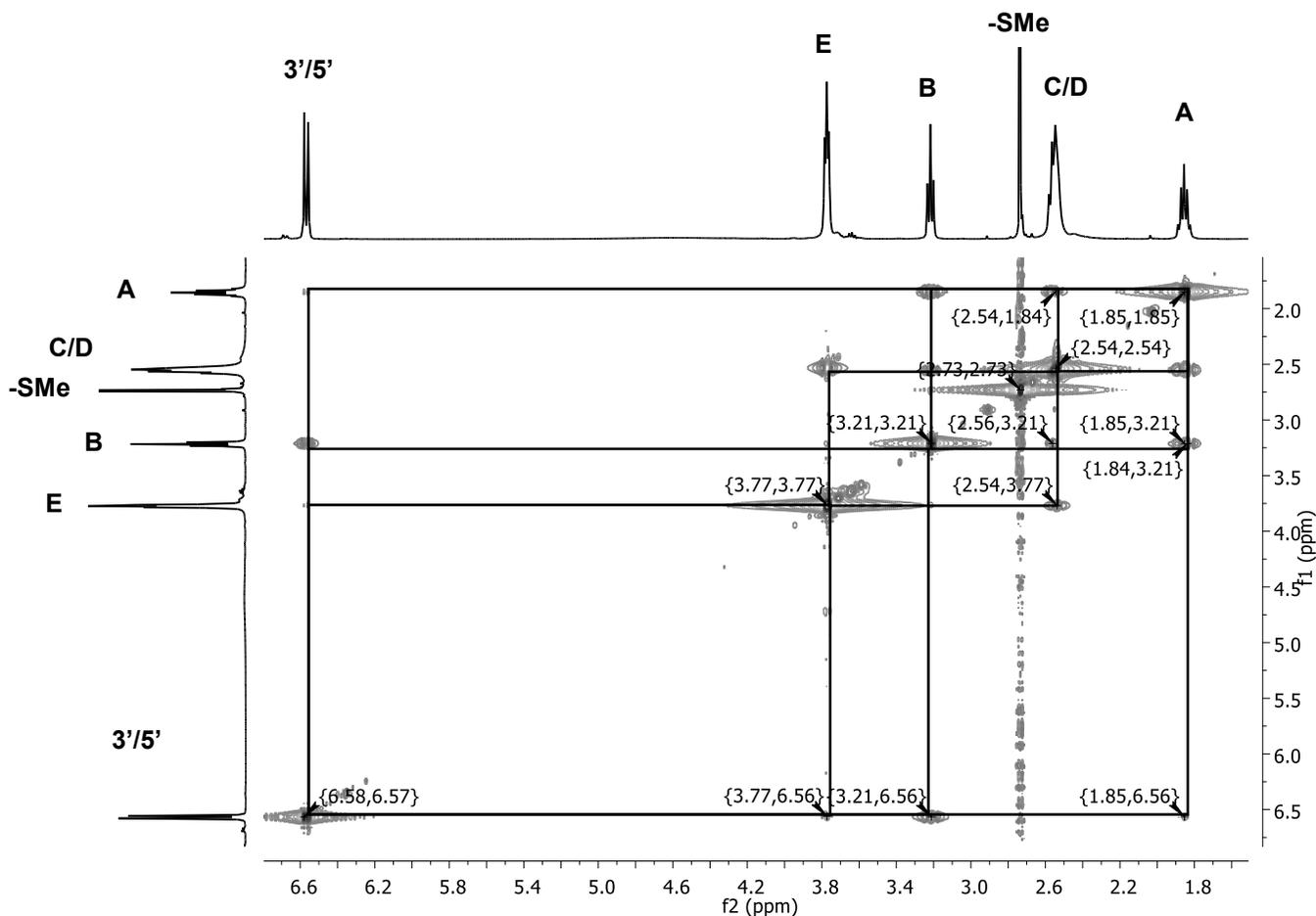


Figura 19. Espectro de correlación NOESY del compuesto **IVi**. Ampliación zona alifática (400 MHz, CDCl_3).

La señal triple a 3.21 ppm también interactúa con la señal múltiple y además muestra un efecto NOE con los protones 3' y 5', por lo que se ha asignado a los hidrógenos A. Sin embargo, dicha señal no presenta efecto NOE ni acoplamiento con la señal a 4.60 ppm del hidrógeno de la amina secundaria, al igual que el derivado **IVc**. La señal a 2.73 ppm corresponde al grupo metilto y no muestra interacciones NOE.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La señal a 1.85 ppm interacciona con la señal múltiple y con la señal triple a 3.21 ppm (hidrógenos A) y que se observa como una señal quintuple, corresponde a los hidrógenos B. La conformación tipo escorpión queda confirmada por la interacción de los hidrógenos E con la señal de los protones 3' y 5' del anillo de anilino.

Lo anterior nos permite proponer que el resto de los derivados con sustituyentes (dialquilamino)alquilamino y (azacicloalquil)alquilamino también presentan esta conformación tipo escorpión causada por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular, como ya se mencionó.

6.3.3. Compuestos **IVk**, **IVI** y **IVm**

Para la asignación inequívoca de las señales de RMN-¹H de los compuestos **IVk**, **IVI** y **IVm** se obtuvo el espectro de RMN ¹H con intercambio de D₂O y el espectro de correlación NOESY del compuesto **IVI**, en sulfóxido de dimetilo deuterado.

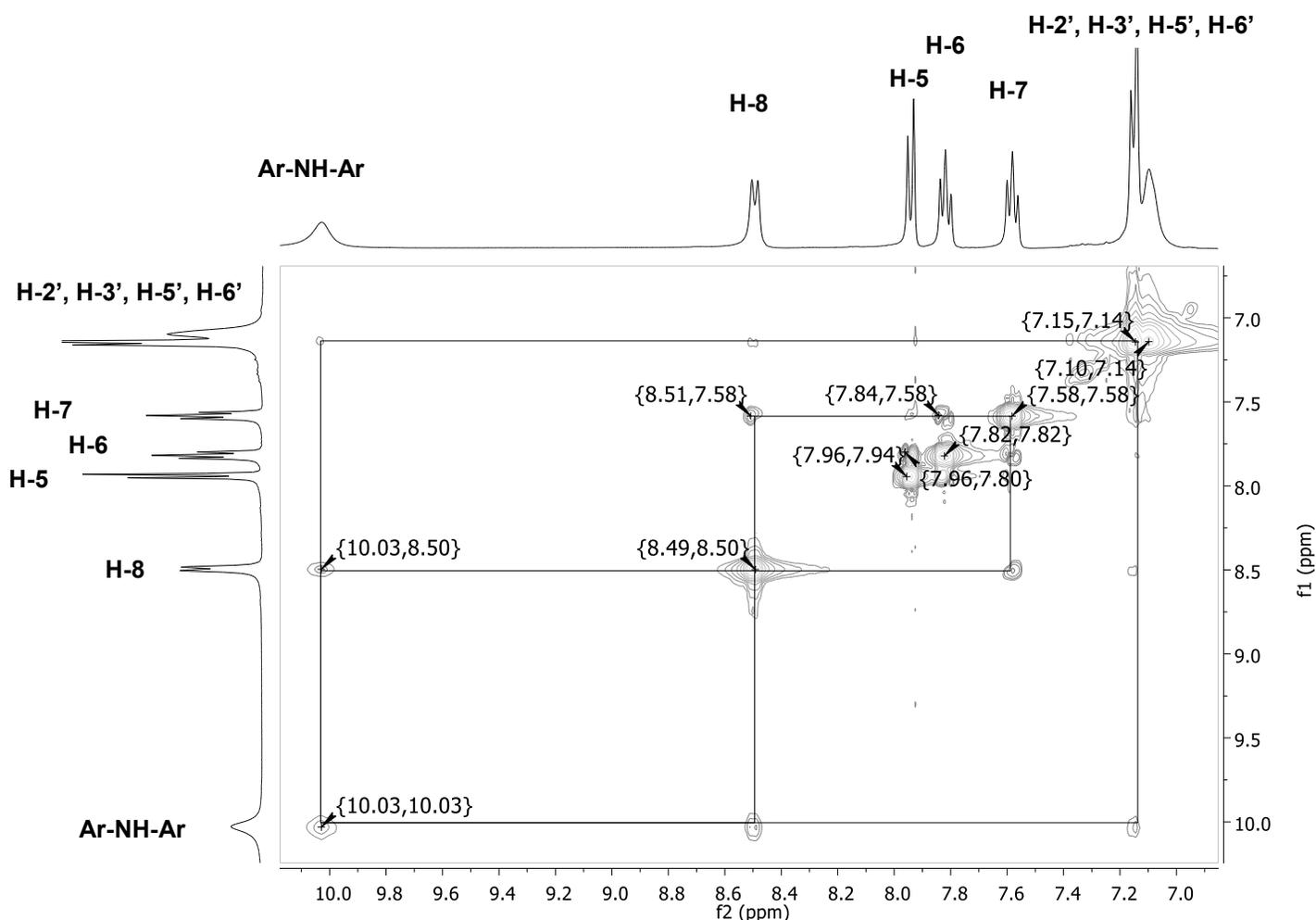


Figura 20. Espectro de correlación NOESY del compuesto **IVI**. Ampliación zona aromática (400 MHz, DMSO-*d*₆).



La señal a 10.02 ppm, que se asignó al hidrógeno Ar-NH-Ar, desaparece al añadir D₂O, por lo que éste se encuentra unido a heteroátomo, además dicha señal tiene un efecto NOE con el protón 8 del sistema tricíclico y con los protones del anillo de anilino (Figura 20), que no sería posible observar con el hidrógeno del grupo amino en posición 4', inclusive su aspecto es de una señal simple fina, lo que indica que no tiene acoplamiento con algún protón vecino. La asignación también se realizó conforme a reportes previos de derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina analizados en DMSO-*d*₆, donde el orden en que aparecen los protones del sistema tricíclico es H-8, H-5, H-6, H-7, de campo bajo a campo alto, y que coincide con la asignación para el compuesto **VI** como se puede observar en el espectro NOESY. El patrón de una *para* sustitución no se observa como el típico AA'-BB'.

Los hidrógenos, del grupo amino de la posición 4' (Ar-HN-CH₂) y del grupo hidroxilo, se observan como una señal ancha entre 4.00-5.5 ppm, la cual integra para dos protones y desaparece por intercambio con D₂O (Figura 21). Además, dicha señal no se observa en el espectro NOESY.

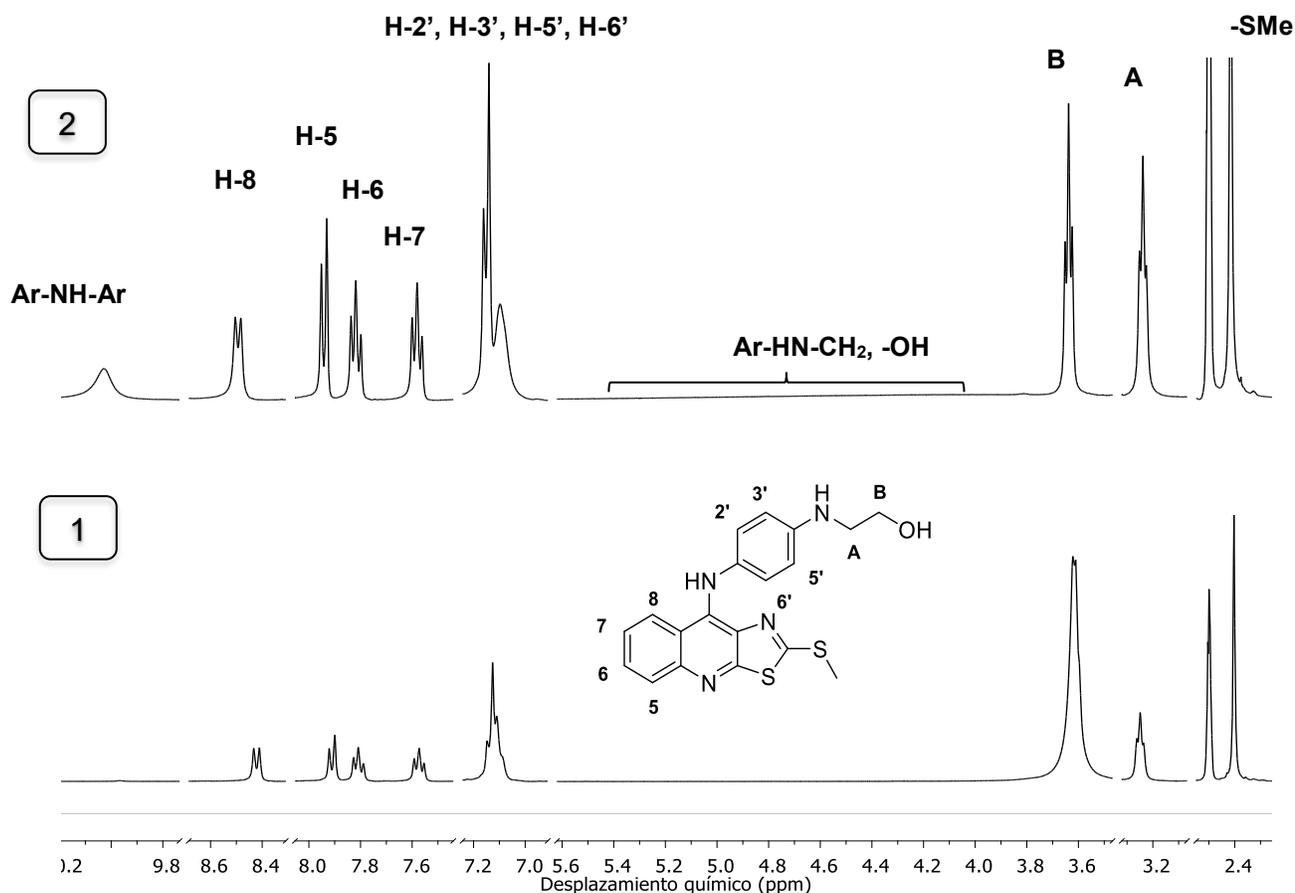


Figura 21. Espectro de RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) del compuesto **VI**. Espectro 1: intercambio con D₂O. Espectro 2: sin intercambio con D₂O.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, el metileno B se asignó a la señal triple entre 3.62-3.65 ppm debido al efecto de desprotección causado por el átomo de oxígeno sobre dichos protones desplazándose la señal a campo más bajo que la otra señal triple del metileno A. Finalmente, los protones del grupo metilto aparecen como una señal simple a 2.41 ppm que presentan interacción con los protones del anillo de anilino (Figura 22).

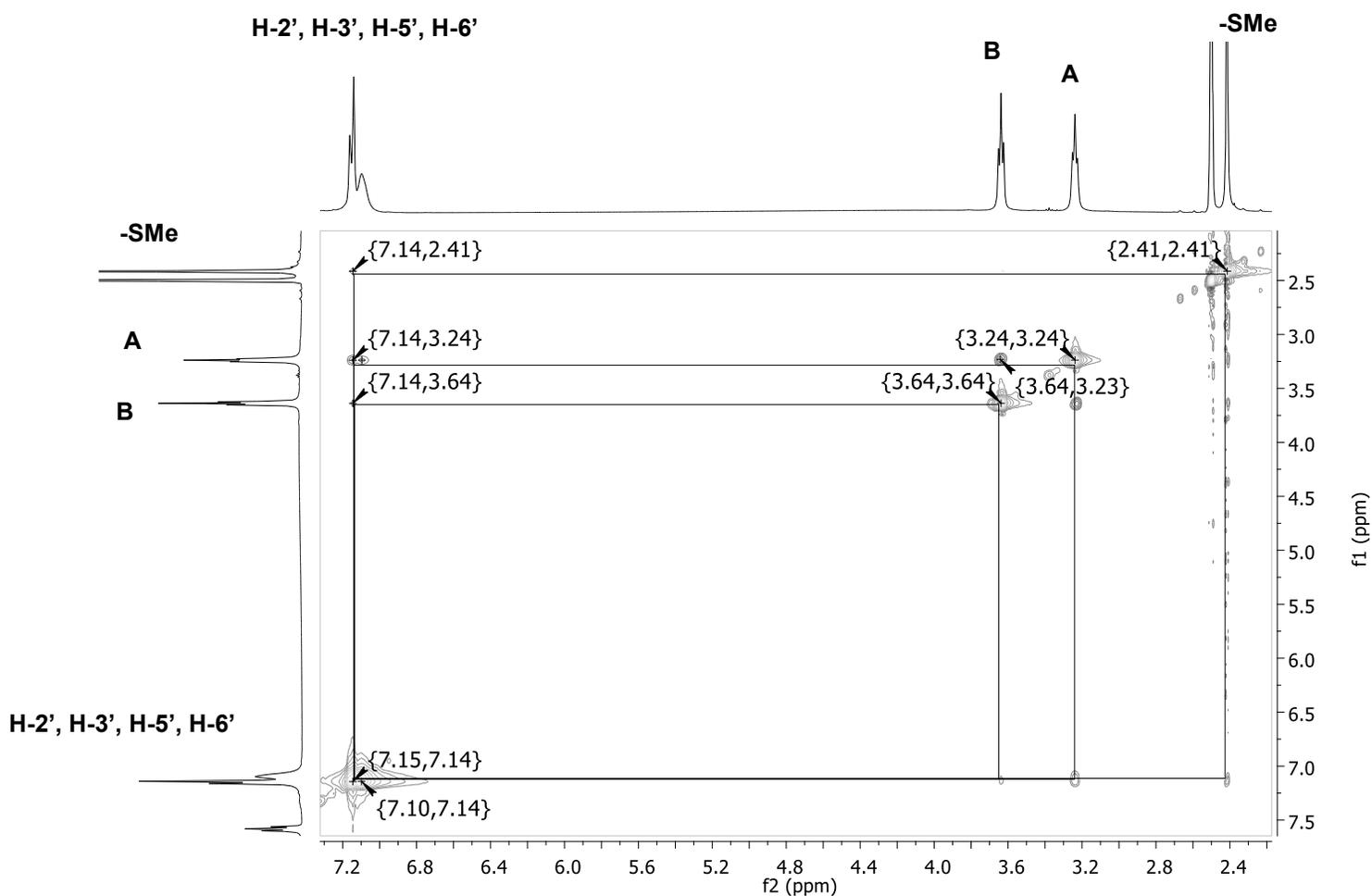


Figura 22. Espectro de correlación NOESY del compuesto **VI**. Ampliación zona alifática (400 MHz, DMSO- d_6).

La información de la caracterización del compuesto **VI** permitió la asignación de las señales de RMN ^1H de los compuestos **IVk** y **IVm**. La Tabla 9 muestra la variación de las señales de acuerdo al sistema de sustitución, la multiplicidad de las señales y las respectivas constantes de acoplamiento.



6.4. Espectrometría de masas

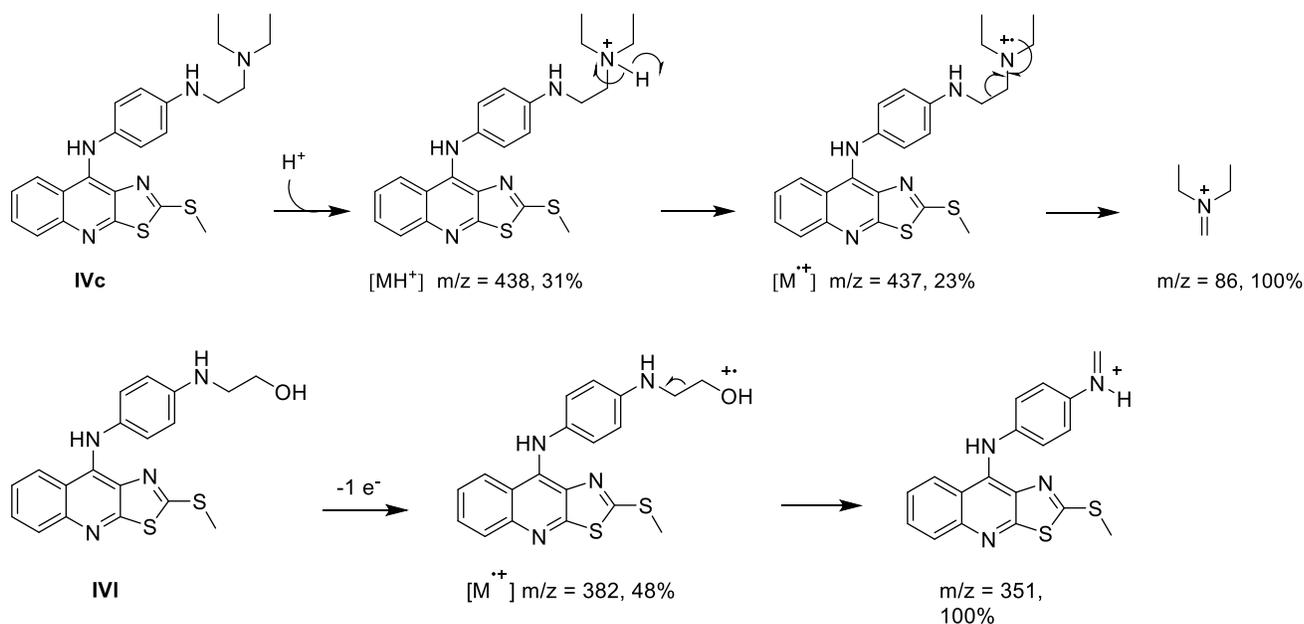
Los espectros fueron obtenidos por Bombardeo de Átomos Rápidos (FAB), utilizando como matriz alcohol 3-nitrobencílico o por impacto electrónico (IE). En los espectros de masas, se pudo verificar que el peso molecular corresponde al de las estructuras propuestas, observándose principalmente la especie $[M^+]$ o $[MH^+]$ (ion cuasi-molecular). Debido a la técnica por la cual fueron obtenidos algunos compuestos (FAB), **IVc** y **IVi**, se obtuvo poca información concerniente a los patrones de fragmentación. En la Tabla 6 se muestran los datos de la espectrometría de masas de los compuestos **IVa-IVñ**.

Tabla 6. Espectrometría de masas (IE) de los derivados **IVa-IVñ**

	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe	IVf	IVg	IVh
$[M^+]$	409 (40)	423 (100)	437 (23)	451 (62)	435 (48)	463 (100)	449 (20)	463 (100)
[PB]	58	423	86	74	84	463	98	463
	IVi	IVj	IVk	IVl	IVm	IVn	IVñ	
$[M^+]$	465 (91)	475 (100)	382 (58)	382 (48)	396 (100)	438 (14)	438 (8)	
[PB]	154	475	351	351	396	86	86	

(Abundancia relativa, %)

En el Esquema 7 se presenta el posible patrón de fragmentación de los compuestos **IVc**, **IVl** y **IVñ**.

**Esquema 7.** Patrón de fragmentación propuesto para los derivados **IVc**, **IVl** y **IVñ**.



6.5. Evaluación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los derivados obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual permite conocer la cantidad de células viables después de someter una muestra de cultivo celular a la sustancia que se desea analizar.³⁶

El ensayo se realizó a 48 horas de exposición *in vitro* con las líneas celulares K-562 (leucemia mielógena humana), HeLa (cáncer cervicouterino), SW620 y SW480 (adenocarcinoma colorrectal). Los valores de CI_{50} (μM) se obtuvieron mediante análisis de correlación no lineal que representan el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar, utilizando concentraciones de 1, 10, 30, 60 y 100 μM de los derivados sintetizados. Asimismo, se empleó el compuesto *m*-AMSA como compuesto de referencia.

Los valores de actividad citotóxica de los compuestos obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad citotóxica (CI_{50} , μM) de los compuestos sintetizados a 48 h de tratamiento.

Compuesto	HeLa	K562	SW 480	SW620
IVa	9.36 \pm 1.80	8.65 \pm 2.10	11.65 \pm 0.95	7.67 \pm 1.9
IVb	10.64 \pm 2.43	7.98 \pm 2.10	17.72 \pm 1.83	9.77 \pm 1.41
IVc	9.95 \pm 2.18	9.42 \pm 1.04	10.22 \pm 2.52	11.62 \pm 3.53
IVd	10.24 \pm 2.04	9.42 \pm 1.40	13.62 \pm 2.80	9.24 \pm 1.36
IVe	6.3 \pm 1.22	5.02 \pm 1.46	6.78 \pm 1.03	7.41 \pm 0.92
IVf	20.2 \pm 2.76	16.89 \pm 3.47	26.44 \pm 3.21	30.62 \pm 1.99
IVg	8.01 \pm 1.89	6.06 \pm 1.02	9.01 \pm 1.33	9.7 \pm 2.10
IVh	9.21 \pm 1.09	8.45 \pm 0.98	14.26 \pm 2.10	8.35 \pm 2.07
IVi	20.77 \pm 3.8	14.99 \pm 3.87	18.4 \pm 3.37	25.18 \pm 5.93
IVj	N/A	N/A	N/A	N/A
IVk	99.61 \pm 14.83	59.65 \pm 10.60	N/A	N/A
IVl	N/A	N/A	N/A	95.84 \pm 13.07
IVm	N/A	89.67 \pm 20.6	N/A	84.07 \pm 12.91
IVn	11.23 \pm 2.89	10.62 \pm 1.26	19.3 \pm 4.10	12.03 \pm 2.78
IVñ	10.85 \pm 2.17	8.87 \pm 1.31	14.8 \pm 2.47	11.55 \pm 2.3
Amsacrina ^a	14.64 \pm	8.33 \pm	9.25 \pm 2.01	12.07 \pm 2.63
Amsacrina	4.87 \pm 0.88	3.22 \pm 1.20	4.06 \pm 1.01	3.43 \pm 0.31

CI_{50} = concentración necesaria para inhibir el 50% de crecimiento celular (ensayo de MTT).

\pm Desviación estándar. N/A, No activo a la máxima concentración ensayada.

^a Citotoxicidad del compuesto de referencia para **IVc**, **IVi** y **IVk-IVm**.



Debido a que la evaluación de la actividad citotóxica fue realizada en dos etapas fue necesario la obtención del índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina para fines comparativos, el cual se define de la siguiente manera:

$$IC = \frac{CI_{50} \text{ amsacrina}}{CI_{50} \text{ compuesto}}$$

En el Gráfico 2 se presentan los valores de **IC** para las cuatro líneas celulares evaluadas. Un valor mayor de 1 indica que el compuesto es más activo que la amsacrina.

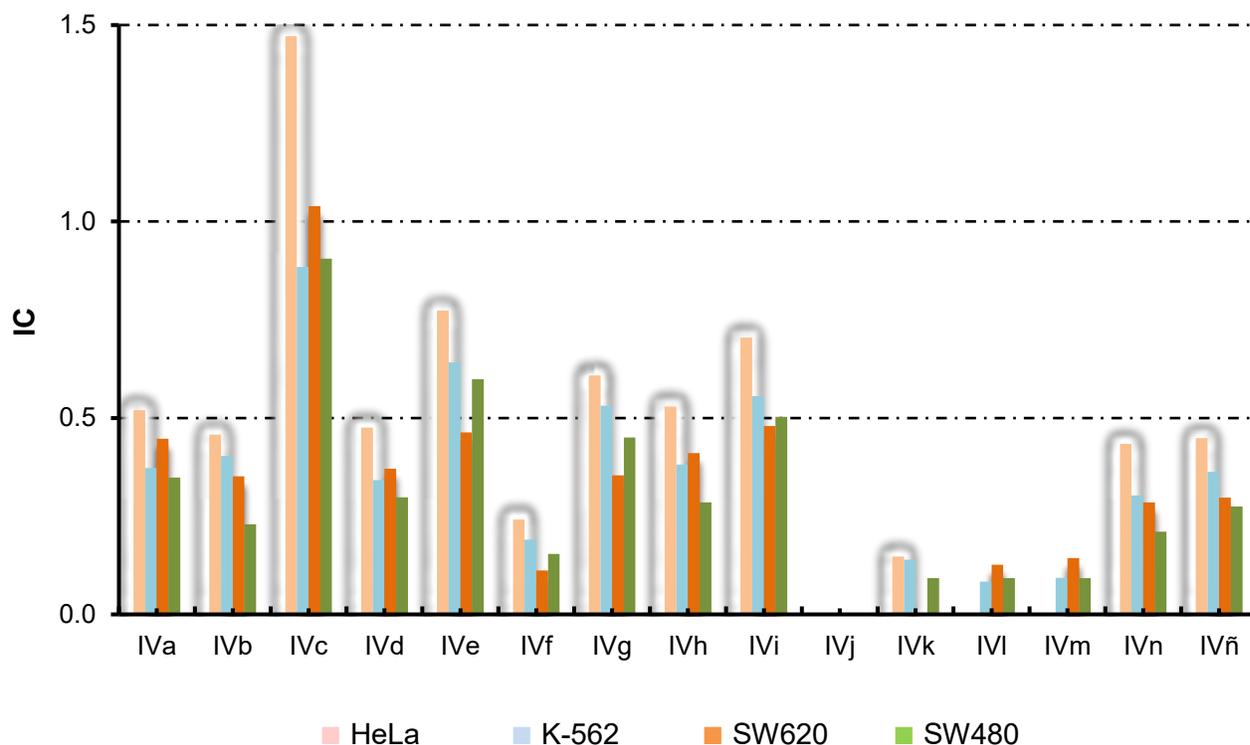


Gráfico 2. Índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina (IC) de los compuestos sintetizados.

Como puede observarse en el Gráfico 2, con excepción de los derivados **IVf**, **IVj** y **IVk-IVm**, todos los compuestos sintetizados mostraron actividades citotóxicas de buenas a moderadas. El compuesto más activo en todas las líneas celulares es el derivado **IVc**, con un sustituyente de (dietilamino)etilamino y actividades citotóxicas superiores a la amsacrina en las líneas celulares HeLa y SW620.

Asimismo, el anclaje del grupo amino terciario es bueno para la actividad cuando la distancia entre los nitrógenos α y β es de dos metilenos (**IVe**, **IVg**), aunque en la mayoría de los casos el homólogo superior mostró menor actividad.



El reemplazo de un anillo de piperidina (**IVh**) por un anillo de morfolina (**IVi**) incrementa la actividad, lo cual podría explicarse por la formación de un posible puente de hidrógeno con la diana biológica o al aumento del área polar superficial.

Los compuestos con un grupo hidroxialquilamino (**IVk**, **IVl** y **IVm**) son poco activos o inactivos a la máxima concentración ensayada, lo cual podría estar relacionado con su incapacidad de ionizarse a pH fisiológico, aunado a su baja solubilidad en agua, como se observó durante su obtención.

Para conocer la influencia de la basicidad sobre la actividad citotóxica se determinaron los valores de pKa de los compuestos que presentan un grupo amino terciario terminal (nitrógeno β), en el programa MarvinSketch 16.11.7., los cuales se graficaron vs. los valores de índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina en la línea celular HeLa. En el gráfico 3, se observa que no existe una relación directamente proporcional entre el valor de pKa del grupo amino terciario terminal y la citotoxicidad de los compuestos, ya que mientras el compuesto **IVj** presenta el valor más alto (pKa 10.11), este es inactivo a la máxima concentración ensayada, por lo cual la libertad conformacional en dicha zona de la molécula es un factor importante para la citotoxicidad.

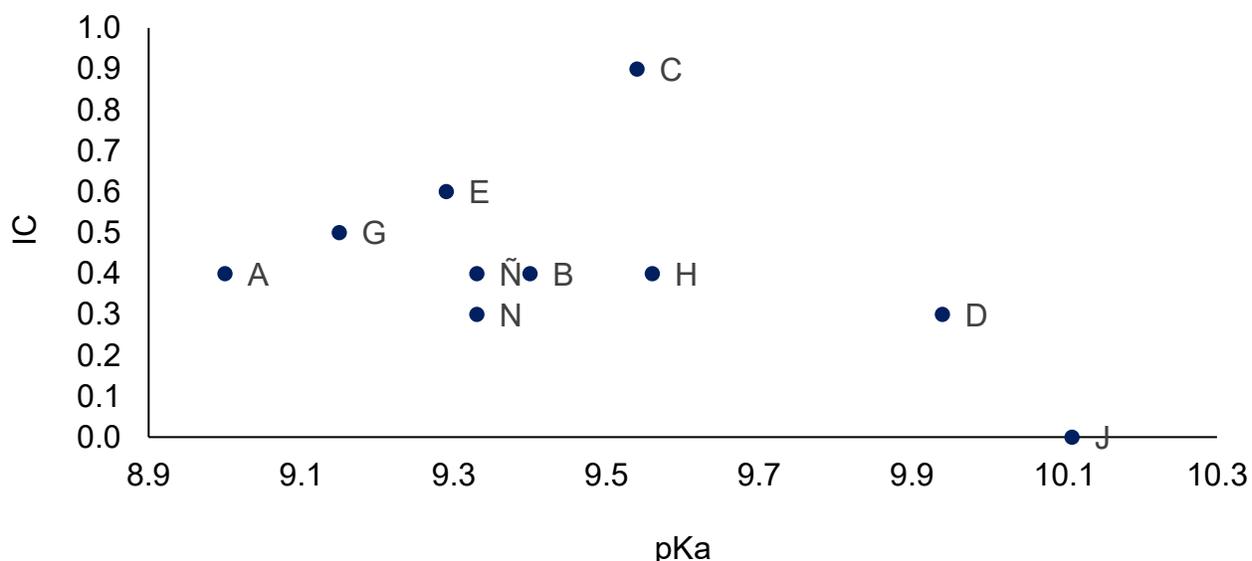


Gráfico 3. Relación entre el valor del pKa y el índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina en la línea celular HeLa.

Finalmente, los compuestos **IVn** y **IVñ** muestran actividades de buenas a moderadas lo que podría indicar que también un grupo aceptor de enlace hidrógeno, como lo es el oxígeno, en posición 3' o 4' podría ser un requerimiento estructural para una adecuada interacción ligando-receptor. En este caso el derivado *para* sustituido muestra una actividad citotóxica ligeramente superior que su isómero de posición.

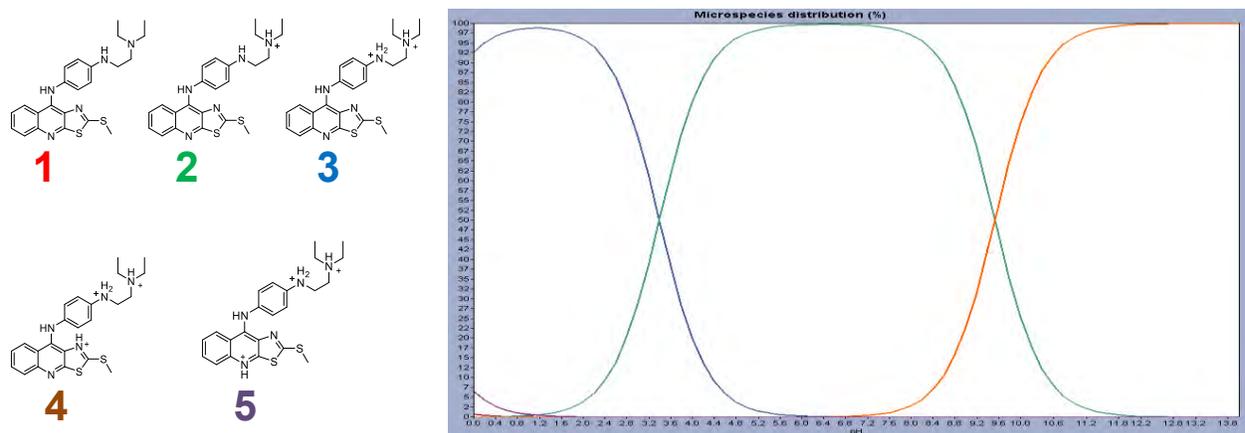


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, los compuestos del presente trabajo son más activos en la línea celular HeLa, lo cual difiere con lo reportado en estudios previos, donde los compuestos han sido más citotóxicos en la línea celular K-562.^{4, 59} Respecto a las líneas celulares de cáncer de colon, se observa mayor actividad citotóxica hacia la línea celular SW620 por parte de los derivados con sustituyentes libres en el nitrógeno β . La línea celular SW620 proviene del cáncer primario de colon de células SW480 que hizo metástasis a nódulos linfáticos, previo al inicio de la quimioterapia. También se caracteriza por ser más tumorigénica, metastásica y tener menor susceptibilidad a la inducción de apoptosis.⁴⁸ La susceptibilidad de ambos tipos de células por cambios en su morfología (SW480-epiteliales y SW620-fibroblásticas) para este tipo de compuestos es algo que aún no se sabe, pero que podría ser un factor a considerar en estudios posteriores.

6.6. Modelado molecular

El efecto farmacológico de un fármaco que interacciona con su diana biológica está mediado por dos características principalmente, afinidad y especificidad. La información que codifica la afinidad y especificidad está contenida en la estructura química del ligado y su sitio de unión complementario en el receptor. Al respecto, se ha demostrado que la basicidad de la cadena lateral es importante, más no determinante, para la actividad citotóxica, ya que cuando dicha propiedad disminuye, los compuestos son menos activos.^{4, 57} Esto condujo a proponer que a pH fisiológico la forma protonada de la amina terciaria es la especie química responsable de su comportamiento farmacológico. Lo anterior se ilustra en el siguiente diagrama de predominio de especies para el compuesto **IVc** (Figura 23), calculado con MarvinSketch 16.11.7., donde se observa que a pH fisiológico (pH 7.4) la especie predominante es aquella con el nitrógeno de la amina terciaria ionizado.



pH	% (1)	% (2)	% (3)	% (4)	% (5)
7.40	0.72	99.24	0.01	0.00	0.00

Figura 23. Diagrama de abundancia (%) vs. pH para el compuesto **IVc**.



Por este motivo, se realizó el modelado molecular de los compuestos como moléculas en su forma ionizada, por cálculos de funcionales de la densidad (RB3LYP 6-31G*), para revelar algunos factores electrónicos y geométricos involucrados. Para este propósito se llevaron a cabo cálculos computacionales de las moléculas de la Figura 24 con el software Spartan'10®, tal como se describe en la sección 6.5.

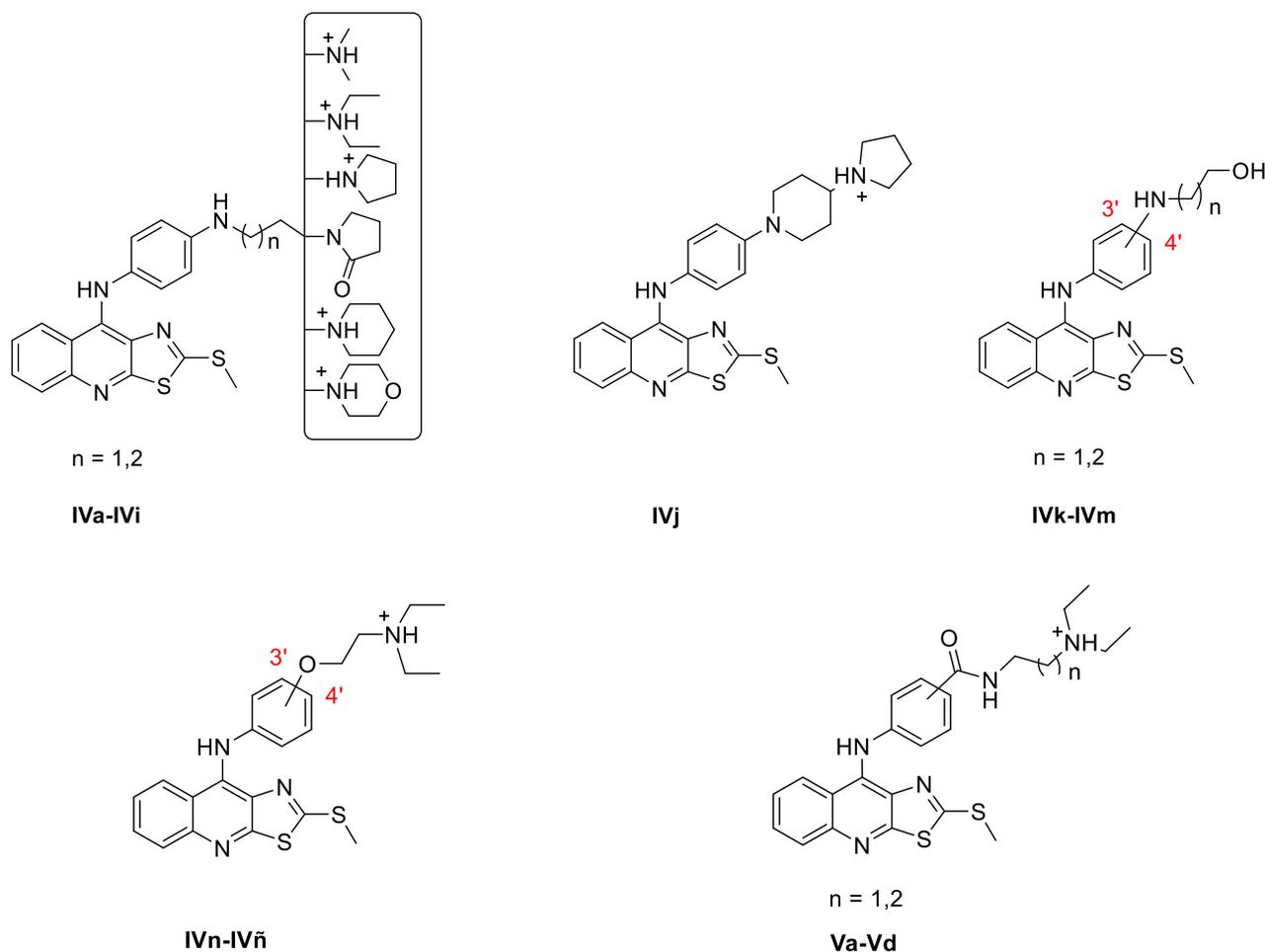


Figura 24. Compuestos analizados computacionalmente. **IVa-IVñ** son compuestos sintetizados en el presente trabajo, **Va-Vd** son compuestos previamente reportados.

6.6.1. Análisis conformacional

Se realizó el análisis conformacional por un protocolo de búsqueda sistemática utilizando el campo de fuerza MMFF. De reportes previos se sabe que el grupo metilto se mantiene coplanar al anillo de tiazol en las conformaciones de menor energía,²⁸ por lo que se decidió mantenerlo fijo en esta posición y rotar los otros enlaces sp^3 cada 30° . Las moléculas con un grupo amino terciario terminal se consideraron como compuestos ionizados.



La determinación del conformero más estable se llevó a cabo con base en la energía y la distribución de Boltzmann. Posteriormente, se optimizó la geometría del conformero más estable mediante un método semiempírico AM1, además de un método cuántico de funcionales de la densidad (RB3LYP 6-31G) y se calcularon los descriptores QSAR (HOMO, LUMO, dipolo, PSA, Ovalidad, Log P, etc.). La distribución electrónica calculada fue usada para generar las correspondientes superficies de energía potencial electrostática.

Para conocer la orientación del anillo de anilina con respecto al sistema tricíclico se midieron los ángulos diedros τ_1 y τ_2 que describen los diedros C8a, C9, N, C1' y C9, N, C1' y C2', respectivamente; cada uno de los cuales se rotó 30° (Figura 25).

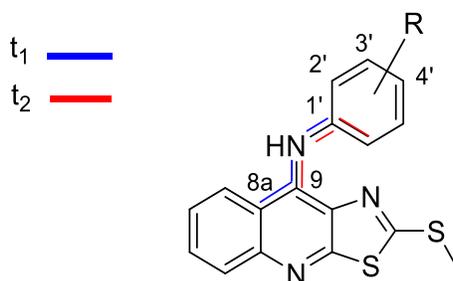


Figura 25. Ángulos diedro para el análisis conformacional.

El valor del ángulo diedro τ_1 para los derivados **IVa-IVñ** y **Va-Vd** engloba valores entre 59° a 78° , ligeramente menor al valor del compuesto de referencia. Por otro lado, el valor de τ_2 en los compuestos sustituidos en la posición 3', **IVk** y **IVn**, es 1.09 y 0.82 respectivamente, lo que indica que el anillo de anilino está ortogonal al núcleo tricíclico, mientras que en los derivados sustituidos en posición 4' está entre -18° y -21° , y que coincide con lo observado en los experimentos NOESY, respecto a la relación oblicua que guarda el anillo de anilina con el núcleo tricíclico en estos derivados (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de los ángulos diedros τ_1 y τ_2

Compuesto	τ_1 ($^\circ$)	τ_2 ($^\circ$)	Compuesto	τ_1 ($^\circ$)	τ_2 ($^\circ$)
IVa	77.80	-18.80	IVk	66.30	1.09
IVb	78.41	-19.98	IVl	59.01	17.05
IVc	77.49	-18.17	IVm	61.44	16.06
IVd	78.42	-20.71	IVn	66.16	0.82
IVe	77.40	-18.14	IVñ	73.42	-15.19
IVf	78.97	-20.40	Va	75.21	-12.26
IVg	77.30	-18.94	Vb	72.53	-14.19
IVh	77.29	-18.72	Vc	74.90	-13.16
IVi	77.00	-18.68	Vd	76.79	-18.17
IVj	77.46	-20.41	m-AMSA	110.27	-6.44



6.6.1.1. Derivados de 9-[4-(2-*N,N*-dialquilamino)etilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina y 9-[4-(2-(1-azacicicloalquil)etilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina.

La relación oblicua que guarda el anillo de anilina y el sistema tricíclico de los derivados 4'-sustituidos, anteriormente mencionada, se ilustra en la Figura 26 para los derivados con una cadena de etil (**IVa**, **IVc**, **IVe** y **IVg**), así como la conformación que adopta la cadena de la posición 4'.

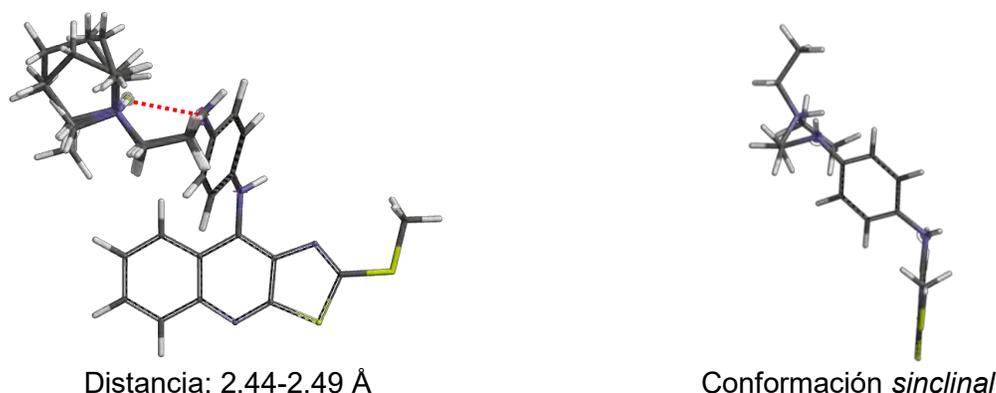


Figura 26. Conformación del anillo de anilina y de la cadena en su posición 4' de los derivados **IVa**, **IVc**, **IVe** y **IVg**.

Además, se ha reportado que la capacidad de una sustancia para atravesar las membranas biológicas y ejercer su efecto biológico puede estar en función de su conformación. Con esto en mente, es importante señalar que todos los compuestos, presentan una conformación *sinclinal* de la cadena lateral (Figura 27), que en la literatura científica se ha denominado de “gancho” o de “escorpión”, siendo biológicamente más activas aquellas moléculas que presentan dicha disposición espacial al vacío.⁴ Sin embargo, no resulta realista asumir que los ligandos siempre se unen al receptor en sus conformaciones de mínima energía ya que la energía libre de asociación generalmente supera la energía necesaria para que el ligando sufra un cambio conformacional.



Figura 27. Ángulos diedro τ_3 y τ_4 de la cadena alifática etilo para los derivados **IVa**, **IVc**, **IVe** y **IVg**.



Dicha conformación se encuentra favorecida por la presencia de un puente de hidrógeno intramolecular entre los nitrógenos de la cadena, lo que causa que el ángulo diedro τ_3 , representado en la Figura 30, adquiera valores entre -78° y -89° y el ángulo diedro τ_4 , con valores entre -41 y -44° .

6.6.1.2. Derivados de 9-[4-(2-(*N,N*-dialquilamino)propilamino)anilino]-2-metiltiofiazolo[5,4-*b*]quinolina y 9-[4-(2-(1-azacicloalquil)propilamino)anilino]-2-metiltiofiazolo[5,4-*b*]quinolina.

Todos los derivados con una cadena de grupo propilo (**IVb**, **IVd**, **IVf**, **IVh** y **IVi**), presentan la conformación de “escorpión”, anteriormente descrita, excepto el compuesto **IVf**. Esta conformación se estabiliza por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que conduce a la formación de un anillo de seis miembros (Figura 28), resaltando la importancia de la basicidad del nitrógeno β , ya que el derivado **IVf** al contener un grupo amida terminal con una conformación diferente y que se ve reflejado en los valores que adquieren los ángulos diedros τ_3 y τ_4 , 170.11° y 174.10° , respectivamente.

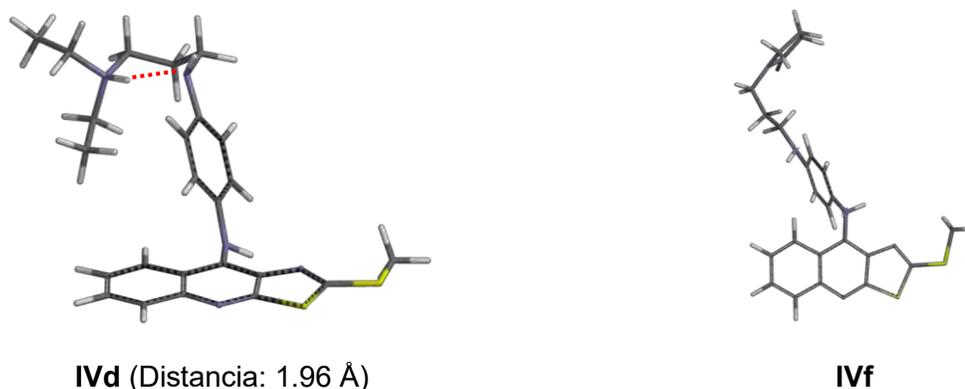


Figura 28. Conformación del anillo de anilina y de la cadena en su posición 4 de los derivados **IVd** y **IVf**.

6.7. Análisis de las propiedades electrónicas y descriptores QSAR.

En el presente estudio resultan de particular importancia las propiedades electrostáticas, como los mapas de potencial molecular electrostático y sus descriptores QSAR, debido a que en reportes previos de modelos QSAR de este tipo de compuestos la actividad citotóxica se ha explicado en términos de algunos de estos descriptores.^{4, 29} Para ello se empleó el método de los funcionales de la densidad electrónica (DFT), nivel B3LYP y 6-31G* como base.



La elección del método se basa en que, generalmente, los cálculos del funcional de la densidad dan geometrías moleculares precisas con 6-31G* o bases mayores; por otra parte, los métodos semiempíricos dan usualmente longitudes y ángulos de enlaces satisfactorios, pero los resultados no son tan precisos como los resultados *ab initio* o DFT con una base de tamaño adecuado.

Empleando el método anterior se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Energía de formación
- Energías de orbitales frontera (HOMO y LUMO).
- Momento dipolar
- Área molecular
- Volumen molecular
- Área polar superficial (PSA)
- Ovalidad
- Log P (Ghose-Crippen).
- Gráficos de isopotencial del potencial molecular electrostático (PME).

Dichas propiedades se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Descriptores moleculares calculados mediante el método cuántico DFT B3LYP 6-31G*.

	E (au)	E (HOMO) (eV)	E (LUMO) (eV)	Momento dipolar (Debye)	Volumen (Å ³)	PSA (Å ²)	Ovalidad	Log P
IVa	-1884.59	-7.39	-3.48	27.38	412.03	43.16	1.61	4.76
IVb	-1923.91	-7.46	-3.52	25.64	429.54	38.90	1.62	5.04
IVc	-1963.22	-7.34	-3.45	25.76	449.05	42.43	1.65	5.43
IVd	-2002.54	-7.49	-3.56	23.06	465.55	38.83	1.65	5.71
IVe	-1962.01	-7.32	-3.44	26.24	437.48	43.51	1.63	5.07
IVf	-2075.42	-7.53	-5.49	20.32	457.74	53.47	1.64	4.59
IVg	-2001.34	-7.31	-3.43	25.22	454.10	43.15	1.64	5.49
IVh	-2040.74	-7.41	-3.51	23.05	471.73	39.29	1.66	5.77
IVi	-2076.54	-7.45	-3.53	23.06	477.20	46.93	1.65	4.64
IVj	-2078.74	-7.15	-3.24	31.79	480.23	35.24	1.66	6.16
IVk	-1825.48	-5.23	-1.65	3.79	365.75	56.92	1.55	4.59
IVl	-1864.79	-5.27	-1.59	2.45	384.26	55.75	1.58	4.87
IVm	-1864.79	-4.79	-1.18	7.35	384.54	49.32	1.57	4.87
IVn	-1983.12	-7.98	-4.08	14.48	445.24	35.15	1.65	5.81
IVñ	-1983.09	-7.30	-3.39	28.14	445.74	37.46	1.65	5.81
Va	-2076.58	-7.69	-4.00	18.12	469.37	51.18	1.67	5.08
Vb	-2076.60	-7.53	-3.82	24.27	469.21	49.80	1.67	5.08
Vc	-2115.98	-7.73	-3.91	15.75	487.70	50.55	1.70	5.57
Vd	-2115.91	-7.48	-3.64	24.27	486.82	49.53	1.68	5.57



A continuación, se describen algunos parámetros analizados y las diferencias y similitudes entre los diferentes compuestos. En el Anexo II, se muestran las imágenes de todos los compuestos analizados, y para fines explicativos, en este apartado solo se muestran algunos ejemplos representativos.

6.7.1. Análisis de la magnitud y dirección del vector del momento dipolar.

El momento dipolar, que es la primera derivada de la energía en presencia de un campo eléctrico, describe la distribución de carga en una molécula y de alguna manera muestra un resumen de los efectos electrónicos que participan en el reconocimiento molecular, sobre todo con intercaladores del ADN.⁴⁹ Este parámetro fisicoquímico también se ha relacionado con la capacidad de un compuesto para atravesar la membrana biológica.²⁸ En virtud de lo anterior, se decidió tomar en cuenta tanto la magnitud, como la dirección que adquiere el vector del momento dipolar.

El análisis del momento dipolar para los compuestos sintetizados reveló que el vector está orientado hacia el átomo de nitrógeno de la quinolina, con una ligera desviación hacia el anillo de tiazol, como se muestra en la Figura 29 para el compuesto **IVc**. Sin embargo, no se observa una correlación entre la dirección del vector de momento dipolar y la actividad citotóxica.

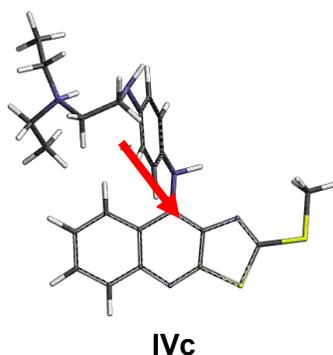


Figura 29. Orientación del vector de momento dipolar del compuesto **IVc**.

La magnitud del vector del momento dipolar puede ser considerado como un patrón de correlación dentro de las moléculas sintetizadas con la actividad biológica en virtud de que los compuestos con los valores más bajos (Tabla 13), derivados con un sustituyente hidroxialquilamino (**IVk-IVm**), no son activos a la concentración máxima ensayada.



6.7.2. Análisis de los orbitales frontera HOMO y LUMO.

El proceso de intercalación involucra una serie de interacciones entre el agente intercalante y el ADN, entre las que se encuentran las interacciones de los orbitales moleculares frontera, HOMO y LUMO,²⁹ por lo que fue importante calcular el valor de energía de dichos orbitales moleculares. En las moléculas analizadas, los mapas de distribución de los orbitales HOMO se ubican a lo largo del núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina y el núcleo de anilino (Figura 30).

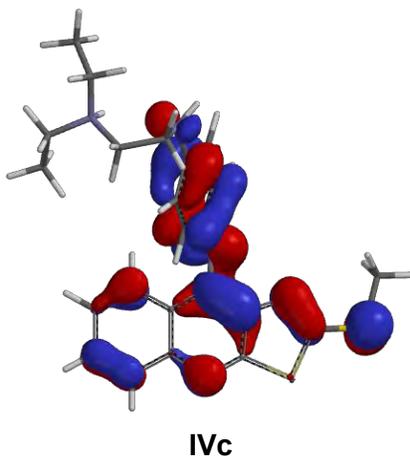


Figura 30. Distribución de los orbitales HOMO del compuesto **IVc**.

En los derivados con un grupo hidroxialquilamino (**IVk-IVm**) el orbital HOMO se localiza principalmente en el anillo de anilino, pero también sobre el núcleo tricíclico, sin embargo, dichos derivados no fueron activos a la máxima concentración ensayada (Figura 31).

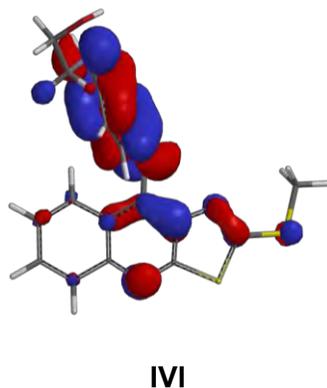


Figura 31. Distribución de los orbitales HOMO del compuesto **IVI**.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios previos, se ha demostrado que la interacción con el ADN, mediante el proceso de intercalación, es uno de los factores, aunque no determinante, que rigen la actividad citotóxica de este tipo de compuestos.^{31, 50} Varios reportes indican que dicho proceso es energéticamente favorecido por el traslape del orbital LUMO del agente intercalante con el orbital HOMO de los pares de bases del ADN.^{51, 52}

Esta interacción se favorece cuando la magnitud de dicho orbital presenta valores más negativos, es decir, los compuestos son mejores aceptores de electrones. Lo anterior se cumple para los derivados **IVk-IVm**, compuestos inactivos o muy poco activos, los cuales presentan los valores más altos para este orbital, reduciendo su capacidad de intercalación con el ADN, y en consecuencia su citotoxicidad.

Para los orbitales LUMO, se observa que éstos se localizan en el sistema tricíclico, y no existe marcada contribución por parte del anillo de anilino (Figura 32). La ubicación del orbital LUMO sobre el sistema tricíclico brinda información sobre el probable mecanismo de acción de estas sustancias, que, como ya se mencionó, se ha propuesto que es por intercalación con el ADN.²⁸

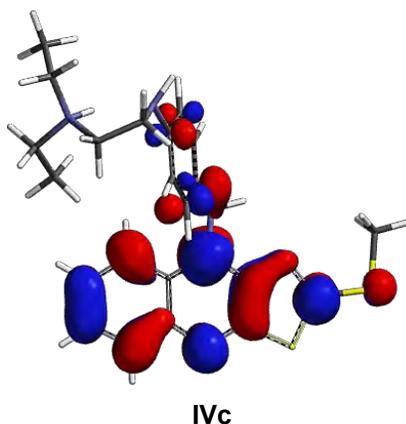


Figura 32. Distribución del orbital LUMO de compuesto **IVc**.

Este fenómeno estabiliza la formación de complejos de transferencia de carga o traslape de orbitales, los cuales interfieren con procesos metabólicos esenciales del ADN. A nivel farmacológico, la intercalación del sistema de tiazolo[5,4-*b*]quinolina colocaría el sustituyente de anilino hacia alguno de los surcos del ADN. La proyección del sustituyente hacia el surco menor favorecería la interacción con la posible diana, ADN-topoisomerasa II, como ocurre con la *m*-AMSA.³



Otros dos parámetros relevantes del proceso de intercalación y su efecto a nivel biológico son: la afinidad y cinética de la unión. De la serie de compuestos analizados se observa que los derivados con cadenas de (dialquilamino)alquilamino y (azacicloalquil)alquilamino presentan valores más bajos de energía del orbital LUMO, es decir, mayor afinidad, que los derivados con sustituyentes de hidroxialquilamino, los cuales son compuestos inactivos (Tabla 13). Además, la ionización del amino terciario posiblemente aumenta la cinética de la unión con el ADN, como se ha reportado en compuestos catiónicos, donde la velocidad de asociación es usualmente muy rápida; esencialmente por difusión controlada.⁴⁹

En todos los compuestos se observa que la distribución del orbital LUMO no es simétrica (Anexo II). Si esta asimetría le confiere selectividades diferentes por ciertas secuencias del ADN, es algo que aún no se sabe. Sin embargo, la sola existencia del orbital en sistemas policíclicos fusionados no es la única condición que confiere citotoxicidad a esta clase de derivados, ya que mientras que, en derivados de acridina, el factor de intercalación es un pre-requisito para la actividad antitumoral de estos compuestos, existen otros fármacos, como el etopósido, el cual no se intercala entre las pares de bases del ADN, pero que también es capaz de estabilizar los complejos de ruptura ADN-topoisomerasa II.⁵³

6.7.3. Potencial Molecular Electroestático (PME)

Estudios realizados por Medhi y colaboradores⁵⁴ sugieren que las interacciones electrostáticas entre un agente intercalante y las pares de bases del ADN, dependerán de si la distribución de carga en el intercalante es complementaria al potencial generado por las pares de bases, por lo que los mapas de potencial molecular electrostático son de utilidad para estudiar dicha interacción. Además, la cadena lateral del sistema tricíclico es también importante para determinar la estabilización y especificidad por cierto tipo de bases.

El análisis de los mapas de isopotencial permite generalizar la existencia de ciertas zonas donde se concentra la densidad electrónica de los compuestos. Las zonas ricas en electrones se ubican en la periferia de los átomos de nitrógeno del triciclo, en el átomo de nitrógeno de la posición 9 en los compuestos con un sustituyente (dialquilamino)alquilamino, (azacicloalquil)alquilamino y (dietilamino)alquilalcoxi (Figura 33).

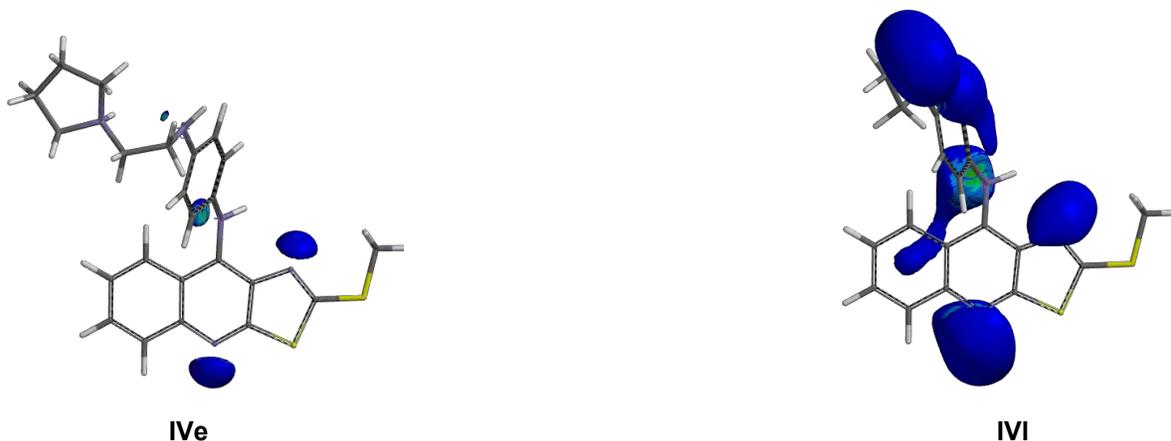


Figura 33. Mapas del potencial molecular electrostático a un isovalor de -20 \AA/Bohr para algunos de los compuestos estudiados.

Previamente, se reportó que la presencia de la cadena lateral en el sistema de tiazoloquinolina, incrementa la densidad electrónica en las regiones anteriormente descritas, como se puede apreciar en los derivados **IVk-IVm**, con un sustituyente de hidroxialquilamino. Por otro lado, en el resto de los derivados con un grupo amino terciario, la densidad electrónica sobre el nitrógeno y oxígeno unido al anillo de 9-anilino es prácticamente nula, al nivel energético mostrado. Lo anterior se explica debido a que la carga se encuentra localizada en el puente de hidrógeno intramolecular.

6.7.4. Análisis del área polar superficial (PSA)

El área polar superficial, definido como la superficie molecular que es polar, es, junto con el coeficiente de partición octanol-agua, uno de los parámetros más importantes para caracterizar las propiedades de absorción y distribución de fármacos. Este descriptor engloba las características de puentes de hidrógeno, polaridad molecular y solubilidad, las cuales juegan un papel muy importante en el transporte a través de membrana.⁵⁵

El PSA se ha identificado como uno de los mejores parámetros para la predicción de la absorción intestinal (permeabilidad pasiva); compuestos con un $\text{PSA} < 60 \text{ \AA}^2$ se absorben más del 90%, mientras que con un valor de $\text{PSA} > 140 \text{ \AA}^2$ se absorben menos del 10%.⁵⁵ Todos los compuestos del presente trabajo tienen valores de PSA menores a 60 \AA^2 (Tabla 13), por lo que serían buenos candidatos, en principio, para administrarse por vía oral.



Comparando los valores de PSA de los compuestos obtenidos, dependiendo del sustituyente incorporado en el anillo de anilino, no se observan diferencias apreciables, sin embargo, el derivado con una cadena de propilo y un anillo de pirrolidinona (**IVf**) y los derivados con un grupo hidroxialquilamino (**IVk-IVm**) presentan los valores más altos de PSA en un rango de 49 a 57 Å². Estos derivados no son compuestos activos por lo que se infiere que el PSA puede ser un factor importante para la actividad citotóxica de estas moléculas.

6.7.5. Análisis de logP

El logP es un parámetro muy utilizado en la obtención de modelos matemáticos de correlación entre la estructura química y la actividad biológica (QSAR) al relacionarse con la capacidad de los compuestos para atravesar las membranas biológicas.⁵⁶ Este parámetro, junto con el PSA y la masa atómica, se emplean para la caracterización de compuestos y sus propiedades de absorción por difusión pasiva (Regla de Lipinski, “regla de los 5”). Compuestos con buena absorción por difusión pasiva deberán tener valores de logP menores a 5. Los compuestos del presente trabajo no muestran diferencias considerables en los valores de logP y el rango de valores obtenido es de 4.59 a 5.81, lo que en permitiría la llegada de los compuestos a su sitio de acción, es decir, el núcleo de la célula.

6.8. Relación cuantitativa estructura química-actividad biológica (QSAR)

Con el propósito de establecer modelos de la relación cuantitativa estructura-actividad citotóxica, se analizaron los descriptores moleculares obtenidos de los estudios de modelado molecular (Tabla 13), para cada línea celular evaluada.

En este análisis se consideraron los valores del índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina (IC) de los compuestos sintetizados a fin de realizar la normalización de los valores de citotoxicidad, así como los de la serie **V**, los cuales habían sido obtenidos en un estudio previo. Los compuestos que no fueron activos a la máxima concentración ensayada fueron excluidos del estudio.

A continuación, se indican las ecuaciones de correlación para cada línea celular con sus respectivos parámetros estadísticos de regresión lineal múltiple, los cuales son:

n = número de compuestos.

R² = coeficiente de correlación cuadrado múltiple.

s = error estándar de la estimación.

F = prueba de Fischer con 95 % de confianza.

Q² = coeficiente cuadrado de predicción de correlación.



6.8.1. Línea celular HeLa

El grupo de compuestos activos en esta línea celular fue disminuido a un total de 13, después de la eliminación de tres valores atípicos: **IVc**, **IVf** y **IVk**. A partir de la matriz de correlación se determinó que el volumen molecular, el área superficial, la ovalidad y la masa molecular, son descriptores colineales, así como el HOMO, LUMO y momento dipolar lo son entre sí.

De esta manera se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{IC} = 1.2672 (4.2261) \text{Ovalidad} - 0.0217 (0.0168) \text{PSA} - 2.4145 (6.6081) \quad (\text{ecuación 1})$$

($n = 13$, $R^2 = 0.6032$, $s = 0.120$, $F = 7.60$, $Q^2 = 0.327$)

Este modelo de cuatro variables independientes formalmente satisface el límite aceptado de $n > 4k$, donde n es el número de compuestos y k el número de descriptores. En primer lugar, el valor de R^2 indica que el modelo reproduce parcialmente la respuesta del grupo de entrenamiento, al ser un valor cercano a la unidad, sin embargo, no es un parámetro que represente la calidad predictiva del modelo.

Por otro lado, el parámetro estadístico Q^2 , que resulta de la validación interna del modelo, es considerado, en algunos estudios QSAR, como un criterio de que el modelo es predictivo cuando su valor es mayor a 0.5.³⁸ En nuestro caso, dicho parámetro es cercano a lo reportado, aunque se requiere de la evaluación externa del modelo para asegurar su predictibilidad.

La ecuación 1 está formada por dos descriptores, ovalidad y PSA. Estudios QSAR previos, basados en el núcleo de tiazolo5,4-bquinolina, han reportado el descriptor PSA como un elemento importante en la actividad citotóxica de esta serie de compuestos en la línea celular HeLa.^{4, 57} Este descriptor, del cual se habló anteriormente, contribuye de forma negativa al índice de citotoxicidad como se observa en la ecuación 1. Esto se observa en los derivados poco activos o inactivos, **IVf** y **IVk-IVm**, los cuales presentan los valores más altos de este parámetro.

El descriptor de ovalidad muestra la evaluación de la forma geométrica de la molécula, siendo igual a 1 para una esfera y se relaciona con la capacidad de solvatación de una molécula en un ambiente acuoso, particularmente para hidrocarburos no polares.⁵⁷ El volumen molecular está implícitamente contenido en este descriptor, por lo que, mientras mayor sea el término de ovalidad, mayor será el volumen molecular, y diferente la forma geométrica del compuesto de la forma esférica. Lo anterior explica la alta correlación entre ambos descriptores (0.915).



En el gráfico 4 se muestra la correlación obtenida de la ecuación 1 para la actividad pronosticada vs la actividad observada.

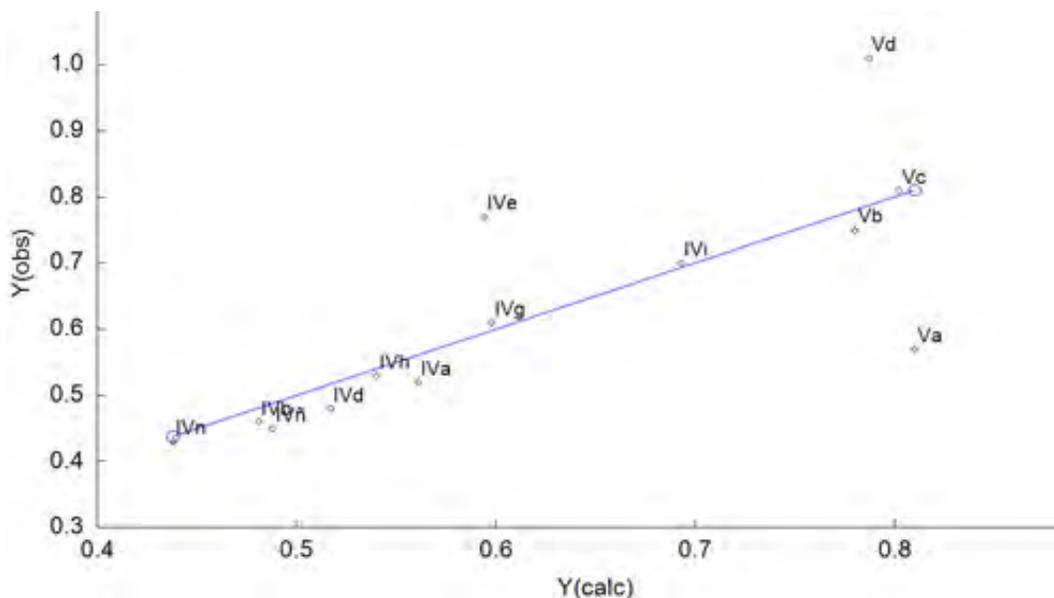


Gráfico 4. Actividad pronosticada vs actividad observada en la línea HeLa, obtenida de la ecuación 1.

Los compuestos con los cuales se generó la ecuación 1 presentan, como característica en común, la capacidad de ionización del nitrógeno β a pH fisiológico.

6.8.2. Línea celular K562

Se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{IC} = 8.1804 (14.4180) \text{Ovalidad} + 0.0356 (0.0380) \text{PSA} - 0.3038 (0.5370) \text{NH} - 14.1676 (23.4062) \quad (\text{ecuación 2})$$

(n = 15, $R^2 = 0.662$, s = 0.331, F = 7.175, $Q^2 = 0.276$)

Como en el caso de la línea celular HeLa, el parámetro R^2 indica que el modelo explica la actividad de los compuestos empleado para su obtención. Sin embargo, el valor de Q^2 es menor a lo reportado de 0.5.

El descriptor que mayor contribución presenta al valor del índice de citotoxicidad es el PSA, debido a que, a diferencia de la ovalidad, los valores de este parámetro son superiores a 35 \AA^2 . Asimismo, este descriptor es importante considerando el tipo de línea celular presente, leucemia mielógena crónica, la cual se cultiva en suspensión, por lo que compuestos más polares serán más solubles en este medio acuoso, requerimiento indispensable para la absorción de un compuesto.



El descriptor NH es un descriptor topológico que indica la presencia de un grupo amino directamente unido al anillo de anilino en posición 4', adquiriendo valores de 0 o 1. En la ecuación 2 se observa que la presencia de un grupo amino directamente enlazado al anilino es desfavorable para el valor de IC. El gráfico 5 muestra la correlación obtenida de la ecuación 2 para la actividad pronosticada vs. la actividad observada.

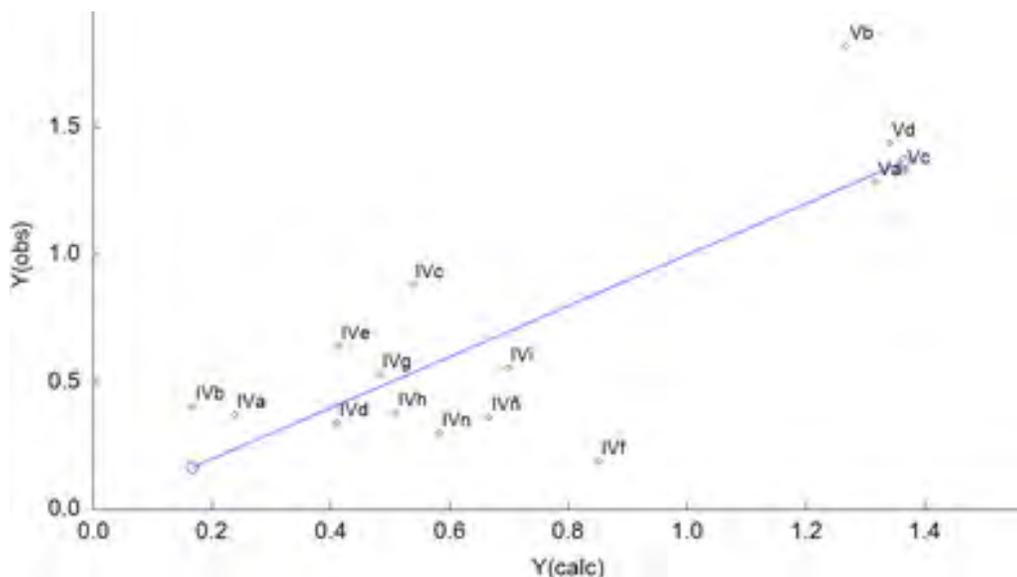


Gráfico 5. Actividad pronosticada vs actividad observada en la línea K562, obtenida de la ecuación 2.

Asimismo, se observan dos grupos de compuestos, ubicándose los compuestos previamente reportados por Martínez-Vázquez (IVa-IVd) en el grupo con mayor índice de citotoxicidad.

6.8.3. Línea celular SW480

Se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{IC} = 9.4807 (18.7359) \text{Ovalidad} + 0.0517 (0.0494) \text{PSA} - 0.4407 (0.6979) \text{NH} - 16.9154 (30.4158)$$

(n = 15, R² = 0.678, s = 0.430, F = 7.730, Q² = 0.330) (ecuación 3)

Los descriptores de la ecuación 3 que predicen el índice de citotoxicidad relativo son los mismos que para la ecuación 2 por lo que valores grandes de ovalidad y PSA son benéficos, además la presencia del grupo amino directamente unido al anillo de benceno contribuye de forma negativa. Asimismo, se observan dos grupos de compuestos en el gráfico 6 de la actividad pronosticada vs. la actividad observada.

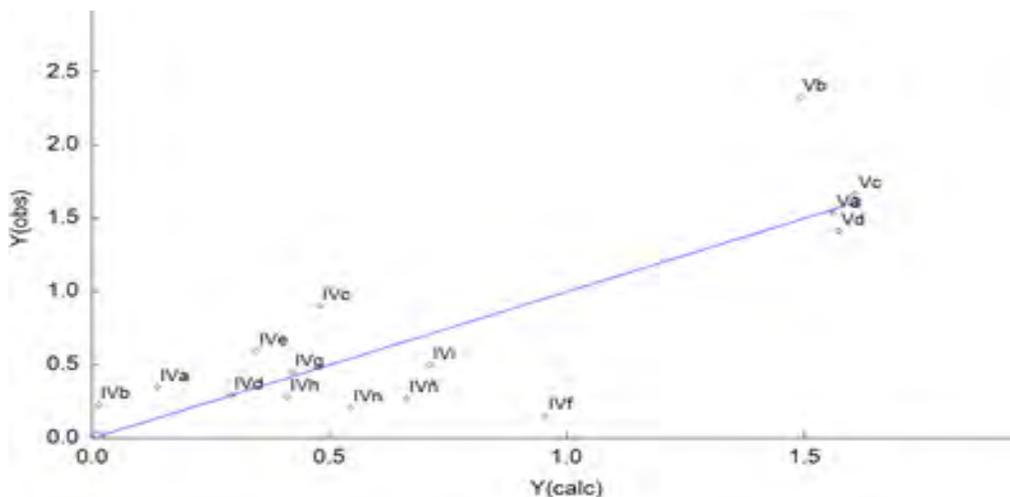


Gráfico 6. Actividad pronosticada vs actividad observada en la línea SW480, obtenida de la ecuación 3.

6.8.4. Línea celular SW620

Se obtuvo la siguiente ecuación:

$$IC_x = 3.0120 (4.8355) \text{ Ovalidad} - 0.4137 (0.4144) \text{ LUMO} + 0.0475 (0.0173) \text{ PSA} - 7.9375 (7.0702) \quad (\text{ecuación 4})$$

(n = 13, R² = 0.913, s = 0.122, F = 31.550, Q² = 0.659)

A diferencia de las ecuaciones anteriores, la ecuación 4 incluye un descriptor diferente, LUMO, del cual se habló en el apartado 7.7.2. y que se ha reportado en estudios QSAR previos.^{4,57} El gráfico 7 muestra la correlación obtenida de la ecuación 4 para la actividad pronosticada vs. la actividad observada.

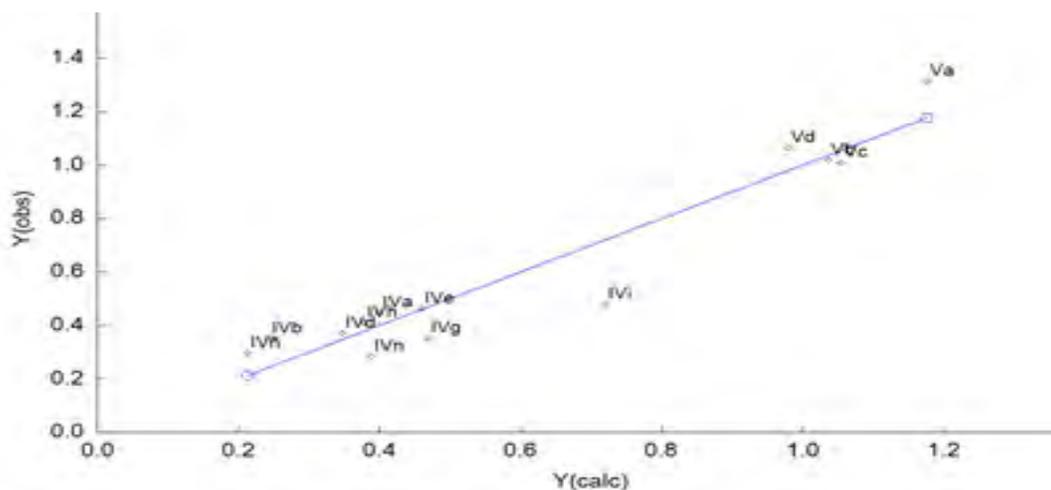


Gráfico 7. Actividad pronosticada vs actividad observada en la línea SW620, obtenida de la ecuación 4.



6.9. Estudios de acoplamiento molecular (*docking*)

A pesar de que recientemente se reportó la estructura cristalográfica del complejo ADN-topoisomerasa II β -amsacrina, los estudios de acoplamiento molecular con dicha macromolécula no han sido objeto de gran interés y, por lo tanto, los estudios de *docking* conducidos en el presente trabajo se pueden considerar novedosos. Además, la inconsistencia entre los resultados de la evaluación de la actividad de la enzima ADN-topoisomerasa II *in vitro* e *in vivo*,³¹⁻³³ justifica el estudio de acoplamiento molecular de los compuestos de este proyecto en dicho complejo molecular.

6.9.1. Validación

Como parte de la validación de cualquier metodología de *docking* es fundamental la reproducción del modo de unión del ligando en la macromolécula donde está co-cristalizado, para lo cual se calcula el valor de la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD, por sus siglas en inglés). Programas que son capaces de reproducir el modo de unión del ligando con un valor de RMSD por debajo de la 1.5 o 2 Å, dependiendo del tamaño del ligando, son considerados efectivos.⁵⁸ El valor obtenido de RMSD para *m*-AMSA es de 0.0 Å, lo cual comprueba la efectividad del programa ADT en reproducir el modo de unión de la molécula endógena (Figura 34).

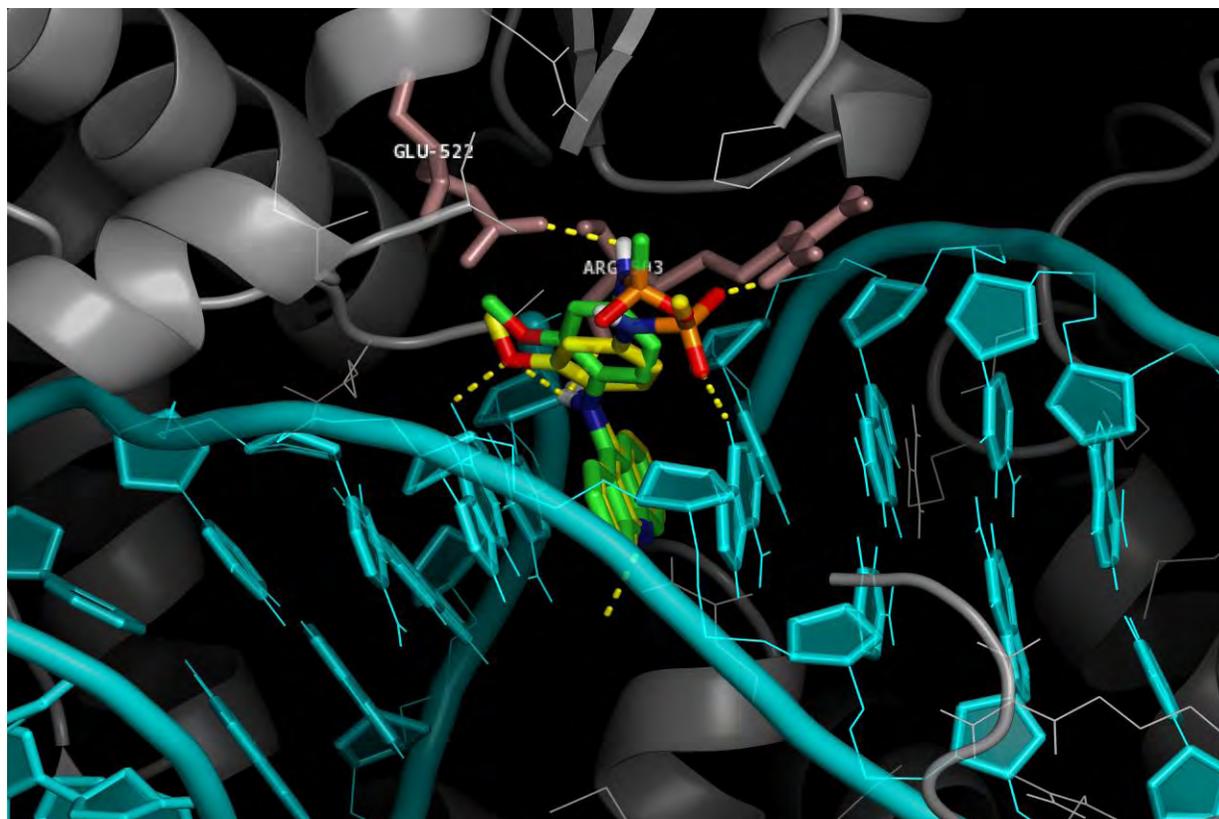


Figure 34. Modos de unión de *m*-AMSA co-cristalizada (verde) y del estudio de *docking* (amarillo), RMSD igual a 0.0 Å. Interacciones polares con Arg503 y Glu522 se indican con líneas discontinuas.



De esta manera, la información obtenida sobre los requerimientos estructurales que conduzcan a moléculas con mejor interacción con el complejo ADN-topoisomerasa II β podrá ser considerada relevante.

6.9.2. Derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina

El diseño de compuestos más potentes y específicos se enfoca principalmente en el acoplamiento entre el ligando y la enzima. Una molécula que permanece unida por un largo tiempo a su diana biológica y la activa o inactiva por un periodo largo de tiempo, puede ser administrada en menores dosis. Además, una sustancia que es diseñada para acoplarse de manera perfecta con un sitio de unión particular de una proteína, es menos probable que interactúe con otra macromolécula; por lo tanto, la sustancia debería minimizar interacciones no deseadas (promiscuidad molecular) y, con ello, los efectos secundarios. Bajo esta perspectiva, se realizó el estudio de acoplamiento molecular para elucidar algunos de los factores electrónicos y topológicos de la interacción ligando y la posible diana biológica.

El estudio de acoplamiento molecular de los derivados **IVa-IVe**, **IVg-IVj**, **IVn-IVñ** y **Va-Vd** se llevó a cabo con los compuestos en estado ionizado, considerando que a pH fisiológico son las especies que predominan. La elección del modo de unión del compuesto en el sitio de acción se realizó considerando la energía libre de unión (ΔG) y el tamaño de clúster y los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Energía libre de unión y tamaño de clúster para los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.

	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe	IVf	IVg	IVh	IVi	IVj
ΔG	-7.07	-7.45	-6.37	-6.84	-7.60	-6.17	-7.52	-8.12	-7.44	-8.27
(kcal/mol)	(8)	(3)	(2)	(5)	(11)	(4)	(6)	(6)	(4)	(4)
	IVk	IVl	IVm	IVn	IVñ	Va	Vb	Vc	Vd	AMSA
ΔG	-8.57	-7.70	-7.70	-6.71	-7.90	-7.38	-8.20	-7.14	-7.93	-7.41
(kcal/mol)	(4)	(5)	(5)	(5)	(4)	(5)	(7)	(4)	(6)	(2)

(Tamaño de clúster/20)

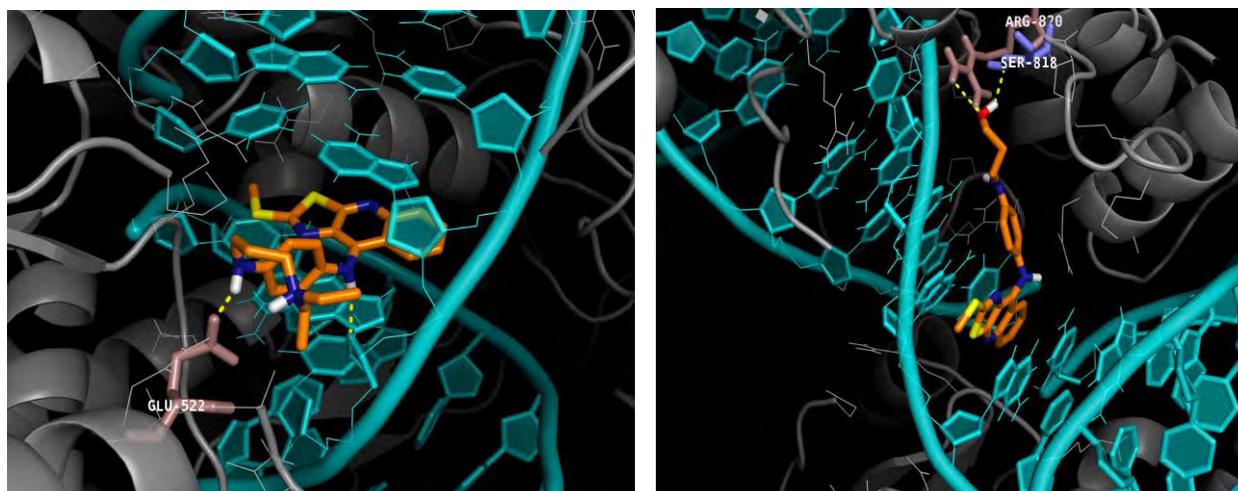
Va-Vd son compuestos previamente reportados [34].

Todos los compuestos presentan valores de energía libre negativos, es decir, la interacción con el complejo Topo II β -ADN es favorable. El rango de valores obtenido oscila entre -6.17 y -8.57 kcal/mol. Sin embargo, no se observa correlación entre el estudio de acoplamiento molecular y la evaluación citotóxica, es decir, la interacción de los compuestos **IVj** y **IVk-IVm** con la posible diana farmacológica es energéticamente posible, sin embargo, son derivados poco activos o inactivos, mientras que el compuesto **IVc**, derivado más activo, no presenta el valor de ΔG más negativo.



Lo anterior confirmaría lo previamente reportado,³¹⁻³³ donde los compuestos de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina no inhiben la acción catalítica de esta enzima o debido a otros factores como solubilidad, paso a través de membranas celulares y/o metabolismo.

Las principales interacciones observadas son interacciones π - π con las pares de bases adyacentes (intercalación paralela al ADN), puentes salinos entre el grupo amino cuaternario y los oxígenos de los grupos fosfato del ADN y en algunos casos puentes de hidrógeno con algunos residuos de la enzima. Sin embargo, mientras que en la *m*-AMSA el grupo anilino se proyecta hacia el surco menor del ADN, en los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, la orientación es hacia el surco mayor del ADN, excepto en el derivado **IVd** (Figura 35), el cual mantiene dos interacciones con el complejo ADN-enzima, equivalente a la amsacrina en el residuo de Glu522 aunque su actividad citotóxica es menor. Por otro lado, los compuestos que mantienen interacciones tipo puente de hidrógeno con residuos de la enzima son **IVf**, **IVi**, **IVl** y **IVm** y la Arg 820, y **IVj** y **IVm** con Ser 818 (Figura 35).



IVd

IVm

Figura 35. Modos de unión de los compuestos **IVd** y **IVm** en el sistema Topo II β -ADN.

A diferencia de los derivados con un grupo hidroxialquilamino (**IVk-IVm**), compuestos no citotóxicos, los compuestos **IVa**, **IVc**, **IVg**, **IVh**, **IVi**, **IVn**, **IVñ** y **IVb** interactúan con uno de los oxígenos del grupo fosfato unido a la citosina 11 y los derivados **IVb**, **IVe**, **IVn** y **Va** con el oxígeno del grupo fosfato de la adenina 12, a través de la formación de un puente salino (Anexo II), interacciones que podrían ser importantes para la actividad citotóxica de este tipo de análogos.



En la Tabla 11 se presentan las interacciones polares previamente mencionadas:

Tabla 11. Interacciones polares de los compuestos de la serie **IV** y **V**.

	Interacción polar		Interacción polar
IVa	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (α) PO ₄ ⁻ (A12) y NH (β)	IVk	O6 (G13) y -O <u>H</u> H7 (G13) y <u>O</u> H O6 (G7) y NH (α).
IVb	PO ₄ ⁻ (A12) y NH (β)	IVl	Arg 820, H41 (C11) y <u>O</u> H
IVc	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (α) O6 (G13) y NH (9-anilino)	IVm	Arg 820 y <u>O</u> H Ser 818 y -O <u>H</u>
IVd	Glu 522 y NH (α, β) O4-desoxirribosa (G13) y 9-NH	IVn	PO ₄ ⁻ (C11) y ⁺ N <u>H</u> R ₂ H7 (A12) y Ar-O O6 (G13) y 9-NH
IVe	PO ₄ ⁻ (A12) y NH (β) O6 (G13) y 9-NH.	IVñ	PO ₄ ⁻ (C11) y ⁺ N <u>H</u> R ₂ O6 (G13) y 9-NH
IVf	Arg 820 y O=CN (β) H7 (A12) y N (1).	Va	PO ₄ ⁻ (A12) y NH (β) O6 (G13) y 9-NH H7 (A12) y O=CNH
IVg	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (β) O6 (G13) y 9-NH	Vb	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (β) H41 (C11) y O=CNH
IVh	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (β)	Vc	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (β)
IVi	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (α) Arg 820 y O (morfolina)	Vd	PO ₄ ⁻ (C11) y NH (β) O6 (G13) y 9-NH H41 (C11) y O=CNH
IVj	Ser 818 y NH (β)	Amsacrina	Glu 522 y N <u>H</u> SO ₂ Me Arg 503 y 9-NH

Aunque se confirmó teóricamente que los compuestos de la serie **IV** y **V** forman complejos energéticamente favorables con el complejo ADN-topoisomerasa IIβ, son necesarios más estudios como la inhibición de la enzima *in vivo* por parte de los compuestos más activos y algunos inactivos que confirmen la propuesta de mecanismo de acción. Sin embargo, los compuestos aquí presentados deben de ser considerados en estudios posteriores para la optimización de su actividad citotóxica y la evaluación de sus propiedades farmacocinéticas.



7. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron quince nuevos compuestos de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina, cuya característica estructural principal es la presencia de un grupo amino sustituido unido directamente al anillo de anilino.
- El análisis de la actividad citotóxica de estos compuestos permite concluir que la incorporación de sustituyentes flexibles del tipo (dialquilamino)alquilamino, (azacicloalquil)alquilamino y (dietilamino)etoxi en el anillo de anilino mejora la actividad citotóxica de esta clase de compuestos, siendo el factor de longitud y el patrón de sustitución, 3' o 4', importantes mas no críticos. Sin embargo, la incorporación de sustituyentes hidroxialquilamino (**IVk-IVm**), independientemente de la posición, 3' o 4', y la preparación de la correspondiente amida (**IVf**) conduce a compuestos inactivos o poco activos, lo que pone de manifiesto la importancia de la basicidad del nitrógeno terciario en la cadena terminal para conferir actividad citotóxica a este tipo de compuestos.
- El remplazo isostérico del grupo amino α por un átomo de oxígeno en el anillo de anilino mantiene la actividad citotóxica en los compuestos de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina confirmando la hipótesis de que la presencia de un grupo donador de puente de hidrógeno en posición 3' o 4' es un requisito farmacofórico para la actividad citotóxica de estos compuestos.
- El estudio de modelado molecular reveló los siguientes aspectos:
 - El estado de protonación de las moléculas sintetizadas es un factor importante que determina la conformación de la cadena lateral, debido a la presencia de interacciones intramoleculares.
 - El hecho de que el orbital molecular LUMO esté centrado en el triciclo revela que la intercalación entre las pares de bases del ADN puede contribuir en el proceso de interacción ligando-receptor.
- El análisis QSAR indicó que los descriptores ovalidad, PSA y LUMO, son los parámetros de mayor contribución a la actividad citotóxica, lo que podría indicar que la actividad de estos compuestos está relacionada con su capacidad de ingresar a la célula, intercalación al ADN y polaridad.
- El estudio de acoplamiento molecular demostró que, asumiendo que el complejo topoisomerasa II β -ADN es la diana biológica de estos compuestos, la interacción de las moléculas del presente estudio está mediada por la formación de puentes de hidrógeno e intercalación en el ADN.



8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

8.1. Reactivos y equipo

Todas las materias primas utilizadas en la síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo. Los compuestos intermediarios fueron caracterizados por punto de fusión y CCF comparativa con base en datos previamente reportados.^{4, 27}

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

Para la evaporación de los disolventes, se utilizó un evaporador rotatorio IKA, modelo *Basic* 10. En la destilación a presión reducida se usó una bomba de vacío marca Felisa, modelo FE-1405 con capacidad máxima de 0.1 mmHg.

Los espectros de Infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro de FT-IR/FT-FIR *Spectrum* 400 de PerkinElmer, mediante la técnica de Reflectancia Totalmente Atenuada (ATR) con un accesorio universal ATR *Sampling* de PerkinElmer y las unidades se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H se realizaron en un equipo Varian-MR (400 MHz), en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM. Los desplazamientos químicos están dados en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa como s: señal simple, d: señal doble, t: señal triple, c: señal cuádruple, q: señal quíntuple, sa: señal simple ancha, ta: señal triple ancha, dd: señal doble de doble, ddd: señal doble de doble de doble, dt: señal doble de triple, m: señal múltiple. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, cloroformo deuterado (CDCl_3) y sulfóxido de dimetil deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) como disolventes.

Los espectros de masas fueron determinados por medio de la técnica de Impacto Electrónico (IE) y Bombardeo Rápido de Átomos (FAB) con iones de cesio, empleando alcohol 3-nitrobencílico como matriz y de baja resolución, en un espectrómetro: *MStation* y *Thermo-Electron* (modelo DFS), respectivamente. El ion molecular se muestra como $[\text{M}^+]$. La nomenclatura se indica como masa/carga (m/z), con su respectivo porcentaje de abundancia relativa (% AR).



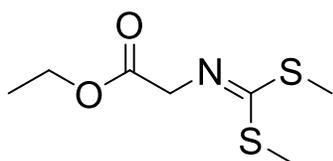
Para las cromatografías en columna se empleó gel de sílice 60 (malla 70-230, Aldrich). Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo técnicas convencionales y utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Aldrich) con indicador de UV y espesor de 0.2 mm. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y exposición a vapores de yodo.

Tabla 12. Sistemas de elución empleados en CCF.

	Mezcla de disolventes	Proporción		Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano/Acetato de etilo	7:3	III	Cloroformo/Metanol/NH ₄ OH	8:2:0.1
II	Cloroformo/Metanol/NH ₄ OH	7:3:0.1	IV	Cloroformo/Metanol/NH ₄ OH	9:1:0.1

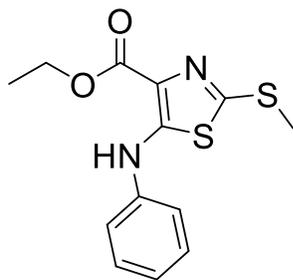
8.2 Síntesis química

N-(Etoxicarbonilmetil)iminoditiocarbamato de dimetilo (I) ⁴¹

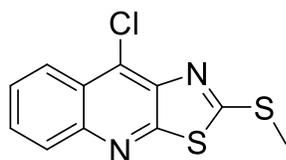


Para la preparación del compuesto I, en un matraz de tres bocas, acondicionado con termómetro, refrigerante y embudo de adición, se mezclaron 200 mL de CHCl₃ y 50 g (0.361 mol) de clorhidrato de glicinato de etilo, la suspensión se agitó vigorosamente empleando agitación mecánica.

Posteriormente, se adicionó 83.5 mL (0.75 mol) de Et₃N, seguida de la adición de 21.6 mL (0.361 mol) de CS₂; la mezcla de reacción se calentó a 40°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se transfirieron mediante una cánula, al embudo de adición, 34 mL (0.359 mol) de (CH₃)₂SO₄. Se mantuvo con calentamiento durante 1 hora más y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La disolución resultante se lavó con agua destilada y la fase orgánica se concentró a presión reducida obteniéndose un aceite amarillo, el cual fue disuelto en 300 mL de acetona. A la disolución amarilla resultante, se le agregó lentamente una disolución de 50 g de K₂CO₃ en 38 mL de agua, seguida de la adición de 22.3 mL de MeI (0.353 mol). La reacción se calentó a 40°C, manteniendo un reflujo suave durante 3 horas, después de lo cual se retiró el calentamiento dejando enfriar la mezcla a temperatura ambiente y continuando la agitación durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó la acetona a presión reducida, obteniéndose un aceite con coloración ámbar. Dicho aceite se purificó por destilación a presión reducida, colectándose la fracción que destiló entre 145-160°C. Se obtuvieron 68 g (0.328 mol) correspondiente al 90.9% de un aceite incoloro con un R_f de 0.4 (sistema I, Tabla 4), que se torna amarillo con la exposición a la luz.

4-Etoxicarbonil-5-fenilamino-2-metiltiofiazol (II) ⁴¹

Para la preparación del compuesto **II**, en un matraz de tres bocas, Ace tipo Europeo, acondicionado con termómetro para bajas temperaturas, embudo de adición, condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno, se mezcló 6.34 g de *t*-BuO⁻K⁺ (56.6mmol) en 200 mL de THF anhidro. La suspensión formada se enfrió a -75°C mediante un baño de hielo seco-acetona. Al embudo de adición se transfirió, mediante una cánula, una disolución de 8.0 g del compuesto **I** (38.64 mmol) en 25 mL de THF anhidro, la cual se adicionó gota a gota a la suspensión de *t*-BuO⁻K⁺, manteniendo la temperatura a -75°C. Terminada la adición, la solución amarillo-naranja resultante, se agitó durante 90 minutos a la misma temperatura. A continuación, se transfirió al embudo de adición una disolución de 4.8 mL de isotiocianato de fenilo (38.64mmol) en 15 mL de THF anhidro y se adicionó gota a gota, cuidando que la temperatura se mantuviera a -75°C. Se dejó agitar durante 50 minutos más y se retiró el sistema de enfriamiento. Cuando la temperatura se acercó a -10°C, se formó un precipitado amarillo. La suspensión formada se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se vertió lentamente sobre 1600 mL de agua con agitación constante, formándose un precipitado blanco-rosado el cual se separó y secó por filtración al vacío. El crudo se recrystalizó de EtOH, obteniendo un sólido cristalino blanco que se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 10.4 g (35.37mmol, 91.5%) del compuesto **II** con un punto de fusión de 80°C y un R_f de 0.57 (sistema I, Tabla 4).

9-Cloro-2-metiltiofiazolo[5,4-*b*]quinolina (III) ⁴¹

Para la preparación del compuesto **III**, en un matraz de fondo redondo de una boca, acondicionado con refrigerante y trampa de humedad, se colocó 2.94 g (10 mmol) del compuesto **II**, se adicionaron 710 mg de PPA y 3 mL de POCl₃ (11.7mmol). La mezcla de reacción se calentó a 130-35°C, con agitación constante por cuatro horas. Después de lo cual se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, posteriormente se agregó lentamente 10 mL de EtOH frío. Al disolverse el aceite obtenido, precipitó un sólido color naranja; la suspensión se vertió sobre 100 mL de agua y se neutralizó con una disolución saturada de NaHCO₃. El precipitado color amarillo-café se separó por filtración al vacío y se secó por succión. El crudo se suspendió en MeOH, se calentó ligeramente con agitación durante 5 minutos y se filtró para obtener 1.6 g (6mmol, 60%) del compuesto **III** (Lit. 60.3%), con un punto de fusión de 160°C y un R_f de 0.65 (sistema I, Tabla 4).



Procedimiento general de síntesis de los intermediarios nitrados (**1a-1ñ**).

Condiciones A. Para la preparación de los compuestos **1a-1e**, en un matraz de fondo redondo de dos bocas previamente flameado y acondicionado con refrigerante se colocó el compuesto nitrado (249 mg, 1 mmol), la amina alifática correspondiente (1.3 equiv.), el Cs_2CO_3 (1.4 equiv.) y 2 mL de 1,4-dioxano anhidro; el sistema se purgó con nitrógeno. En un segundo matraz de una boca previamente flameado se colocó 1 mol % de acetato de paladio y 2 mol % del compuesto 2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxibifenil (Ruphos) y se hizo pasar una corriente de nitrógeno durante 1 min, posteriormente se adicionó 1.5 mL de 1,4-dioxano anhidro obteniendo una solución ámbar, la cual se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió al primer matraz a través de una cánula. La reacción se colocó a reflujo durante 4 horas, tiempo en el cual se observó el consumo de la materia prima (CCF, sistema IV). Una vez fría la mezcla de reacción, el contenido del matraz se filtró a través de una cama de celita, el filtrado se extrajo con 20 mL de NaHCO_3 y acetato de etilo (3x15 mL) y la fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniendo un aceite amarillo intenso. Los rendimientos de reacción fueron superiores al 90%. Los intermediarios obtenidos se caracterizaron por apariencia y R_f .

Condiciones B. Para la preparación de los compuestos **1a-1j**, en un matraz de fondo redondo de una boca y acondicionado con refrigerante, se colocó el compuesto *p*-fluoronitrobenceno (423 mg, 3 mmol), la amina alifática correspondiente (1.3 equiv.) y 3 mL de DMSO. La mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 2 horas, tiempo en el cual se observó el consumo de la materia prima (CCF, sistema IV). Después de lo cual se adicionaron 10 mL de agua destilada y se extrajo la fase orgánica EtOAc (3x5 mL). La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Los productos se purificaron con extracciones líquido-líquido con una solución de HCl al 10% y EtOAc. Los intermediarios obtenidos se caracterizaron por apariencia y R_f .

Condiciones C. Para la preparación de los compuestos **1k-1m**, en un matraz de fondo redondo de dos bocas se colocó 725 mg (3 mmol) del compuesto nitrado con el patrón de sustitución respectivo, el aminoalcohol correspondiente (7.4 equiv.), CuO (1 mol%) y 3 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se colocó a reflujo durante 10 h, tiempo en el cual se observa el consumo de la materia prima (CCF, sistema IV). Ya fría la mezcla de reacción, se filtró sobre una cama de celita, la cual se lavó con diclorometano. Posteriormente, el filtrado se concentró al vacío y al aceite marrón obtenido se le adicionaron 5 mL de una solución de HCl al 10%, colocándose en agitación durante 20 minutos. Se realizaron extracciones con CHCl_3 (3x5 mL); la fase orgánica se desechó y la fase acuosa se neutralizó con NaHCO_3 sólido. Finalmente, se realizaron extracciones adicionales con EtOAc (3x5 mL) y la fase orgánica se trató con Na_2SO_4 y concentró al vacío obteniendo un aceite amarillo.



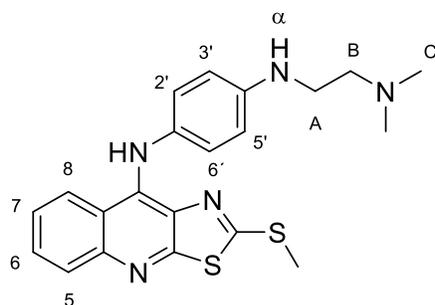
Condiciones D. En un matraz de fondo redondo de una boca y acondicionado con refrigerante se colocó el compuesto *m*- ó *p*-nitrofenol (417 mg, 3 mmol), el derivado clorado 671 mg (1.3 equiv.), K_2CO_3 (4.5 mmol) y 3 mL de DMF. La reacción se calentó a 80°C durante 6 horas, tiempo en el cual se observó el consumo de la materia prima (CCF, sistema IV). Después de lo cual se adicionaron 10 mL de agua destilada y se extrajo la fase orgánica con EtOAc (3x5 mL). La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Los intermediarios obtenidos se caracterizaron por su apariencia y R_f .

Procedimiento general de síntesis para la obtención de los derivados de anilina (**2a-2ñ**).

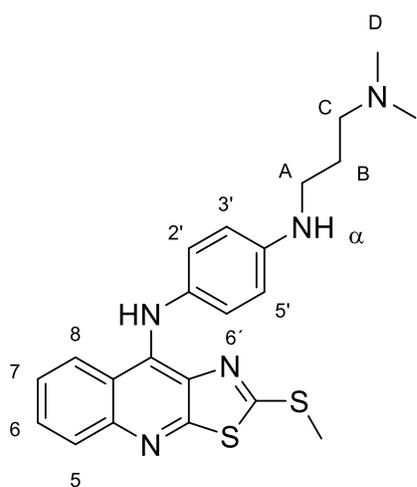
Para la preparación de los compuestos **2a-2ñ**, se disolvió el derivado correspondiente (**1a-1ñ**) en 20 mL de MeOH y se transfirió al recipiente de hidrogenación. Se adicionó el 10 % en masa de Pd/C y 80 mL de MeOH. La mezcla de reacción se hidrogena (H_2 , 65 lb/in²) a temperatura ambiente, durante 1 h en el caso de los derivados con sustituyente en posición 3' y a 60 °C durante 1h para los derivados 4' sustituidos, tiempo en el cual se consume la materia prima y se observa un cambio en la coloración de amarillo a incoloro. La mezcla de reacción se filtró sobre una cama de celita y el filtrado se evaporó al vacío. Debido a que se ha reportado que las anilinas anteriores son compuestos sensibles a la oxidación se hicieron reaccionar inmediatamente después de su obtención.

Metodología general de síntesis de los derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina (**IVa-IVñ**).

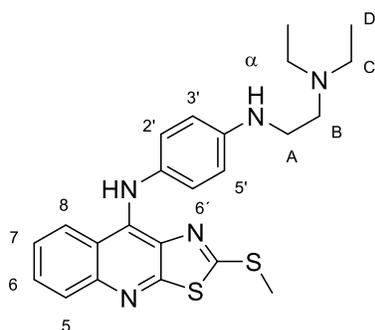
Para la preparación de los compuestos finales **IVa-IVñ**, en un matraz de fondo redondo de una boca, se suspendieron 266 mg (1 mmol) del compuesto **III** en 3 mL de AcOH glacial. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos. Después de este tiempo se adicionaron 1.3 mmol de la anilina correspondiente. La reacción se colocó a reflujo durante 3-10 horas, obteniendo una solución rojiza que se intensifica su coloración con el transcurso del tiempo. Al término de la reacción (CCF, sistema III) la mezcla de reacción fría se ajustó el pH a básico con solución de NaOH al 10% y se extrajo con acetato de etilo (3x5 mL); la fase orgánica de color amarillo se trató con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. Al crudo de reacción se le adicionó éter diisopropílico para generar un sólido, el cual se purificó por recristalización o a mediante cromatografía en columna abierta.

9-[4-(2-(*N,N*-Dimetilamino)etilamino)anilino]-2-metiltioiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVa**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se refluxó durante 5 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 397 mg (0.97 mmol, 97 %) de **IVa** como un sólido color amarillo. **Punto de fusión:** 113-114 °C. **R_f:** 0.33 (sistema III, Tabla 4). **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 1):** 3372, 3180 (N-H), 2974, 2927, 2821, 2772 (C-H insat. y sat.), 1612, 1569, 1513, 1475 (aromáticos), 1274, 1250 (=C-N), 1035 (C-N alifático), 757 (C-S). **RMN-¹H (espectro 2, CDCl₃, δ):** 2.29 (s, 6H) C; 2.58-2.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H) B; 2.74 (s, 3H) SCH₃; 3.16-3.18 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H) A; 4.36 (s, 1H) α; 6.59-6.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.00-7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.14-7.18 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-7; 7.41 (s, 1H) ArNHAr; 7.53-7.57 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-6; 7.72-7.75 (dd, *J* = 8.7, 1.3 Hz, 1H) H-8; 7.92-7.94 (dd, *J* = 8.7, 1.3 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 3):** 409 (M⁺, 40%), 351 (M⁺-58, 40%), 58 (M⁺-351, 100%).

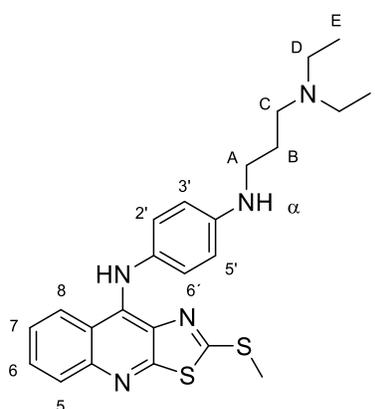
9-[4-(3-(*N,N*-Dimetilamino)propilamino)anilino]-2-metiltioiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVb**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se refluxó durante 6 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 389 mg (0.92 mmol, 92 %) de **IVb** como un sólido color amarillo. **Punto de fusión:** 100-102 °C. **R_f:** 0.31 (sistema III, Tabla 4). **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 4):** 3315, 3208 (N-H), 2943, 2784, 2764 (C-H insat. y sat.), 1609, 1577, 1551, 1516, 1474 (aromáticos), 1276, 1242 (=C-N), 1036 (C-N alifático), 753 (C-S). **RMN-¹H (espectro 5, DMSO-D₆, δ):** 1.63-1.70 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H) B; 2.14 (s, 6H) D; 2.28-2.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H) C; 2.43 (s, 3H) -SCH₃; 3.01-3.04 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) A; 5.48 (s, 1H) α; 6.52-6.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 6.94-6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.36-7.40 (ddd, *J* = 8.3, 6.7, 1.4 Hz, 1H) H-7; 7.62-7.66 (ddd, *J* = 8.3, 6.7, 1.3 Hz, 1H) H-6; 7.80-7.82 (dd, *J* = 8.6, 1.3 Hz, 1H) H-5; 8.28-8.31 (dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H) H-8; 8.99 (s, 1H) NH-Ar. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 6):** 423 (M⁺, 100%), 338 (M⁺-85, 70%), 58 (M⁺-365, 84%).

9-[4-(2-(*N,N*-Dietilamino)etilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVc**).

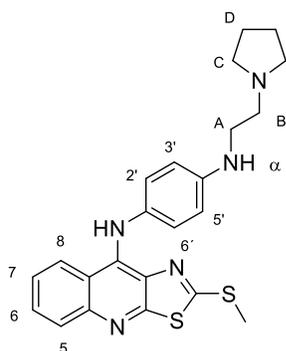
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 4 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 423 mg (0.97 mmol, 97 %) de **IVc** como un sólido color café. **Punto de fusión:** 108-109 °C. **R_f:** 0.32 (sistema IV, Tabla 4). **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 7):** 3381, 3197 (NH), 2965, 2820 (C-H insat. y sat.), 1687, 1600, 1552, 1533, 1509 (aromáticos), 1253, 1163 (=C-N), 1049 (C-N alifático), 749 (C-S). **RMN ¹H (espectro 8, CDCl₃) δ:**

1.06-1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H) D; 2.62-2.67 (c, *J* = 7.1 Hz, 4H) C; 2.73 (s, 3H) -SCH₃; 2.74-2.78 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H) B; 3.17-3.20 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H) A, 4.57 (s, 1H) α; 6.59-6.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.00-7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.12-7.17 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-7; 7.41 (s, 1H) NH-Ar-; 7.54-7.57 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.4 Hz, 1H) H-6; 7.72-7.75 (dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H) H-8; 7.91-7.94 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H) H-5. **EM (FAB, m/z, % AR., espectro 9):** 438 (MH⁺, 31%), 437 (M⁺, 23%), 86 (M⁺ - 351, 100).

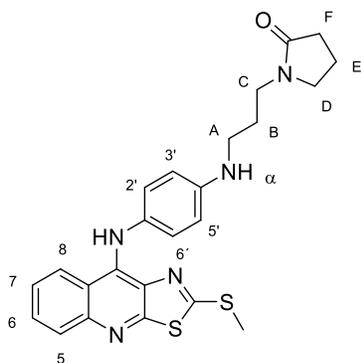
9-[4-(3-(*N,N*-Dietilamino)etilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVd**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 5 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 415 mg (0.92 mmol, 92 %) de **IVd** como un sólido color amarillo. **R_f:** 0.26 (sistema III, Tabla 4). **Punto de fusión:** 79-80 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 10):** 3270 (NH), 2965, 2927, 2806 (C-H insat. y sat.), 1612, 1583, 1551, 1514, 1496 (aromáticos), 1278, 1240 (=C-N), 1032 (C-N alifático), 756 (C-S). **RMN ¹H (espectro 11, CDCl₃) δ:**

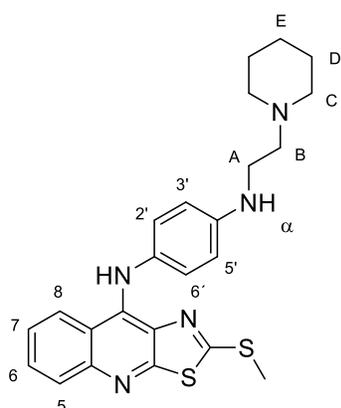
1.07-1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H) E; 1.80-1.87 (q, *J* = 6.5 Hz, 6H) B; 2.58-2.65 (q, *J* = 6.9 Hz, 6H) C y D; 2.75 (s, 3H) -SCH₃; 3.19-3.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H) A; 4.91 (s, 1H) α; 6.55-6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.00-7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.13-7.17 (ddd, *J* = 8.2, 6.7, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.41 (s, 1H) NH-Ar, 7.53-7.57 (ddd, *J* = 8.2, 6.7, 1.4 Hz, 1H) H-6; 7.72-7.75 (dd, *J* = 8.6, 1.3, 0.6 Hz, 1H) H-8; 7.92-7.94 (dd, *J* = 8.6, 1.3, 0.6 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 12):** 451 (M⁺, 62%), 74 (M⁺-377, 100%), 55 (M⁺-396, 68%).

9-[4-(2-(Pirrolidin-1-il)etilamino)anilino]-2-metilthiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVe**).

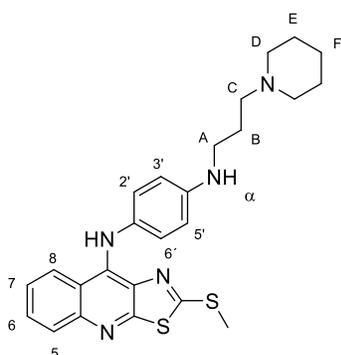
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 5 horas. El compuesto se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol a gradiente, para rendir 239 mg (0.55 mmol, 55 %) de **IVe** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.39 (sistema III, Tabla 4). **Punto de fusión**: 118-120 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 13)**: 3271 (NH), 3030, 2958, 2925, 2686 (C-H insat. y sat.), 1613, 1579, 1551, 1514, 1497 (aromáticos), 1277, 1243 (=C-N), 1038 (C-N alifático), 757 (C-S). **RMN ¹H (espectro 14, CDCl₃) δ (ppm)**: 1.87-1.90 (q, *J* = 2.8 Hz, 4H) D; 2.69-2.75 (m, 7H) C y -SCH₃; 2.87-2.90 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H) B; 3.28-3.31 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H) A, 4.59 (s, 1H) α; 6.61-6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.00-7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.14-7.18 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-7; 7.40 (s, 1H) ArNHAr; 7.54-7.58 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.4 Hz, 1H) H-6; 7.75-7.73 (dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H) H-8; 7.92-7.94 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 15)**: 435 (M⁺, 48%), 436 (MH⁺, 12%), 351 (M⁺-84, 22%), 84 (M⁺-351, 100%).

9-[4-(3-(2-Oxo-pirrolidin-1-il)propilamino)anilino]-2-metilthiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVf**).

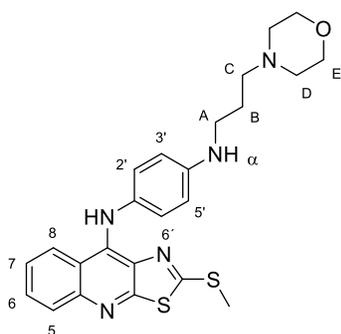
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 8 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 402 mg (0.87 mmol, 87 %) de **IVf** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.56 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 162-163 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 16)**: 3313, 3127 (NH), 3042, 2922, 2861, 2825 (C-H insat. y sat.), 1645, 1615, 1575, 1552, 1535, 1459 (aromáticos), 1278, 1237 (=C-N), 1049 (C-N alifático), 758 (C-S). **RMN ¹H (espectro 17, CDCl₃) δ**: 1.79-1.86 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H) B; 2.00-2.08 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H) E; 2.40-2.44 (t, *J* = 8.1, 2H) A; 2.75 (s, 3H) SCH₃; 3.15-3.18 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H) F; 3.38-3.43 (c, *J* = 6.8, 7.2, 6.4, 4H) C y D; 4.36 (s, 1H) α; 6.60-6.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.01-7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.14-7.19 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-7; 7.43 (s, 1H) NH-Ar, 7.55-7.58 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-6; 7.73-7.76 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H) H-8; 7.93-7.96 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 18)**: 463 (M⁺, 100%), 351 (M⁺-112, 32%).

9-[4-(2-(Piperidin-1-il)etilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVg**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 8 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 413 mg (0.92 mmol, 92 %) de **IVg** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.40 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 152-153 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 19)**: 3341, 3297 (NH), 2932, 2919, 2849, 2834, 2763 (C-H insat. y sat.), 1614, 1592, 1525, 1496, 1470 (aromáticos), 1300, 1239 (=C-N), 1029 (C-N alifático), 762 (C-S). **RMN ¹H (espectro 20, CDCl₃) δ**: 1.45-1.51 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H) E; 1.62-1.67 (q, *J* = 5.7 Hz, 4H) D; 2.49 (m, 4H) C; 2.64-2.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H) B; 2.74 (s, 3H) -SCH₃; 3.19-3.22 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H) A; 4.48 (s, 1H) -NH (α); 6.59-6.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.0-7.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.14-7.18 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.3 Hz, 1H) H-7; 7.40 (s, 1H) ArNHAr; 7.53-7.57 (ddd, *J* = 8.4, 6.7, 1.4 Hz, 1H) H-6; 7.73-7.76 (dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H) H-8; 7.92-7.94 (dd, *J* = 8.6, 1.2 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 21)**: 449 (M⁺, 20%), 98 (M⁺-351, 100%).

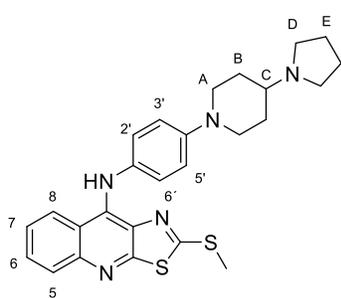
9-[4-(3-(Piperidin-1-il)propilamino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVh**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 8 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 439 mg (0.95 mmol, 95 %) de **IVh** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.31 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 60-61 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 22)**: 3352, 3273 (NH), 3060, 3028, 2932, 2819 (C-H insat. y sat.), 1594, 1528, 1496, 1471 (aromáticos), 1274, 1242 (=C-N), 1032 (C-N alifático), 753 (C-S). **RMN ¹H (espectro 23, CDCl₃) δ**: 1.47-1.50 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H) F, 1.63-1.68 (q, *J* = 5.6 Hz, 4H) E, 1.84-1.89 (q, *J* = 6.4 Hz) B, 2.48-2.54 (m) C y D, 3.18-3.22 (t, *J* = 6.4 Hz) A, 4.45 (s, 1H) -NH (α); 6.55-6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.00-7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.13-7.17 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.41 (s, 1H) ArNHAr; 7.53-7.57 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.73-7.75 (dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz, 1H) H-8; 7.91-7.93 (dd, *J* = 8.6, 0.8 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 24)**: 463 (M⁺, 100%), 98 (M⁺-267, 44%).

9-[4-(3-(Morfolin-4-il)propilamino)anilino]-2-metiltioiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVi**).

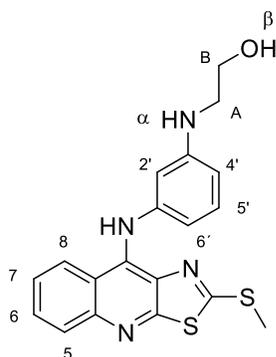
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 8 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 455 mg (0.98 mmol, 98 %) de **IVi** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.50 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 120-121 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 25)**: 3415, 3220 (NH), 3038, 2955, 2936, 2924, 2849, 2805 (C-H insat. y sat.), 1612, 1575, 1549, 1515, 1472 (aromáticos), 1275, 1257 (=C-N), 1115 (C-O), 1039 (C-N alifático), 759 (C-S). **RMN ¹H**

(**espectro 26, CDCl₃**) δ : 1.82-1.89 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H) B; 2.53-2.58 (m, $J = 6.8$ Hz, 2H) C y D; 2.74 (s, 3H) -SCH₃; 3.20-3.23 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H) A; 3.76-3.79 (t, $J = 4.4$ Hz, 4H) E; 4.60 (s, 1H) α ; 6.55-6.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H) H-3' y H-5'; 6.99-7.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.13-7.17 (ddd, $J = 7.2, 6.8, 1.2$ Hz, 1H) H-7; 7.40 (s, 1H) ArNHAr; 7.53-7.57 (ddd, $J = 7.2, 6.8, 1.2$ Hz, 1H) H-6; 7.72-7.74 (dd, $J = 8.8, 1.2$ Hz, 1H) H-8; 7.92-7.94 (dd, $J = 8.4, 0.8$ Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 27)**: 465 (M⁺, 91%), 154 (M⁺-311, 100%).

9-[4-(4-(Pirrolidin-1-il)piperidin-1-il)anilino]-2-metiltioiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVj**).

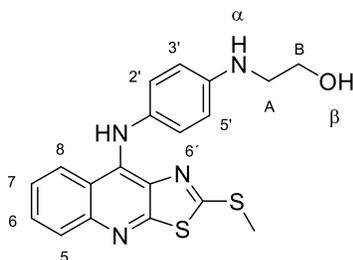
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 5 horas. El compuesto se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol a gradiente, para rendir 199 mg (0.42 mmol, 42 %) de **IVe** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.33 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 105-106 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 28)**: 3198, 3163 (NH), 3048, 2963, 2809 (C-H

insat. y sat.), 1621, 1574, 1551, 1509, 1461 (aromáticos), 1271, 1213 (=C-N), 1038 (C-N alifático), 756 (C-S). **RMN ¹H** (**espectro 29, CDCl₃**) δ : 1.66-1.78 (m, 2H) D; 1.78-1.85 (m, 4H) E; 2.00-2.03 (m, 2H) D; 2.11-2.17 (m, 1H) C; 2.60-2.64 (m, 4H) B; 2.74 (s, 1H) -SCH₃; 2.75-2.80 (m, 1H) A; 3.64-3.67 (ddd, $J = 12.8, 4.0$ Hz, 1H) A; 6.88-6.91 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.03-7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.17-7.21 (ddd, $J = 7.2, 6.8, 1.6$ Hz, 1H) H-7; 7.37 (s, 1H) ArNHAr; 7.55-7.60 (ddd, $J = 6.8, 1.6$ Hz, 1H) H-6; 7.73-7.75 (dd, $J = 8.4, 0.8$ Hz, 1H) H-8; 7.94-7.96 (dd, $J = 8.8, 0.8$ Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 30)**: 475 (M⁺, 100%), 404 (M⁺-71, 92%), 350 (M⁺-125, 32%).

9-[(3-(2-Hidroxietil)amino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVk**).

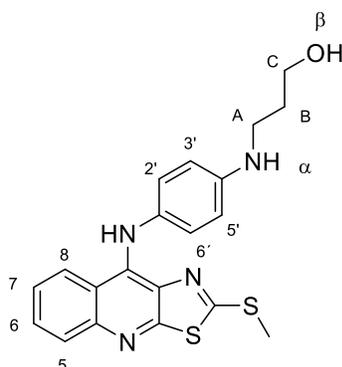
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 5 horas. El precipitado obtenido se purificó con lavados de EtOAc caliente para rendir 324 mg (0.85 mmol, 85 %) de **IVk** como un sólido color verde. **R_f**: 0.40 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 173-175 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 31)**: 3388 (O-H), 3297, 3182 (NH), 2997, 2949, 2776, 2705 (C-H insat. y sat.), 1623, 1598, 1572, 1536, 1478 (aromáticos), 1276, 1240 (=C-N), 1160 (C-O), 1046 (C-N alifático), 752 (C-S).

RMN ¹H (espectro 32, DMSO-*d*₆) δ: 2.43 (s, 3H) –SCH₃, 3.16-3.19 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H) A, 3.58-3.61 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H) B, 3.70-5.40 (sa, 2H) α y β, 7.23-7.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H) H-2', 6.80-6.86 (m, 1H) H-4', H-6' y H-5'; 7.58-7.62 (dd, *J* = 7.2, 0.8 Hz, 1H) H-7, 7.82-7.86 (ddd, *J* = 7.2, 0.8 Hz, 1H) H-6; 7.96-7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) H-5, 8.51-8.53 (d, *J* = 8.3, 1H) H-8; 10.16 (s, 1H) –NH-Ar. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 33)**: 382 (M⁺, 58%), 351 (M⁺-31, 100%).

9-[(4-(2-Hidroxietil)amino)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVI**).

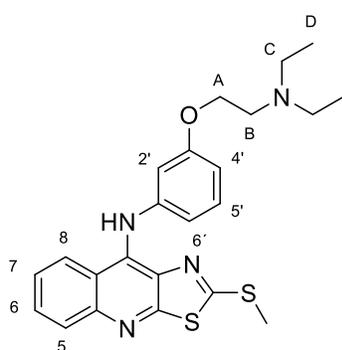
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 3 horas. El precipitado obtenido se purificó con lavados de EtOAc caliente para rendir 259 mg (0.68 mmol, 68 %) de **IVI** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.69 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 183-185 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 34)**: > 3338 (O-H, banda ancha), 3338, 3200 (NH), 3072, 3028, 2857,

2773, 2685 (C-H insat. y sat.), 1622, 1609, 1575, 1546, 1525, 1499 (aromáticos), 1271 (=C-N), 1173 (C-O), 1045 (C-N alifático), 751 (C-S). **RMN ¹H (espectro 35, DMSO-*d*₆) δ**: 2.41 (s, 3H) –SCH₃, 3.22-3.25 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H) H-α, 3.66-3.62 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H) H-β, 3.78-5.0 (sa, 2H) α y β, 7.09-7.17 (m, 4H) H-2', H-3', H-5', H-6'; 7.56-7.60 (m, 1H) H-7, 7.84-7.79 (m, 1H) H-6; 7.96-7.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-5, 8.52-8.49 (d, *J* = 8.7, 1H) H-8; 10.01 (s, 1H) –NH-Ar. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 37)**: 382 (M⁺, 58%), 351 (M⁺-31, 100%).

9-[4-(3-Hidroxipropil)amino]anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVm**).

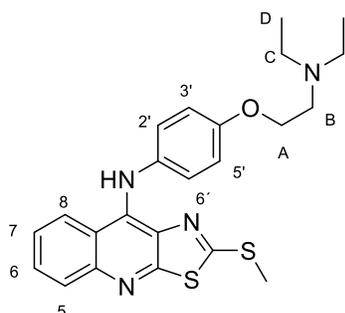
Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 3 horas. El precipitado obtenido se purificó con lavados de EtOAc caliente para rendir 364 mg (0.92 mmol, 92 %) de **IVm** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.69 (sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 165-167 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 38)**: > 3339 (O-H), 3339, 3170 (N-H), 3054, 2941, 2863, 2770, 2682 (C-H insat. y sat.), 1608, 1574, 1535, 1519, 1478, 1458, 1428 (aromáticos), 1272, 1257 (=C-N), 1172 (C-O), 1043 (C-N alifático), 755 (C-S). **RMN ¹H (espectro 39, DMSO-*d*₆) δ**:

1.75-1.82 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H) B, 2.43 (s, 1H) -SCH₃, 3.21-3.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H) C, 3.50-3.55 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H) A, 3.65-4.91 (sa, 2H) α y β, 7.14-7.26 (m, 4H) H-2', H-3', H-5', H-6', 7.55-7.60 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.79-7.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H) H-6, 7.92-7.95 (d, *J* = 9 Hz, 1H) H-5, 8.46-8.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) H-8, 9.91 (s, 1H) -NH-Ar. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 40)**: 396 (M⁺, 100%), 351 (M⁺-45, 44%).

9-[3-(2-(*N,N*-Dietilamino)etoxi)anilino]-2-metiltiozolo[5,4-*b*]quinolina (**IVn**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 8 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 332 mg (0.76 mmol, 76 %) de **IVn** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.44 sistema IV, Tabla 4). **Punto de fusión**: 70 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 41)**: 3354 (NH), 3062, 2970, 2921, 2872, 2795 (C-H insat. y sat.), 1595, 1549, 1493, 1450 (aromáticos), 1267 (=C-N), 1193 (C-O), 1045 (C-N alifático), 766 (C-S). **RMN ¹H (espectro 42, CDCl₃, δ)**:

1.01-1.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) D; 2.56-2.62 (c, *J* = 7.2 Hz, 4H) C; 2.76 (s, 3H) -SCH₃; 2.79-2.83 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H) B; 3.94-3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H) A; 6.59-6.60 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H) H-2'; 6.62-6.66 (dt, *J* = 5.2, 2.0 Hz, 2H) H-4' y H-6'; 7.15-7.19 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H) H-5'; 7.27-7.31 (ddd, *J* = 6.8, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.33 (s, 1H) NH-Ar-; 7.60-7.64 (ddd, *J* = 6.8, 1.6 Hz, 1H) H-6; 7.80-7.83 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H) H-8; 7.99-8.01 (dd, *J* = 8.4, 0.4 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 43)**: 438 (M⁺, 14%), 86 (M⁺-352, 100%).

9-[4-(2-(*N,N*-Dietilamino)etoxi)anilino]-2-metiltioiazolo[5,4-*b*]quinolina (**IVñ**).

Se siguió la metodología general, empleando el compuesto III (266 mg, 1 mmol). La reacción se reflujo durante 6 horas. El compuesto se purificó con lavados de éter diisopropílico caliente para rendir 376 mg (0.86 mmol, 86 %) de **IVñ** como un sólido color amarillo. **R_f**: 0.55 (sistema III, Tabla 4). **Punto de fusión**: 113 °C. **IR (ATR, cm⁻¹, espectro 44)**: 3130 (NH), 3037, 2969, 2926, 2862 2800 (C-H insat. y sat.), 1611, 1571, 1554, 1509, 1472 (aromáticos), 1281, 1239 (=C-N), 1172 (C-O), 1039 (C-N alifático), 756 (C-S). **RMN-¹H (espectro 45,**

CDCl₃, δ): 1.06-1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) D; 2.63-2.68 (c, *J* = 7.2 Hz, 4H) C; 2.74 (s, 3H) -SCH₃; 2.87-2.91 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H) B; 4.03-4.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H) A; 6.85-6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-3' y H-5'; 7.05-7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H) H-2' y H-6'; 7.18-7.22 (ddd, *J* = 7.2, 6.8, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.35 (s, 1H) NH-Ar-; 7.56-7.60 (ddd, *J* = 7.2, 6.4, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.69-7.71 (dd, *J* = 8.8, 0.8 Hz, 1H) H-8; 7.95-7.97 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H) H-5. **EM (IE, m/z, % AR., espectro 46)**: 438 (M⁺, 8%), 86 (M⁺-352, 100%).

8.3. Citotoxicidad en líneas celulares ^{32, 36}

Los ensayos de citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas de los compuestos sintetizados se realizaron en el Departamento de Biología en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo del M. en C. José Solano Becerra. Los efectos citotóxicos de los derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina se determinaron en un panel de cuatro líneas celulares: una línea celular cervical (HeLa), dos líneas celulares de cáncer colorrectal humano (SW620 y SW480) y una línea celular de leucemia humana mielógena (K-562), realizando un perfil de dosis-respuesta gradual (1, 10, 30, 60 y 100 μM), mediante el método de determinación de MTT a 48 h de tratamiento, expresándose como Cl₅₀, que representa el promedio de tres experimentos independientes +/- desviación estándar.

8.4. Modelado molecular ³⁷

Los estudios de modelado molecular se realizaron en una PC, con 4.5 Gb de memoria RAM, utilizando el programa *Spartan' 10*. Las moléculas se construyeron a partir de fragmentos convencionales y se optimizó su geometría. Las moléculas **IVa-IVj** y **IVñ-IVn** se consideraron en su forma ionizada (sección 7.6., Figura 26). El análisis conformacional fue llevado a cabo utilizando MMFF como campo de fuerza. Todos los enlaces sp³ presentes en la molécula fueron rotados cada sesenta grados.



El conformero más estable fue elegido considerando la energía y la distribución de Boltzmann. Las geometrías de los conformeros más estables fueron optimizadas con el método de Funcionales de la Densidad Electrónica, DFT B3LYP/6-31 G*. El cálculo de propiedades electrónicas y la distribución electrónica se requirió para generar los mapas de energía del potencial molecular electrostático y realizar el estudio QSAR.

8.5. Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) ³⁸

Se utilizaron los descriptores calculados en el estudio de modelado molecular (volumen molecular, área superficial, ovalidad, masa molecular, HOMO, LUMO, momento dipolar, log P y PSA) del conformero más estable. Empleando el programa Build-QSAR [®] se generaron las correspondientes matrices de correlación para cada línea celular evaluada. La variable dependiente se consideró como el valor del índice de citotoxicidad relativo a la amsacrina (*IC*). La condición para la selección de los descriptores fue una correlación no mayor a 0.70 entre ellos, pero mayor a 0.6 con *IC*. Los modelos QSAR se generaron con el método de regresión lineal múltiple.

8.6. Estudio de acoplamiento molecular (*Docking*) ³⁹

Proteína. El complejo ternario ADN~Topoisomerasa II~*m*-AMSA (*PDB ID: 4G0U*) fue obtenido de *Protein Data Bank*, ⁴⁰ con una resolución de 2.7 Å. La preparación de la proteína consistió en eliminar manualmente las moléculas de agua, iones de Mg²⁺ y ligandos de *m*-AMSA. Se adicionaron los hidrógenos polares y se corrigieron los sitios de protonación. Las cargas atómicas parciales se calcularon usando el método de cargas de Gasteiger y se guardó en formato PDBQT empleando AutoDockTools-1.5.6 (ADT).

Ligandos. Se optimizó la geometría del conformero de menor energía y mayor abundancia de cada uno de los compuestos **IVa-IVñ**, **Va-Vd** y *m*-AMSA empleando el modelo de Funcionales de la Densidad RB3LYP/6-31G* del programa *Spartan' 10* y se guardó en formato de archivo MOL2, asignando cargas electrostáticas. Empleando ADT, se detectó la raíz de la estructura, se identificaron y visualizaron los enlaces rotables, se adicionaron cargas Gasteiger y se guardaron en formato PDBQT.

Docking. El acoplamiento molecular se llevó a cabo con el software AutoDockTools-1.5.6 [44] y la visualización se realizó en PyMol versión 1.8, en una PC con 4.5 Gb de memoria RAM y sistema operativo Windows 10. Se consideraron todos los enlaces rotables de los ligandos y la macromolécula como rígida. Se estableció una rejilla de 70x70x70 puntos con un espacio de 0.375 Å y se emplearon las coordenadas del sitio de unión de *m*-AMSA para centrar la rejilla preestablecida.



Se empleó la función de Energía Libre-Empírica y el Algoritmo Genético Lamarckiano como el método de búsqueda, con un total de 20 corridas, 2 500 000 evaluaciones y una población inicial de 150 conformeros, dejando el resto de los parámetros preestablecidos. La exactitud del *docking*, representado como el parámetro de “exhaustividad” fue fijado a 100. El mejor modo de unión de cada molécula se seleccionó conforme al valor de energía libre de unión (ΔG) y el tamaño del clúster y se guardó en formato PDB. Inicialmente se realizó la validación del modelo con la molécula de amsacrina y se obtuvo del valor de la desviación cuadrada media (RMSD, por sus siglas en inglés).

Programas empleados

- Spartan'10®
- AutoDockTools-1.5.6.
- PyMOL, Versión 1.8 Schrödinger.
- MarvinSketch 16.11.7.



9. PERSPECTIVAS

- Realizar el ensayo de inhibición de ADN-topoisomerasa II *in vivo* de las moléculas obtenidas.
- Evaluar la inhibición de células no tumorales de los compuestos del presente proyecto.
- Optimizar la actividad citotóxica del derivado **IVc**.



10. REFERENCIAS

- [1] Datos de la Organización Mundial de la Salud. Recurso en línea. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Accesado el 17 de noviembre de 2016.
- [2] Cairns, A. R., Harris, S. I., Mak, W. T. *Nat. Rev. Cancer.* **2011**, *11*, 85-95.
- [3] Wu, C. C., Li, Y. C., Wang, Y. R., Li, T. K., Chan, N. L. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10630-10640.
- [4] González, M. I. Síntesis, Modelado Molecular y Actividad Citotóxica *in vitro* de nuevos derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2015.
- [5] González-Sánchez, I., Solano, J. D., Loza-Mejía, M. A., Olvera-Vázquez, S. Rodríguez-Sotres, R. Morán, J., Lira-Rocha, A., Cerbón, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2102-2108.
- [6] Datos de la Organización Mundial de la Salud, México. Recurso en línea. http://www.who.int/nmh/countries/mex_en.pdf Accesado el 17 de noviembre de 2016.
- [7] Sieber, O. M., Heinemann, K., Tomlinson, I. P. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, *3*, 701-708.
- [8] U.S. Food & Drug Administration (FDA). Recurso en línea. <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm279174.htm> Accesado el 5 de noviembre de 2016.
- [9] Chabner, B. A., Roberts Jr, G. T. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, *5*, 66-72.
- [10] DeVita, T. V., Chu, E. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643-8653.
- [11] Allan, M. J., Travis, B. L. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, *5*, 943-955.
- [12] Avendaño, C., Menéndez, J. C. (2015). Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 2a. Edición. Elsevier.
- [13] Hurley, H. L. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, *2*, 188-200.
- [14] Mukherjee, A., Sasikala, W. D. *Adv Protein Chem Struct Biol.* **2013**, *92*, 1-62.
- [15] Berman, M. H., Young, R. P. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 87-114.
- [16] Wang, C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 430-440.
- [17] Vos, M. S., Tretter, M. E., Schmidt, H.B., Berger, M. J. *Nat. Rev. Cancer.* **2011**, *12*, 827-841.
- [18] Deweese, E. Osheroff, N. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 738-748.
- [19] Wu, C.C., Li, T. K., Farh, L., Lin, T. S., Yu, Y. J., Yen, T. J., Chiang, C. W., Chan, N. L. *Science*, **2011**, *333*, 459-462.
- [20] Ketron, C. A., Denny, A. W., Graves, E. D., Osheroff, N. *Biochemistry.* **2012**, *51*, 1730-1739.
- [21] Schellenberg, J. M., Appel, C. D., Adhikari, S., Robertson, P. D., Williams, S.R. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1363-1372.
- [22] Chen, Y. L., Chen, I. L., Wang, T. C., Han, C. H., Tzeng, C. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 928-934.
- [23] Chen, I. L., Chen, Y. L., Tzeng, C. C., Chen, I. S. *Helv. Chim. Act.* **2002**, *85*, 2214-2221.
- [24] Das, B., Rout, M. K. *J. Sci. Ind. Res.* **1957**, *16C*, 125-126.
- [25] Modica, G. di., Barni, E. *Gazz. Chim. Ital.* **1963**, *93*, 679-686.
- [26] Bernstein, S. C.; Abrams, S. K.; Leckrone, K. J.; Paul, L. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 61-69.
- [27] Álvarez-Ibarra, C., Fernández-Granda, R., Cárdenas, F., Giralt, E. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 668-676.
- [28] Loza-Mejía, M. A. Síntesis, Modelado Molecular y Actividad Citotóxica *in vitro* de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2009.



- [29] Loza-Mejía, M. A. Castillo, R., Lira-Rocha, A. *J. Mol. Graphics Modell.* **2009**, *27*, 900-907.
- [30] Loza-Mejía, M. A., Maldonado-Hernández, K., Rodríguez-Hernández, F., Rodríguez-Sotres, R., González-Sánchez, I., Quintero, A., Solano, D. J., Lira-Rocha, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1142-1149.
- [31] Loza-Mejía, M. A., Olvera-Vázquez, S., Maldonado-Hernández, K., Guadarrama-Salgado, T., González-Sánchez, I., Rodríguez-Hernández, F., Solano, J., Rodríguez-Sotres, R., Lira-Rocha, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3266-3277.
- [32] Páez-Franco, J. C. Cambios en el proteoma de líneas celulares de cáncer humano bajo tratamiento con derivados citotóxicos de tiazolo[5,4-*b*]quinolinas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2013.
- [33] González-Sánchez, I., Solano, J. D., Loza-Mejía, M. A., Olvera-Vázquez, S., Rodríguez-Sotres, R., Morán, J., Lira-Rocha, A., Cerbón, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2102-2108.
- [34] Martínez-Vázquez, R. Síntesis y evaluación citotóxica de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina con grupos dietilaminoalquilamino. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2012.
- [35] Surry, D. S., Buchwald, L. S. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27-50. Fors, P. B., Buchwald, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15914-15917. Wolfe, P. J., Buchwald, L. S. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1133-1135.
- [36] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55-63. Denizot F., Lang R. *J. Immunol. Methods.* **1986**, *89*: 271-277.
- [37] Vijayan, R. S. K., Peng, H., Modi, V., Duong-Ly, K. C., Ma, H., Peterson, R. J., Dunbrack, R. L. Levy, R. M. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 466-479. Pennington, L. D., *et al.* *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9663-9679.
- [38] Tropsha, A. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476-488. Tropsha, A., Gramatica, P., Gombar, V. K. *QSAR Comb. Sci.* **2013**, *22*, 69-77. Polanski, J., Bak, A., Gieleciak, R., Magdziarz, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 2310-2318.
- [39] Coupez, B. Lewis, R. A. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2995-3003. Han, T. Y., Choi, G. I., Son, D., Kim, N. J., Yun, H., Lee, s., Chang, D. J., Hong, H. S., Kim, H., Ha, H. J., Kim, Y. H., Park, H. J., Lee, J., Suh, Y. G. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9120-9135.
- [40] *Protein Data Bank*. Recurso en línea. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> Accesado el 10 de noviembre de 2015.
- [41] Olvera Vázquez, S. Síntesis de 2-alquilamino-9-anilino[5,4-*b*]quinolina como potenciales antitumorales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2005.
- [42] **1a**. Lo Meo, P., D'Anna, F., Gruttadauria, M., Riela, S., Noto, R. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 9099-9111. **1b**, **1i**, **2b**, **2i**. Cuenca, F. Moore, M. J., Johnson, K., Guyen, B., De Cian, A., Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5109-5113. **1c**, **2c**, **2e**. Höglund, P.J., Silver, S., Engström, M. T., Salo, H., Tauber, A., Kyrönen, H. K., Saarenketo, P., Hoffrén, A. M., Kokko, K., Pohjanoksa, K., Sallinen, J., Savola, J. M., Wurster, S., Kallatsa, O. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6351-6363. **1d**. Prasana de Silva, A., Nimal Gunaratne, H. Q., Mark Lynch, P. L., Patty, j. A., Spence, L. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, *2*, 1611-1616. **2d**. Gamage, S. A., Figgitt, P. D., Wojcik, J. S., Ralph, K. R., Ransijn, A., Mauel, J., Yardley, V., Snowdon, D., Croft, L. S., Denny, A. W. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2634-2642. **1e**, **1g**. Morita, Y. *Synthesis*, **2007**, *16*, 2517-2523. **1f**, **1j**, **2a**, **2f**, **2j**. Tong, Y., Penning, D. T., Florjancic, A. S., Miyashiro, J., Woods, W. K. (2012). *Preparation of substituted fused tricycles as inhibitors of kinases for treating cancer*. Patente 20120220572.



ANEXO I

- 2g.** Pease, E. J., Williams, E. J., Bradbury, R. H., Pearson, S. E. (2001) *Preparation of 2,4-di(hetero)arylamino(oxy)-5-substituted pyrimidines as antineoplastic agents*. Patente 2001064656.
- [43] **1k, 1m.** Akhmedova, M. A., et al. *Dokl. Akad. Nauk UzSSR*. **1985**, 2, 39-41. **2k.** Ebenezer, W. J., Hutchings, M. G., Jones, K., Lambert, D. A., Watt, I. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1641-1643. **1l.** Costa, V. M., Viana, G. M., De Souza, T. M., Malta, B. L. F., Aguilár, C. S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 2332-2335. **2l.** Yang, J., Wang, L. J., Liu, J. J., Zhong, L., Zheng, R. L., Xu, Y., Ji, P., Zhang, C. H., Wang, W. J., Lin, X. D. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 10685–10699.
- [44] **1n, 2n.** Han, Y. T., Choi, G. I., Son, D., Kim, N. J., Yun, H., Lee, S. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9120-9135. **1ñ, 2ñ.** Wen, L., Li, P., Shan, Y., Su, P., Wang, J., Shi, Y., Zhang, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1044-1054. [44] Sanner, F. M. *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, 17, 57-61.
- [45] Pearson, G. R. *J. Chem. Educ.* **1968**, 45, 643-648.
- [46] Carbain, B., Coxon, R. C., Lebraud, H., Elliott, J. K., Matheson, J. C., Meschini, E., Roberts, R. A., Turner, M. D., Wong, C., Cano, C., Griffin, J. R. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 2311-2317.
- [47] Álvarez-Ibarra, C.; Fernández-Granda, R.; Quiroga, M. L.; Pingarrón, J. M.; Pedrero, M. *Tetrahedron* **1996**, 52, 11929-11946.
- [48] Hewitt, E. R. McMarlin, A., Kleiner, d., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G. W., Stetler-Stevenson, W. G. *J. Pathol.* **2000**, 192, 446-454.
- [49] Eynollahi, S., Riah, S., Ganjali, M. R and Norouzi, P. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, 5, 1367–1378.
- [50] Reyes-Rangel, F. J. Síntesis y citotoxicidad antitumoral de nuevos derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina. Influencia del sustituyente 2-metiltilio sobre la actividad biológica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2009.
- [51] Loanovicu A, Antony S, Pommier Y, Staker BL, Stewart L, Cushman M. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4803–4814.
- [52] Marchand C, Antony S, Kohn KW, Cushman M, loanovicu A, Staker BL, Burgin AB, Stewart L, Pommier Y. *Mol Cancer Ther.* **2006**, 5, 287–295.
- [53] Wu, C.C., et al. *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, 1063-1064.
- [54] C. Medhi, J. Mitchell, S. Price, A. Tabor. *Nucleic Acids Sci.* **1999**, 52, 84–93.
- [55] Ertl, P. (2007) Polar Surface Area, in *Molecular Drug Properties - Measurement and Prediction* (ed. R. Mannhold), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- [56] Modarresi, H., Modarress, H., & Dearden, J. C. *SAR QSAR Environ. Res.*, **2005**, 16, 461–482.
- [57] Márquez-Cadena, M. A. Síntesis, actividad citotóxica y modelado molecular de nuevos derivados de 9-anilino-7-metoxitiazolo[5,4-*b*]quinolina como potenciales agentes antitumorales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2014.
- [58] Hevener, E. K., Zhao, W., Ball, M. D., Babaoglu, K., Qi, J., White, W. S., Lee, E. R. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 444–460.

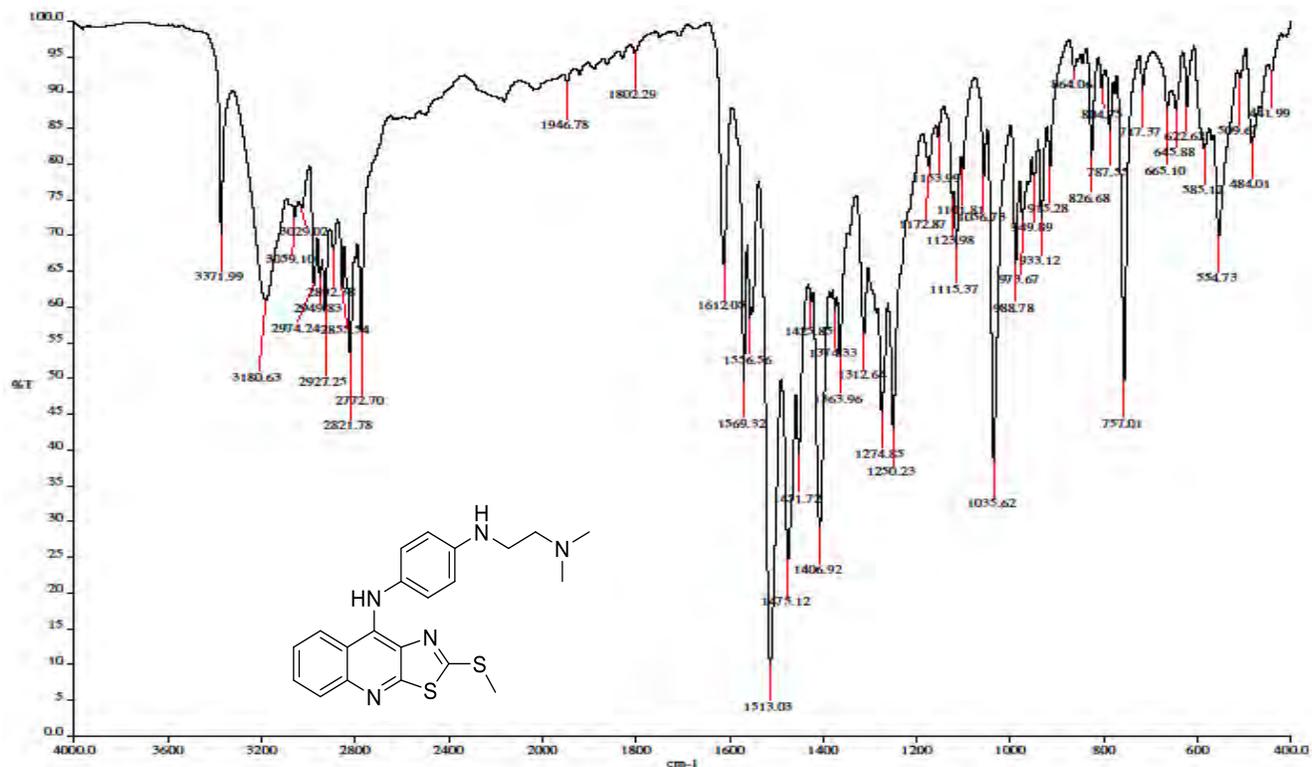


ANEXO I

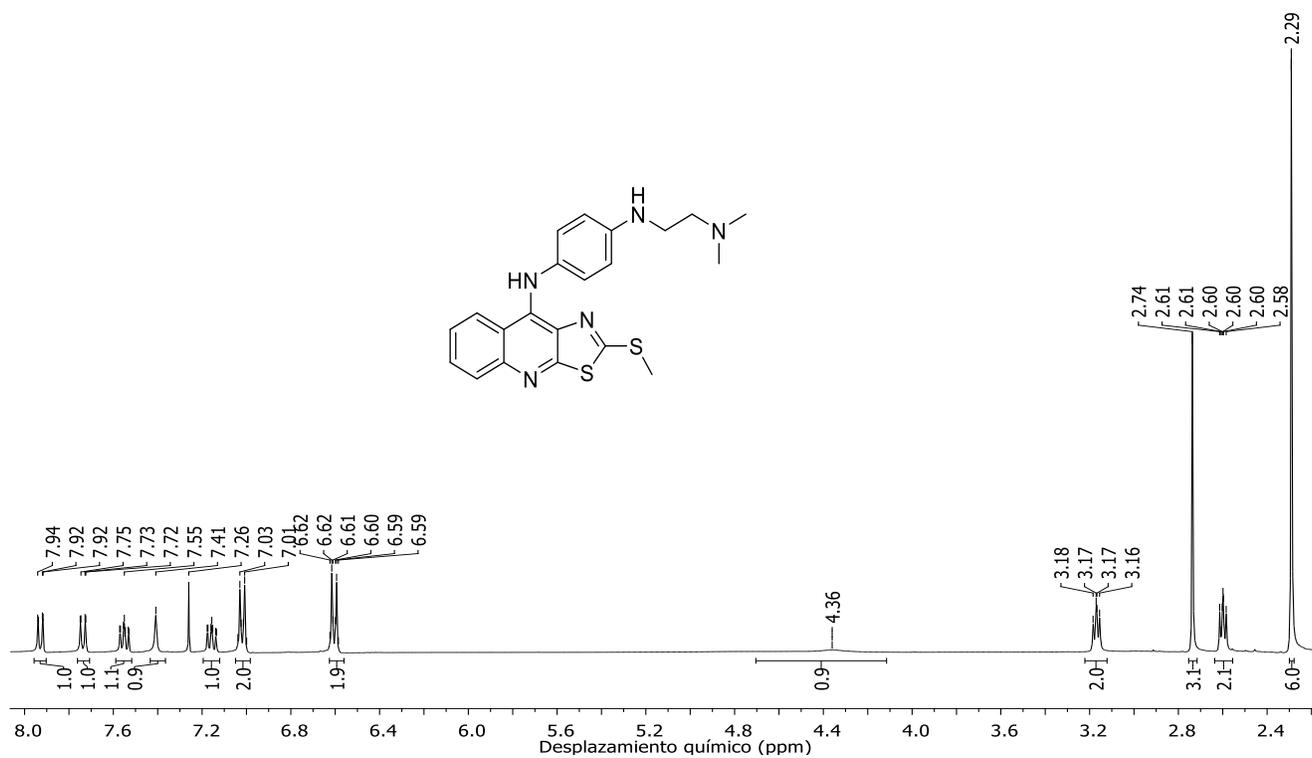
ESPECTROS DE IR, RMN ^1H y EM



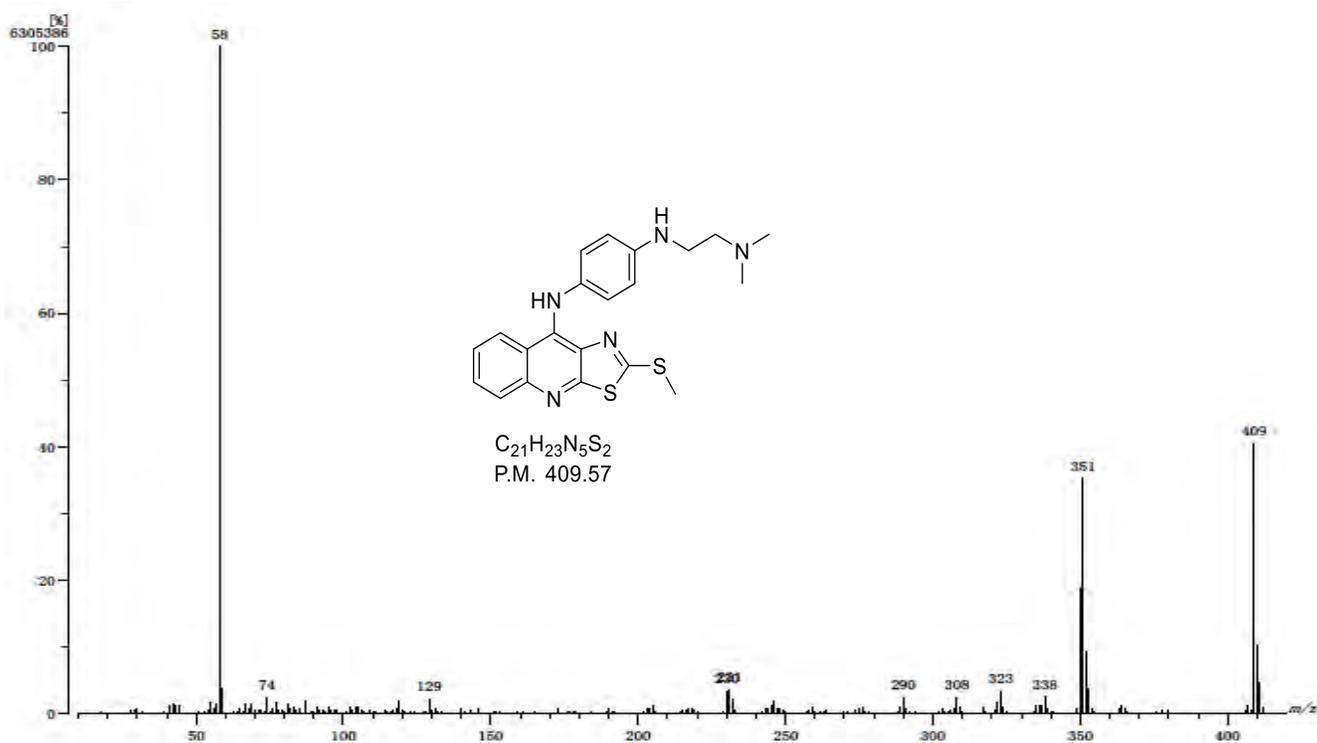
ANEXO I



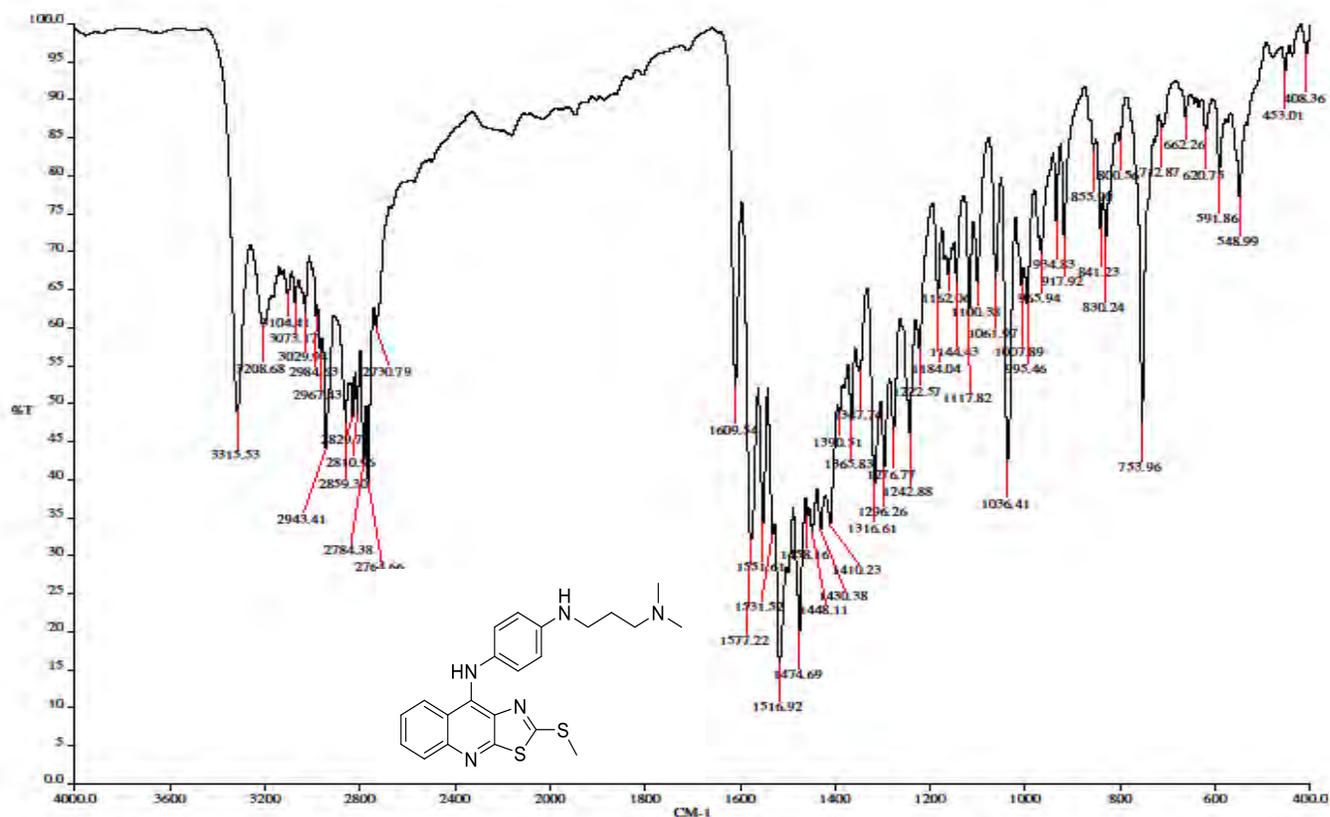
Espectro 1. IR (RTA) del compuesto IVa.



Espectro 2. Espectro RMN ¹H del compuesto IVa (CDCl₃).



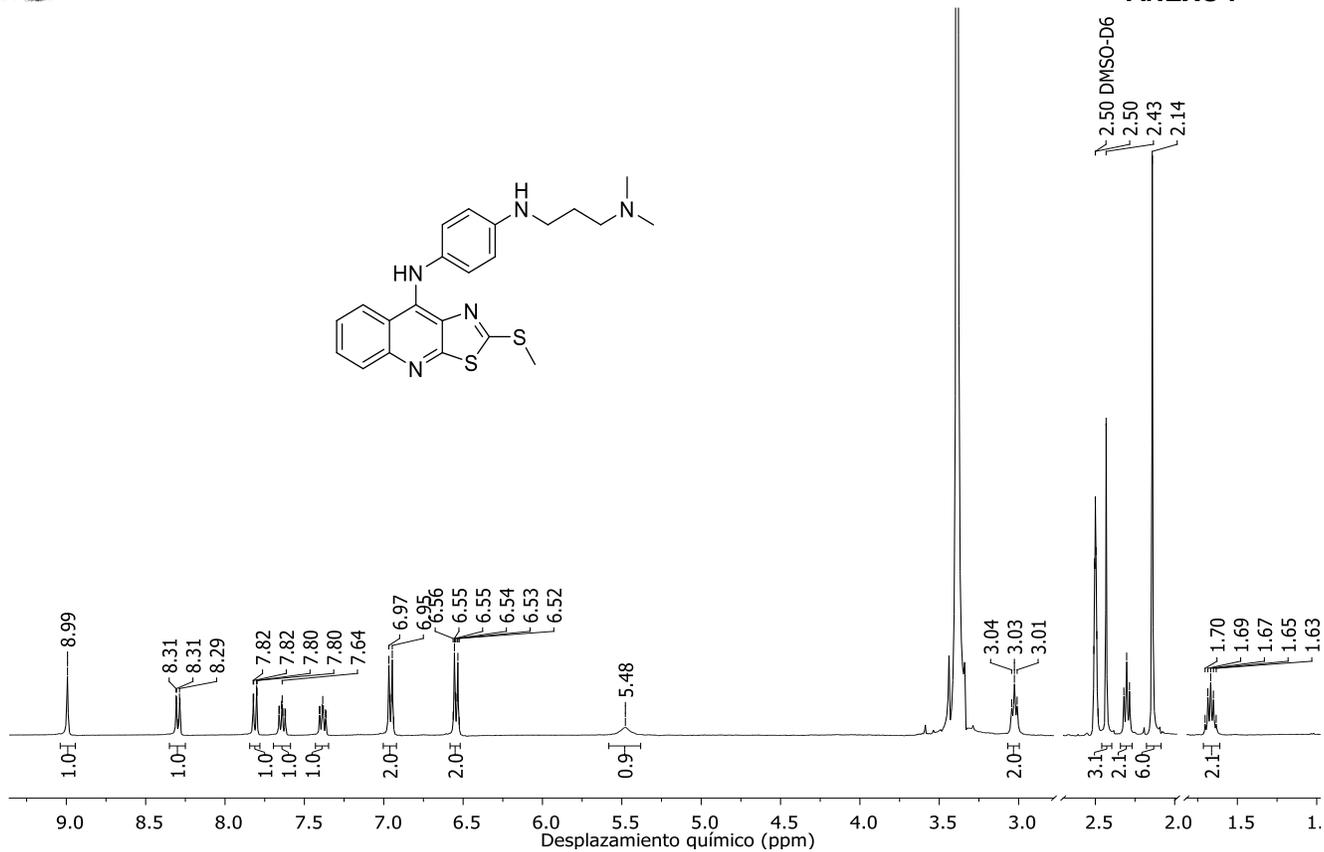
Espectro 3. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVa.



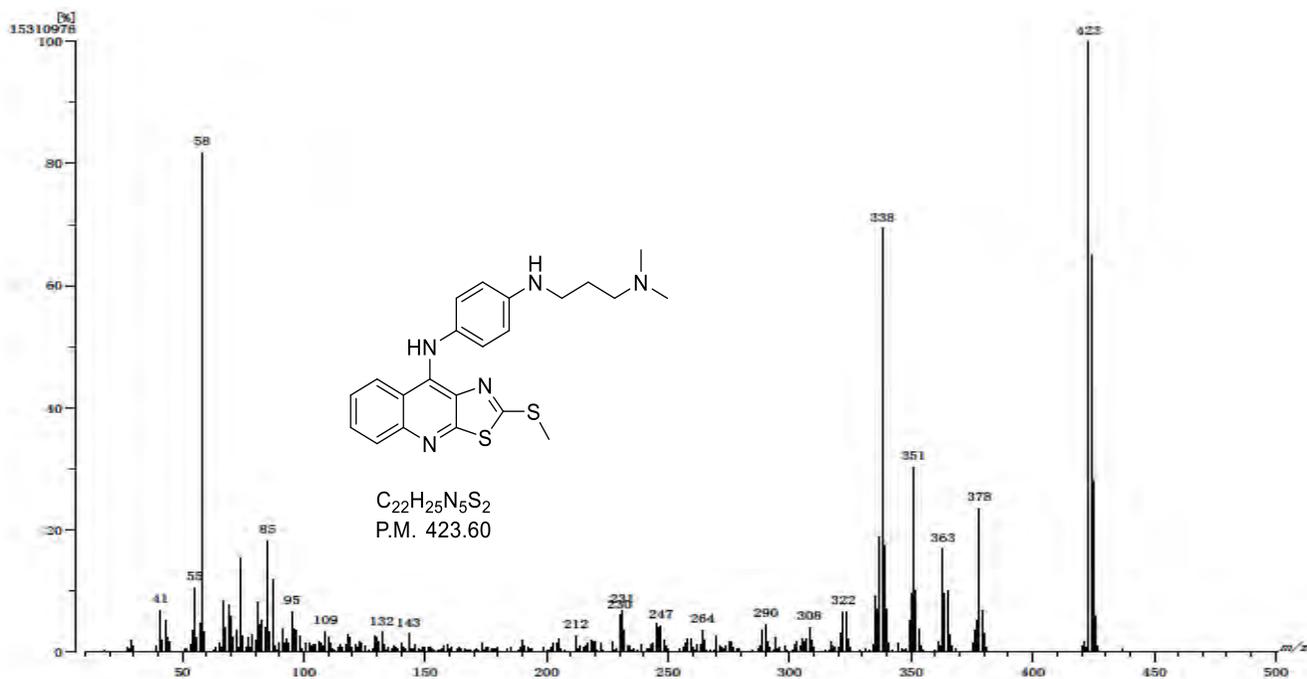
Espectro 4. IR (RTA) del compuesto IVb.



ANEXO I



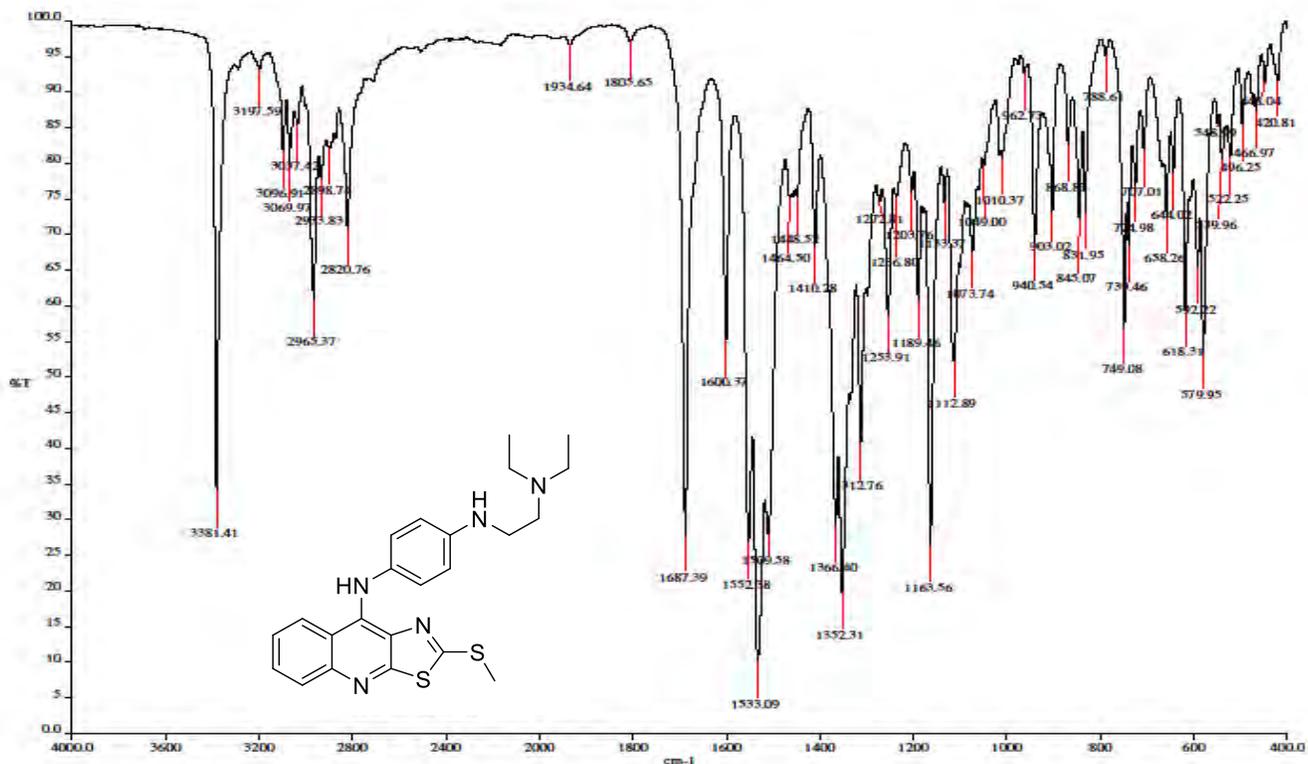
Espectro 5. Espectro RMN ^1H del compuesto **IVb** ($\text{DMSO-}d_6$).



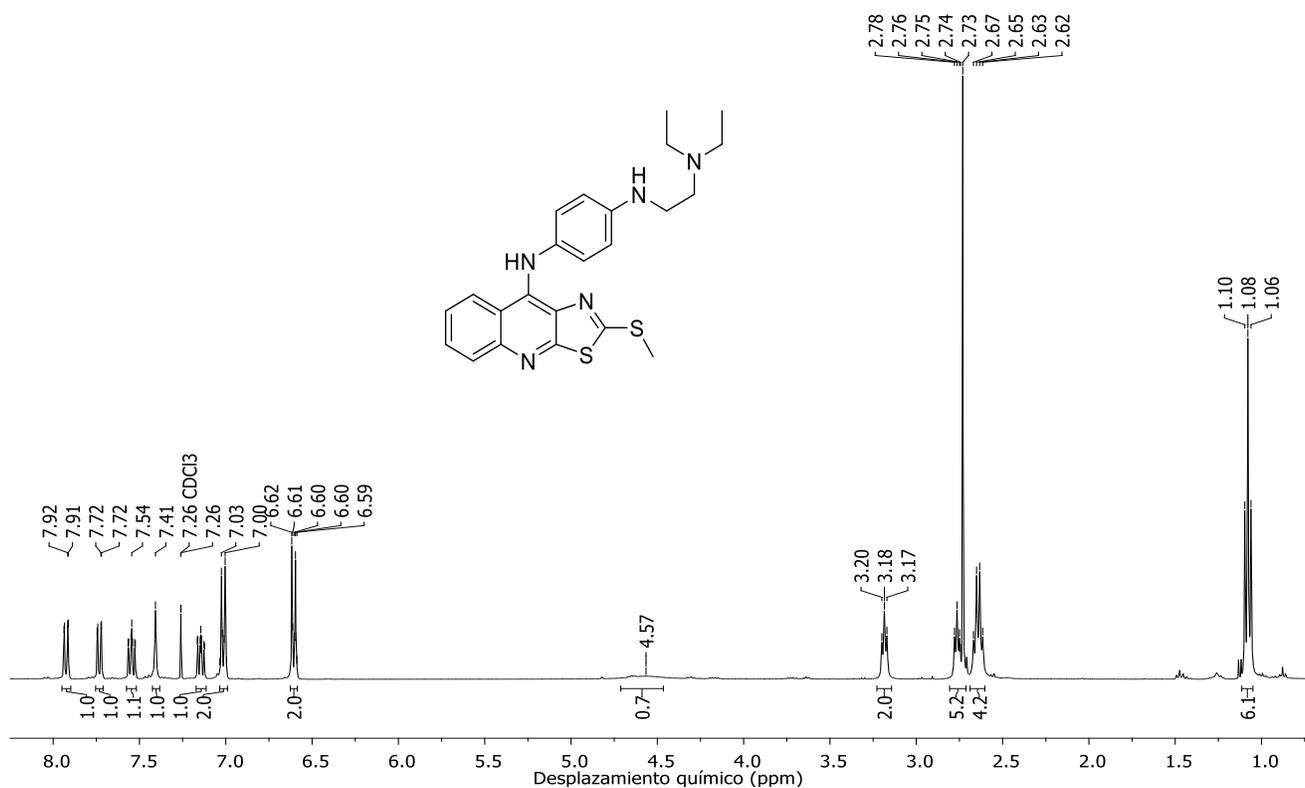
Espectro 6. Espectrometría de masas (IE) del compuesto **IVb**.



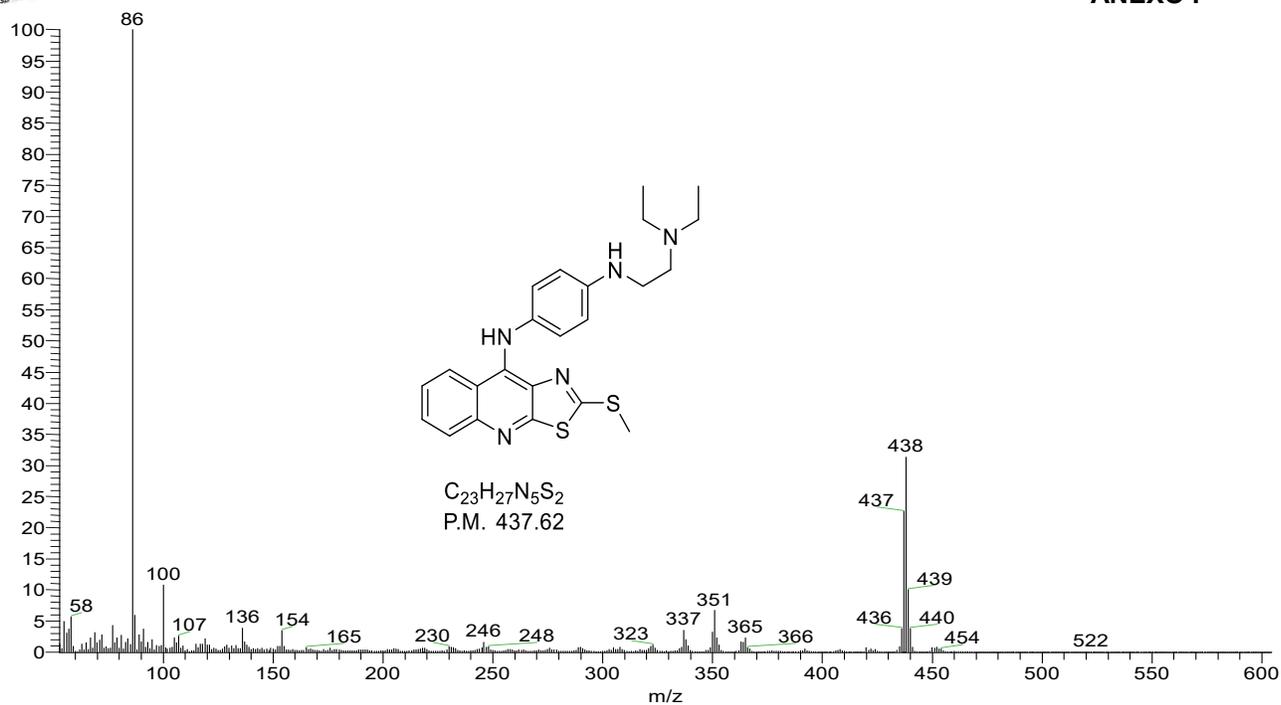
ANEXO I



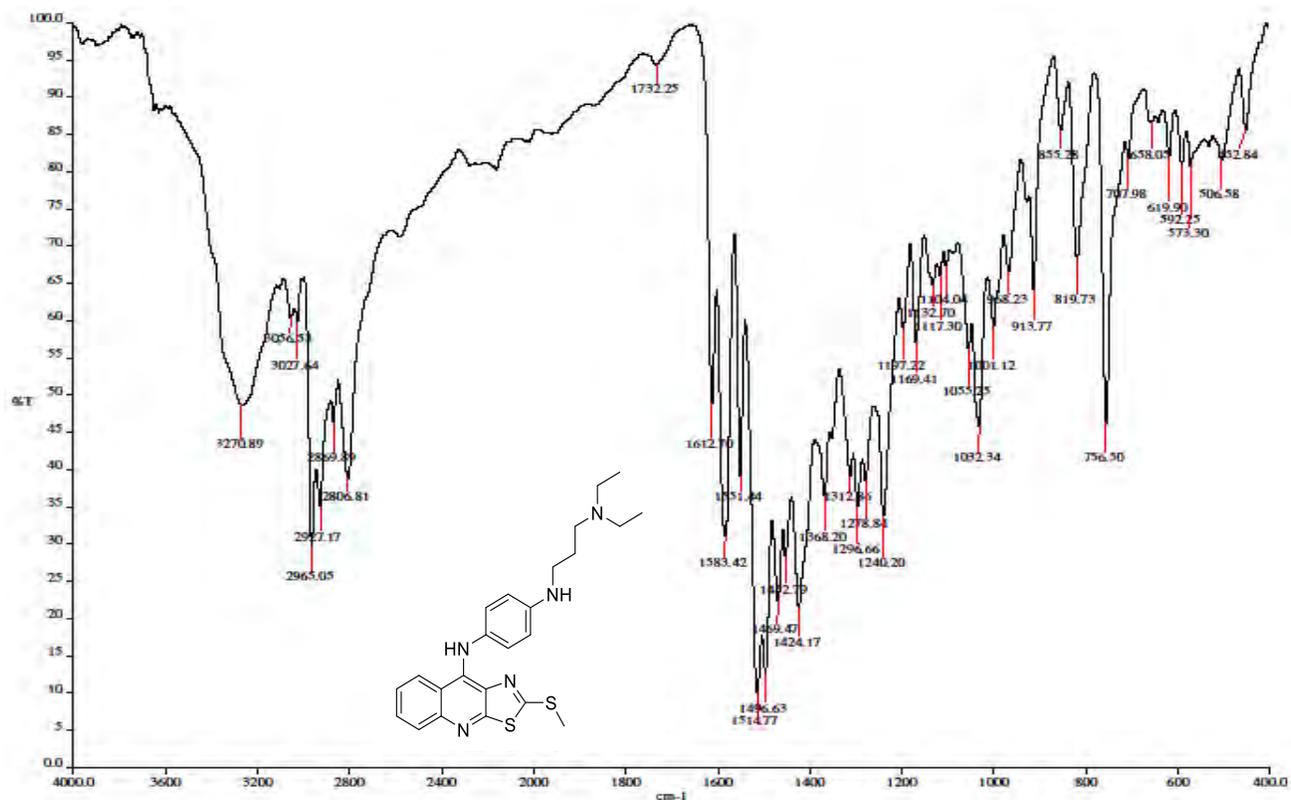
Espectro 7. IR (RTA) del compuesto **IVc**.



Espectro 8. Espectro RMN ¹H del compuesto **IVc** (CDCl₃).



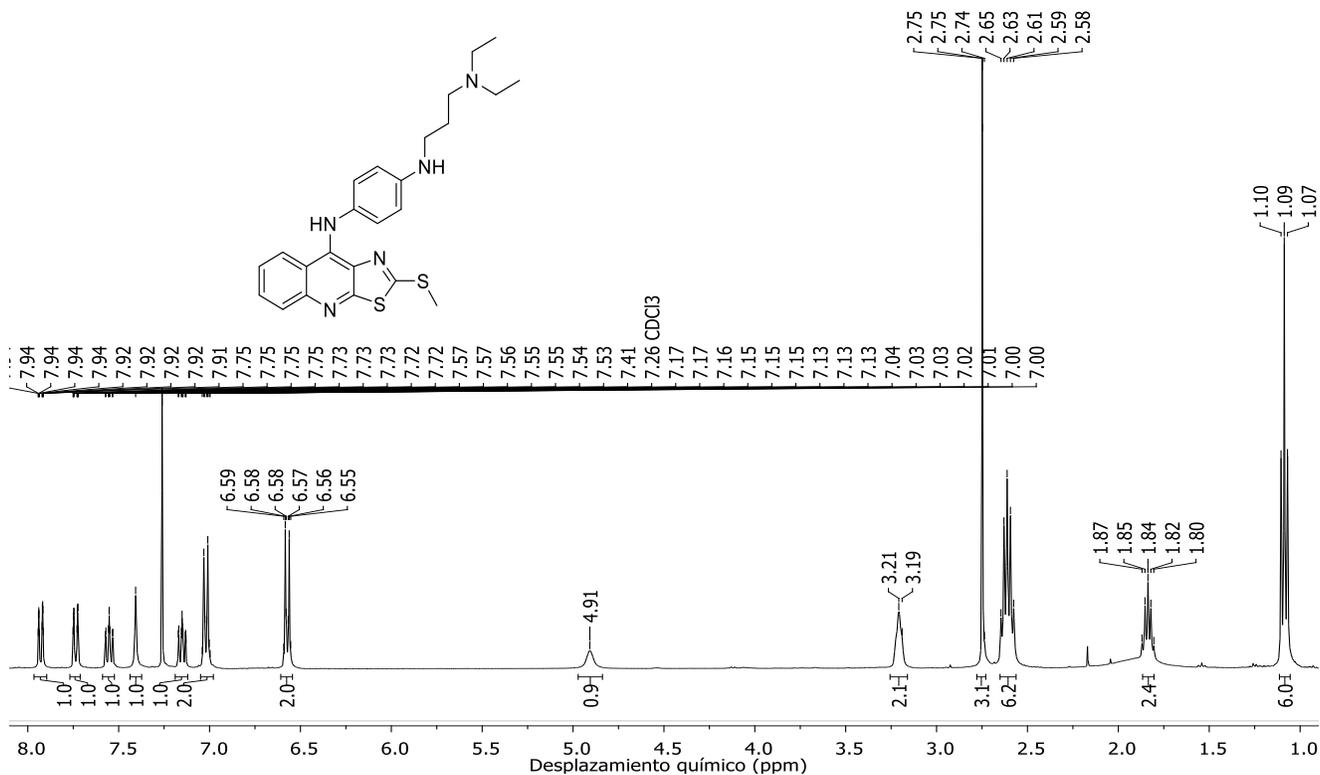
Espectro 9. Espectrometría de masas (FAB) del compuesto IVc.



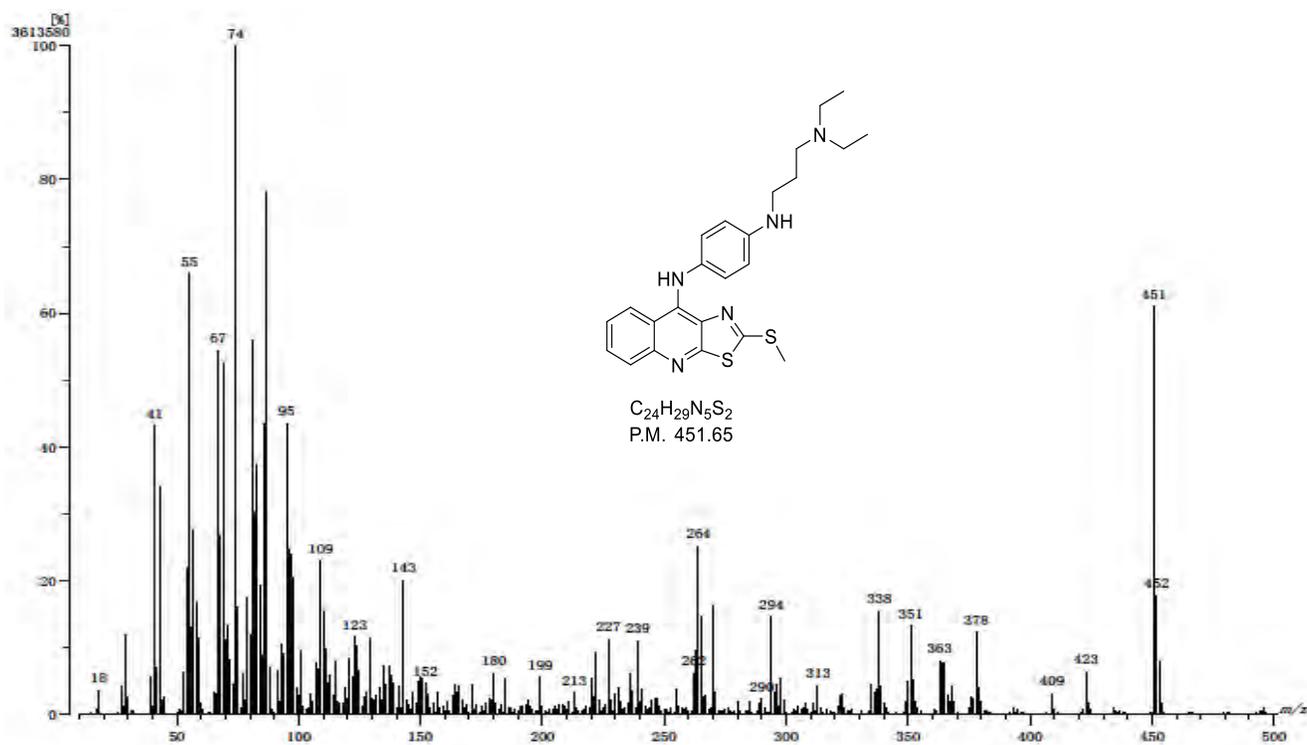
Espectro 10. IR (RTA) del compuesto IVd.



ANEXO I



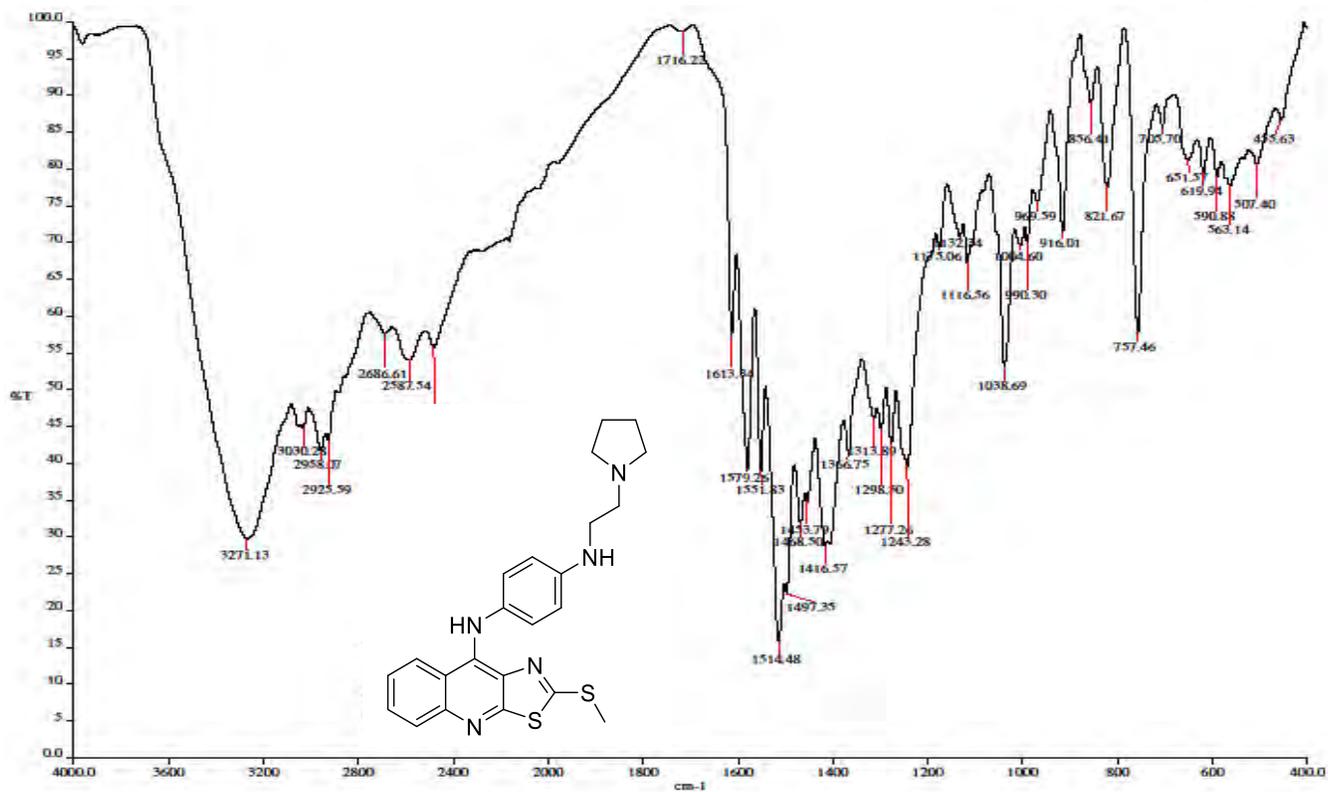
Espectro 11. Espectro RMN ¹H del compuesto IVd (CDCl₃).



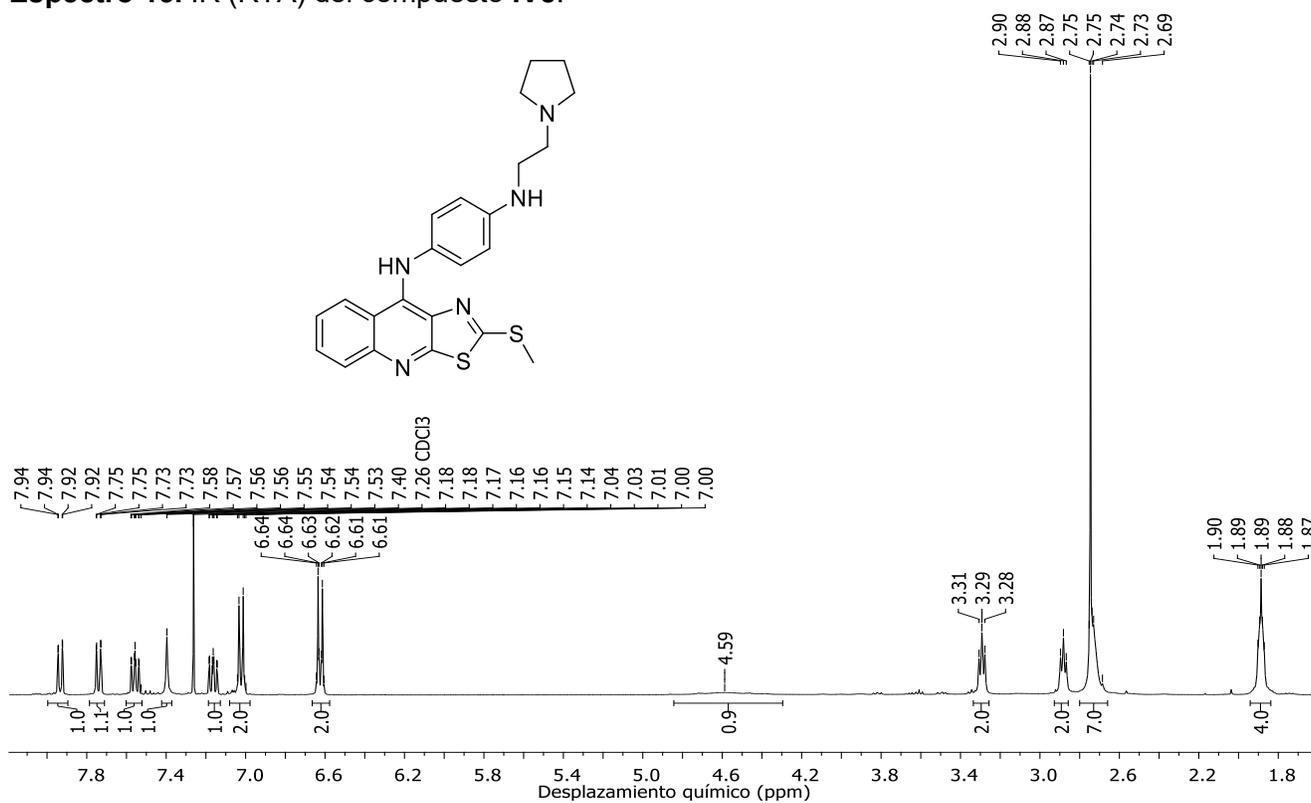
Espectro 12. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVd.



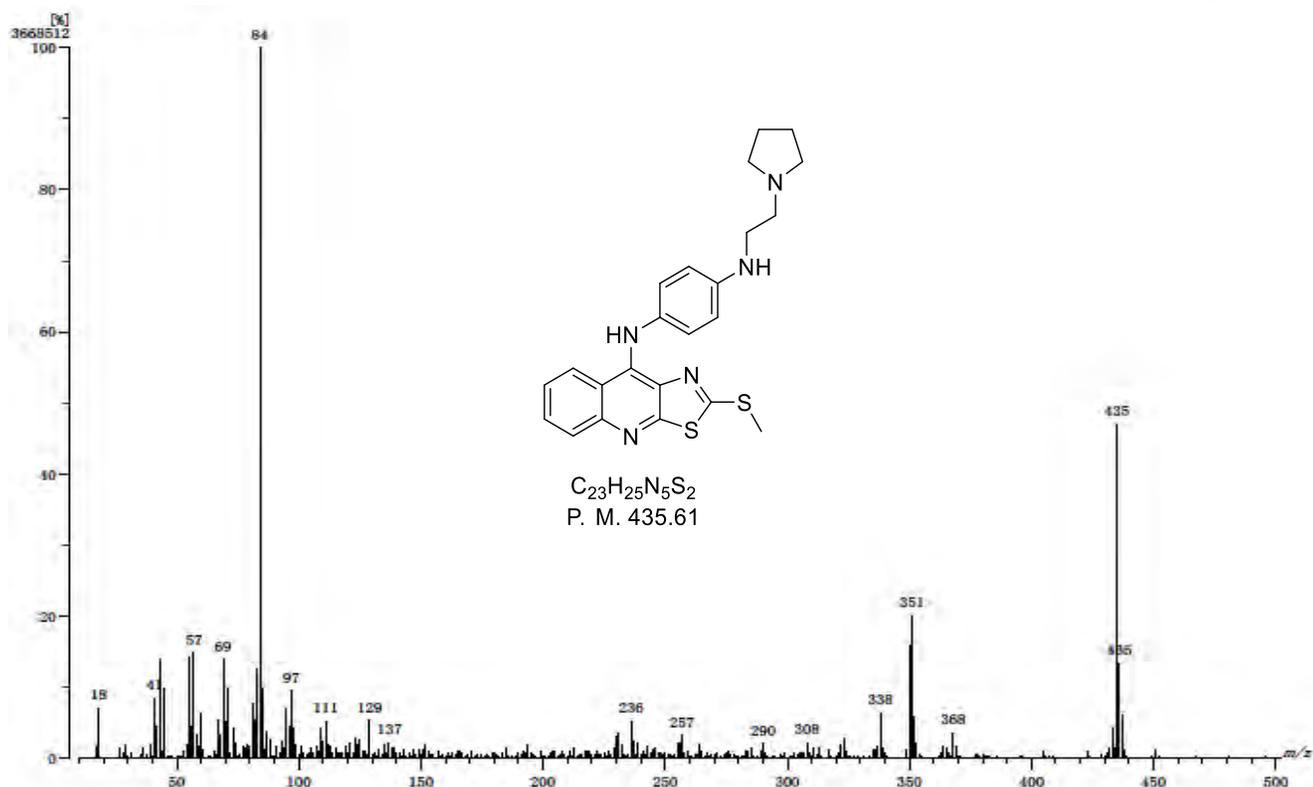
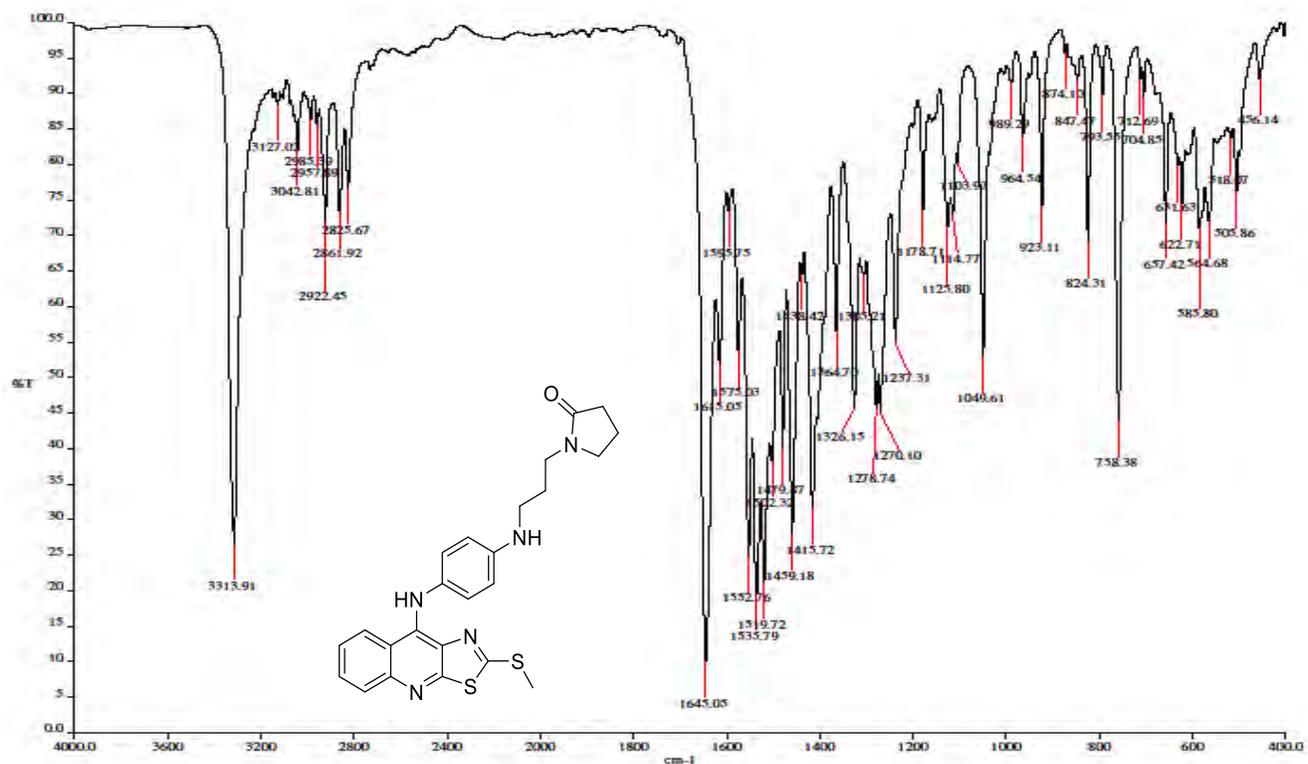
ANEXO I



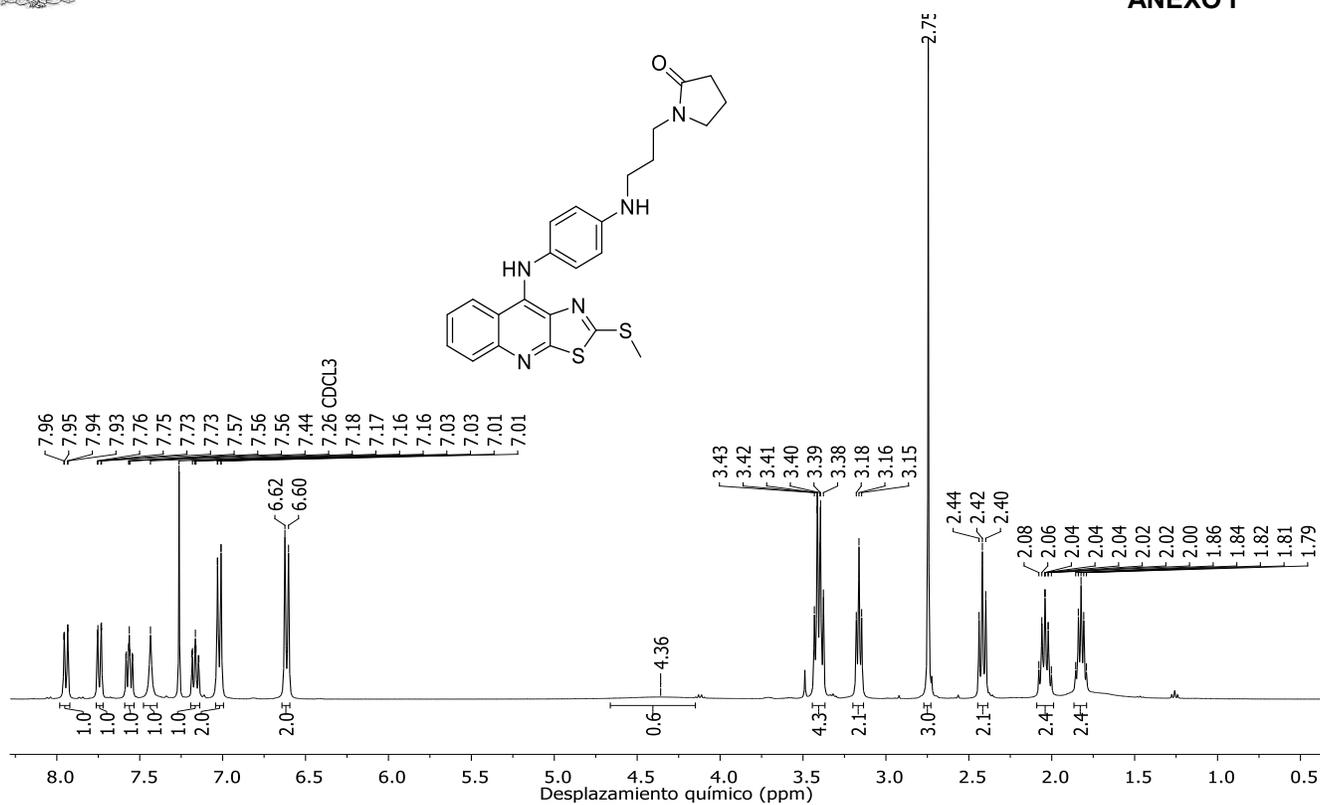
Espectro 13. IR (RTA) del compuesto **IVe**.



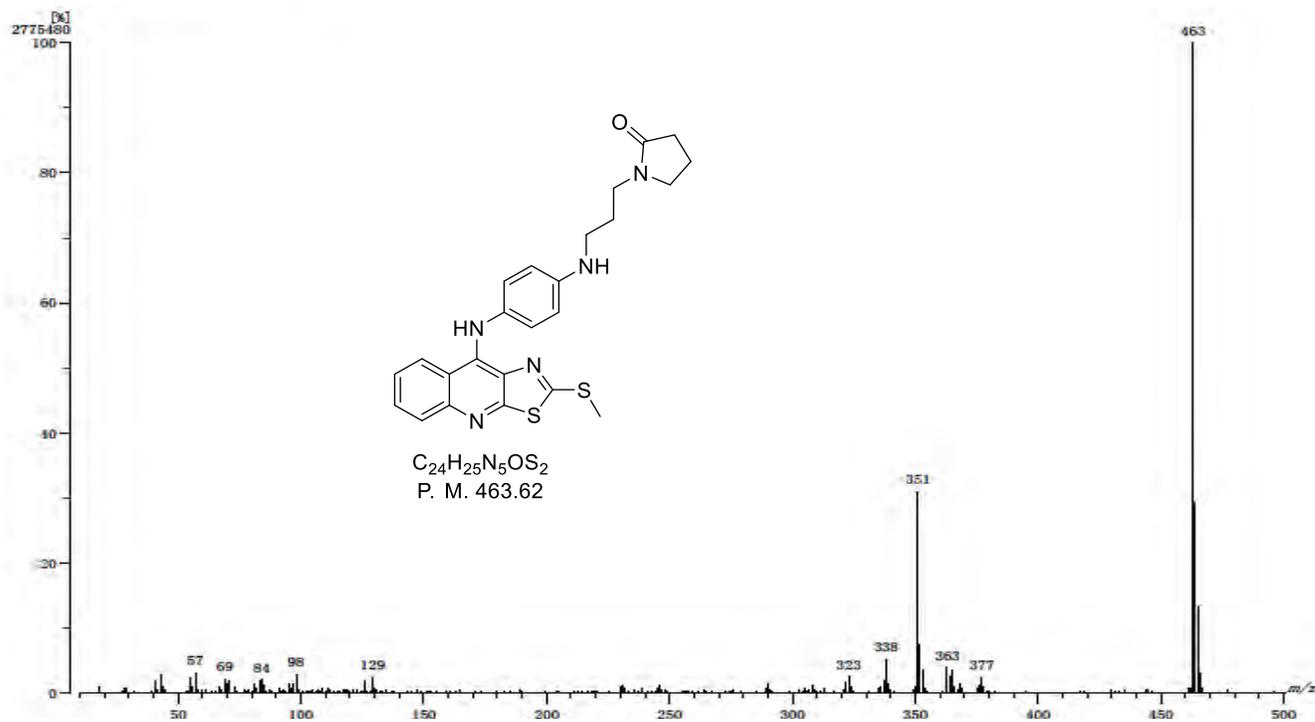
Espectro 14. Espectro RMN ^1H del compuesto **IVe** (CDCl_3).

Espectro 15. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVe ($CDCl_3$).

Espectro 16. IR (RTA) del compuesto IVf.



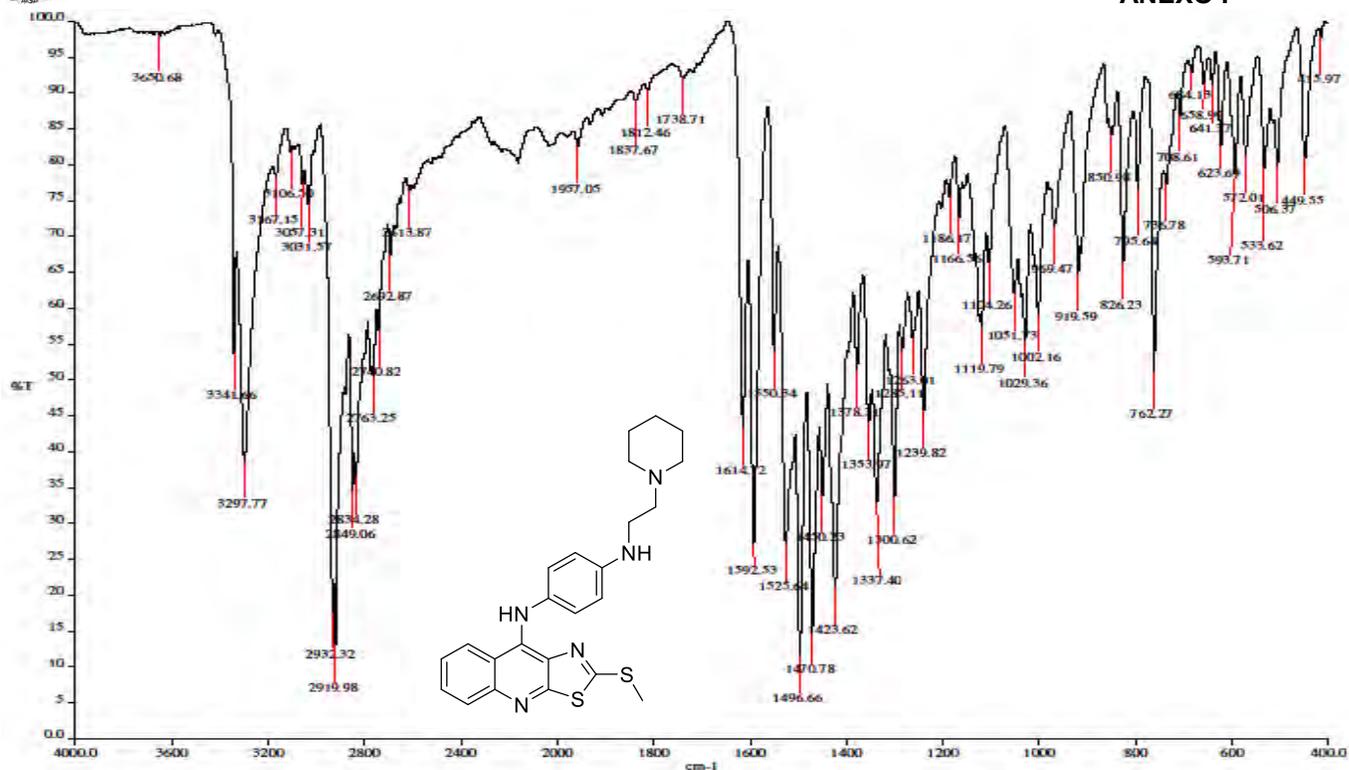
Espectro 17. Espectro RMN ¹H del compuesto IVf (CDCl₃).



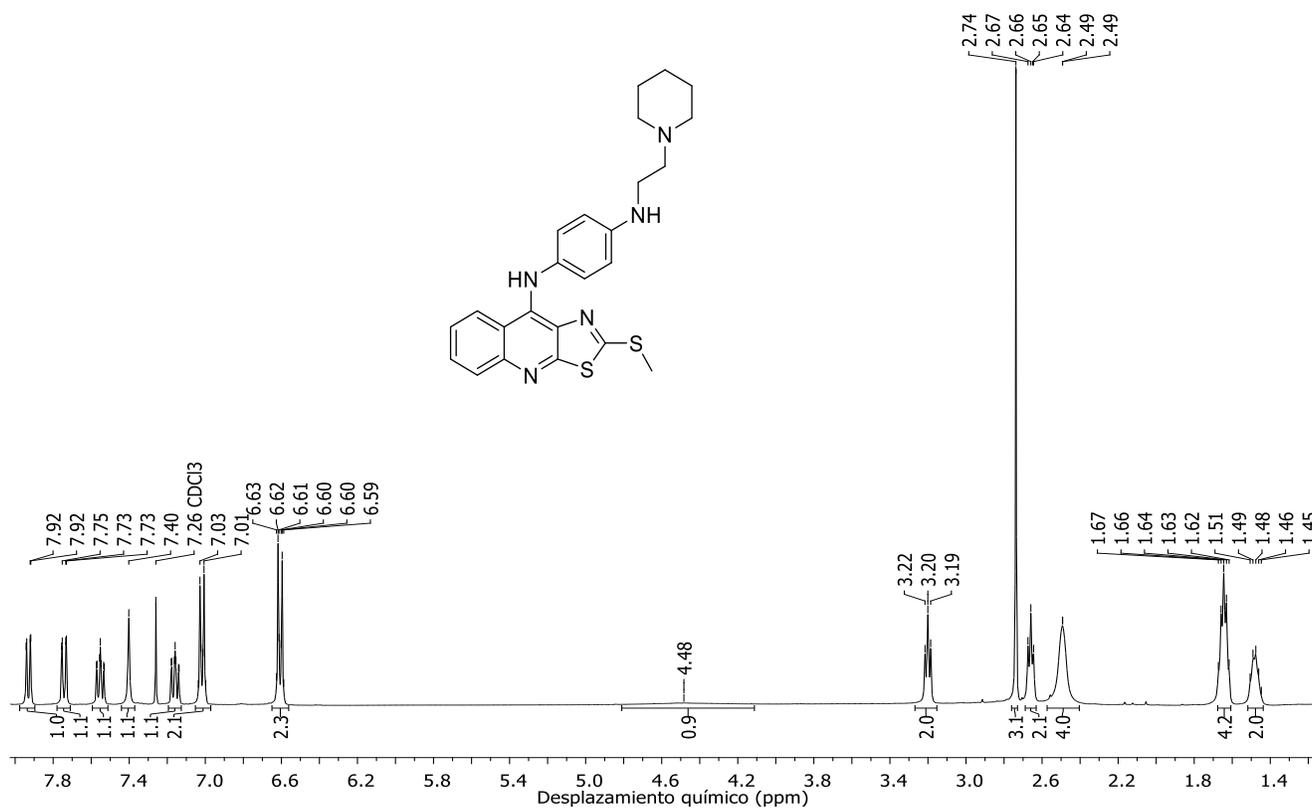
Espectro 18. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVf.



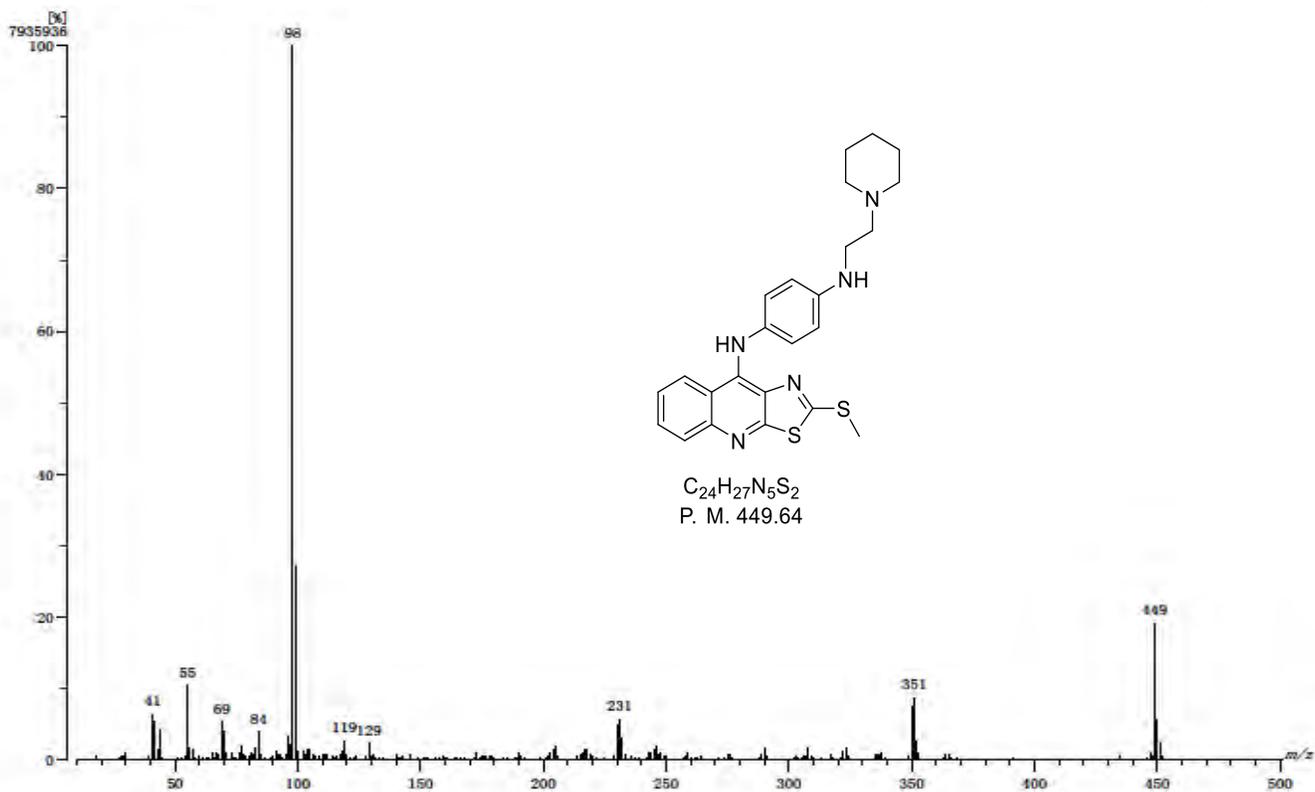
ANEXO I



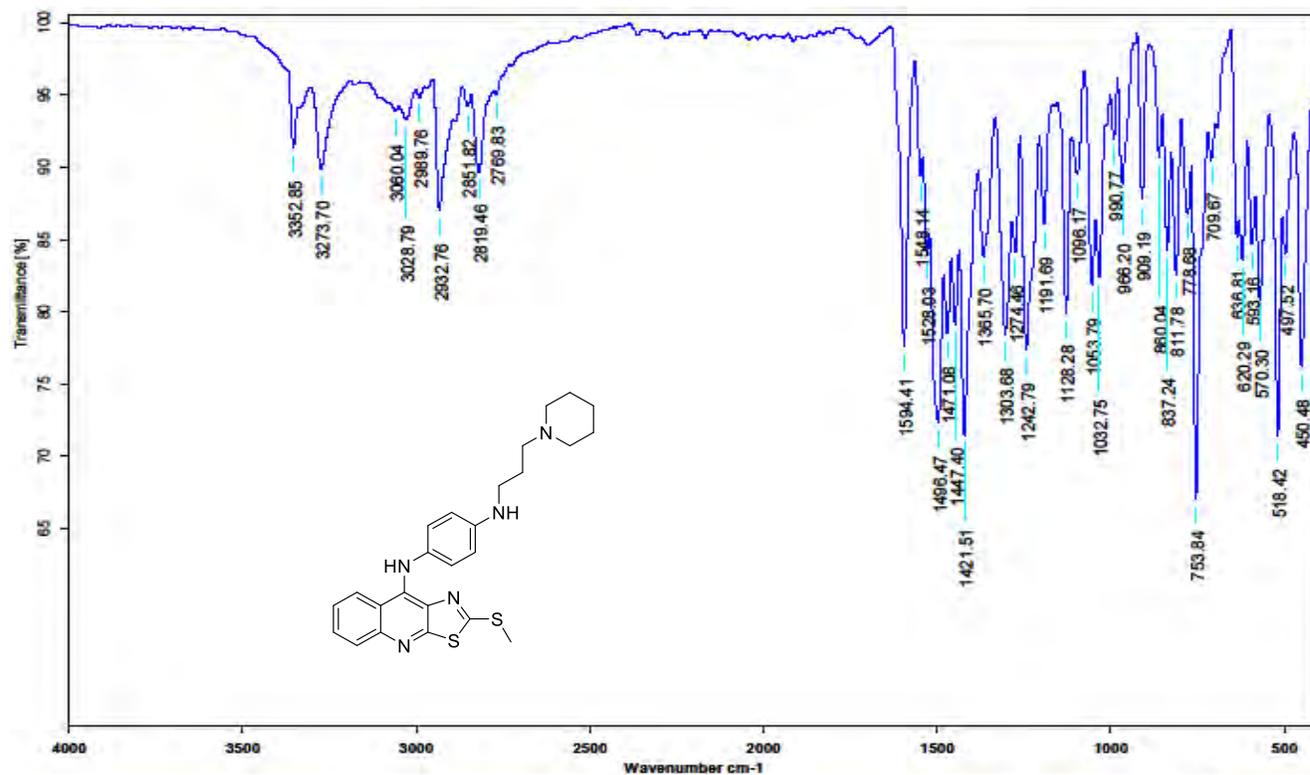
Espectro 19. IR (RTA) del compuesto IVg.



Espectro 20. Espectro RMN ^1H del compuesto IVg (CDCl_3).



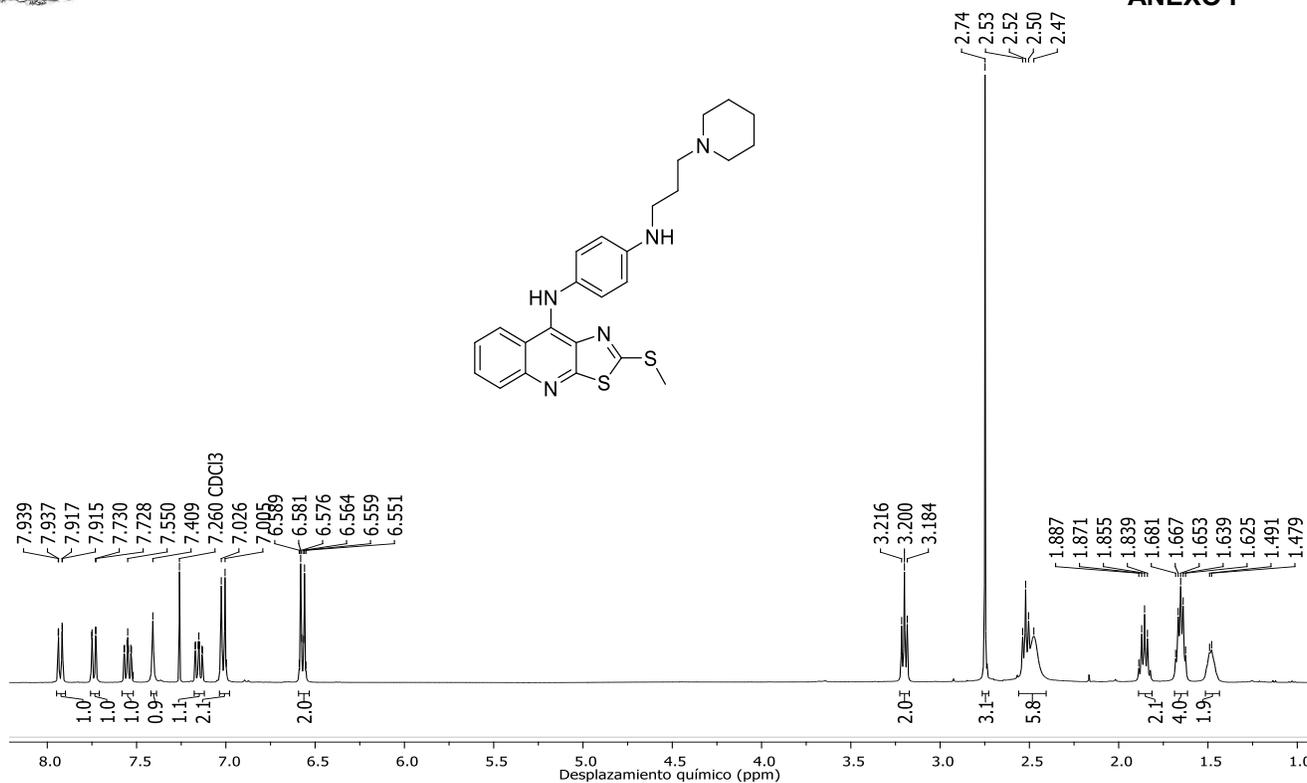
Espectro 21. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVg.



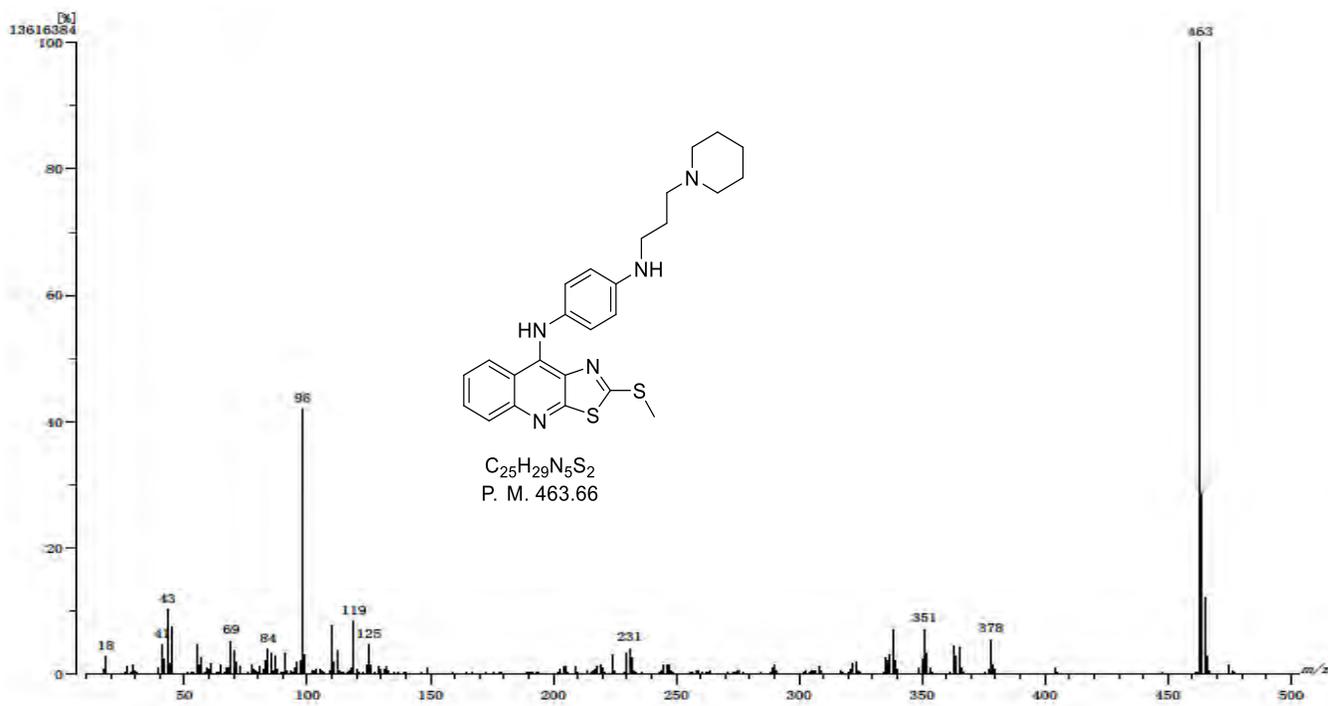
Espectro 22. IR (RTA) del compuesto IVh.



ANEXO I



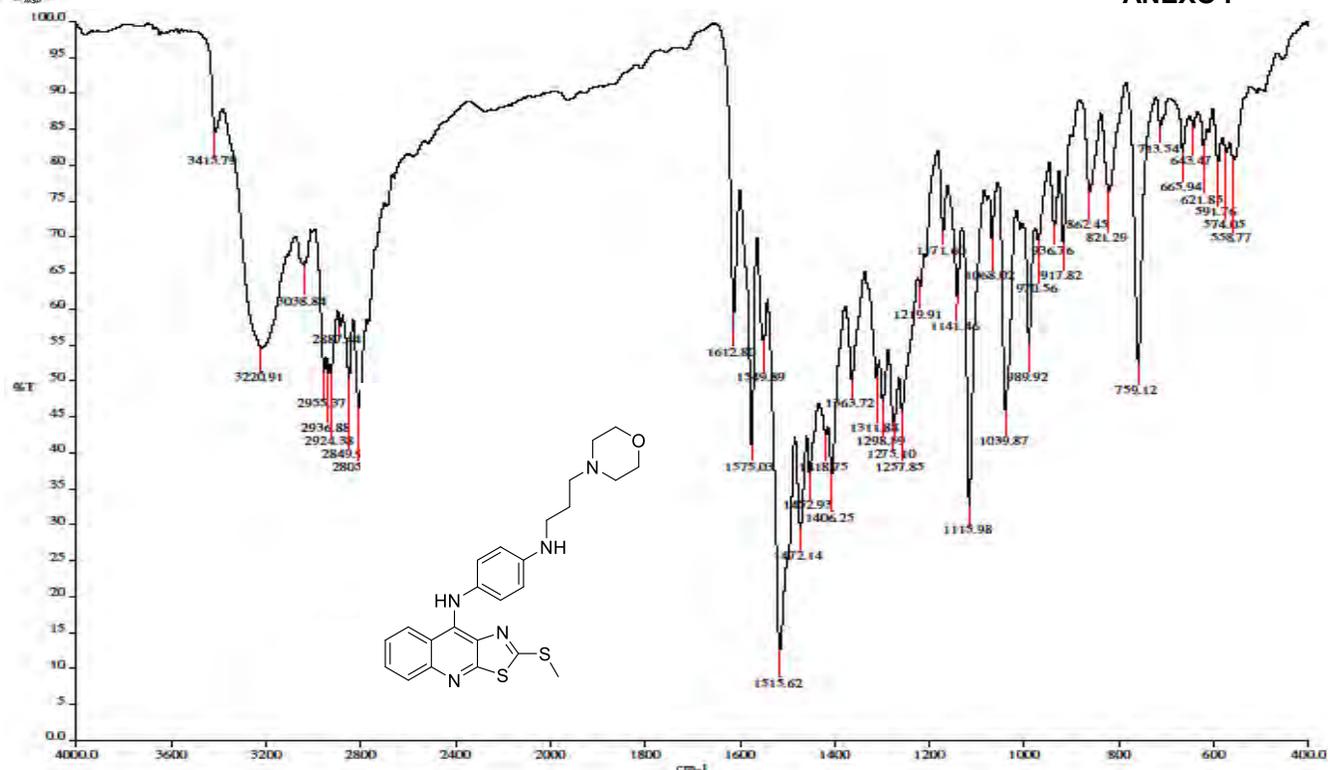
Espectro 23. Espectro RMN ¹H del compuesto IVh (CDCl₃).



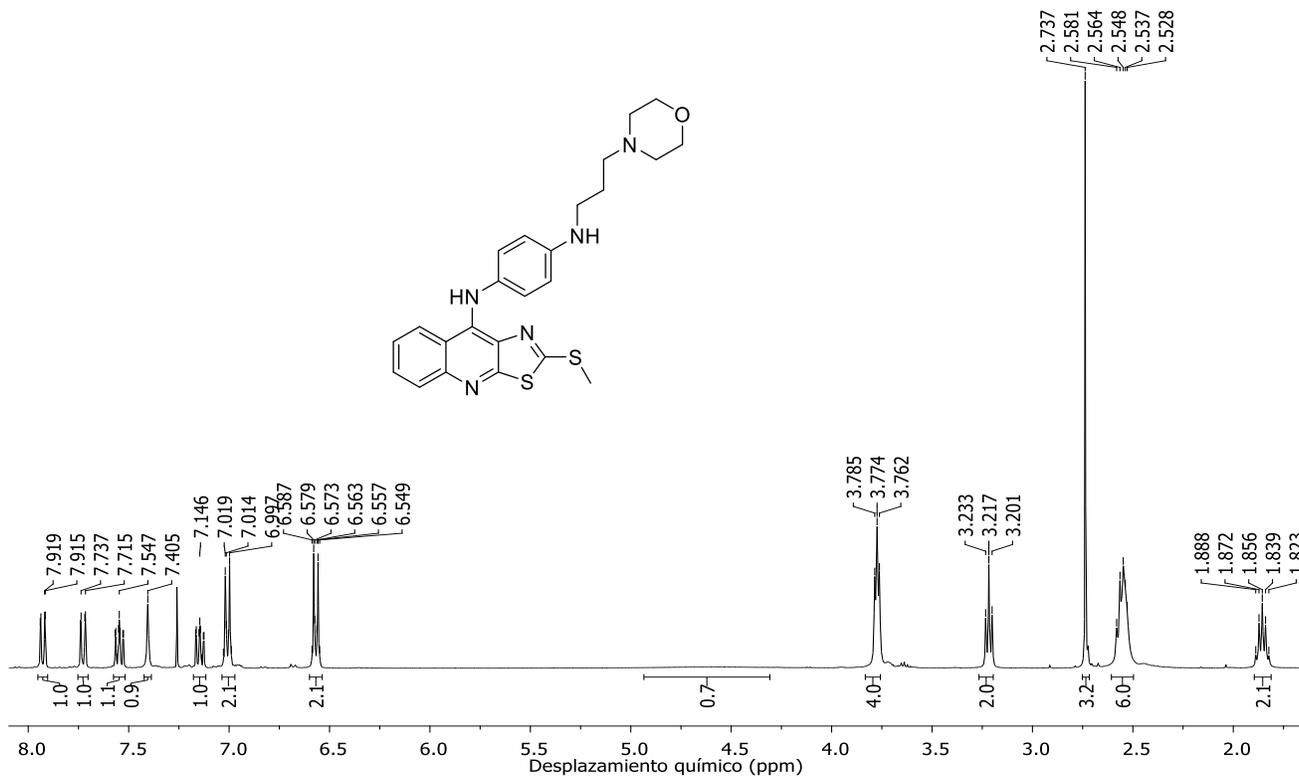
Espectro 24. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVh.



ANEXO I



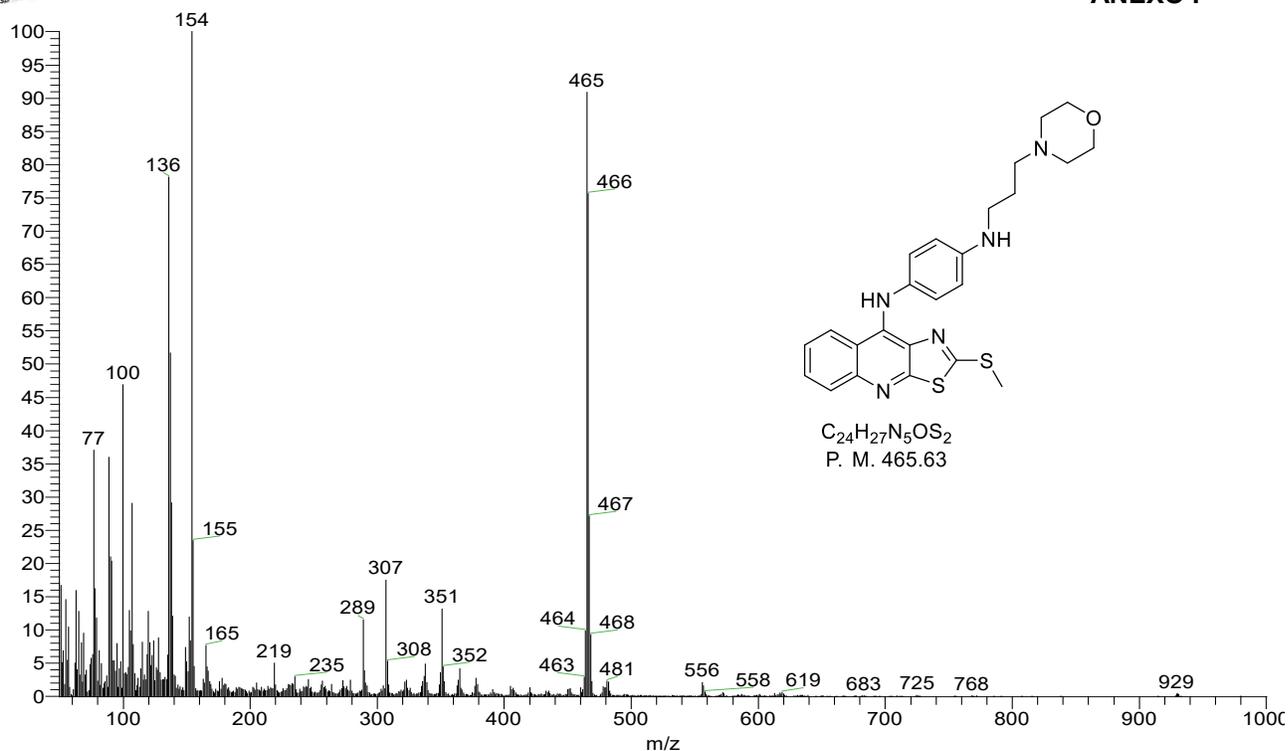
Espectro 25. IR (RTA) del compuesto IVi.



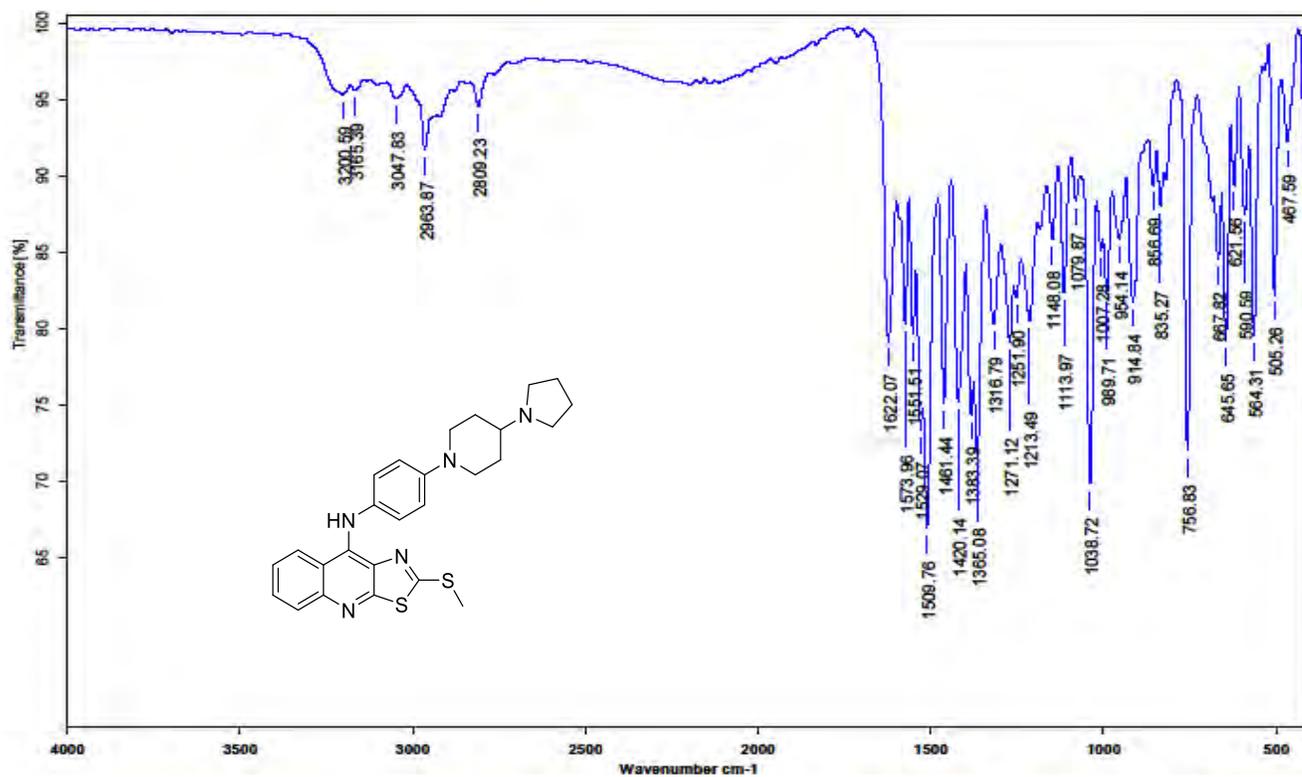
Espectro 26. Espectro RMN ¹H del compuesto IVi (CDCl₃).



ANEXO I



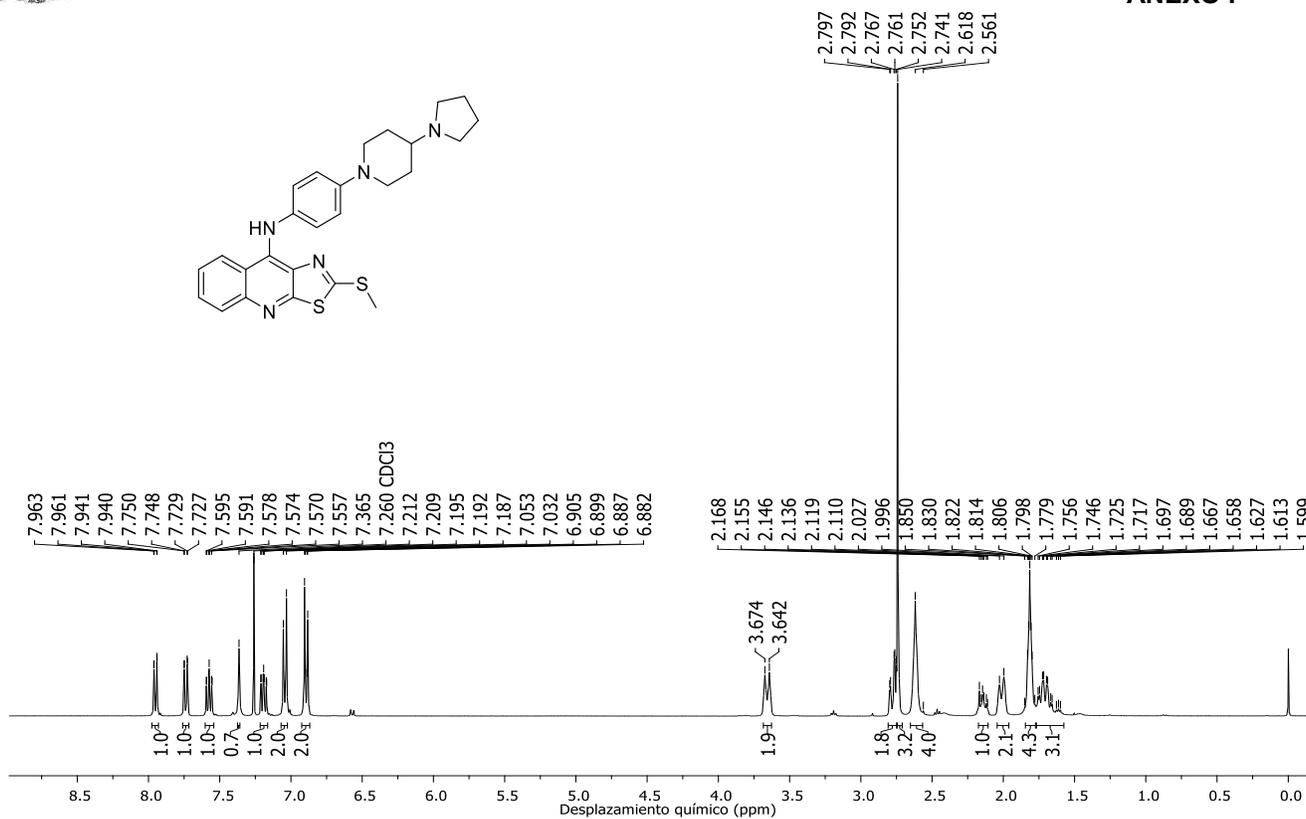
Espectro 27. Espectrometría de masas (FAB) del compuesto IVi ($CDCl_3$).



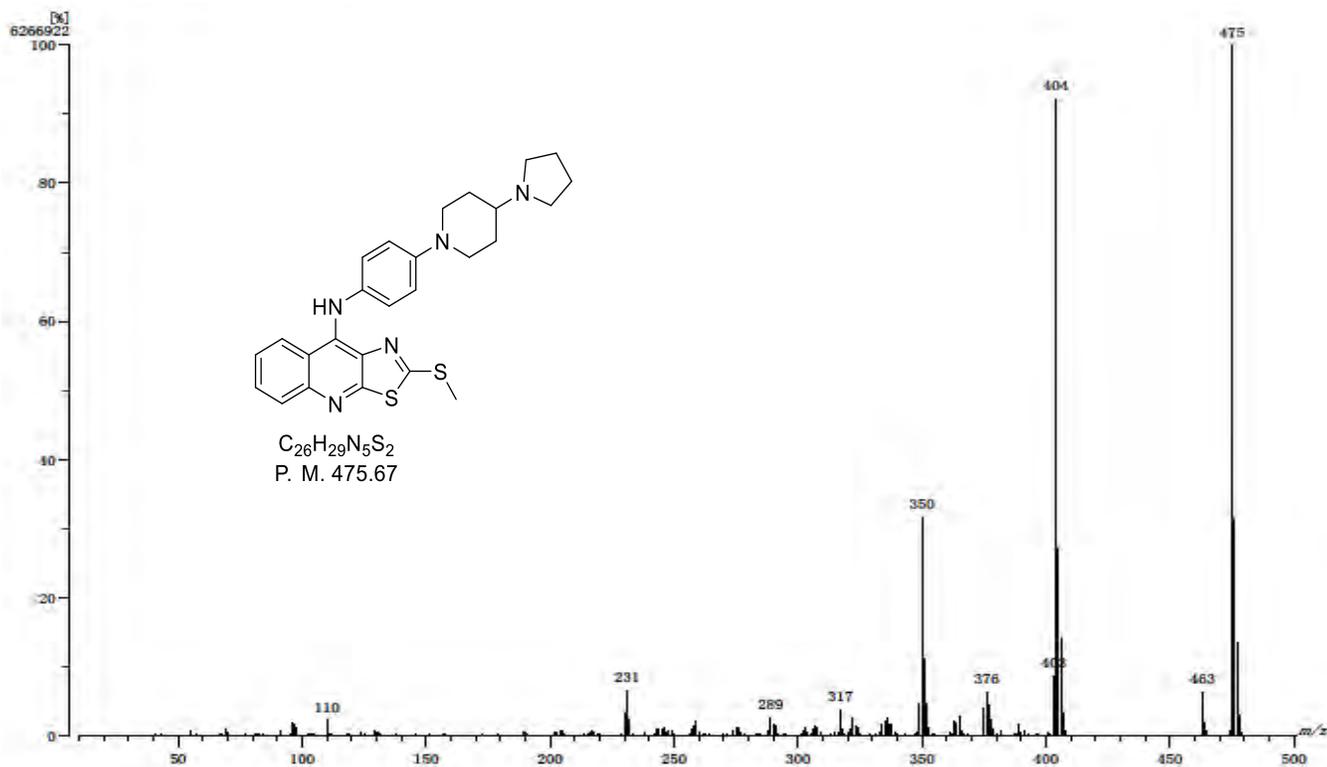
Espectro 28. IR (RTA) del compuesto IVj.



ANEXO I



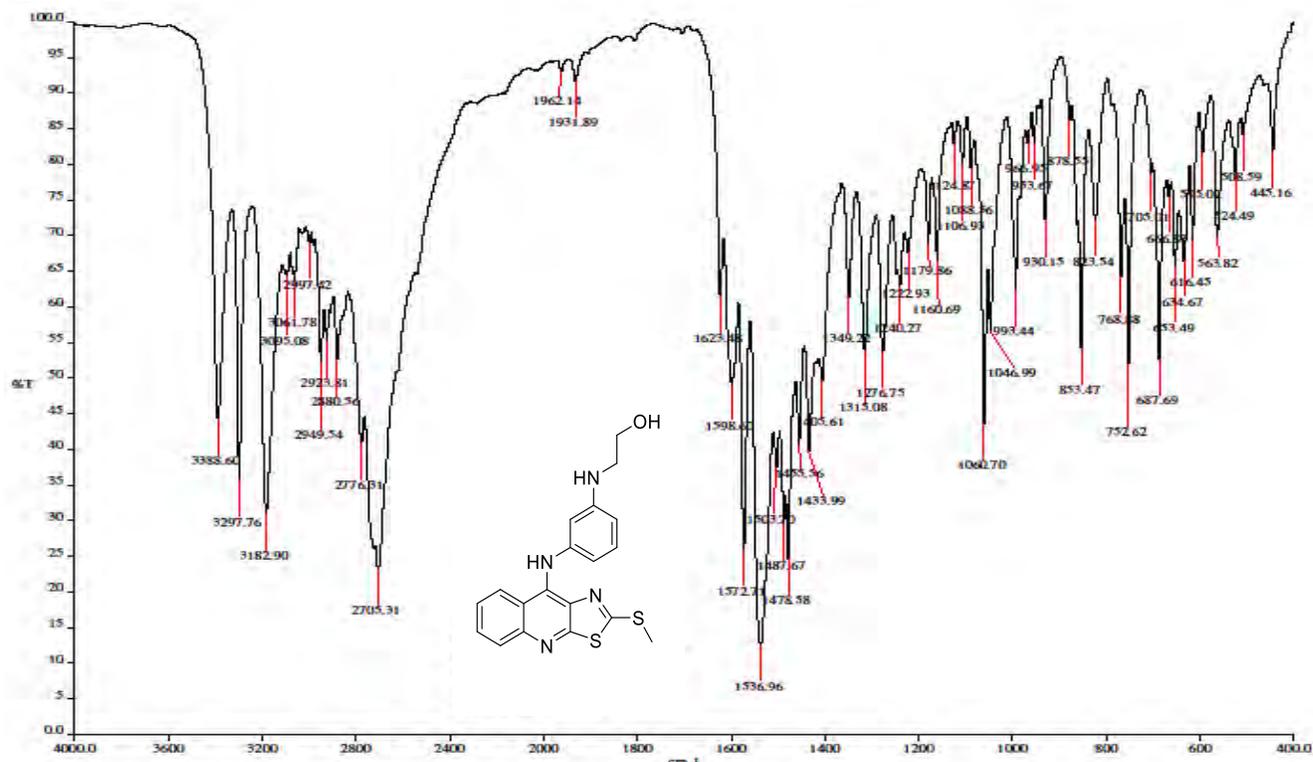
Espectro 29. Espectro RMN ¹H del compuesto IVj (CDCl₃).



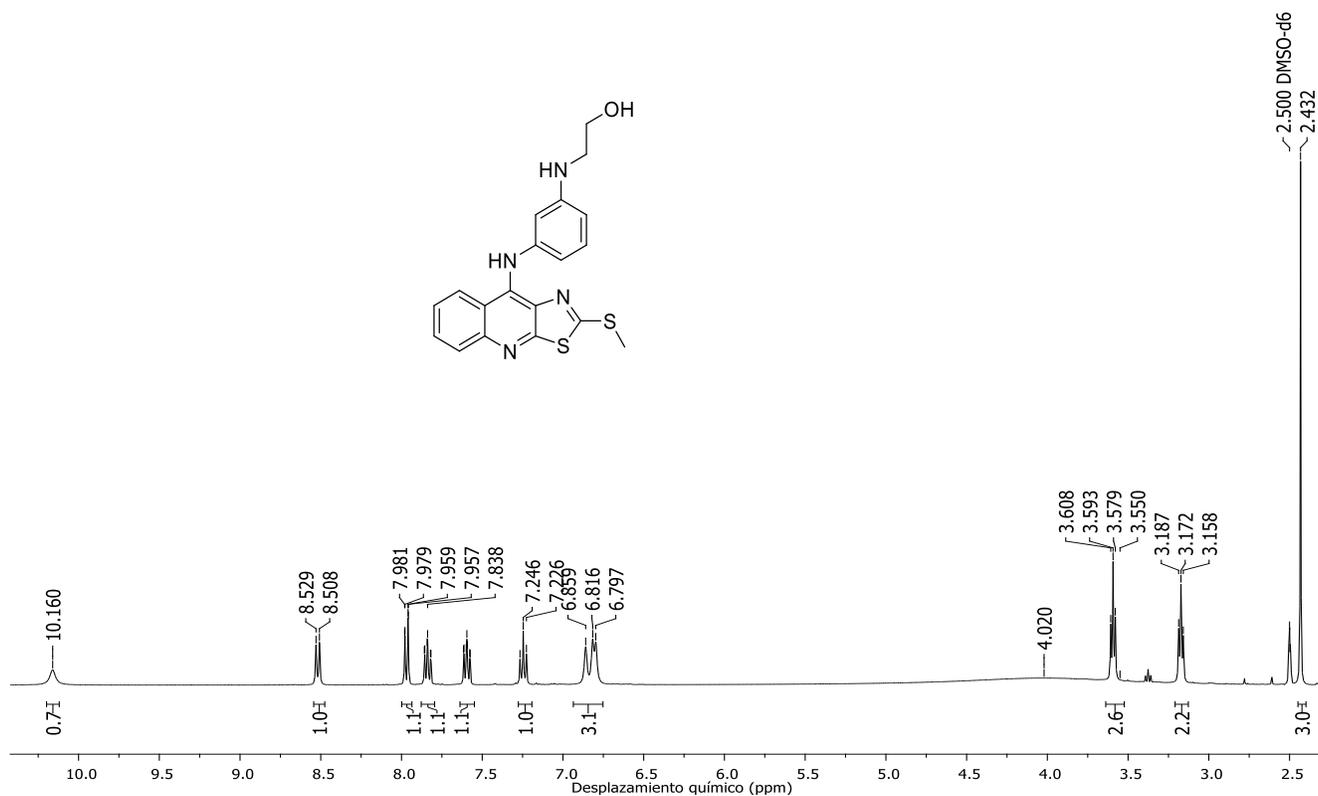
Espectro 30. Espectrometría de masas del compuesto IVj (CDCl₃).



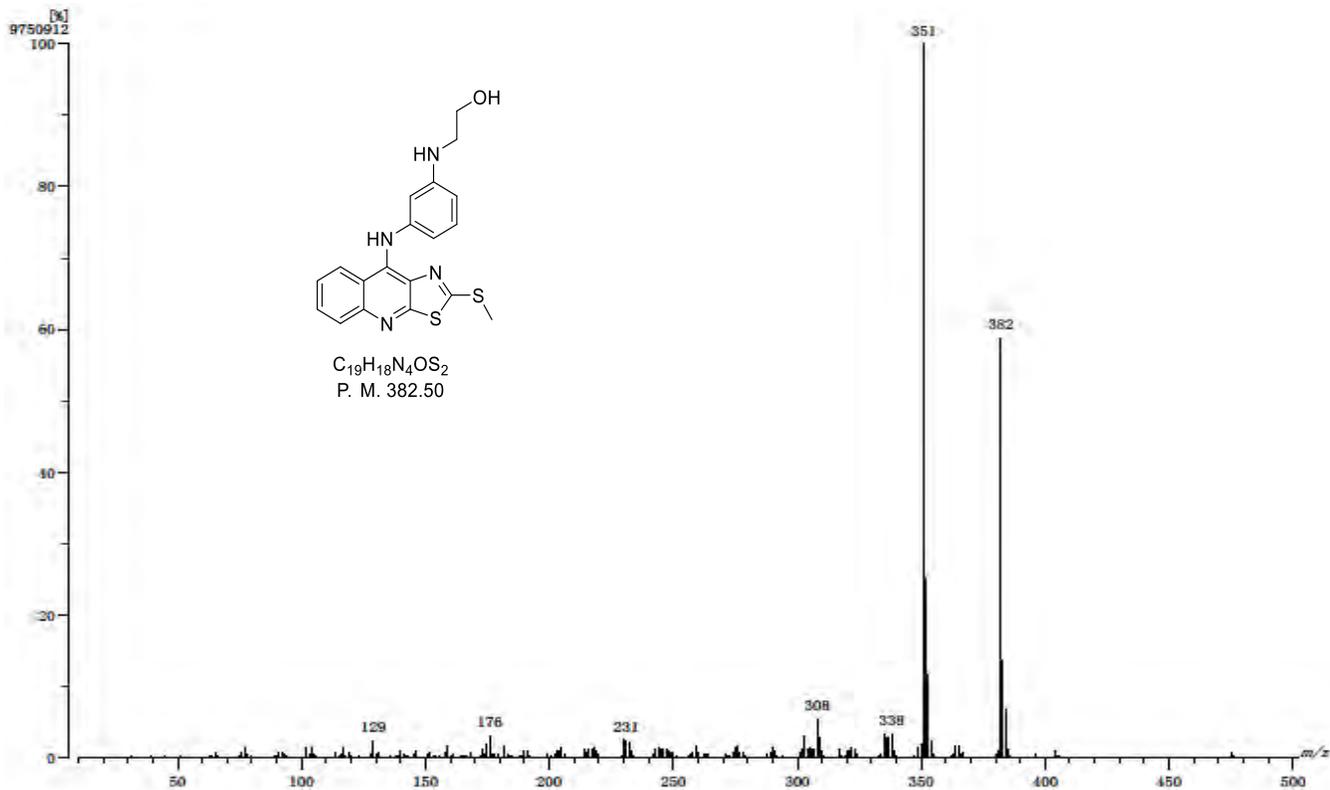
ANEXO I



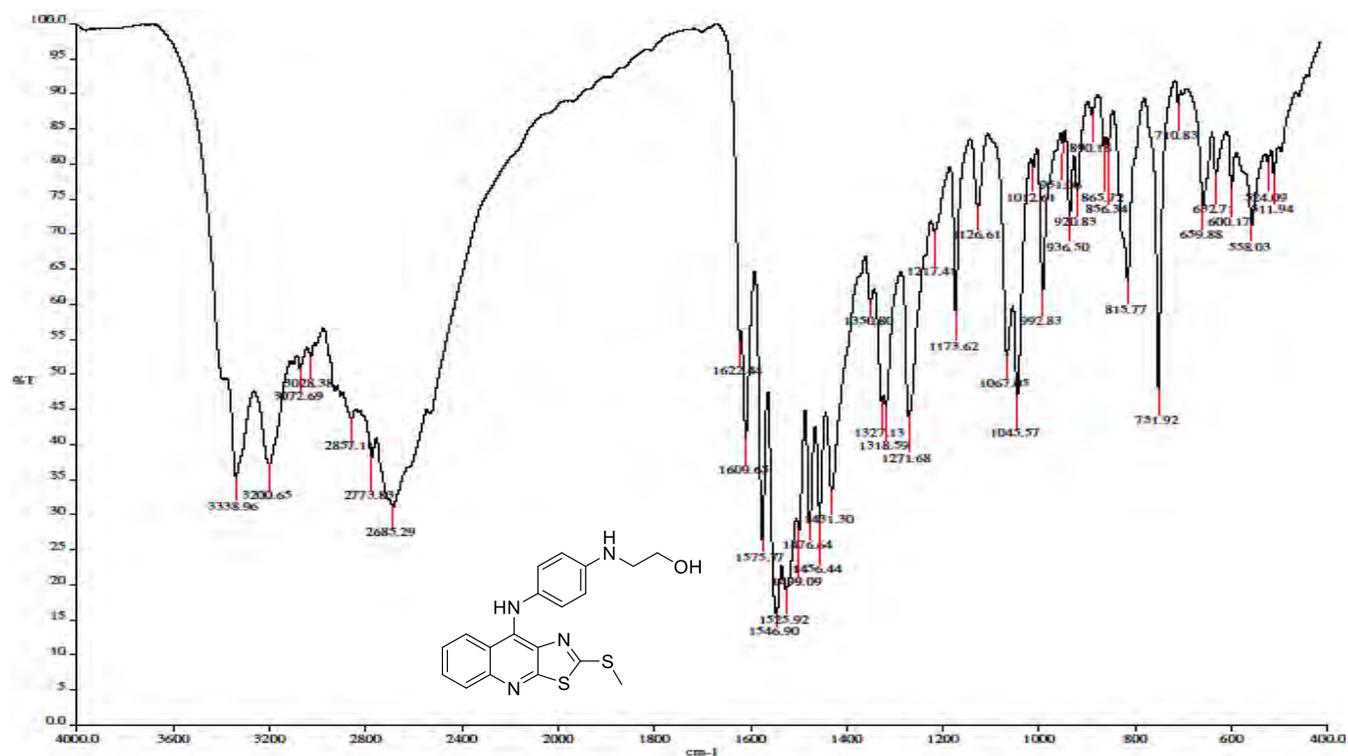
Espectro 31. IR (RTA) del compuesto **IVk**.



Espectro 32. Espectro RMN ^1H del compuesto **IVk** (DMSO- D_6).



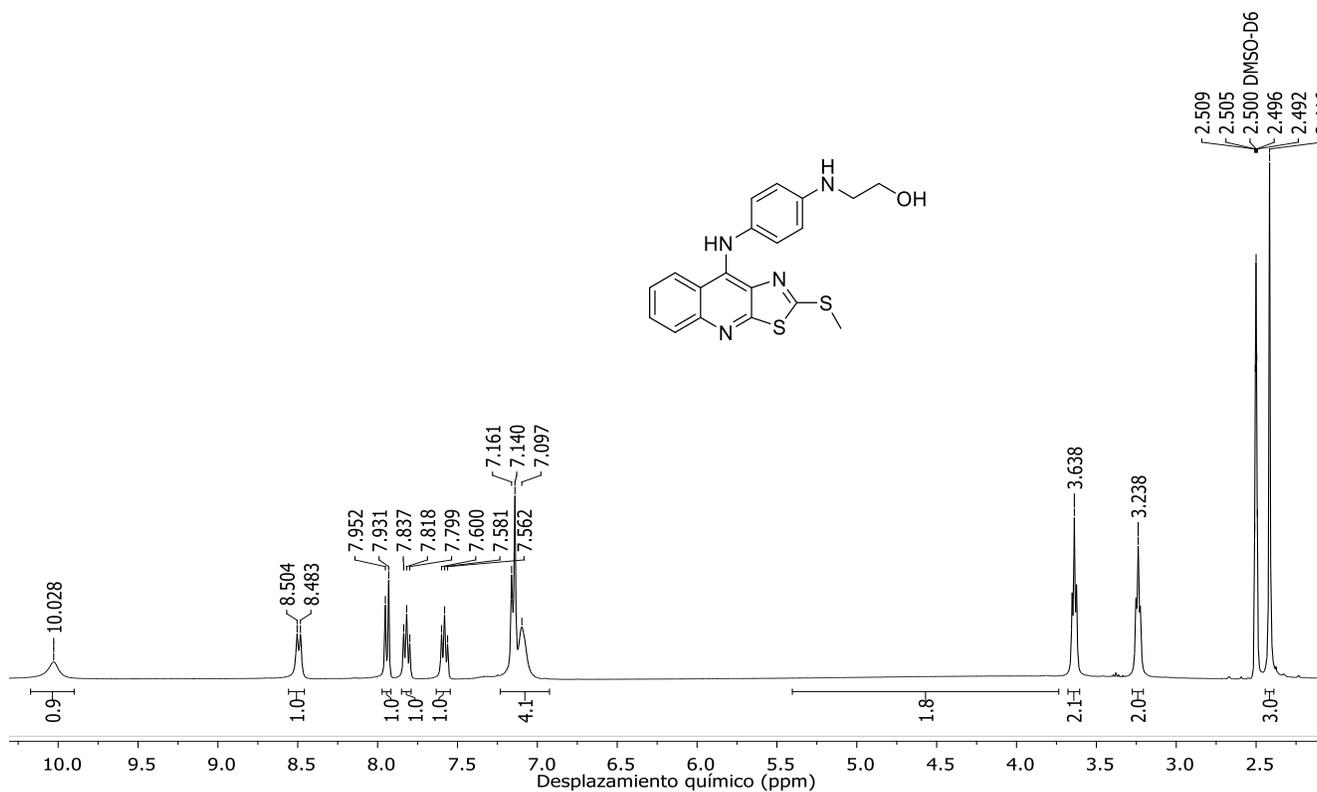
Espectro 33. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVk.



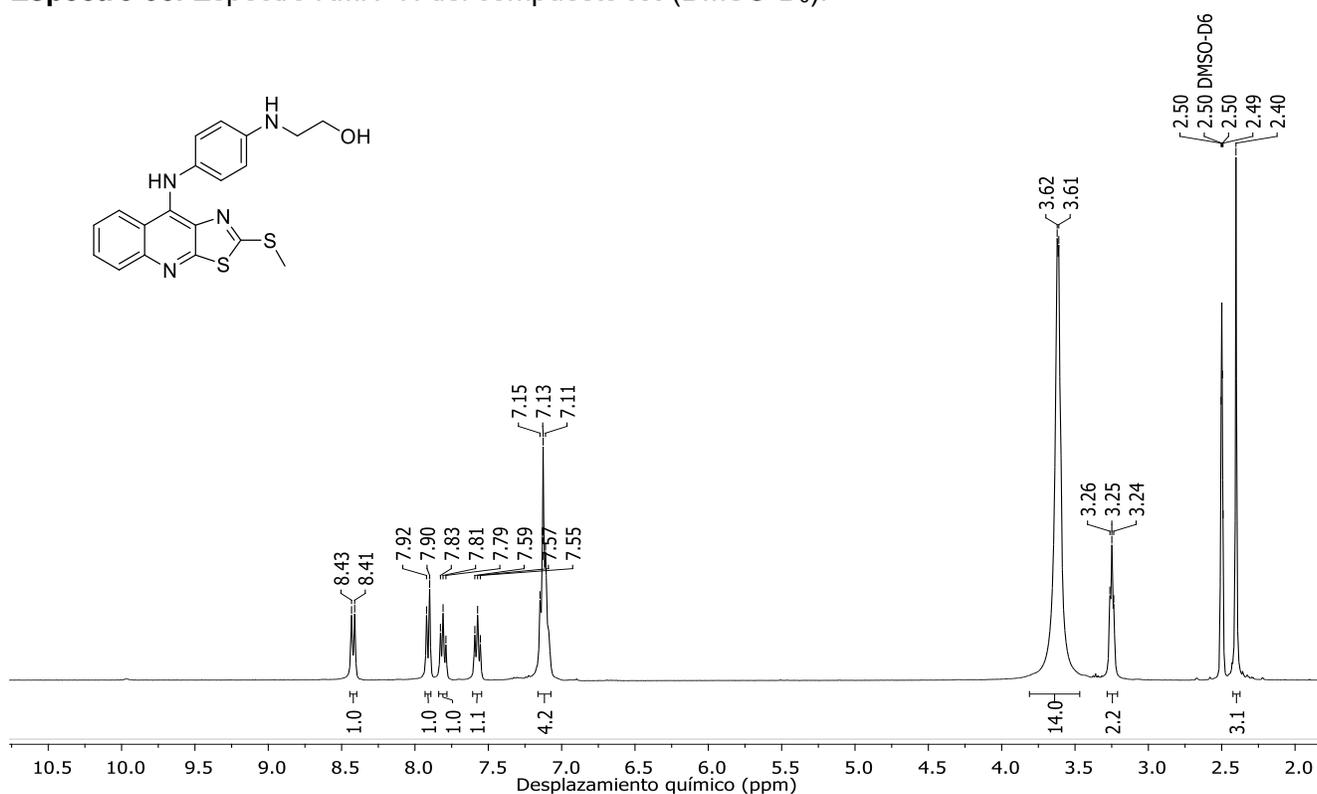
Espectro 34. IR (RTA) del compuesto IVl.



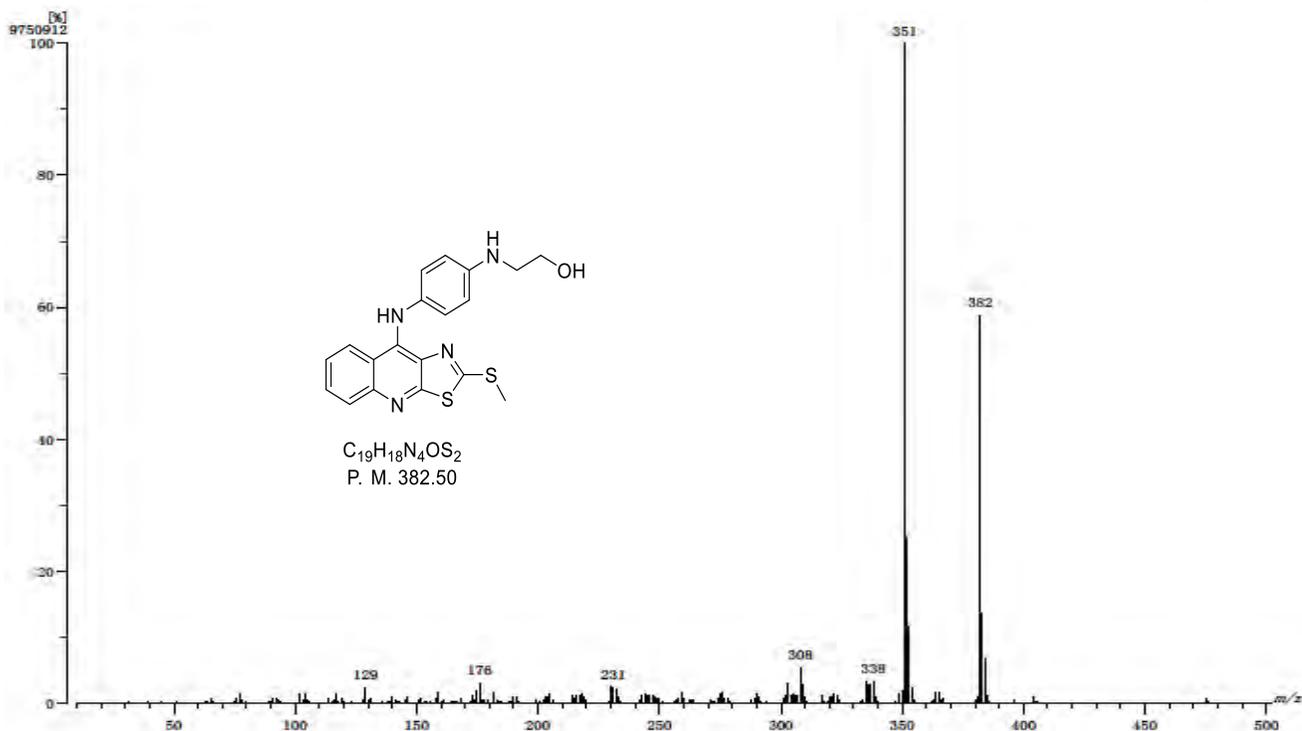
ANEXO I



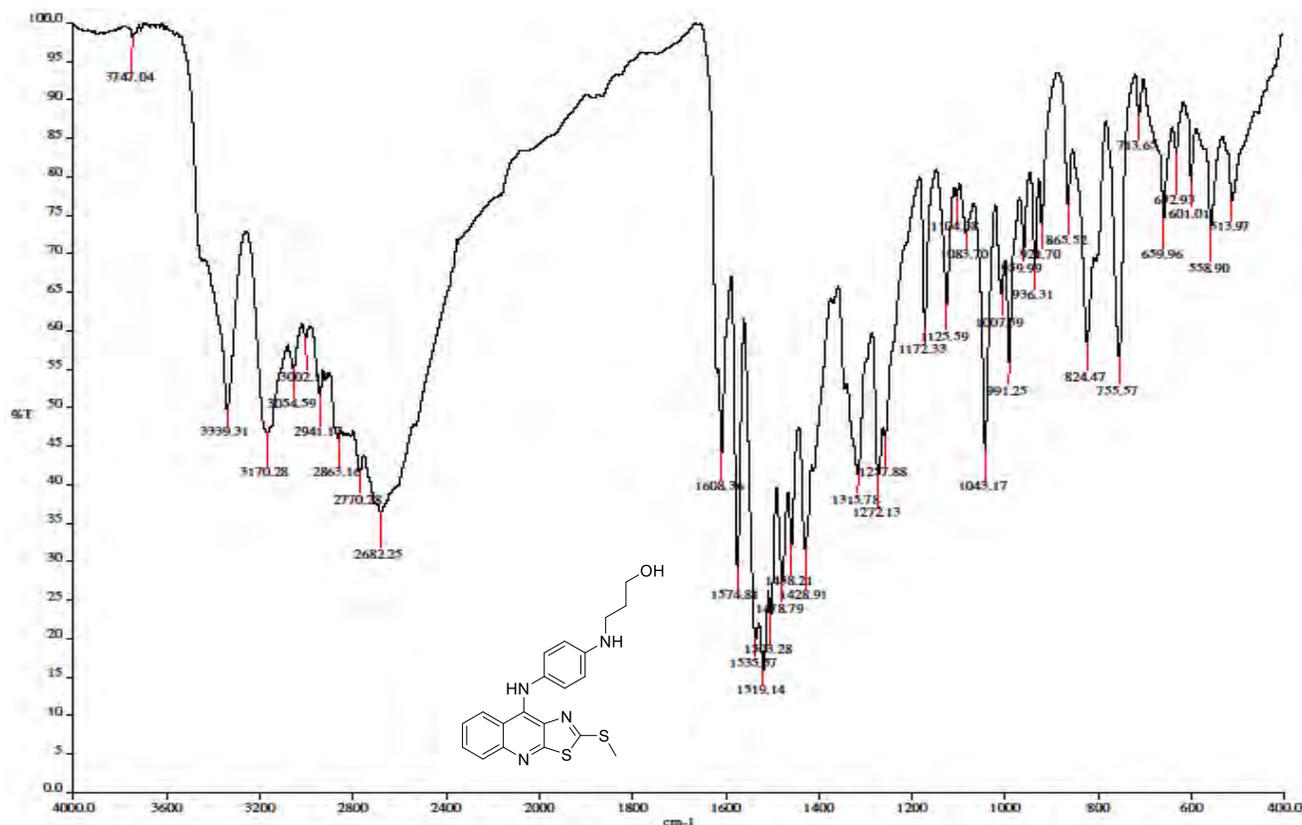
Espectro 35. Espectro RMN ^1H del compuesto IVI (DMSO-D₆).



Espectro 36. Espectro RMN ^1H del compuesto IVI (DMSO-D₆). Intercambio con D₂O



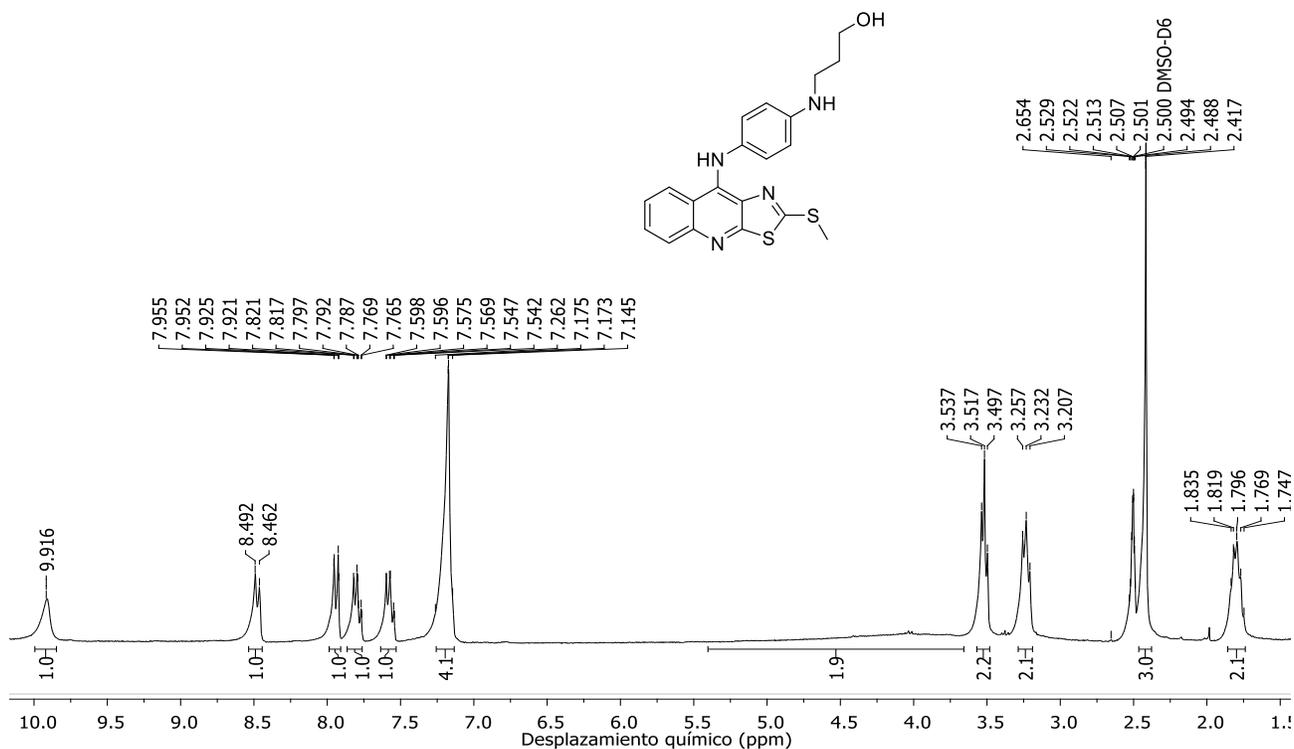
Espectro 37. Espectrometría de masas (IE) del compuesto **IV**.



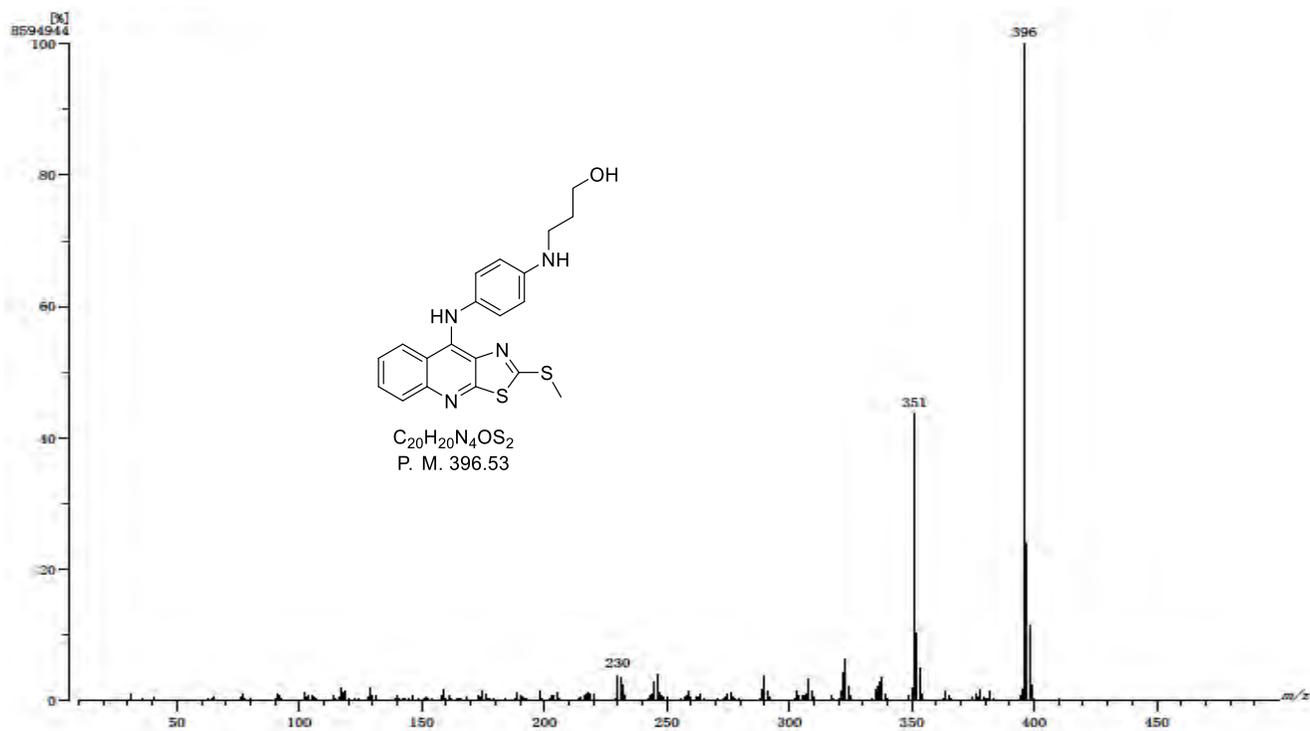
Espectro 38. IR (RTA) del compuesto **IVm**.



ANEXO I



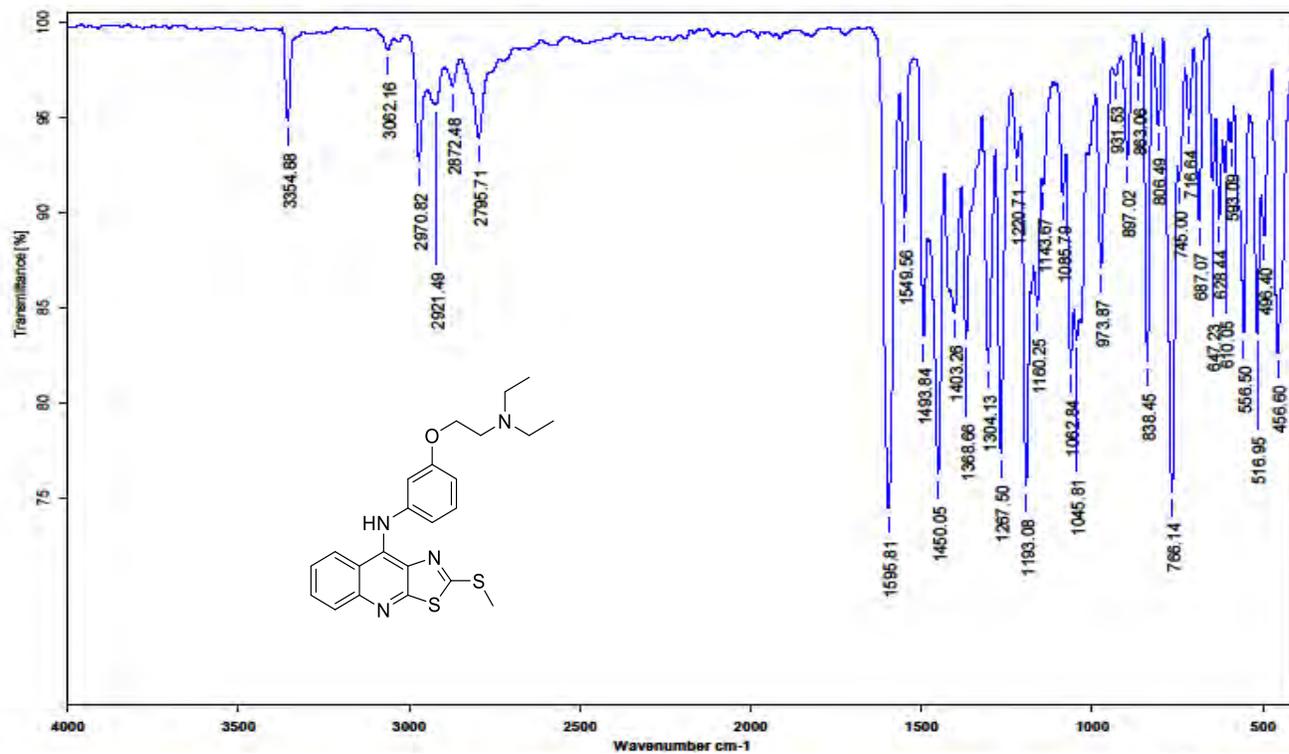
Espectro 39. Espectro RMN ^1H del compuesto IVm (DMSO- D_6 , 300 MHz).



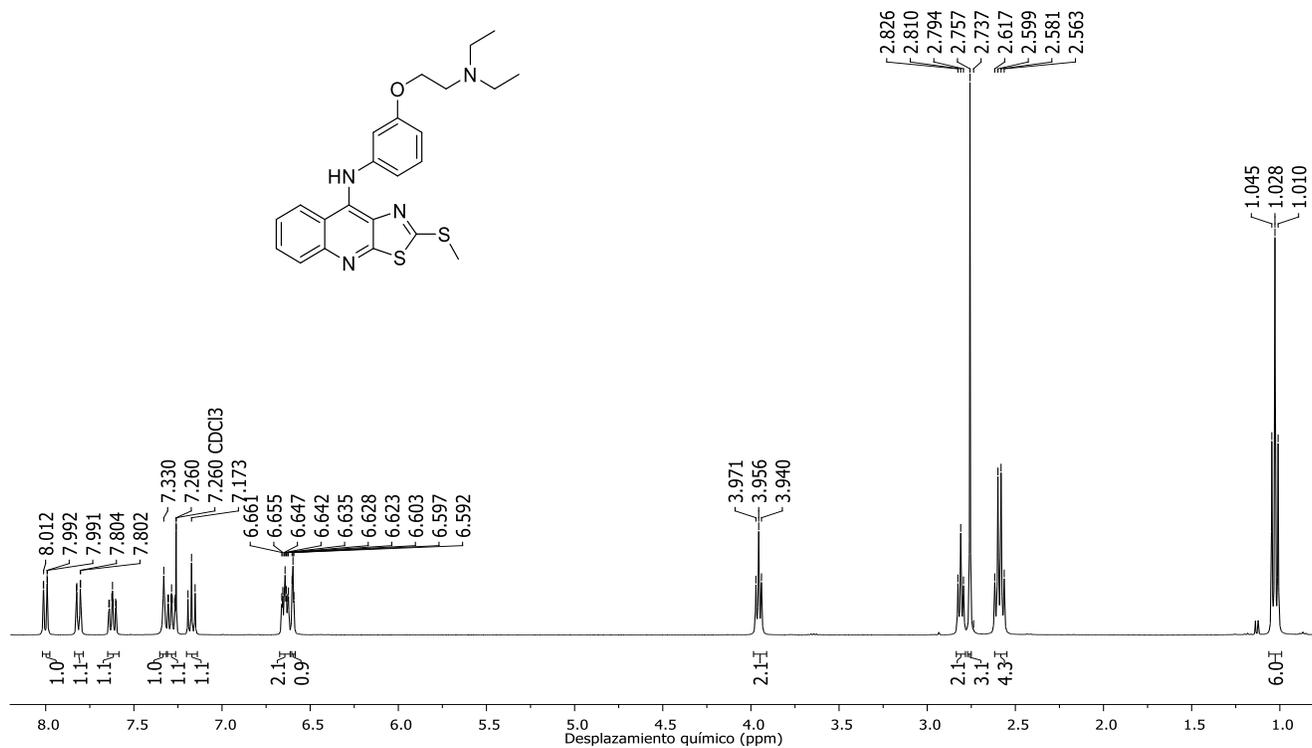
Espectro 40. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVm.



ANEXO I



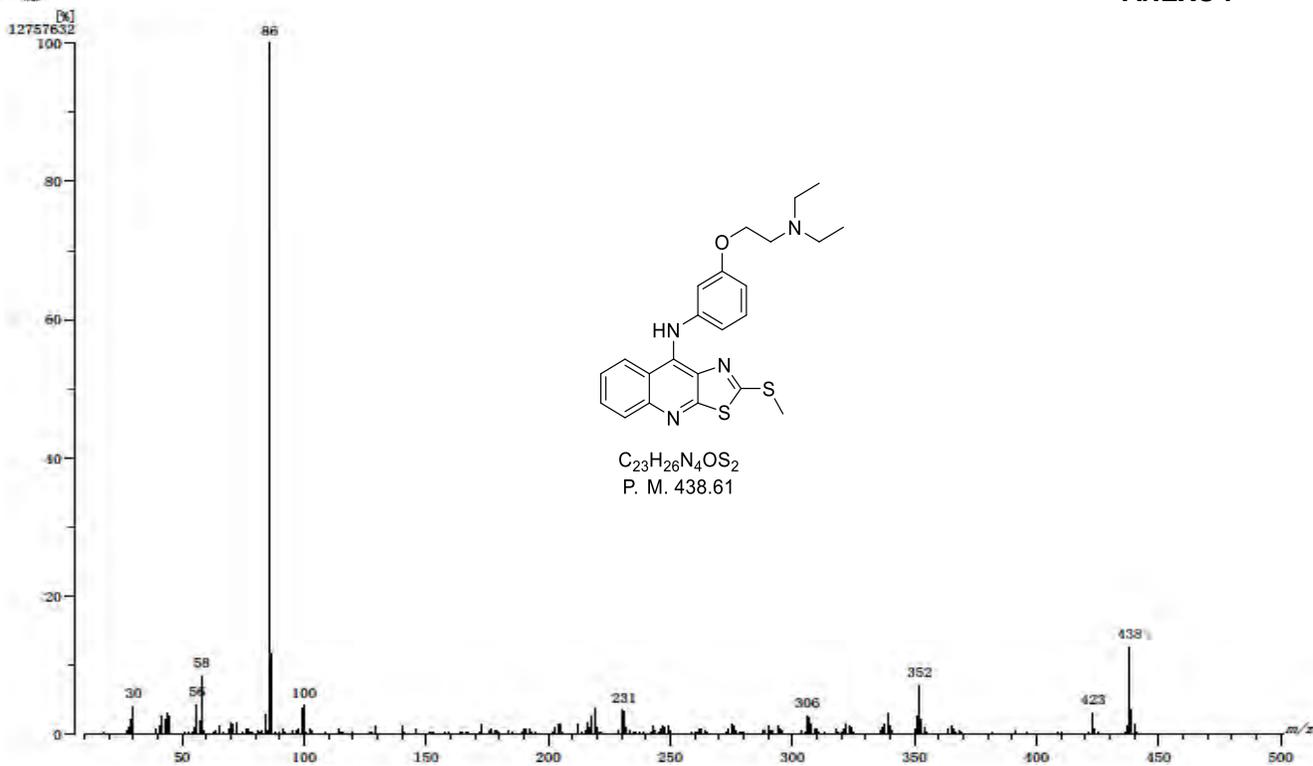
Espectro 41. IR (RTA) del compuesto IVn.



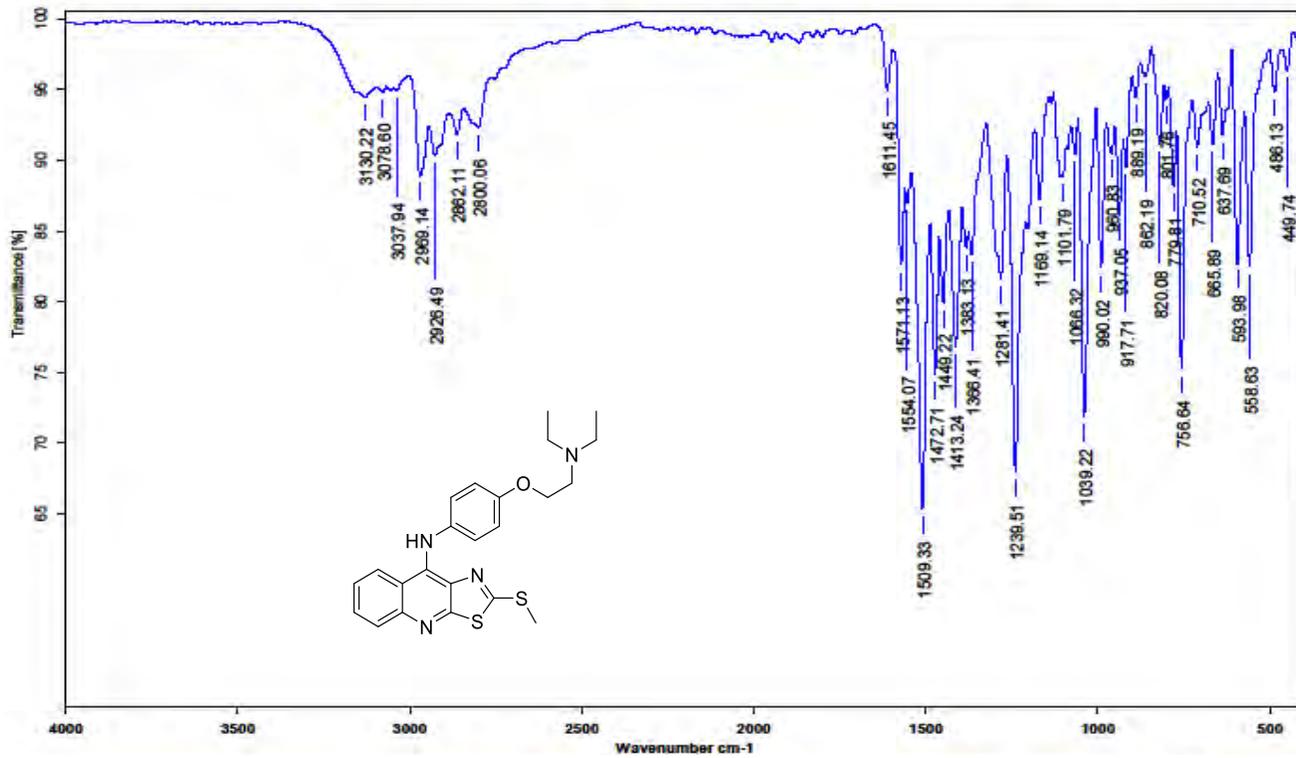
Espectro 42. Espectro RMN ¹H del compuesto IVn (CDCl₃).



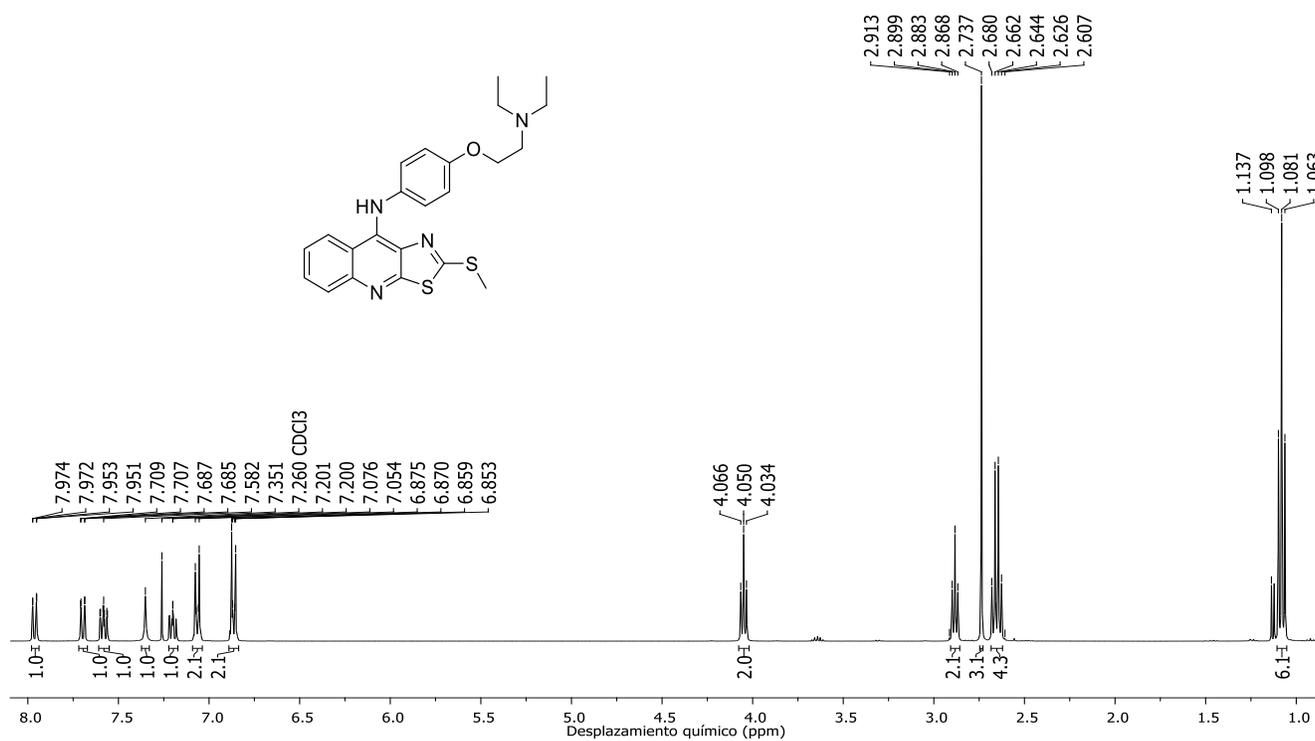
ANEXO I



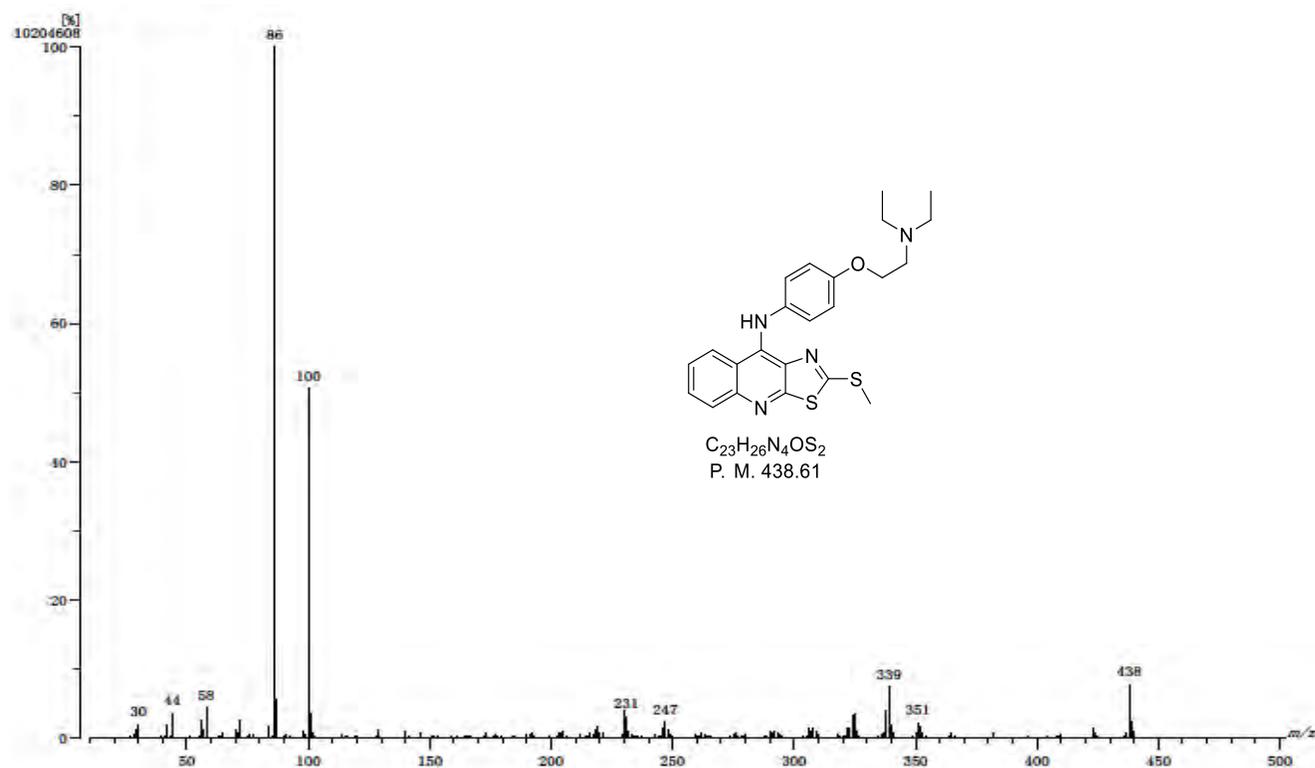
Espectro 43. Espectrometría de masas (IE) del compuesto IVn.



Espectro 44. IR (RTA) del compuesto IVñ.



Espectro 45. Espectro RMN ¹H del compuesto IVñ (CDCl₃).



Espectro 46. Espectrometría de masas del compuesto IVñ (CDCl₃).



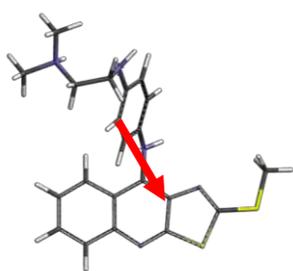
ANEXO II

MODELADO MOLECULAR

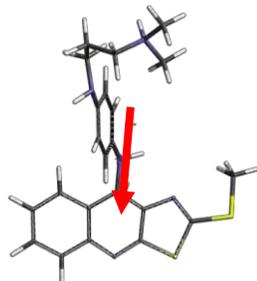


II. Imágenes de los compuestos analizados como entidades aisladas.

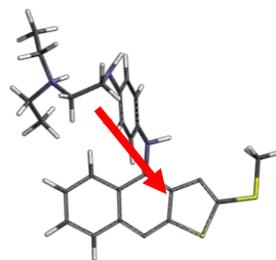
II.1. Orientación del momento dipolar



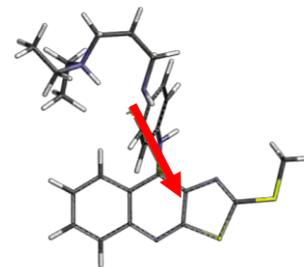
IVa



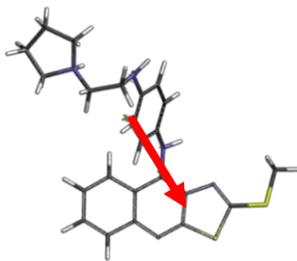
IVb



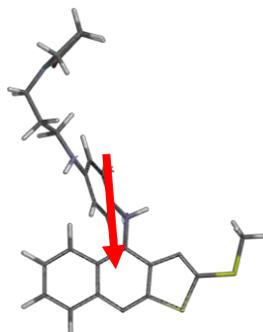
IVc



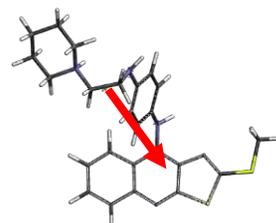
IVd



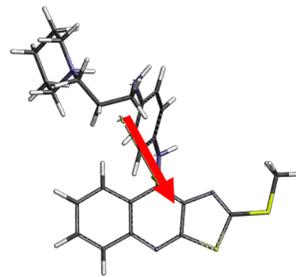
IVe



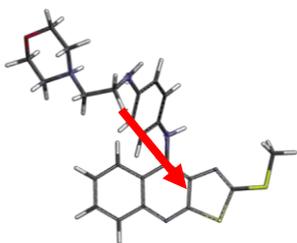
IVf



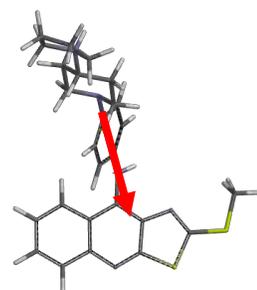
IVg



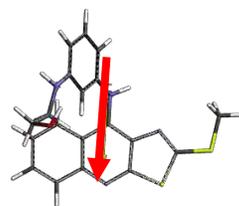
IVh



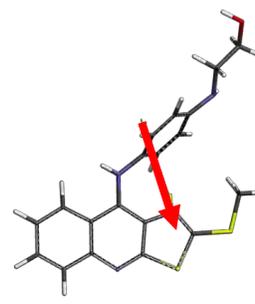
IVi



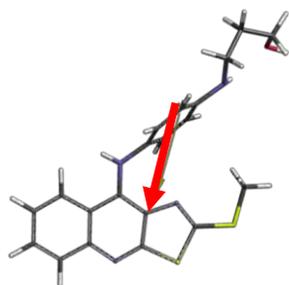
IVj



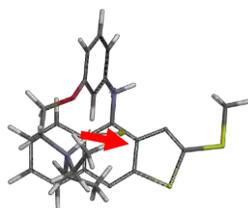
IVk



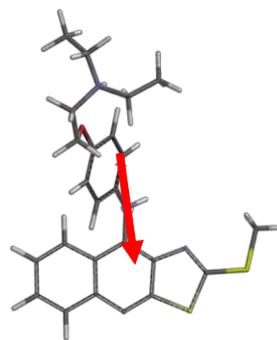
IVl



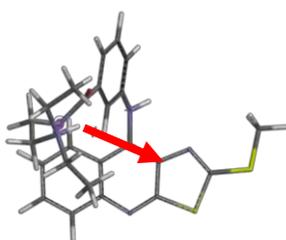
IVm



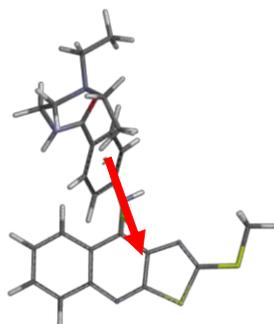
IVn



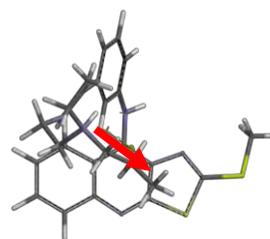
IVñ



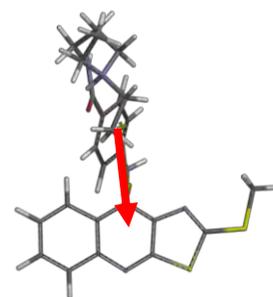
Va



Vb

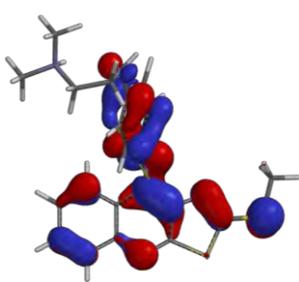


Vc

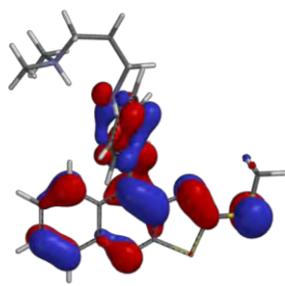


Vd

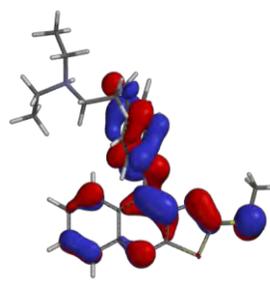
II.1.3. Distribución de los orbitales HOMO.



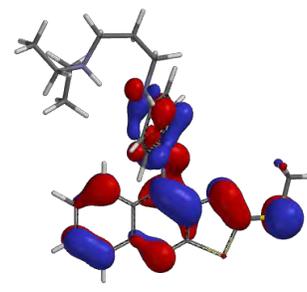
IVa



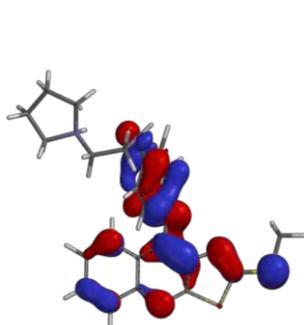
IVb



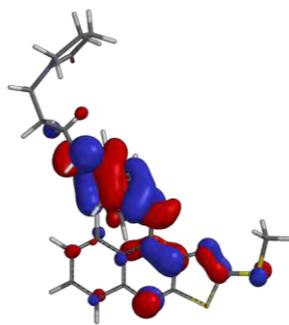
IVc



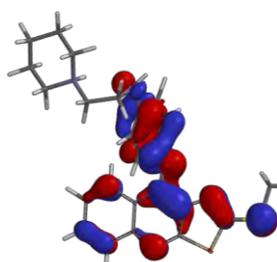
IVd



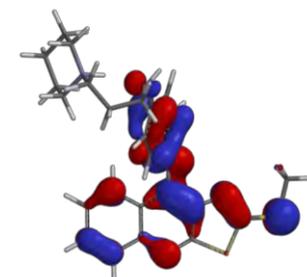
IVe



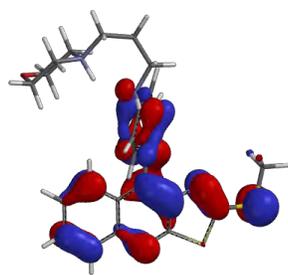
IVf



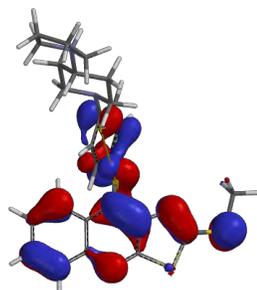
IVg



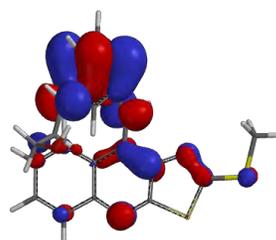
IVh



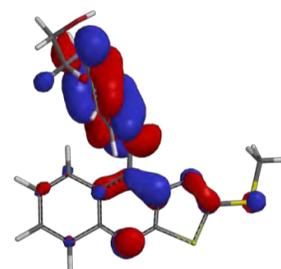
IVi



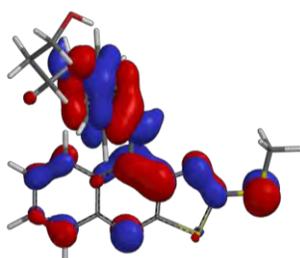
IVj



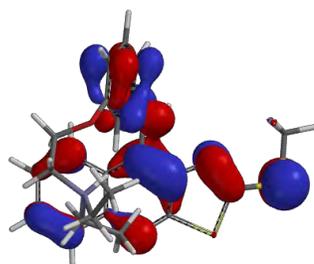
IVk



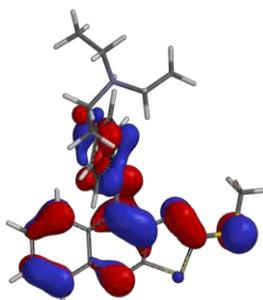
IVl



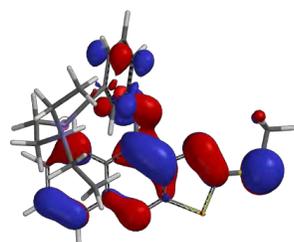
IVm



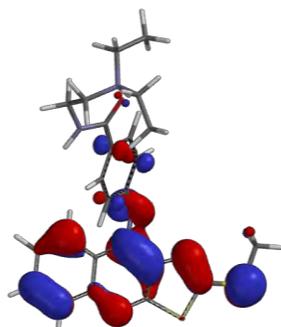
IVn



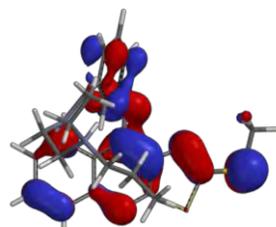
IVñ



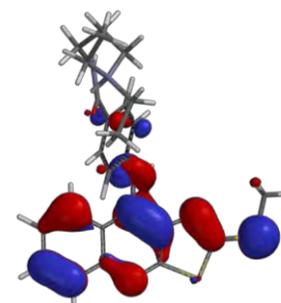
Va



Vb

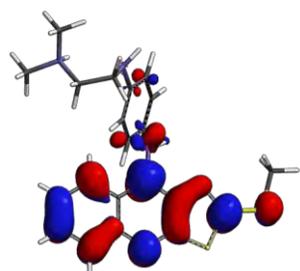


Vc

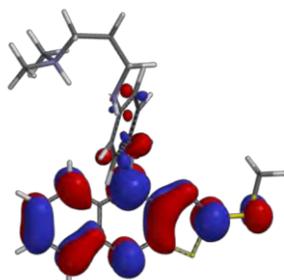


Vd

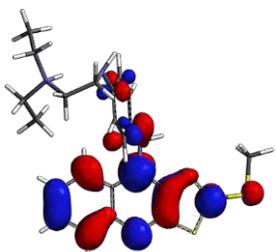
II.1.4. Distribución de los orbitales LUMO



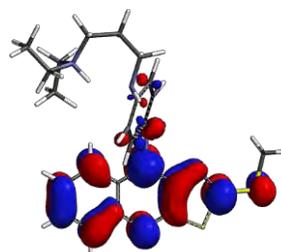
IVa



IVb



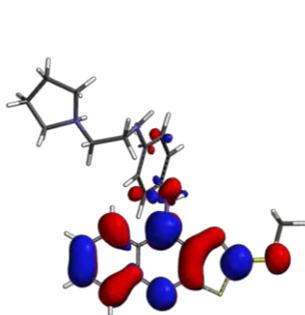
IVc



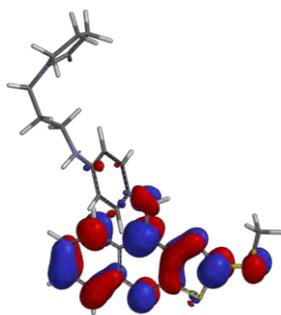
IVd



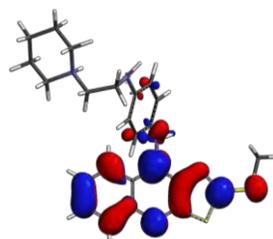
ANEXO II



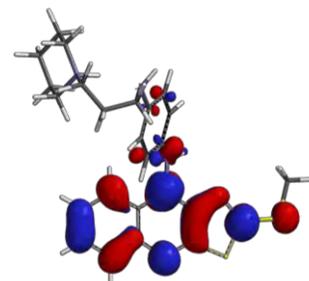
IVe



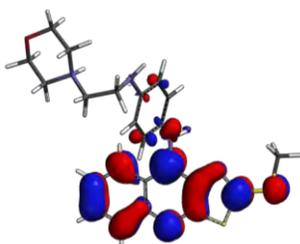
IVf



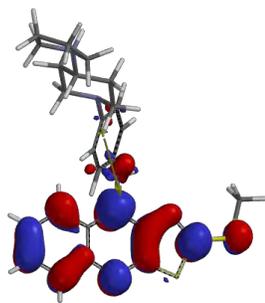
IVg



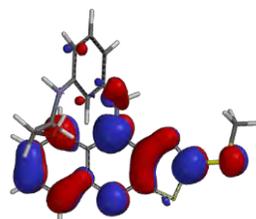
IVh



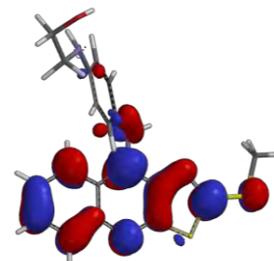
IVi



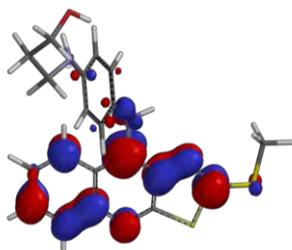
IVj



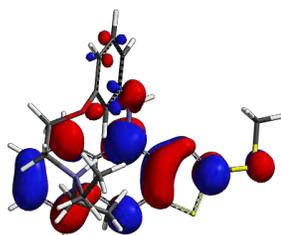
IVk



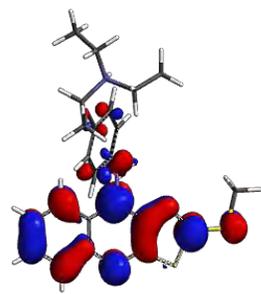
IVl



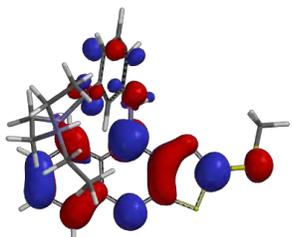
IVm



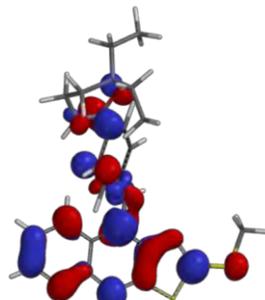
IVn



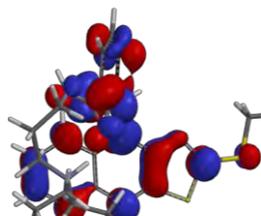
IVñ



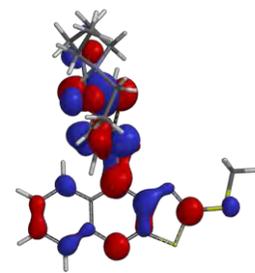
Va



Vb



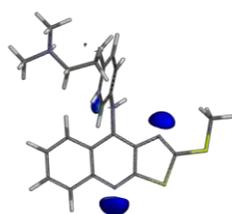
Vc



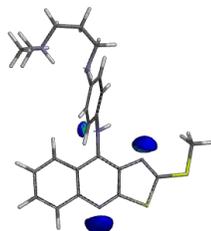
Vd



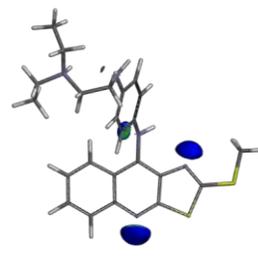
II.1.5. Mapas de Potencial Molecular Electrostático



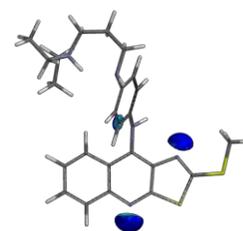
IVa



IVb



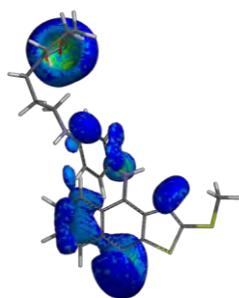
IVc



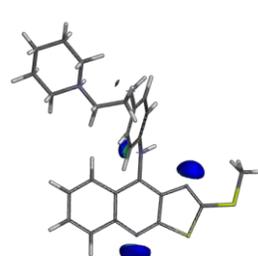
IVd



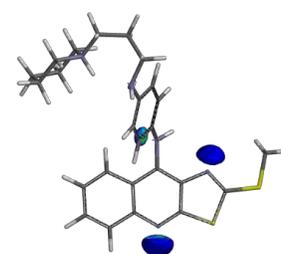
IVe



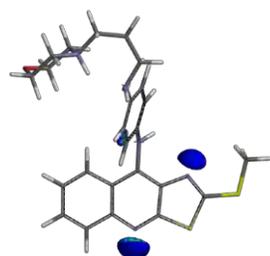
IVf



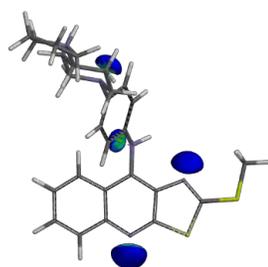
IVg



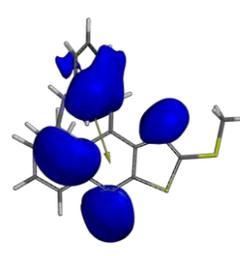
IVh



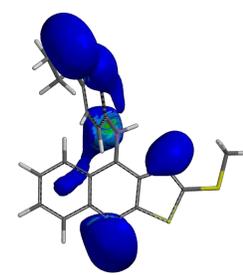
IVi



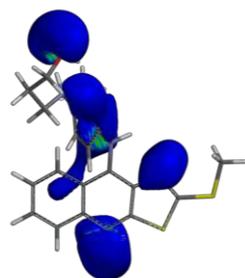
IVj



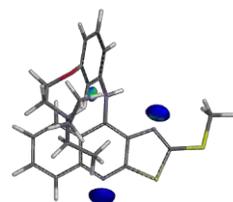
IVk



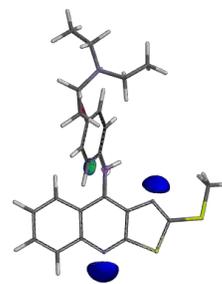
IVl



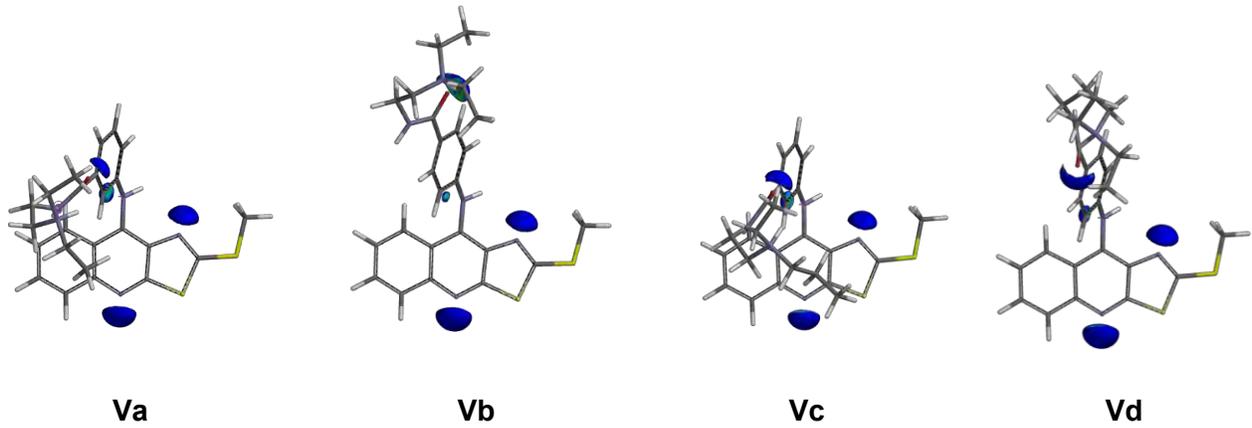
IVm



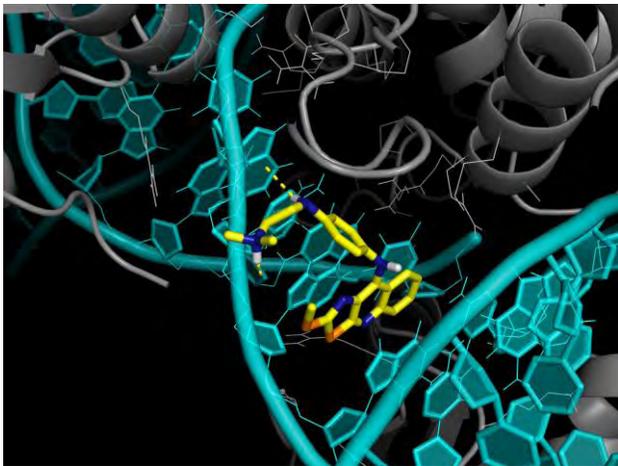
IVn



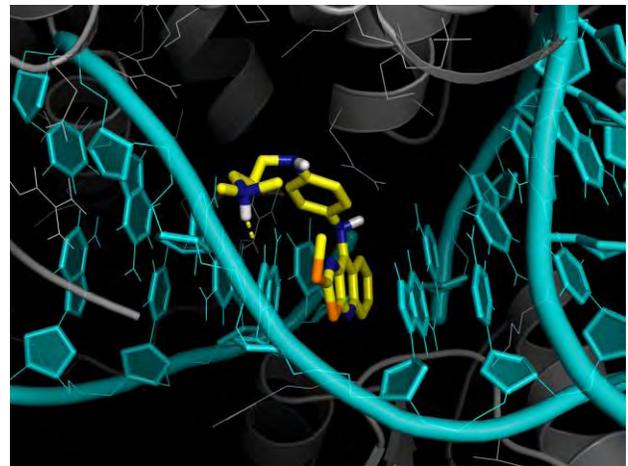
IVñ



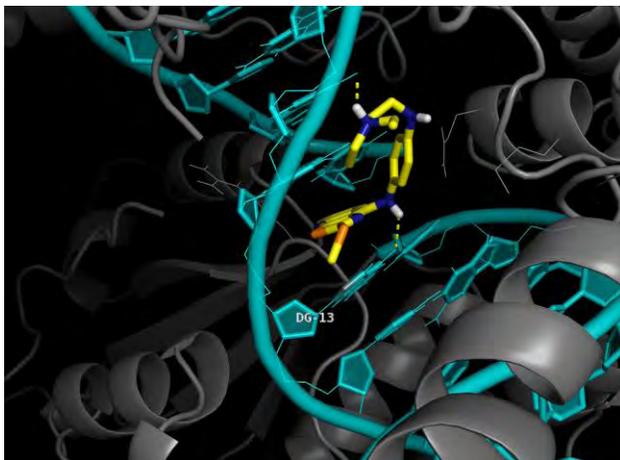
II.2. Imágenes de los complejos topoisomerasa II β -AND-Inhibidor.



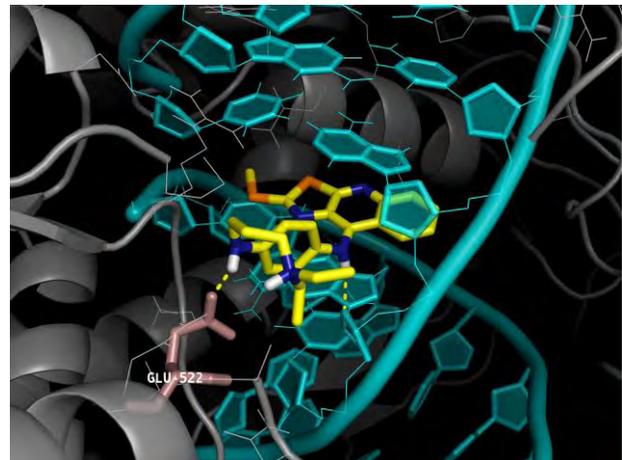
IVa



IVb



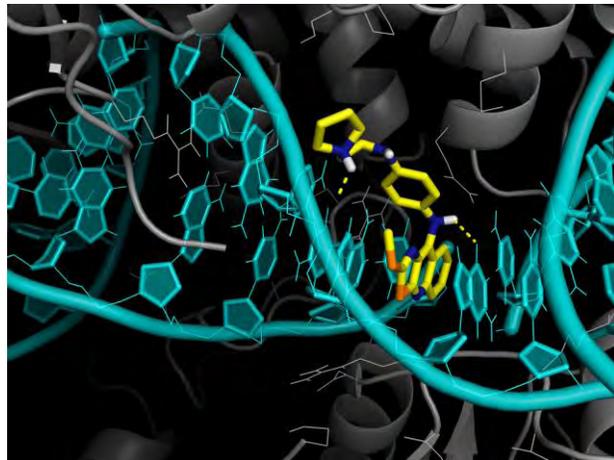
IVc



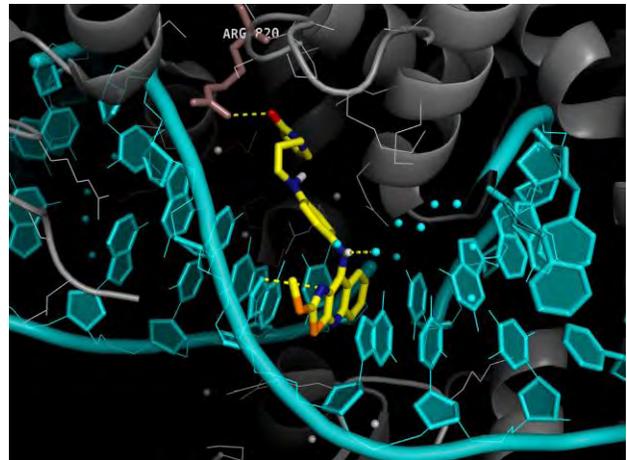
IVd



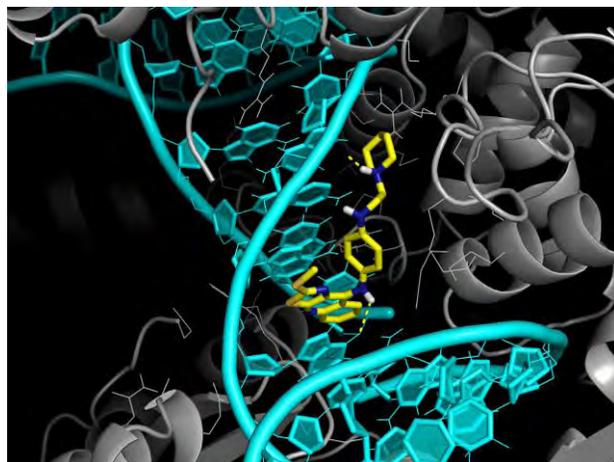
ANEXO II



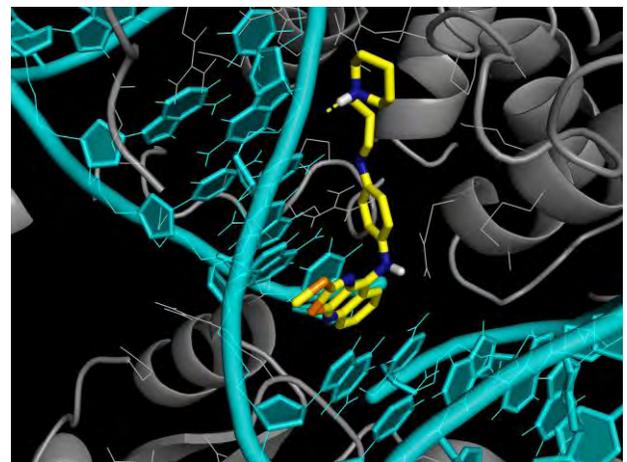
IVe



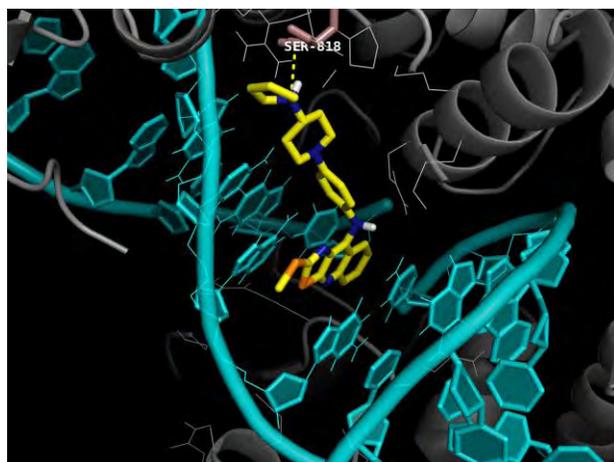
IVf



IVg



IVh



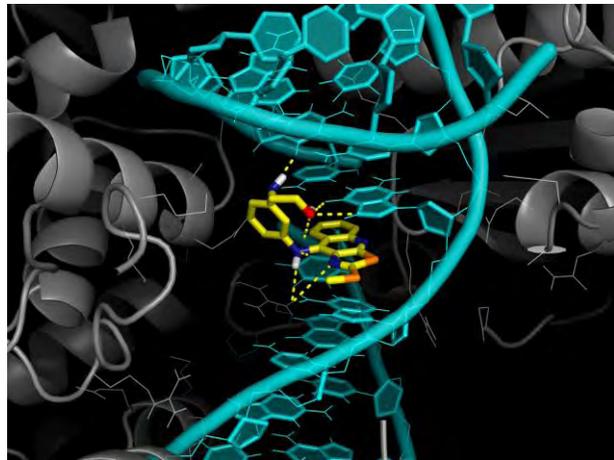
IVj



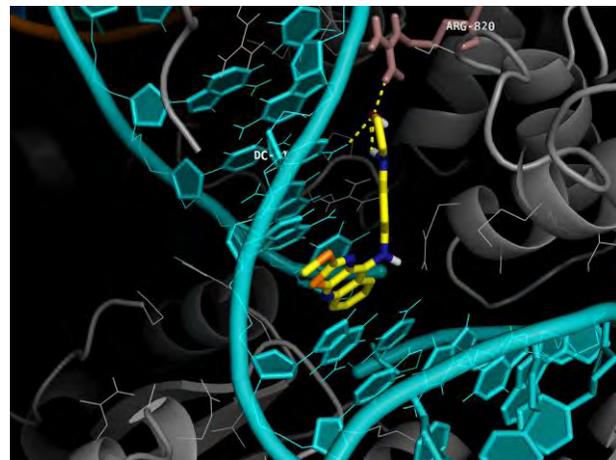
IVi



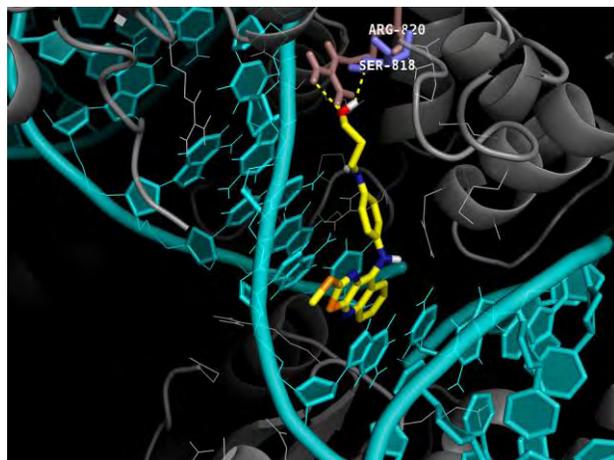
ANEXO II



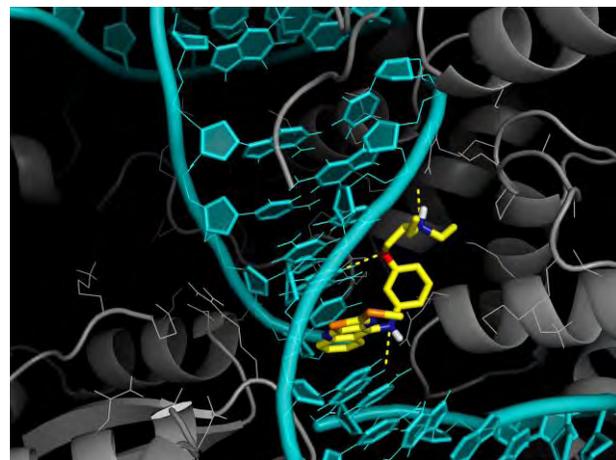
IVk



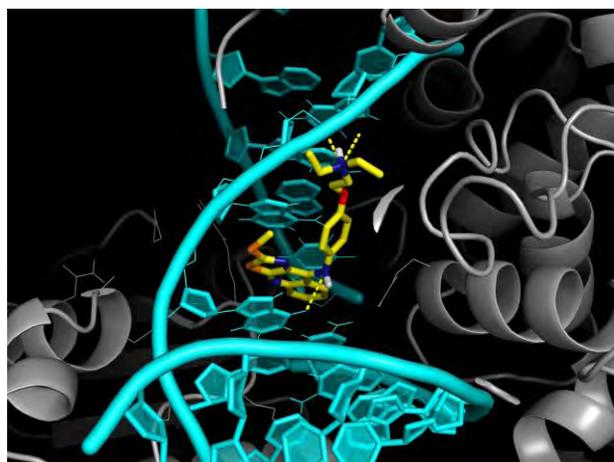
IVl



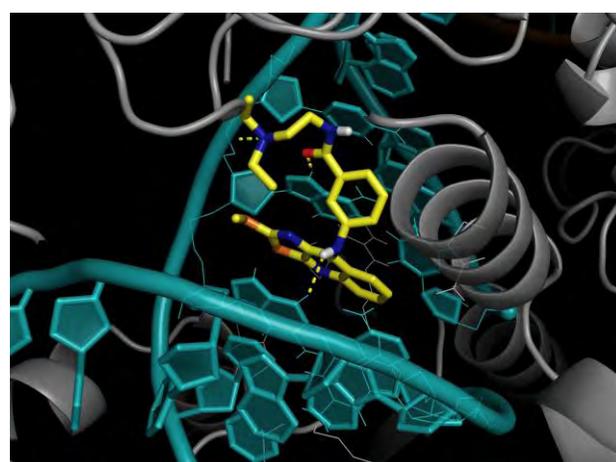
IVm



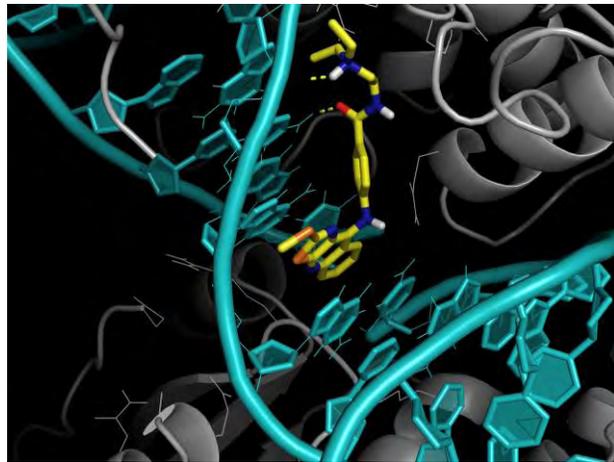
IVn



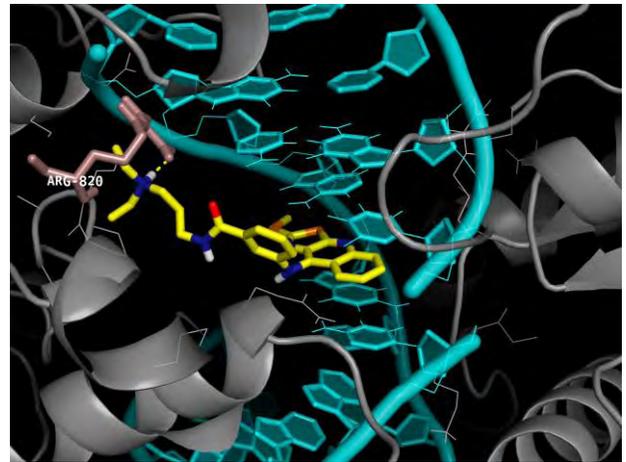
IVñ



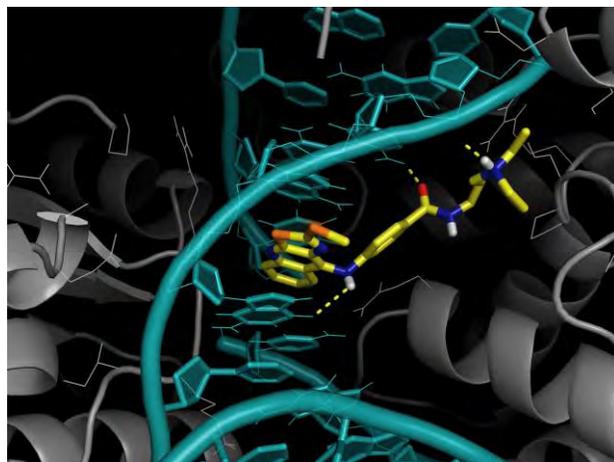
Va



Vb



Vc



Vd