



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Estudio *in combo* de derivados de quinazolina
como agentes citotóxicos en líneas celulares de
interés farmacéutico”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

VICTOR MANUEL FARÍAS GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

SUPERVISOR TÉCNICO

M. EN C. LUIS ROBERTO GARDUÑO VILLAVICENCIO



Ciudad universitaria, CDMX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Miembros del jurado

Dr. Francisco Hernández Luis	Presidente
M. en C. Margarita Romero Ávila	Vocal
Dra. Cristina del Carmen Jiménez Curiel	Secretario
M. en C. Maria Eugenia Mendoza Jasso	Suplente
Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz	Suplente

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 121, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Sustentante: Victor Manuel Farías Gutiérrez

Asesor: Dr. Francisco Hernández Luis

Supervisor técnico: c.Dr. Luis Roberto Garduño Villavicencio





Agradecimientos institucionales

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

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** de la que me siento orgulloso de pertenecer. Gracias a todos los profesores que desde mi llegada en 2014 a esta institución han dejado alguna enseñanza, ya que dichas enseñanzas son una parte fundamental de mi desarrollo como profesional y como persona.

Expreso mi agradecimiento a la Dirección General del Personal Académico UNAM por el apoyo proporcionado en la compra de materiales de vidriería y sustancias químicas dentro del proyecto **UNAM-DGAPA-PAPIIT IN223120**.

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

A la Facultad de Química por el apoyo otorgado para el financiamiento de los ensayos in vitro en líneas celulares y pago del registro de espectros de RMN e IR, dentro del programa **PAIP 5000 9136**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (**USAI**) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales, Nayeli López Balbiaux); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco).

Al Laboratorio de Pruebas Biológicas LSA del Instituto de Química de la UNAM, por llevar a cabo los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares solicitadas.





“Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo.”

-Niels Bohr





Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 El cáncer. Entendiendo la enfermedad	2
2.2 El cáncer en cifras	4
2.3 La lucha contra el cáncer. Tratamientos más comunes.	6
2.4 La estrella del trabajo. Las quinazolinas como agentes quimioterapéuticos.	7
2.5 Receptores acoplados a Tirosin-cinasa	9
2.6 EGFR, una importante diana biológica en el tratamiento del cáncer.	9
2.7 Las pruebas biológicas	11
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
6. Metodología	14
6.1 Predicción de descriptores químicos	14
6.2 Acoplamiento molecular	14
6.3 Síntesis	15
6.4 Evaluación biológica	18
7. Resultados y análisis	19
7.1 Descriptores químicos	19
7.2 Acoplamiento molecular	20
7.3 Síntesis y caracterización física	22
7.4 Caracterización espectroscópica y espectrométrica	25
7.4 Evaluación biológica	31
8. Conclusiones	33
9. Perspectivas	34
10. Referencias bibliográficas	35
Anexos	37





1.Introducción

El cáncer, es uno de los mayores problemas de salud en la actualidad, no solo a nivel nacional, también a nivel mundial, siendo por ende, una de las principales causas de muerte.^[1,2,5] Presenta una incidencia variable en pacientes de diferente edad y sexo. Debido a este gran problema, se tiene la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos, ya que con los que se cuenta actualmente, suelen presentar problemas como toxicidad, invasividad o baja selectividad, entre muchas otras.^[7]

Este padecimiento, engloba un amplio espectro de enfermedades, que se originan por un crecimiento celular descontrolado, el cual, puede iniciarse en cualquier parte del cuerpo.^[1] Por la complejidad de la enfermedad, existen diferentes tipos de tratamientos, siendo uno de los más comunes la quimioterapia, que se define como el uso de moléculas para detener o disminuir el crecimiento de células cancerosas.^[7] Como consecuencia de esto, el desarrollo de nuevas moléculas que actúen contra dicha enfermedad es una rama de estudio de suma importancia en el ámbito de la salud.

Al día de hoy, se cuenta con fármacos, que actúan en diversos procesos celulares y, que van dirigidos, a diferentes tipos de cáncer. Un grupo muy estudiado de fármacos son los que actúan sobre cinasas o proteínas acopladas a cinasas, dentro de los que se encuentran los que tienen acción sobre el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)^[13], una proteína acoplada a tirosina-cinasa. Este receptor actúa en diferentes procesos vitales para las células. Algunos ejemplos de moléculas que inhiben al EGFR son el gefitinib, erlotinib, dacomitinib, entre otros. Las moléculas antes mencionadas a su vez, comparten la característica de presentar el núcleo de quinazolina en su estructura. Se sabe que este núcleo es una estructura privilegiada en el área de la química farmacéutica para el tratamiento contra el cáncer, puesto que puede actuar inhibiendo al EGFR debido a una similitud estructural en la porción de pirimidina del ATP y de la quinazolina. ^[10,12]

Teniendo en cuenta el contexto anterior, en el presente trabajo de tesis, tuvo como objetivo diseñar racionalmente mediante estudios de acoplamiento molecular, nuevos derivados de quinazolina con actividad citotóxica; la síntesis de las moléculas y, finalmente, la evaluación *in vitro* en líneas celulares cancerosas y una con fenotipo no tumoral.





2.Marco teórico

2.1 El cáncer. Entendiendo la enfermedad.

El cáncer es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Una característica que define a este padecimiento es la multiplicación exacerbada de células anormales; estas células, pasado un determinado tiempo, pueden propagarse a otro órgano, este proceso es conocido como metástasis.^[2] Las células que conforman al tumor maligno reciben el nombre de cancerígenas y presentan características particularmente distintivas, éstas son listadas en la **Figura 1.**^[3]



Figura 1. Características distintivas de una célula cancerígena.

¿Qué factores causan el cáncer?

Es una pregunta lógica que acompaña al estudio del cáncer; sin embargo, no existe una respuesta simple.

El cáncer se origina de la transformación de una célula sana a una célula cancerosa en un proceso de diferentes etapas, que progresa, generalmente, desde una lesión





pre-cancerosa hasta llegar a un tumor maligno. Estos cambios suelen ser el resultado de una acumulación tanto de factores genéticos del individuo y agentes carcinogénicos. Estos agentes se clasifican en tres categorías que se muestran en la **Tabla 1**.^[2,3]

Tabla 1. Clasificación de agentes carcinogénicos

Tipo de carcinógeno	Ejemplos
Físico	Luz ultravioleta (UV), radiación ionizante
Químico	Alcohol, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), asbesto, metales pesados
Biológico	Infecciones causadas por ciertas bacterias, parásitos y virus

Además de lo anterior, el cáncer es considerado como una patología genética, porque puede rastrearse a niveles de alteraciones dentro de genes específicos y, precisamente, los carcinógenos que se mencionan en la tabla anterior, comparten esta característica particular, alterar el genoma. Existen genes que afectan al desarrollo del proceso cancerígeno y se dividen en dos grupos principales, los **genes supresores de tumores** y los **protooncogenes**. El primer grupo actúan como “frenos” celulares, codifican proteínas que actúan regulando la replicación celular y evita que exista una transformación maligna de células. Por otro lado, el segundo grupo tiene la capacidad de alterar el funcionamiento normal de la célula, lo que conduce a una transformación maligna y una eventual pérdida de la capacidad de regulación del crecimiento celular. ^[4] Otro factor a considerar, es el proceso de carcinogénesis, ilustrado en la **Figura 2**^[3], es decir, el proceso de transformación de células normales a malignas que se mencionó anteriormente.



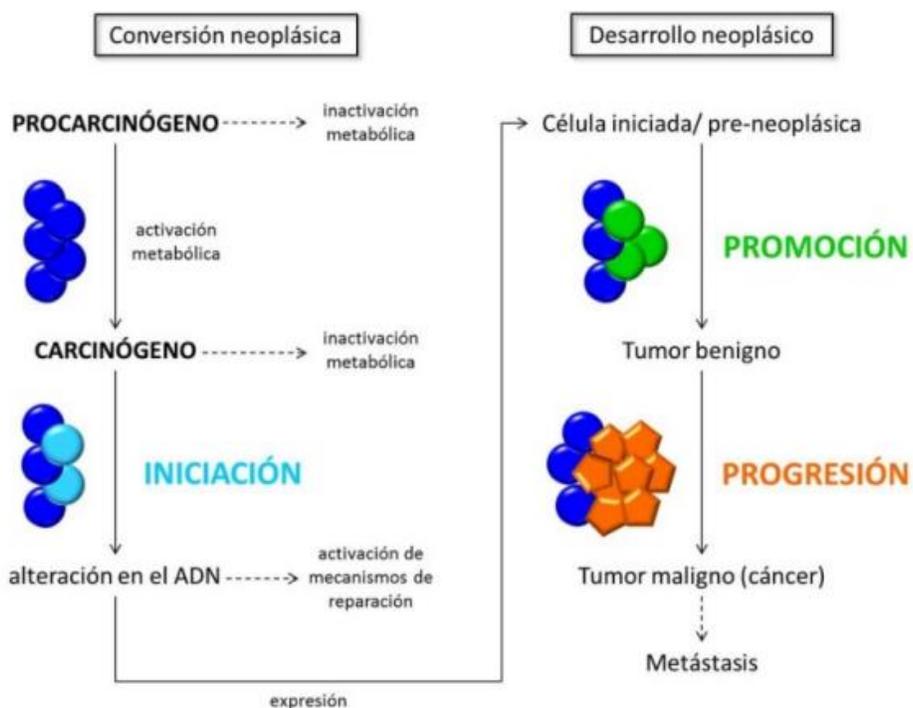


Figura 2. Proceso de carcinogénesis.

Como puede observarse, el proceso de carcinogénesis no es algo simple, es un proceso que puede llevar varios años, desde que se suscita un daño al DNA, hasta el desarrollo de un tumor maligno.^[3,4]

2.2 El cáncer en cifras

Sólo en el año 2020, se atribuyeron cerca de 10 millones de defunciones asociadas al cáncer en todo el mundo, convirtiéndose así, en una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A continuación se muestra la estadística de personas que presentaron esta enfermedad en la **Figura 3**, y los decesos provocados en la **Figura 4**.^[2]





Incidencia de cáncer en el mundo en 2020

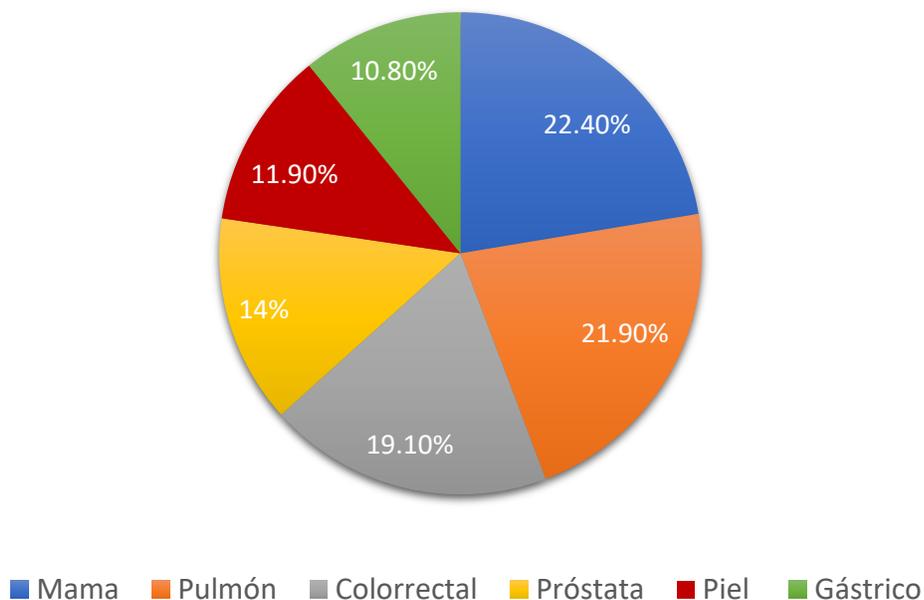


Figura 3. Casos reportados en el mundo en 2020. Cáncer de mama (2.26 millones), de pulmón (2.21 millones), colorrectal (1.93 millones), de próstata (1.41 millones), de piel (distinto al melanoma) (1.2 millones) y gástrico (1.09 millones).

Muertes por cáncer en el mundo en 2020

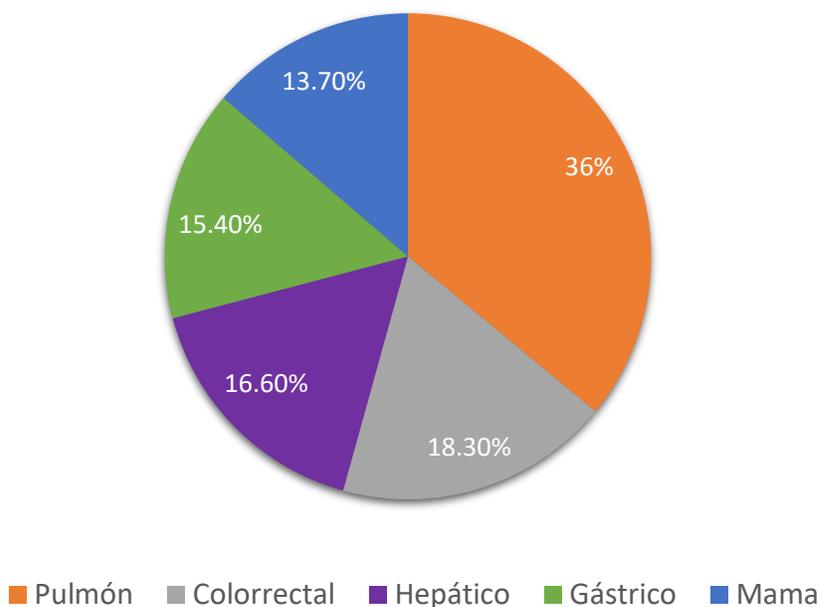


Figura 4. Decesos reportados en el mundo en 2020. Cáncer de pulmón (1.8 millones), colorrectal (916,000), hepático (830,000), gástrico (769,000) y de mama (685,000).





En México, las cifras de la enfermedad son igualmente alarmantes. En el año 2020, el 8% (90,603 decesos) de las muertes en el país, se suscitaron debido a alguna variante en la enfermedad. A su vez, los estados con mayor tasa de defunción fueron la Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima. Las cifras exactas pueden apreciarse en la **Figura 5**.^[5, 6]

Incidencia de cáncer en México en 2020

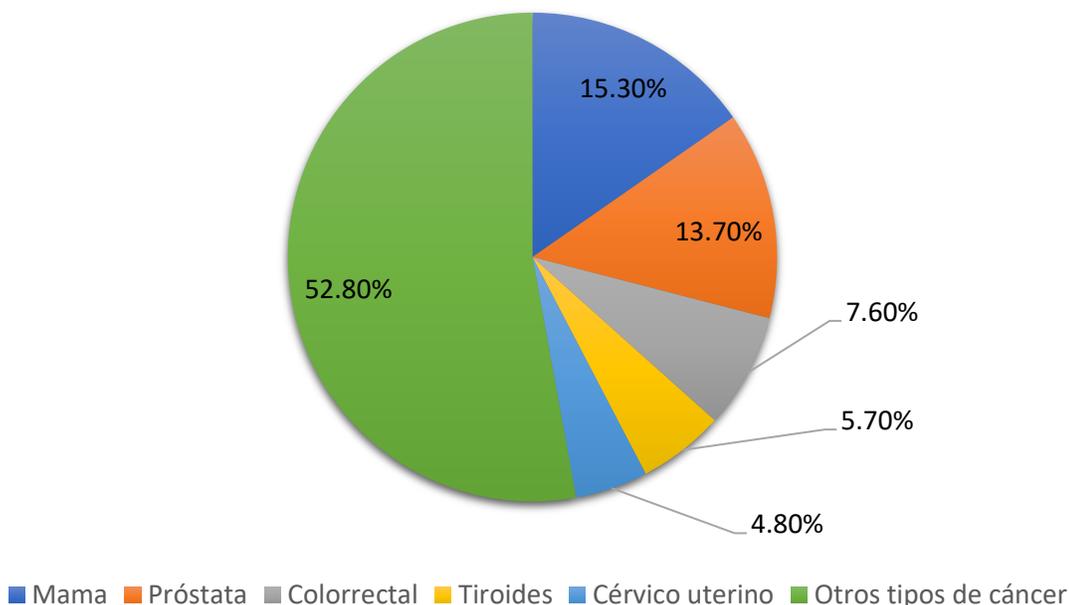


Figura 5. Casos reportados en México en 2020, Cáncer de mama (29929), de próstata (26742), colorrectal (14901), tiroides (11227), cérvico uterino (9439) y las muertes por otros tipos de cáncer (103261).

2.3 La lucha contra el cáncer. Tratamientos más comunes.

Por fortuna, hoy en día se cuenta con diversas alternativas para tratamiento del cáncer, lo que ha aumentado la esperanza y calidad de vida de los pacientes. Para que un tratamiento tenga mayor posibilidad de éxito, es indispensable recibir un diagnóstico adecuado, además de contar con seguimiento durante la enfermedad e incluso, después de haber sido dado de alta.

Los tipos de tratamiento con los que se cuenta al día de hoy se enlistan en la **Tabla 2**.^[7]





Tabla 2. Diferentes tipos de tratamiento contra el cáncer.

Tratamiento	Definición
Cirugía	Procedimiento en el cual se extirpa quirúrgicamente el tumor maligno del cuerpo
Radioterapia	Utiliza altas emisiones de radiación para destruir células cancerosas mediante un daño al DNA
Quimioterapia	Utiliza fármacos para destruir células cancerosas al detener o alentar el crecimiento de las células malignas
Inmunoterapia	Tiene como finalidad ayudar a desencadenar una mejor respuesta inmune para combatir el cáncer
Hormonal	Tiene dos finalidades: bloquear la capacidad de producción de hormonas o interferir en sus funciones normales

Aunado a lo anterior, existen otras alternativas como tratamientos secundarios, como la prueba de biomarcador para ayudar a discernir sobre el uso de un método sobre otro; así mismo, es importante recalcar que normalmente no se administra un solo tipo de tratamiento, también pueden combinarse entre sí para ayudar a tener mejores resultados.

2.4 La estrella del trabajo. Las quinazolininas como agentes quimioterapéuticos.

El término quimioterapia, fue acuñado por el químico alemán Paul Ehrlich en el año de 1900 y la definición en ese entonces fue el “uso de agentes químicos para tratar una enfermedad”.^[8]

A groso modo, y de acuerdo a como interaccionan los agentes quimioterapéuticos en el organismo, pueden clasificarse de diferentes maneras. La gran mayoría de estos, actúan interrumpiendo la función del DNA, ya sea mediante unión o interfiriendo en las hélices de este; por otro lado, existen los fármacos que actúan indirectamente inhibiendo enzimas involucradas en la síntesis del DNA.^[9]

En los últimos años, se ha fortalecido el estudio de la terapia molecular dirigida. Ésta consiste en ser altamente selectiva a blancos moleculares anormales o que se encuentran sobreexpresados como consecuencia del cáncer, un ejemplo de ello son los inhibidores de cinasa.^[9] Algunas estructuras, de fármacos que se conoce son inhibidores de cinasa, se muestran en la **Figura 6**.^[10]



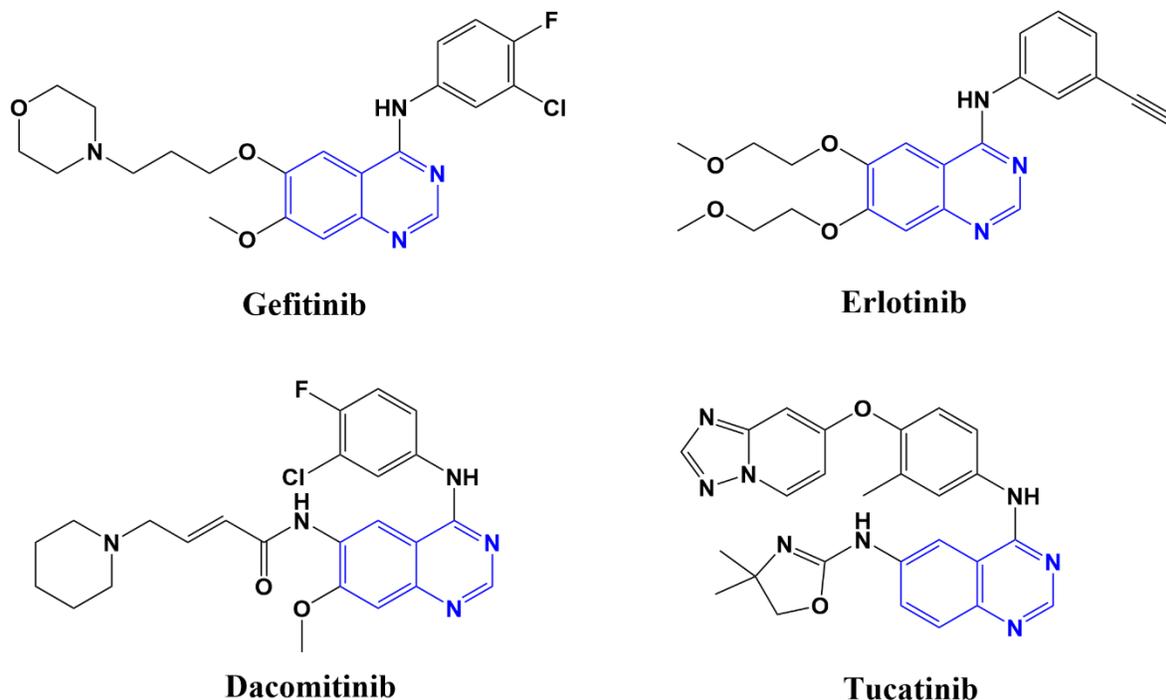


Figura 6. Inhibidores de cinasas usados en la quimioterapia contra el cáncer.

De las estructuras antes ejemplificadas, podemos observar que comparten un núcleo estructural, el *scaffold* de quinazolina (**Figura 7**). Dicha estructura es un biciclo fusionado por un benceno y una pirimidina en las posiciones 5 y 6 de esta última. Es considerado como una estructura privilegiada, puesto que se encuentra en diversas moléculas que presentan una amplia variedad de actividades biológicas, aunado a esto, este núcleo es altamente utilizado debido a su accesible obtención sintética.^[10, 11]

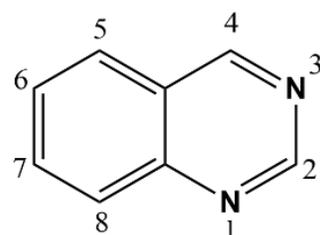


Figura 7. Núcleo de quinazolina.





2.5 Receptores acoplados a Tirosin-cinasa.

Los receptores acoplados a cinasa, son una super familia encargada de activar directamente ciertas enzimas sin la necesidad de ocupar una proteína G, esta proteína cumple con el rol dual, de receptor y enzima. De esta super familia, los receptores acoplados a tirosina-cinasa son un ejemplo de suma relevancia como blancos terapéuticos en el descubrimiento de nuevas moléculas para el tratamiento del cáncer. Su estructura, ilustrada en la **Figura 8**, consiste en una región extracelular (donde se encuentra el amino terminal), que incluye el sitio de unión del mensajero químico, una región hidrofóbica simple, que atraviesa la membrana celular, compuesta de una α -hélice de 7 giros y, en la región intracelular (donde se encuentra el carboxilo terminal), se encuentra el sitio catalítico. Como ejemplo de este receptor, se encuentra el receptor para insulina.^[9]

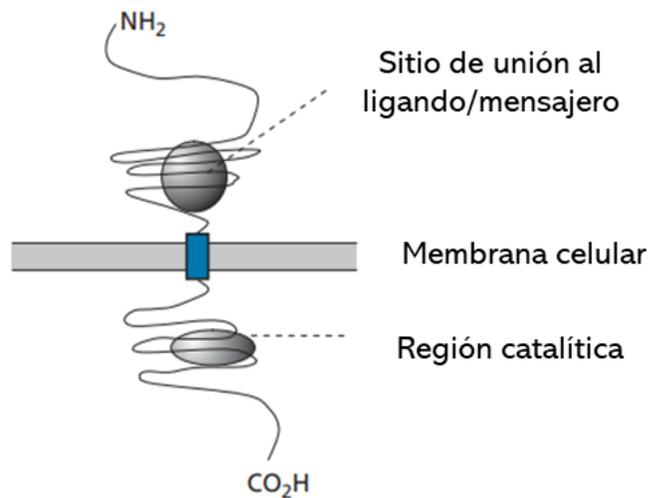


Figura 8. Estructura básica de un receptor de tiro Tirosin-cinasa.

2.6 EGFR, una importante diana biológica en el tratamiento del cáncer.

El EGFR también es un ejemplo de receptor acoplado a tirosina-cinasa, éste se ilustra en la **Figura 9**. En años recientes, ha sido estudiado como uno de los blancos terapéuticos principales en el tratamiento del cáncer, puesto que se ha observado una sobreexpresión de este receptor en células cancerosas. Tiene como función, desencadenar algunos eventos vías como la angiogénesis, la diferenciación, la proliferación, supervivencia celular, entre otros procesos.^[12]



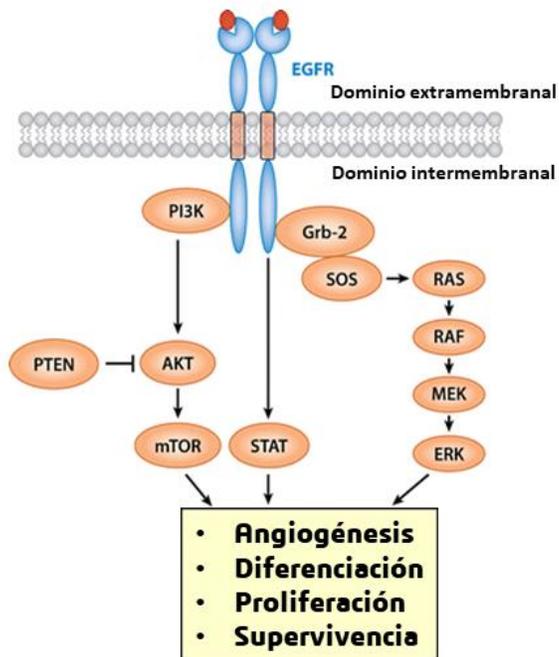


Figura 9. Esquema de EGFR y sus diversas funciones en el organismo.

El sitio particular de interés farmacéutico es la región catalítica ubicada en el dominio intermembranal del EGFR, debido a que en dicho sitio, se da la unión con el ATP para que pueda llevarse a cabo la función de fosforilación, como se muestra en la **Figura 10.**^[9]

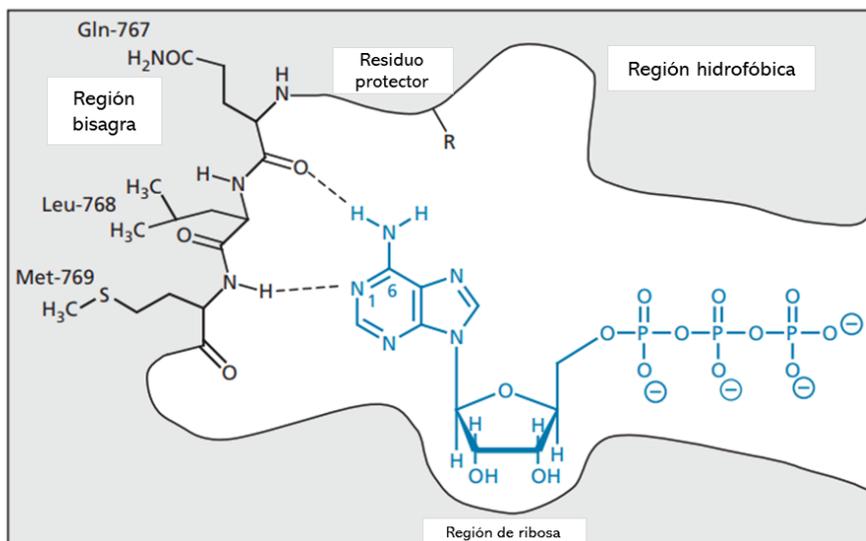


Figura 10. Sitio activo de EGFR unido a una molécula de ATP.





Debido a que el sitio de unión de ATP en EGFR se encuentra en el dominio intramembranal, es importante considerar, en el desarrollo de nuevos inhibidores, las reglas de Lipinski-Veber, para el diseño de moléculas que se busca, se puedan trasladar al interior de las células por difusión pasiva. Los valores teóricos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Reglas de Lipinski-Veber.

Reglas de Lipinski	Reglas de Veber
Peso molecular menos a 500 Da	No más de 10 enlaces rotables
No más de 5 átomos donadores de puente de hidrógeno	Área polar superficial menor a 140 Å ²
No más de 10 átomos aceptores de puente de hidrógeno	Átomos donadores y aceptores de puente de hidrógeno menor a 12
Tener un valor de logP menor a 5	

2.7 Las pruebas biológicas

Debido al diseño de los derivados de quinazolina como agentes citotóxicos, éstos serán evaluados *in vitro*, en ensayos de viabilidad celular. En la **Tabla 4** se muestran las líneas celulares utilizadas en este proyecto, así como sus características particulares.^[13, 14]

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas en el ensayo biológico y sus características.

Línea celular	Organismo de origen	Tipo de tejido	Patología	Presencia de EGFR
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Glándula mamaria	Adenocarcinoma metastásico	Sí 3.0 nTPM
MDA-MB231	<i>Homo sapiens</i>	Glándula mamaria	Adenocarcinoma	No
SK-Lu-1	<i>Homo sapiens</i>	Pulmón	Adenocarcinoma	No
HCT-15	<i>Homo sapiens</i>	Colon	Adenocarcinoma colorrectal en estadio C de Dukes	No
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Riñón	Fibroblasto, fenotipo no canceroso	No





3. Planteamiento del problema

Debido al creciente problema de salud que representa el cáncer actualmente, es apremiante contar con nuevas estrategias para poder tratar dicho padecimiento. El uso de la quimioterapia es una de las alternativas más comunes en el tratamiento del cáncer, siendo los compuestos derivados de quinazolina un grupo de agentes con resultados favorables, en contraparte de tener asociados efectos tóxicos.

De acuerdo a lo anterior se realizó el siguiente cuestionamiento. Si se diseñan derivados de quinazolina que presenten actividad inhibitoria en EGFR como lo hace el gefitinib, ¿se obtendrán compuestos con actividad citotóxica comparable al fármaco de referencia?

4. Hipótesis

Si se obtienen moléculas con el núcleo de quinazolina que muestren un perfil energético comparable al **Gefitinib** cuando se acoplen, mediante estudios de acoplamiento molecular, al dominio tirosin cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y que además presenten la interacción clave con metionina 793 en ese sitio catalítico, entonces dichas moléculas presentarán acción citotóxica en ciertas líneas celulares cancerosas.





5. Objetivos

Objetivo general

Diseñar, sintetizar y evaluar *in vitro*, derivados de quinazolina que presenten actividad frente a ciertas líneas celulares cancerosas y con fenotipo no tumoral, de interés farmacéutico.

Objetivos particulares

- Diseñar 5 moléculas derivadas de quinazolina mediante acoplamiento molecular.
- Predecir *in silico* los descriptores químicos de las moléculas.
- Sintetizar los compuestos y caracterizarlos espectroscópicamente y espectrométricamente.
- Enviar los compuestos a evaluación biológica sobre 4 líneas celulares cancerosas y una con fenotipo no tumoral.





6. Metodología

6.1 Predicción de descriptores químicos

Como primera acción, las moléculas en 2D fueron construidas en Chemdraw y fueron obtenidos sus códigos SMILES, los 5 ligandos fueron nombrados como la serie **WK1–WK5**. Posteriormente, se predijeron los descriptores químicos con el servidor online SwissADME^[15].

6.2 Acoplamiento molecular

Preparación de los ligandos

Para el acoplamiento molecular, los ligandos **WK1–WK5**, además de la molécula de **Gefitinib**, fueron construidos en Chemdraw, se obtuvieron sus códigos SMILES y se depositaron en el software Chem3D donde fueron minimizados energéticamente.

Preparación de la proteína

Como diana farmacológica, se eligió del Protein Data Bank^[16] el EGFR cocrystalizado con **Gefitinib** (PDB: 4WKQ) y para su preparación se utilizó el software Chimera 1.16; en ésta, fueron retiradas moléculas de agua y se agregaron hidrógenos a la proteína.

Acoplamiento molecular

Finalmente, para realizar el acoplamiento molecular se utilizó la interfaz gráfica del programa LeDock. La proteína fue cargada junto a su ligando cocrystalizado para que el programa generara la rejilla de manera automática. Se llevaron a cabo 100 evaluaciones con una tolerancia de 2 Å (espacio mínimo entre átomo y átomo) para generar las agrupaciones (clústers), una vez que se ejecutó el acoplamiento molecular.

Validación

Para la validación del método, se realizó un acoplamiento entre la molécula de **Gefitinib** cocrystalizada y la previamente construida. Y mediante el servidor online DockRMSD. Docking Pose Distance Calculation,^[17] se calculó el valor de la Raíz de desviación cuadrada media (RMSD: Root Mean Square Deviation), considerando que un valor menor a 2Å establece que no existen diferencias significativas, asegurando que el método es adecuado y confiable.





Visualización

La visualización y análisis de las poses generadas se realizó con el software Maestro.

6.3 Síntesis

Para la obtención de los compuestos finales, se siguió la ruta sintética que se muestra a continuación.

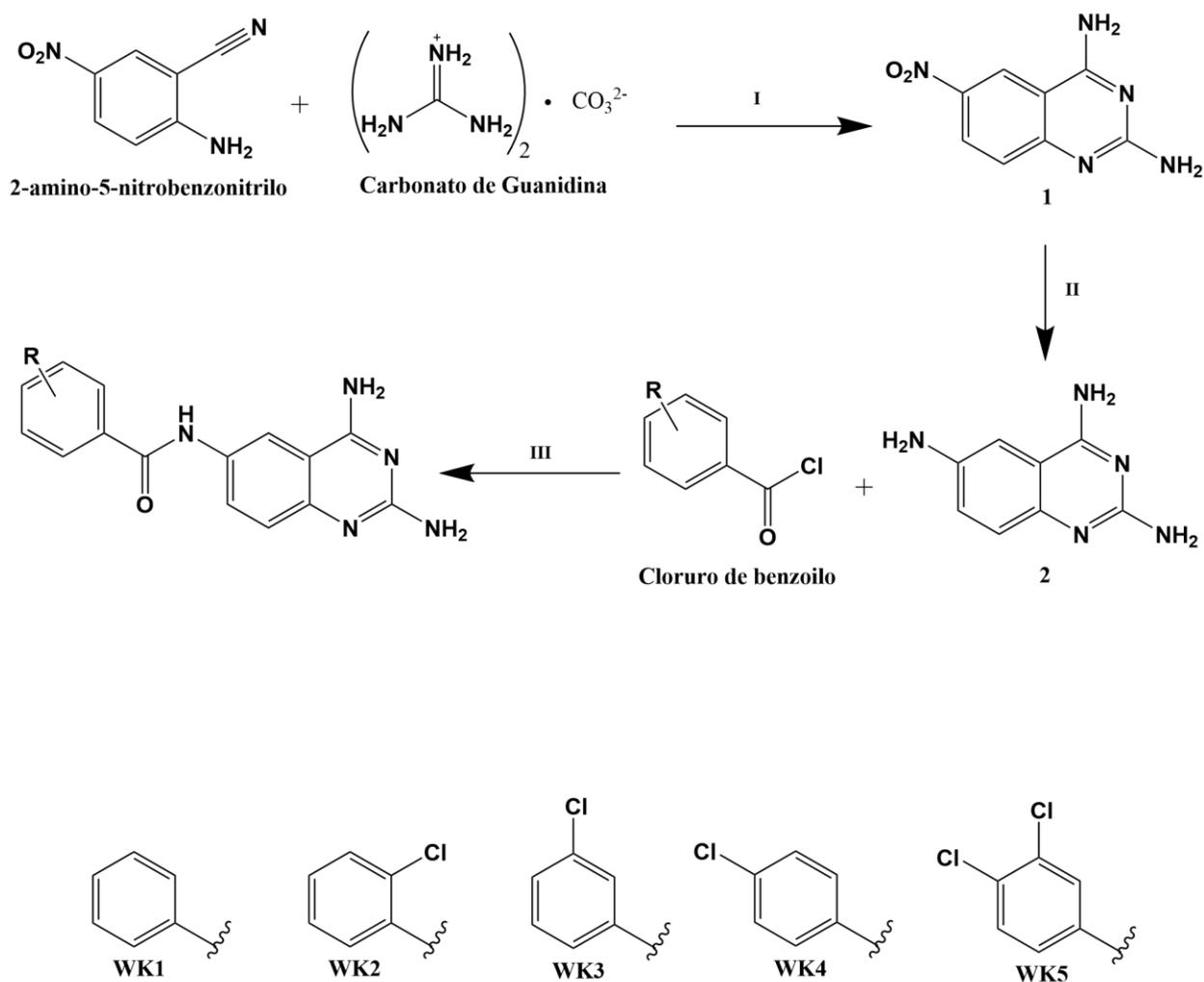


Figura 10. Ruta sintética para la obtención de los compuestos finales **WK1–WK5**. I: KOH, EtOH/PrOH, 95°C, 8h. II: HCO₂NH₄, [Pd/C] 10%, MeOH, 80°C, 4h. III: CH₃CN, 75 °C, 3h.





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

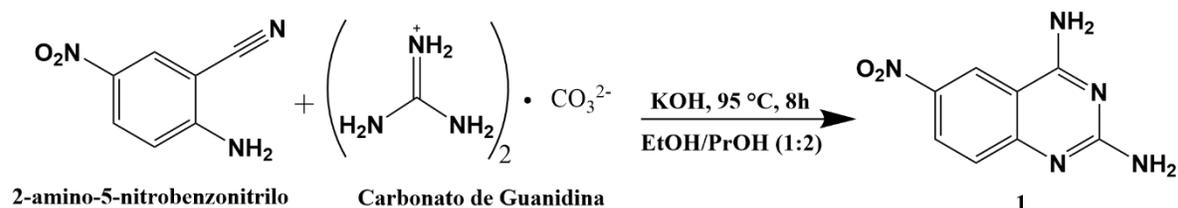


Figura 11. Síntesis de 1.

En un matraz de bola se añadió 1 eq de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (9.19 mmol), 0.75 eq de carbonato de guanidina (6.90 mmol), 1.2 eq de KOH (11.03 mmol) y 30 mL de una mezcla 1:2 EtOH/PrOH. El sistema se colocó a reflujo de 95°C durante 8h en agitación constante.

Transcurrido el tiempo de reacción, la suspensión se separó por filtración al vacío y se realizaron extracciones sólido/líquido con 100 mL de agua (20 mL x 5). Después de secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar la fase orgánica, el sólido se secó al vacío y se identificó por cromatografía en capa fina (ccf), usando como fase móvil CH₂Cl₂/MeOH (8:2). Debido a que el producto presentaba impurezas, el sólido fue transferido a un vaso de precipitados y se le adicionó metanol caliente; la suspensión se mantuvo en agitación por 12 min. Por último, la mezcla se separó por filtración en caliente y el sólido residual se dejó secar al vacío durante 24 h.

Síntesis de 2,4,6-triaminoquinazolina (2)

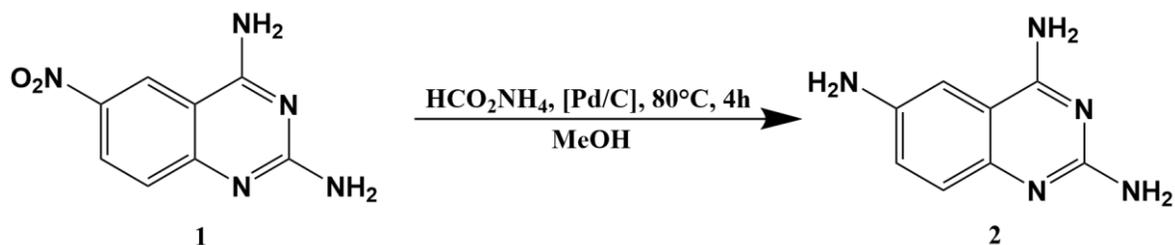


Figura 12. Síntesis de 2.

En un vaso de precipitados se adicionaron 1 eq de 1 (7.31 mmol) y 10% m/m con respecto a 1, de Pd/C al 10%. Los sólidos fueron mezclados hasta que se obtuvo una mixtura de tonalidad verdosa. Ésta fue transferida a un matraz bola, donde posteriormente se añadieron 6 eq de formiato de amonio (43.86 mmol), y se combinó nuevamente. Finalmente, se añadieron lentamente 20 mL de MeOH. El sistema se colocó en agitación constante y reflujo, a una temperatura de 80°C por 4h.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (ccf), comparando el avance con el agotamiento de 1. Al concluir la reacción, la suspensión se separó por filtración usando un embudo de vidrio poroso, colocando





un papel filtro en la base y una pequeña cantidad de celita para retener el Pd/C. El filtrado, se concentró a presión reducida hasta llevar a la obtención de un sólido. Para eliminar las impurezas que se presentaron en el sólido, se realizaron extracciones sólido/líquido con 10 mL de acetona (2 mL x 5). Después el sólido fue filtrado al vacío y se mantuvo secando, a temperatura ambiente, durante 3h.

Síntesis de la serie WK

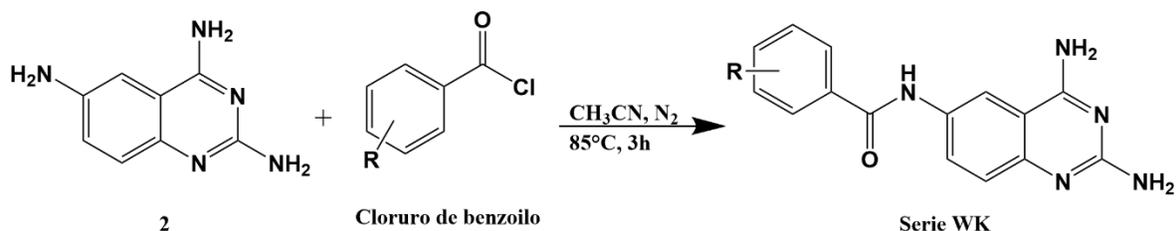


Figura 13. Síntesis de compuestos de la serie WK.

Para obtener los productos finales, en un matraz bola se colocó 1 eq de compuesto **2** y 12 mL de CH₃CN. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 15 min. Posteriormente se añadieron 0.9 eq del respectivo cloruro de benzoilo y la reacción se colocó a 75 °C, en agitación constante, bajo atmósfera de N₂. El tiempo de reacción varió entre 1 a 3 horas dependiendo del cloruro de benzoilo. El seguimiento de la reacción se realizó por ccf, utilizando como fase móvil CH₂Cl₂/MeOH (7:3) y cuidando que entre cada toma de placa se colocara la atmósfera de N₂. Otro indicativo del término de la reacción fue el cambio de color de la suspensión, pasando de amarillo a beige.

Una vez que se observó un avance considerable en la reacción, por ccf, y la formación de un solo producto, la reacción se detuvo y la suspensión fue separada por filtración al vacío.

Para la eliminación de trazas de **2** de los compuestos **WK1**, **WK2** y **WK3**, se realizó una extracción sólido/líquido con MeOH frío. En cuanto al tratamiento de **WK4** y **WK5**, el sólido se disolvió en DMF y, el correspondiente producto, se virtió en una disolución acuosa sobresaturada de NaCl. Las suspensiones se separaron por filtración al vacío y se dejaron secar, a temperatura ambiente, durante 18 h.





6.4 Evaluación biológica

El ensayo de citotoxicidad en líneas celulares, se realizó en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante el ensayo de Sulforrodamina B (SRB).^[18]

Los compuestos fueron evaluados mediante el método de SRB, utilizando el **Gefitinib** como control positivo, sobre cuatro líneas celulares tumorales, MCF-7, MDA-MB231, SK-Lu1, HCT-15 y un cultivo celular no tumoral, COS-7. Los compuestos fueron solubilizados en una disolución de DMSO a una concentración de 20 μM . El medio de cultivo de crecimiento de las células fue RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y con una mezcla de antibióticos/antimicóticos. Las líneas celulares fueron incubadas por 24h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Se realizaron 3 o 4 repeticiones de cada ensayo.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se añadieron 100 μL de SRB y se siguió el procedimiento descrito en el apartado **Anexos**. Se midió la densidad óptica a las 48h de incubación en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm.





7. Resultados y análisis

7.1 Descriptores químicos

Comenzando con el estudio teórico de las moléculas, se presentan en la **Tabla 5**, los valores de los descriptores químicos que enuncian las reglas semiempíricas de Lipinsky-Veber.

Cabe aclarar, que esos valores tuvieron que considerarse, debido a que el sitio activo de EGFR, para el cual fueron diseñadas las moléculas, se encuentra en la parte interna de la célula, por lo que es necesario que las moléculas atraviesen la membrana celular; para ello se realizó la predicción de los descriptores químicos en el servidor SwissADME, el cuál calcula los valores mediante una búsqueda en bases de datos con moléculas (o fragmentos de ellas), que tengan similitud estructural y valores de descriptores previamente reportados.

Tabla 5. Descriptores químicos.

Parámetro	Lipinsky-Veber	WK1	WK2	WK3	WK4	WK5
MM (g/mol)	<500	279.30	313.74	313.74	313.74	348.19
Log P	<5	1.59	2.04	2.10	2.08	2.59
Aceptor H	<10	3	3	3	3	3
Donador H	<5	3	3	3	3	3
TPSA (Å ²)	<140	106.92	106.92	106.92	106.92	106.92
Enlaces rotables	<10	3	3	3	3	3

La información presentada por el servidor nos muestra que ninguno de los compuestos viola las reglas de Lipinski-Veber (cada uno de los parámetros a comparar se muestra en la segunda columna de la **Tabla 5**), las cuales establecen condiciones ideales para que los compuestos puedan atravesar mediante difusión pasiva la membrana celular. Por lo que, en esta primera parte del diseño de las moléculas, se obtuvieron resultados favorables, puesto que todos los valores están dentro de los que son conocidos como aceptables. En el caso del descriptor logP, de observa mayor diferencia entre los valores de los compuestos, poniendo especial





atención al compuesto **WK5**, que presentó el valor mayor de logP, sin ser aún cercano a 5; esto puede ser un indicio de que el compuesto atraviesa con mayor facilidad la membrana celular y tendría concordancia con los resultados de evaluación *in vitro* que se presentan en la página 30, sección 7.6, mismos que se discutirán más adelante.

7.2 Acoplamiento molecular

Los resultados del acoplamiento molecular son resumidos en la **Tabla 6**. La visualización del estudio se realizó en el software Maestro. Las imágenes de cada acoplamiento se encuentran en el apartado de **Anexos**.

Tabla 6. Resultados del acoplamiento molecular.

Compuesto	EGFR (PDB:4KWQ)		
	ΔG (KJ/mol)	Clúster	Interacciones
WK1	-6.68	30	MET 793
WK2	-6.96	20	MET 793
WK3	-6.99	26	MET 793, GLN 791
WK4	-7.19	25	MET 793, GLN 791, LYS 745
WK5	-7.24	16	MET 793, GLN 791
Gefitinib	-8.70	41	MET 793

Podemos observar en la tabla anterior, que ninguno de los valores energéticos obtenidos en los compuestos tuvo un mejor valor respecto al **Gefitinib**, lo que podría indicar que los compuestos anteriores tendrían una actividad biológica más moderada que dicho fármaco. Sin embargo, los resultados en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231 demuestran lo contrario (sección 7.6). El compuesto con menor ΔG fue **WK5**, que también presentó mejor actividad citotóxica, teniendo relación el estudio *in silico* e *in vitro*. Se podría pensar que **WK4** podría tener mejores resultados de porcentaje de inhibición debido a que tiene una interacción más que el resto, lo cual no se cumple, esto puede atribuirse a que dicha interacción extra de tipo catión- π con la LYS 745, está condicionada a cierta orientación por parte de la cadena alifática del aminoácido, por lo que puede no estar o no verse favorecida siempre. Se puede observar que incluso **WK3** presenta mejores resultados en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB231.



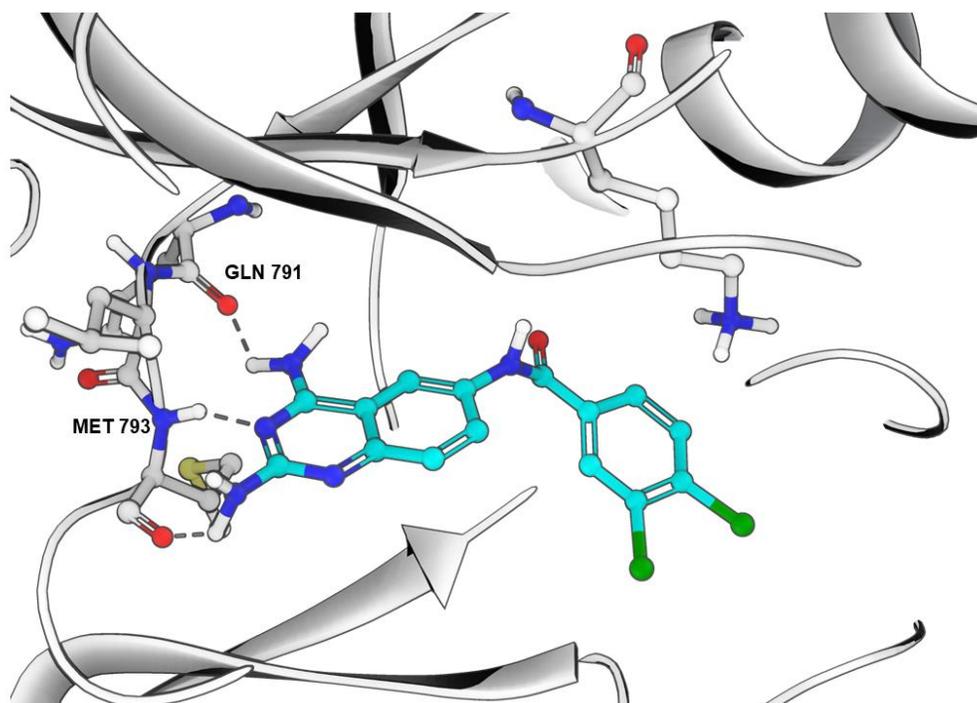


Figura 14. Interacciones presentes con **WK5**.

De la **Figura 14**, las interacciones que están presentes en todas las moléculas son las interacciones de puente de hidrógeno con la MET 793, el grupo amino de la posición 2 de la quinazolina actuando como donador de puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido, y el nitrógeno de la posición 3 de la quinazolina actuando como aceptor de puente de hidrógeno con el nitrógeno que conforma el enlace amida del aminoácido. Y para el caso de las moléculas **WK3–WK5**, se presenta una interacción de puente de hidrógeno con la glutamina 791, entre el nitrógeno de la posición 4 de la quinazolina actuando como donador de puente de hidrógeno y el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido.

Otro punto que es de importancia a discutir, es el número de poses obtenido en el acoplamiento molecular, para el compuesto **WK5**, que fue el que presentó mejor ΔG y con mejores resultados en las pruebas biológicas. Presentó el dato de menor número de poses de todo el conjunto de moléculas, esto puede ser un indicativo de que, el compuesto una vez interiorizado al sitio activo, tiene cierta estabilidad aún dentro de las pocas poses que puede presentar, no obstante, para poder demostrar esto, se tendrían que hacer posteriores estudios para comprobarlo.





7.3 Síntesis y caracterización física

La información de los productos sintetizados se encuentra concentrada en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Caracterización física y porcentaje de rendimiento de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Masa molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	R. f CHCl ₃ -MeOH (7:3)	Rendimiento (%)	Apariencia física
1	205.18	Descomposición 359 °C	0.625	84	Sólido naranja
2	175.20	219.9 – 220.4	0.250	96	Sólido amarillo
WK 1	279.30	358 – 360	0.425	47	Sólido beige
WK 2	313.74	330 – 331	0.450	52	Sólido beige
WK 3	313.74	340 – 341	0.425	43	Sólido beige
WK 4	313.74	336 – 338	0.425	48	Sólido beige
WK 5	348.19	337 – 338	0.475	41	Sólido beige

El intermediario **1**, fue sintetizado mediante una variación a la reacción de Niementowski. [19] Debido a que la reacción presentó la formación de un subproducto, se llevó a cabo la purificación de éste mediante la agitación con metanol para retirar dicho subproducto. Por esto, el rendimiento de la reacción no pudo ser más alto; no obstante, se obtuvo un rendimiento bastante bueno que permitió obtener el producto de partida, de manera confiable y rápida.

Para la reacción de reducción, la hidrogenación catalítica permitió obtener resultados con muy buenos rendimientos. Para que la reacción se llevara a cabo de manera correcta, fue importante que los reactivos se encontraran en disolución, por ello la temperatura y la cantidad de metanol son puntos claves en la reacción. Este método, que fue utilizado con formiato de amonio, también permitió obtener el producto en un tiempo promedio de 4 h (siguiendo la reacción por ccf). Al momento de evaporar el disolvente, el sólido obtenido no resultó uniforme, esto debido a pequeñas trazas de impurezas que pudieron quedar de **1**; dichas impurezas, fueron fácilmente removidas con acetona, dejando un producto totalmente puro. Finalmente, una última ventaja que presentó dicho método de síntesis es que **2**, fue sumamente estable y no presentó problemas de oxidación o descomposición alguna.

En el caso de la obtención de los compuestos finales, es de suma importancia mantener muy controladas todas las variantes de la reacción, esto debido a que la molécula contaba con 3 sitios nucleofílicos susceptibles a la reacción de adición/eliminación con el respectivo cloruro de benzoilo.

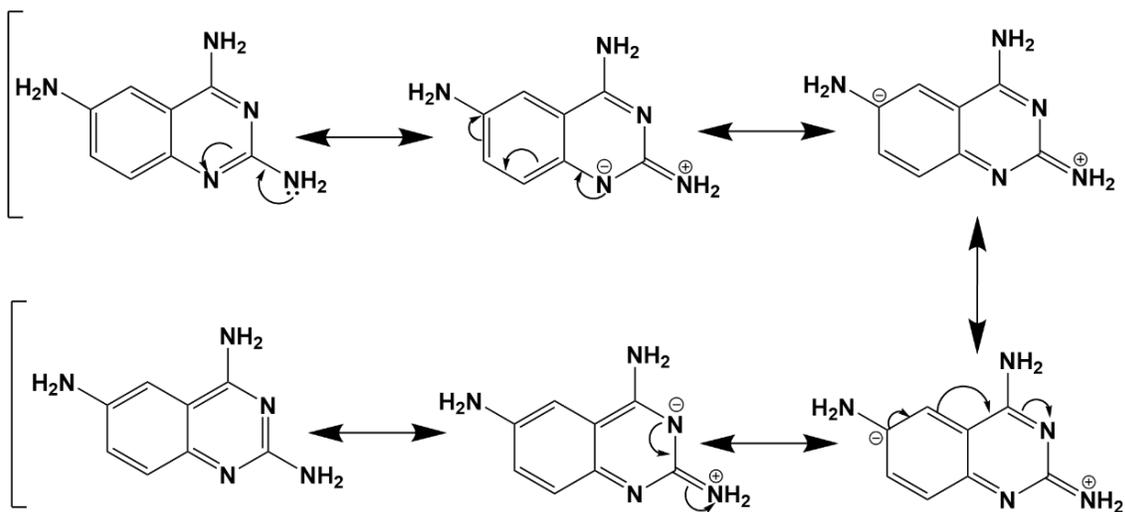
Se decidió seguir la ruta sintética propuesta sin proteger los aminos de la posición 2 y 4, ya que teóricamente el amino en posición 6 de la quinazolina, presentaría las mayores características nucleofílicas. Para la explicación de esta consideración, se



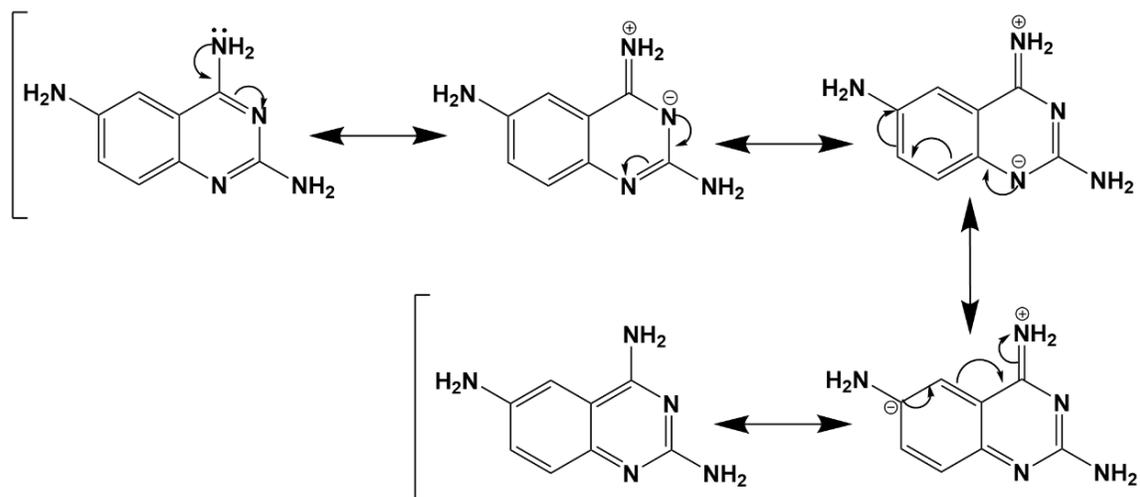


presentan a continuación en la **Figura 15**, las estructuras resonantes de cada uno de los grupos aminos presentes en el intermediario **2**.

Amino en posición 2



Amino en posición 4



Amino en posición 6

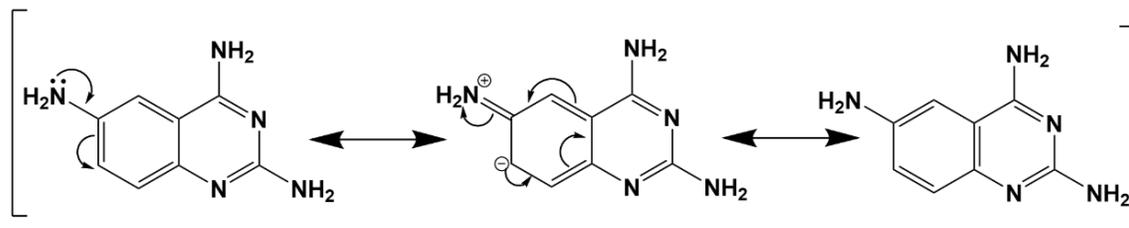


Figura 15. Estructuras resonantes de **2**.





Como se puede apreciar, los aminos de las posiciones 2 y 4, presentan en varias estructuras resonantes una carga positiva que no permitiría un ataque nucleofílico; mientras que el amina de la posición 6, tiene su par electrónico disponible y únicamente participa en estructuras resonantes en la parte del anillo de benceno del núcleo heterocíclico. Un segundo aspecto a considerar, es la cantidad de estructuras resonantes, el amina en posición 6 presenta menos estructuras resonantes. Por otro lado, el amina en posición 2 presenta una mayor cantidad de estructuras resonantes, teniendo mayor estabilidad y baja nucleofilia; ocurriendo un caso similar en el grupo amina de la posición 4. Gracias a todo lo anterior, el amina de la posición 6 posee mayor nucleofilia y la reacción de adición-eliminación se llevará preferentemente sobre dicha posición.

No obstante, a pesar de ser el sitio más favorable para la formación de la amida, fue de suma importancia controlar las condiciones de reacción como ya se había dicho. Por lo tanto, se decidió utilizar acetonitrilo como disolvente, donde los cloruros de ácido eran solubles, y ya que, si bien el intermediario **2** no era totalmente soluble, por la ley de acción de masas, las moléculas que iban reaccionando para dar lugar a la formación de los productos finales, desplazarían la reacción hacia los productos (este último se presentó como precipitado); siendo un cambio muy notable el color del sólido formado en la reacción. Éste pasaba de un color amarillo intenso a un color crema. La temperatura de igual manera ayudaba a dar la formación de dicho producto; sin embargo, uno de los puntos más cruciales fue el tiempo de reacción; de permitir a la reacción continuar por tiempos prolongados, era muy probable que las posiciones 2 y 4 comenzaran a reaccionar. Podemos considerar que la formación de la amida en la posición 6 como el producto cinético de la reacción, por ello fue importante monitorearla mediante ccf para observar la formación de un solo producto. Sobre estas reacciones se puede mencionar que se obtienen rendimientos menores al 50%, debido a problemas en el aislamiento del producto final.

Debido al tratamiento de la última reacción, se tuvo que realizar una purificación para extraer trazas de la materia prima de partida (**2**). Ya que este intermediario, presentaba buena solubilidad en metanol, se decidió utilizar pequeños volúmenes de este disolvente en frío para retirar únicamente la materia prima. Esto fue posible en los compuestos **WK1–WK3**. Sin embargo, dado que los compuestos **WK4–WK5**, fueron medianamente solubles en metanol, se decidió añadir un pequeño volumen de DMF para solubilizarlos en su totalidad, y posteriormente precipitarlos con la adición de una solución saturada de NaCl en agua; de esta manera las impurezas se quedaron en la mezcla de la solución salina y DMF. Con este procedimiento, se presentó el inconveniente para **WK5**, el cual se obtuvo con una pequeña cantidad de DMF, por lo que en sus respectivos espectros de RMN, se pueden encontrar señales características de este disolvente.

Una prueba adicional que se realizó a los compuestos finales fue ponerlos en contacto con ninhidrina para revelar la presencia de grupos aminos. El resultado fue positivo para cada uno de ellos, indicando que al menos se cuenta con un grupo amina en las moléculas obtenidas.



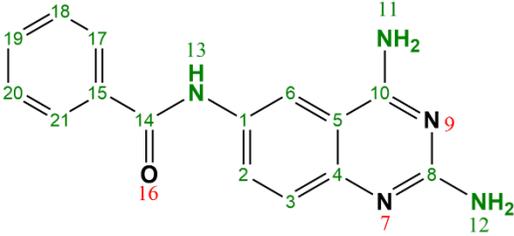


Acerca de los valores de *R.f* determinados, podemos apreciar que los compuestos finales comparten valores bastante similares entre sí, siendo la molécula **WK5**, el compuesto que presenta mayor valor, contejando muy bien con su valor predicho de logP. Esto como se discutió anteriormente, sería una buena razón por la que este compuesto pudiese atravesar de mejor manera la membrana celular y tener buenos resultados en las pruebas biológicas (sección 7.6). A su vez, los valores de punto de fusión permiten observar que se tiene bastante estabilidad en los mismos, lo cual es positivo para la finalidad para la que fueron diseñados.

7.4 Caracterización espectroscópica y espectrométrica

A continuación, presenta la información espectroscópica y espectrométrica de las moléculas finales. Sus respectivos espectros pueden encontrarse en la sección de **Anexos**, mientras que la información de los espectros RMN NOESY será presentada en una parte posterior a manera de ejemplo, y de igual manera, toda la información completa puede encontrarse en la sección de **Anexos**.

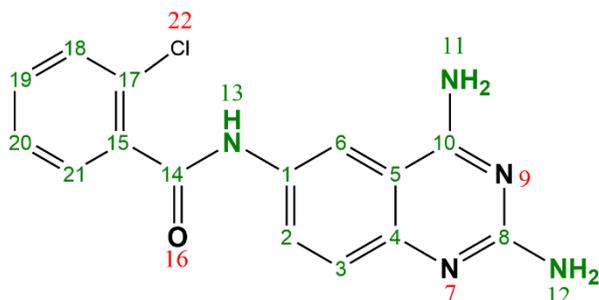
Tabla 8. Datos espectroscópicos y espectrométricos.

Estructura	Datos de caracterización
 <p>N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) benzamida (WK1)</p>	<ul style="list-style-type: none">- IR, ATR (cm⁻¹): 3280, 2928 y 1492 (N-H), 1643 (C=O), 1579 (C=N_{arom}), 3152, 1555, 1446 y 1002 – 729 (C=C_{arom}), 683 (C=C_{arom} mono), 1362 (C-N).- NMR-¹H (600 MHz, DMSO-D6), δ(ppm): 12.58 (s, 1H₁₃), 10.57 (s, 1H₁₁), 8.91 (s, 1H₁₂), 8.76 (s, 1H₁₂), 8.60 (d, J = 2.2 Hz, 1H₃), 8.02 (dd, J = 7.3, 1.8 Hz, 2H₁₇₋₂₁), 7.90 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H₂), 7.74 (s, 1H₁₁), 7.64 – 7.61 (m, 1H₁₉), 7.59 – 7.54 (m, 2H₁₈₋₂₀), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H₆).- NMR-¹³C (151 MHz, DMSO-D6), δ(ppm): 165.45 C₁₄, 162.86 C₁₀, 154.59 C₈, 135.98 C₄, 134.89 C₃, 134.17 C₂, 131.85 C₁, 130.24 C₁₅, 128.48 2C₁₇₋₂₁, 127.74 2C₁₈₋₂₀, 117.15 C₁₉, 116.97 C₅, 109.21 C₆.- EM-DART + (m/z): M [H⁺] = 279





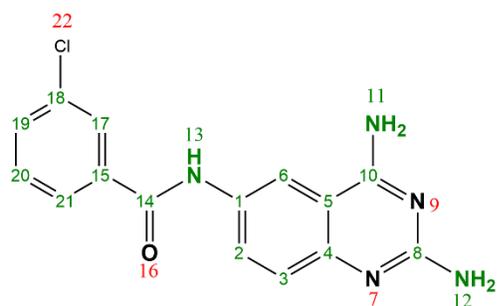
Estructura



**2-cloro-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)
benzamida
(WK2)**

Datos de caracterización

- **IR, ATR (cm^{-1}):** 3259, 2946 y 1494 (N-H), 1639 (C=O), 1563 (C=Narom), 3143, 1534, 1438, 1050 – 724 y 675 (C=Carom), 739 (C-Xorto), 1362 (C-N).
- **NMR- ^1H (600 MHz, DMSO-D $_6$), δ (ppm):** 13.15 (s, 1H $_{13}$), 10.84 (s, 1H $_{11}$), 9.04 (s, 1H $_{12}$), 8.79 (s, 1H $_{12}$) 8.59 (d, J = 2.3 Hz, 1H $_3$), 7.85 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H $_2$), 7.73 (s, 1H $_{11}$), 7.61 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H $_{19}$), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 1H $_{21}$), 7.52 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H $_{20}$), 7.49 (s, 1H $_{18}$), 7.47 (d, J = 7.6 Hz, 1H $_6$).
- **NMR- ^{13}C (151 MHz, DMSO-D $_6$), δ (ppm):** 165.04 C $_{14}$, 162.79 C $_{10}$, 154.57 C $_8$, 136.47 C $_4$ 135.98 C $_3$, 134.61 C $_2$, 131.30 C $_1$, 130.02 C $_{15}$, 129.75 C $_{17}$, 129.16 C $_{21}$, 129.01 C $_{20}$, 127.30 C $_{18}$, 117.37 C $_{19}$, 115.67 C $_5$, 109.31 C $_6$.
- **EM-DART + (m/z):** M [H $^+$] = 314



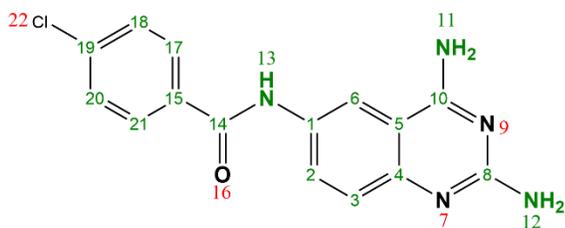
**3-cloro-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)
benzamida
(WK3)**

- **IR, ATR (cm^{-1}):** 3310, 2843 y 1494 (N-H), 1655 (C=O), 1598 (C=Narom), 3130, 1538, 1442, 1077 – 734 y 670 (C=Carom), 734 (C-Xmeta), 1362 (C-N).
- **NMR- ^1H (600 MHz, DMSO-D $_6$), δ (ppm):** 12.71 (s, 1H $_{13}$), 10.72 (s, 1H $_{11}$), 9.0 (s, 1H $_{12}$), 8.80 (s, 1H $_{12}$) 8.59 (d, J = 2.2 Hz, 1H $_3$), 8.08 (t, J = 2.0 Hz, 1H $_{20}$), 8.00 – 7.97 (m, 1H $_{19}$), 7.92 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H $_2$), 7.79 (s, 1H $_{11}$), 7.70 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H $_{21}$), 7.60 (t, J = 7.9 Hz, 1H $_{17}$), 7.50 (d, J = 8.8 Hz, 1H $_6$).
- **NMR- ^{13}C (151 MHz, DMSO-D $_6$), δ (ppm):** 164.04 C $_{14}$, 162.86 C $_{10}$, 154.46 C $_8$, 136.14 C $_4$, 135.84 C $_3$, 134.67 C $_2$, 133.32 C $_{18}$, 131.69 C $_1$, 130.52 C $_{15}$, 130.25 2C $_{21-17}$, 109.21 C $_6$.
- **EM-DART + (m/z):** M [H $^+$] = 314





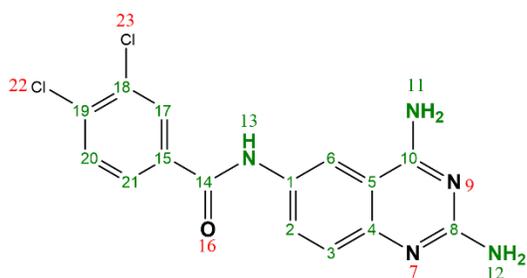
Estructura



**4-cloro-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)
benzamida
(WK4)**

Datos de caracterización

- **IR, ATR (cm^{-1}):** 3456, 2855 y 1488 (N-H), 1650 (C=O), 1593 (C=Narom), 3140, 1535, 1442, 1086 – 732 y 679 (C=Carom), 820 (C-Xpara), 1360 (C-N).
- **NMR- ^1H (600 MHz, DMSO- D_6), δ (ppm):** 12.76 (s, 1H₁₃), 10.70 (s, 1H₁₁), 8.97 (s, 1H₁₂), 8.78 (s, 1H₁₂), 8.59 (d, J = 2.2 Hz, 1H₃), 8.08 – 8.04 (m, 2H₁₇₋₂₁), 7.91 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H₂), 7.77 (s, 1H₁₁), 7.67 – 7.62 (m, 2H₁₈₋₂₀), 7.49 (d, J = 8.8 Hz, 1H₆).
- **NMR- ^{13}C (151 MHz, DMSO- D_6), δ (ppm):** 164.39 C₁₄, 162.84 C₁₀, 154.54 C₈, 136.69 C₄, 135.84 C₃, 134.75 C₂, 132.85 C₁, 130.2 C₁₅, 129.76 2C₁₇₋₂₁, 128.54 2C₁₈₋₂₀, 117.15 C₁₉, 116.99 C₅, 109.18 C₆.
- **EM-DART + (m/z):** M [H^+] = 314



**3,4-dicloro-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)
benzamida
(WK5)**

- **IR, ATR (cm^{-1}):** 3308, 2884 y 1496 (N-H), 1676 (C=O), 1589 (C=Narom), 3149, 1555, 1469, 1031 – 745 y 663 (C=Carom), 824 (C-X tri), 1362 (C-N).
- **NMR- ^1H (600 MHz, DMSO- D_6), δ (ppm):** 12.56 (s, 1H₁₃), 10.76 (s, 1H₁₁), 9.0 (s, 1H₁₂), 8.80 (s, 1H₁₂), 8.57 (d, J = 2.2 Hz, 1H₃), 8.28 (d, J = 2.2 Hz, 1H₂₀), 8.00 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1H₂₁), 7.90 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H₂), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H₁₇), 7.72 (s, 1H₁₁), 7.50 (d, J = 8.8 Hz, 1H₆).
- **NMR- ^{13}C (151 MHz, DMSO- D_6), δ (ppm):** 163.18 C₁₄, 162.85 C₁₀, 154.46 C₈, 135.90 C₄, 134.67 C₃, 134.53 C₂, 134.44 C₁₈, 131.40 C₁, 130.84 C₁₅, 130.22 C₁₉, 129.69 2C₁₇₋₂₁, 128.12 C₂₀, 117.08 C₅ 109.21 C₆.
- **EM-DART + (m/z):** M [H^+] = 348





Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Sobre la información arrojada por el espectro de infrarrojo, se pueden confirmar principalmente la información de la presencia de grupos funcionales, de manera general, a valores un poco diferentes entre cada espectro. Se presentaron los valores característicos de grupos amino, o enlace N-H, entre 3400-3200, 2850-1450 cm^{-1} . En 1500 cm^{-1} podemos identificar los enlaces C=N del núcleo de quinazolina. El valor del grupo carbonilo suele ser de manera general 1550 cm^{-1} , sin embargo, ya que los grupos carbonilo presentes en las moléculas son de amidas, la cual se encuentra en resonancia y muestra un desplazamiento diferente al general, en estos espectros podemos localizar este enlace entre valores de 1680-1630 cm^{-1} . Otro grupo de señales muy características que pueden observarse son de la presencia de grupos aromáticos, encontrando señales por encima de 3000 cm^{-1} , aproximadamente en 3150 cm^{-1} , la presencia de sobretonos en la región de 1600-1500 cm^{-1} no puede apreciarse de manera adecuada, pero se encuentran señales en este intervalo. Finalmente, las señales que varían entre cada espectro son las señales fuera del plano (1000-400 cm^{-1}) correspondientes al tipo de sustitución que se da en los anillos de benceno del lado de la amida, los cuales son indicados en la tabla.

A manera de ejemplo, en el caso de **WK5** encontramos señales del enlace N-H en 3308, 2884 y 1496 cm^{-1} . La señal del grupo carbonilo en 1676 cm^{-1} . En 1589 cm^{-1} la señal del C=N del núcleo de quinazolina y las señales aromáticas del benceno disustituido en 3149 cm^{-1} , sobretonos en 1555 y 1469 cm^{-1} . Además de sus señales características de 1031-745 y 663 cm^{-1} .

Espectroscopia de RMN- ^{13}C

Respecto a estos análisis espectroscópicos se puede confirmar que existen el mismo número de señales características para cada tipo de carbono presente en la molécula. Algunas señales características son la del carbono de tipo carbonilo alrededor de 164 ppm, la señal del carbono de la posición 4 de la quinazolina en 162 ppm y la señal de la posición 2 de la quinazolina en 154 ppm. Por último, también son de importancia destacar los átomos de carbono que soportan a los respectivos átomos de cloro cuyos valores oscilan entre 134-117 ppm

A manera de ejemplo en la molécula **WK5**, encontramos la señal del carbonilo en 163.18 ppm, el carbono de la posición 4 en 162.85, el carbono de la posición 2 en 154.46 y finalmente de 135.90-117.08 ppm.





Espectroscopia de RMN-¹H

En esta espectroscopia se obtuvieron señales para cada tipo de hidrógeno presente en la molécula. De nueva cuenta ciertas señales y comportamientos característicos, por ejemplo, el hidrógeno de la amida presenta un singulete aproximado en 12.8 ppm. Las señales de los hidrógenos del grupo amino de la posición 2, se encuentran como dos singuletes entre 9.0 y 8.8 ppm, indicando la existencia de pequeñas diferencias entre ellos, siendo probable una interacción con el hidrógeno del amino de la posición 4 de uno de ellos. En el caso de los hidrógenos de la amina de la posición 4, se aprecia un efecto muy diferente, en este caso, cada hidrógeno da un singulete, los valores de estas señales difieren mucho entre sí, puesto que una señal se encuentra en 10.7 ppm y la otra en 7.8 ppm; esto indica que, aunque ambos átomos de hidrógeno son equivalentes, interaccionan de forma diferente en el ambiente químico, dando lugar a que no puedan considerarse como equivalentes. Este efecto podría deberse a la amida en posición 6, puesto que dicho grupo funcional se considera como un rotámetro, dando lugar a dos compuestos equivalentes, pero diferentes entre sí, siendo por lo tanto isómeros conformacionales con cierta rotación que ocasione la interacción de uno de los hidrógenos con esta porción de la molécula, mientras que el otro hidrógeno estaría interaccionando prácticamente sólo con uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino de la posición 2 (**Figura 16**).

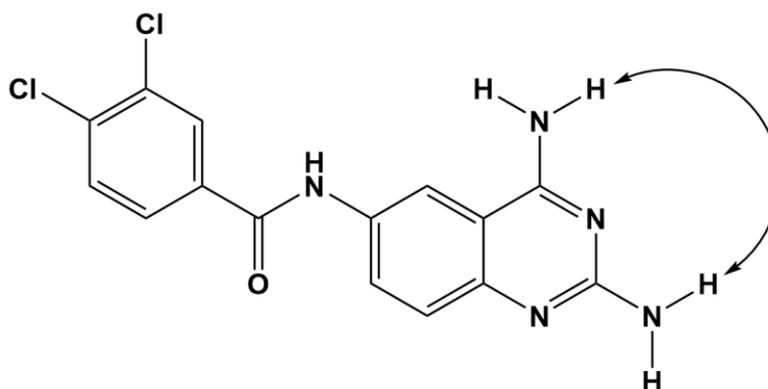


Figura 16. Interacción entre hidrógenos del grupo amino de la posición 2 y 4 de **WK5**.

Finalmente, en el rango de 7.2 a 8.2 ppm, se encuentran las señales aromáticas de la porción del benzoilo, que varían de acuerdo con las posiciones de sus sustituyentes, como lo es el patrón notable a-a' b-b' en la molécula que presenta la sustitución en posición para. Finalmente, puede apreciarse un desplazamiento de las señales a campo bajo debido al efecto electrotractor de la mayoría de los halógenos (**Figura 17**).



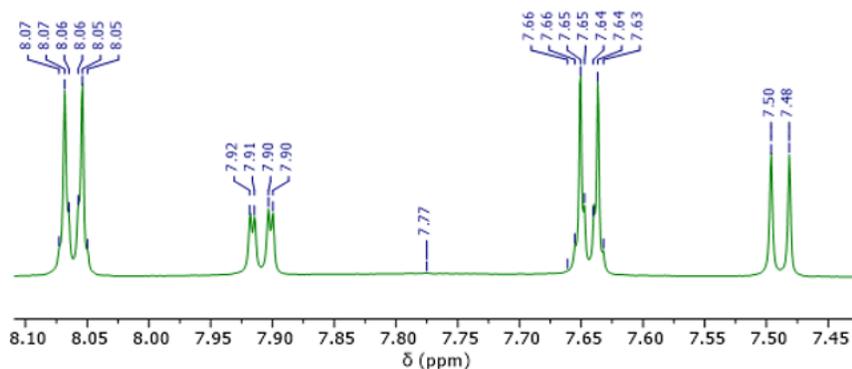


Figura 17. Señales aromáticas de la porción aromática de **WK4**.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de Overhauser (NOESY)

Debido a la metodología sintética que fue llevada a cabo, era de suma importancia determinar la posición dónde se formó la amida en el anillo de quinazolina, por esto, se solicitó de igual manera el análisis por espectroscopia NOESY, mismo que se presenta a continuación (**Figura 18**).

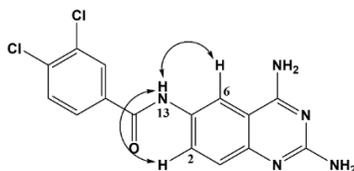
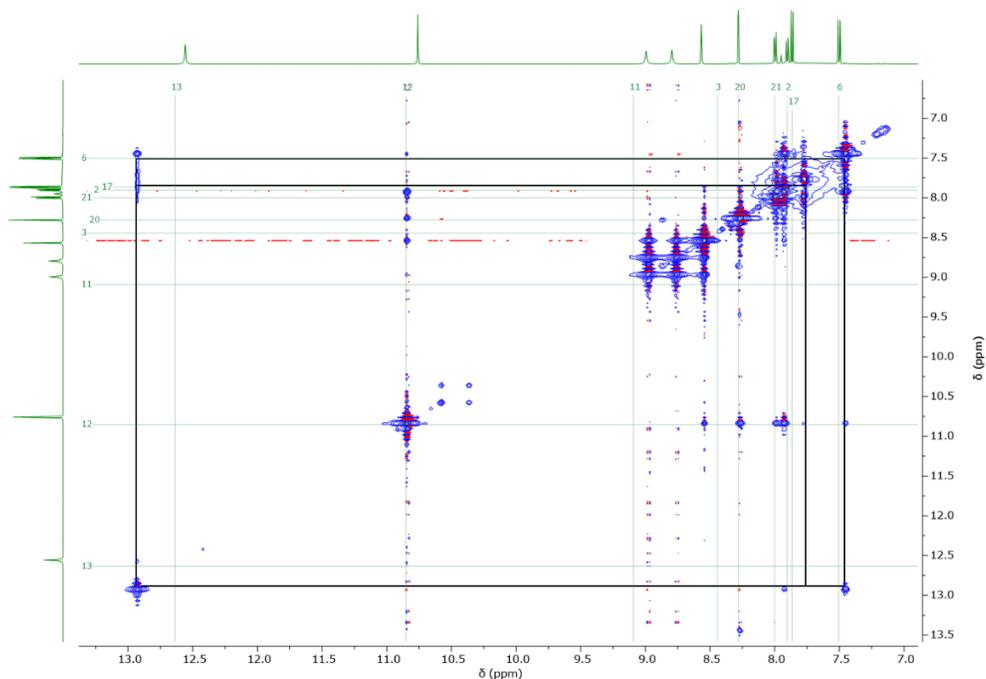


Figura 18. Espectro RMN NOESY de **WK5**. Se muestran las interacciones entre los H 2 y 6 de la quinazolina con el H 13 de la amida.





En el espectro NOESY se puede apreciar claramente que el hidrógeno de la amida presenta interacciones con los hidrógenos del anillo de benceno esperados, esto es un indicador que nos permite concluir firmemente que la amida fue formada en la posición 6 del núcleo de quinazolina. Este mismo patrón se presenta en cada uno de los espectros de los cinco compuestos finales, siendo un buen indicador de la obtención de todos ellos.

Espectrometría de Masas (EM)

El análisis espectrométrico se realizó por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) de baja resolución, dicha técnica nos permite conocer principalmente el ión molecular, el patrón de fragmentación no es algo de suma relevancia en este estudio, finalmente estos resultados confirman de manera satisfactoria la obtención de los compuestos propuestos.

7.4 Evaluación biológica

Como última actividad del proyecto, en la **Tabla 10** se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición en algunas líneas celulares que ofrece el servicio del Instituto de Química.

Los resultados fueron procesados a 48h después de la exposición a los productos finales en las líneas celulares de interés farmacéutico, siendo cuatro de ellas, líneas celulares cancerosas y una, COS-7, con fenotipo no tumoral. Ésta última fue usada para observar la toxicidad asociada que pueden tener los compuestos. ^[13] Por ello, se esperaría que los valores en las líneas MCF-7, MDA-MB-231, SK-Lu-1 y HCT-15 tuvieran valores más cercanos a 100%, mientras que en el caso de COS-7, mientras el valor sea más cercano a 0%, indica que los compuestos son menos tóxicos en líneas celulares sanas. Además, cabe recalcar que, de las líneas celulares cancerosas, MCF-7 cuenta con expresión significativa de EGFR, de acuerdo con la ATCC. Esta línea celular se considera hormono dependiente, al tener además de la expresión de EGFR, expresión de receptores de estrógenos y progesterona; en contra parte, la línea MDA-MB-231 se considera triple negativo, lo que es un buen contraste para observar el comportamiento de las moléculas en ambas condiciones fenotípicas. ^[20,21]

Tabla 10. Porcentaje de inhibición celular a las 48h a 20 μ M de los compuestos.

Compuesto	MCF-7	MDA-MB-231	SK-Lu-1	HCT-15	COS-7
WK 1	21.6 \pm 1.6	12.6 \pm 1.8	3.6 \pm 1.3	23.3 \pm 1.8	34.1 \pm 1.5
WK 2	65.6 \pm 1.8	32.4 \pm 1.8	4.4 \pm 1.8	12.5 \pm 1.8	37.6 \pm 1.8
WK 3	79.2 \pm 1.8	43.2 \pm 1.8	6.1 \pm 1.8	21.8 \pm 1.8	25.6 \pm 1.8
WK4	71.4 \pm 1.8	36.6 \pm 1.8	6.2 \pm 1.8	32.5 \pm 1.8	48.6 \pm 1.8
WK 5	85.9 \pm 1.8	68.3 \pm 1.8	8.7 \pm 1.8	32.8 \pm 1.8	58.6 \pm 1.8
Gefitinib	48.9 \pm 1.8	48.0 \pm 2.0	NA	68.5 \pm 16.8	64.3 \pm 3.2

NA: No Activo





Un resultado que salta a la vista rápidamente es que el compuesto **WK 5**, como ya se venía perfilando y mencionando, tuvo los mejores resultados de todo el ensayo, teniendo mayor efecto inhibitorio que la referencia (**Gefitinib**) en tres líneas celulares distintas, MCF-7, MDA-MB-231 y SK-Lu-1, siendo importante recalcar que en esta última línea, el Gefitinib no presentó actividad, por lo tanto todos los compuestos presentaron un mejor efecto citotóxico, aunque tampoco fue muy notable, ya que fueron valores muy bajos.

En el caso de MCF-7, como se mencionó anteriormente, es la línea que expresa mayor cantidad de EGFR de las que se estudiaron, por lo que es un punto favorable que las moléculas hayan sido más activas sobre este tipo celular.

Todos los compuestos con cloro en el anillo de benceno tienen mayor actividad citotóxica debido al efecto electroatractor, por un lado, además de teóricamente presentar menos metabolismo, debido a la sustitución en el anillo de benceno, ya que el compuesto con benceno puede ser sustituido con un OH en la posición para.^[9] Por otro lado, en las células MDA-MB-231, los compuestos siguieron presentando citotoxicidad, aun teniendo menor expresión de EGFR, lo que indicaría que los compuestos no solo actúan inhibiendo EGFR, también por otras vías, pudiendo ser una de ellas, la inhibición de cinasas, sin tener que estar acopladas directamente a un receptor. Este hecho se respalda con los resultados en SK-Lu-1 y HCT-15, siendo que ambas líneas expresan bajas cantidades de EGFR y los compuestos también presentaron actividad. Sobre los resultados en COS-7, el gefitinib tiene un valor de 64.3%, mientras que toda la serie de moléculas presentó valores menores, lo que demuestra que tienen menos efectos tóxicos en células sanas. El fundamento de que se quiera contar con un efecto citotóxico en líneas cancerosas, inverso al efecto tóxico en células sanas, se basa en que las células cancerosas, normalmente sobreexpresan EGFR, con el fin de aumentar su proliferación, que en contraparte, las células sanas, de manera normal, expresan menor cantidad de EGFR, por lo que, hay mayor probabilidad de que los compuestos inhiban a este receptor en líneas celulares tumorales, disminuyendo la viabilidad celular.

A manera de conclusión, **WK5** presentó resultados prometedores, teniendo mejores valores en las líneas cancerosas y menor efecto tóxico que el Gefitinib en la línea sana, por lo que puede considerarse a **WK5** como el lead de la serie de compuestos. Un compuesto que vale la pena resaltar, es a **WK3**, ya que fue el compuesto que presentó una toxicidad menor en líneas celulares sanas.





8. Conclusiones

Se sintetizaron 5 nuevos compuestos derivados de la 2,4,6-triaminoquinazolina y fueron caracterizados por las técnicas de IR, RMN-¹³C, RMN-¹H, RMN NOESY y EM. Además, se realizó la predicción de descriptores químicos, involucrados en las reglas de Lipinski-Veber, ninguno de los valores incumplió con citado en estas reglas semiempíricas.

Los compuestos fueron evaluados mediante el ensayo de SRB, resultando dos hits, las moléculas **WK3** y **WK5**. En el caso de las moléculas anteriormente citadas mostraron mejores valores que el fármaco gefitinib en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Algo de suma importancia recalcar, es el hecho de que todos los compuestos fueron menos tóxicos que el gefitinib en la línea celular COS-7, por lo que estos compuestos podrían presentar menores efectos adversos.

La molécula **WK5** fue el *lead* de esta serie de compuestos, puesto que presentó mejores resultados de citotoxicidad, relacionados con el mejor perfil energético en el estudio de acoplamiento molecular en EGFR.

Los resultados de las pruebas biológicas muestran también que los compuestos no actúan únicamente sobre EGFR, pero la inhibición de este receptor es algo que permite obtener mejores valores de citotoxicidad.





9. Perspectivas

Como perspectivas de este trabajo de tesis, para obtener resultados más congruentes y dar una mejor explicación, considero importante realizar los siguientes ensayos:

Realizar la determinación de la IC_{50} de los compuestos, o en su caso, de los compuestos **WK3** y **WK5**.

Realizar determinación de citotoxicidad en más líneas celulares cancerosas con alta expresión de EGFR, así como con nula expresión del receptor.

Realizar un ensayo de inhibición directa sobre EGFR.

Considerar otras vías alternas a EGFR sobre las cuales los compuestos pudieran estar ejerciendo su efecto citotóxico, realizando ensayos de inhibición enzimática.

Realizar el estudio de dinámica molecular de **WK3** y **WK5** para observar el tipo de interacción presente con la diana farmacológica.

Finalmente, considero que algo de suma importancia es la optimización del compuesto *lead*, con el fin de mejorar sus efectos citotóxicos en células cancerosas y disminuir la toxicidad sobre células sanas.





10. Referencias bibliográficas

- (1) NIH. *Cancer Biology*. <https://irp.nih.gov/our-research/scientific-focus-areas/cancer-biology>.
- (2) (OMS), O. M. de la S. *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- (3) Hernández Luis, F.; Mouret Hernández, C.; Bravo Gómez, M.; Centeno Llanos, S.; Quijano Mateos, A.; Castañeda López, P. *Fundamentos de Toxicología Para Químicos Farmacéuticos Biólogos*, 1a ed.; UNAM: Ciudad de México, 2017.
- (4) Karp, G. *Biología Celular y Molecular*, 4a ed.; Ciudad de México, 2011.
- (5) INEGI. *Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer (4 de Febrero). Datos Nacionales*; Ciudad de México, 2022.
- (6) Organización Mundial de la Salud. *México. Globocan 2020*; Ciudad de México, 2020.
- (7) NIH. *National Cancer Institute. Tipos de tratamiento*. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.
- (8) DeVita Jr., V. T.; Chu, E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, 68 (21), 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
- (9) Patrick, G. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 5a ed.; United Kingdom, 2013.
- (10) Ravani, R. M.; Patel, L. J. SYNTHESIS AND SCREENING OF QUINAZOLINE ANALOGUES AS CYTOTOXIC AGENTS. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **2016**, 8 (2 SE-Research Article). <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2016.080205>.
- (11) Rina Das, D. K. M. and M. D. Bestowal of Quinazoline Scaffold in Anticancer Drug Discovery. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2022**, 22 (17). <https://doi.org/10.2174/1871520620666200627205321>.
- (12) da Cunha Santos, G.; Shepherd, F. A.; Tsao, M. S. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2011**, 6 (1), 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130206>.
- (13) ATCC. *Cell Products*. 2022. <https://www.atcc.org/>.
- (14) The Human Protein Atlas. *EGFR*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/cell+line>.
- (15) Swiss Institute of Bioinformatics. *SwissADME*. <http://www.swissadme.ch/>.
- (16) RCSB PDB. *Protein Data Bank*. <https://www.rcsb.org/structure/4WKQ>.
- (17) Zhang Lab. *DockRMSD*. <https://zhanggroup.org/DockRMSD/>.





- (18) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- (19) Kakati, P.; Singh, P.; Yadav, P.; Awasthi, S. K. Aiding the Versatility of Simple Ammonium Ionic Liquids by the Synthesis of Bioactive 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine, 2-Aminothiazole and Quinazolinone Derivatives. *New J. Chem.* **2021**, *45* (15), 6724–6738. <https://doi.org/10.1039/D1NJ00280E>.
- (20) Camarillo, I. G.; Xiao, F.; Madhivanan, S.; Salameh, T.; Nichols, M.; Reece, L. M.; Leary, J. F.; Otto, K.; Natarajan, A.; Ramesh, A.; Sundararajan, R. 4 - Low and High Voltage Electrochemotherapy for Breast Cancer: An in Vitro Model Study; Sundararajan, R. B. T.-E.-B. T. for C., Ed.; Woodhead Publishing, 2014; pp 55–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781908818294.55>.
- (21) Theodossiou, T. A.; Ali, M.; Grigalavicius, M.; Grallert, B.; Dillard, P.; Schink, K. O.; Olsen, C. E.; Wälchli, S.; Inderberg, E. M.; Kubin, A.; Peng, Q.; Berg, K. Simultaneous Defeat of MCF7 and MDA-MB-231 Resistances by a Hypericin PDT–Tamoxifen Hybrid Therapy. *npj Breast Cancer* **2019**, *5* (1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0108-8>.
- (22) Nieto, A. PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA COMO AGENTES CITOTÓXICOS POTENCIALES EN LÍNEAS TUMORALES MALÍGNAS, Ciudad de México, 2016.





Anexos

Instrumental y material utilizado

Los reactivos utilizados en la síntesis de los compuestos son comercializados por la marca Sigma Aldrich®, mientras que los disolventes utilizados son de la marca J.T. Baker® de grado analítico, sin tratamiento previo.

Para el proceso de pesado se hizo uso de una balanza analítica de la marca Sartorius™ modelo CP124 S.

El calentamiento y agitación para las reacciones se llevaron a cabo en parrillas de la marca IKA® modelos RET control-visc C, RCT basic y C-MAG HS 4.

Para evaporar disolventes, fue usado un rotaevaporador de la marca IKA® modelo RV 10 digital, acoplado a una bomba de vacío marca Vacuubrand® modelo CVC 3000 y un refrigerante de espiral marca Brinkmann™.

La determinación de puntos de fusión de los intermediarios y productos finales se llevó a cabo en un aparato térmico digital de la marca Electrothermal® modelo 9300.

Para la determinación de *r.f.* y de seguimiento de avance de las reacciones mediante ccf., se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel de fase normal de la marca SORTECH®, con indicador fluorescente a 240 nm. El revelado de las mismas se hizo mediante dos técnicas: exposición a luz UV en una lámpara Spectroline®, modelo ENF-240C y disolución de ninhidrina como revelador de aminas.

Para la caracterización de espectroscopia de IR, RMN-¹³C, RMN-¹H y RMN NOESY se hizo uso del servicio otorgado por la USAII.

Los ensayos de prueba biológicas fueron realizados a cabo en el Instituto de Química.

El software Chemdraw Professional fue utilizado para la nomenclatura de los compuestos finales, obtención de códigos SMILES, generación de las estructuras y esquemas presentadas en este trabajo, el software Chem3D fue usado para la minimización energética de los ligandos, el software Chimera tuvo un uso particular para la preparación de la proteína, para llevar a cabo el acoplamiento molecular se hizo uso del software LeDock, el software Maestro se utilizó para la visualización de los resultados del acoplamiento molecular y finalmente se ocupó el software MestreNova para el análisis espectroscópico.

Los análisis de RMN se realizaron en un espectrómetro de RMN de 14.09 T (600 MHz) Marca Jeol, Modelo ECZ600R, propiedad de la USAII, dónde fueron realizados.

Los análisis de IR fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro de FTIR Spectrum RXI de Perkin-Elmer, propiedad de la USAII, dónde fueron realizados.

Finalmente, los análisis de EM fueron realizados en un espectrómetro de masas, JEOL The AccuTOF: JMS-T100LC, propiedad del Instituto de Química, dónde fueron realizados.





Acoplamiento molecular

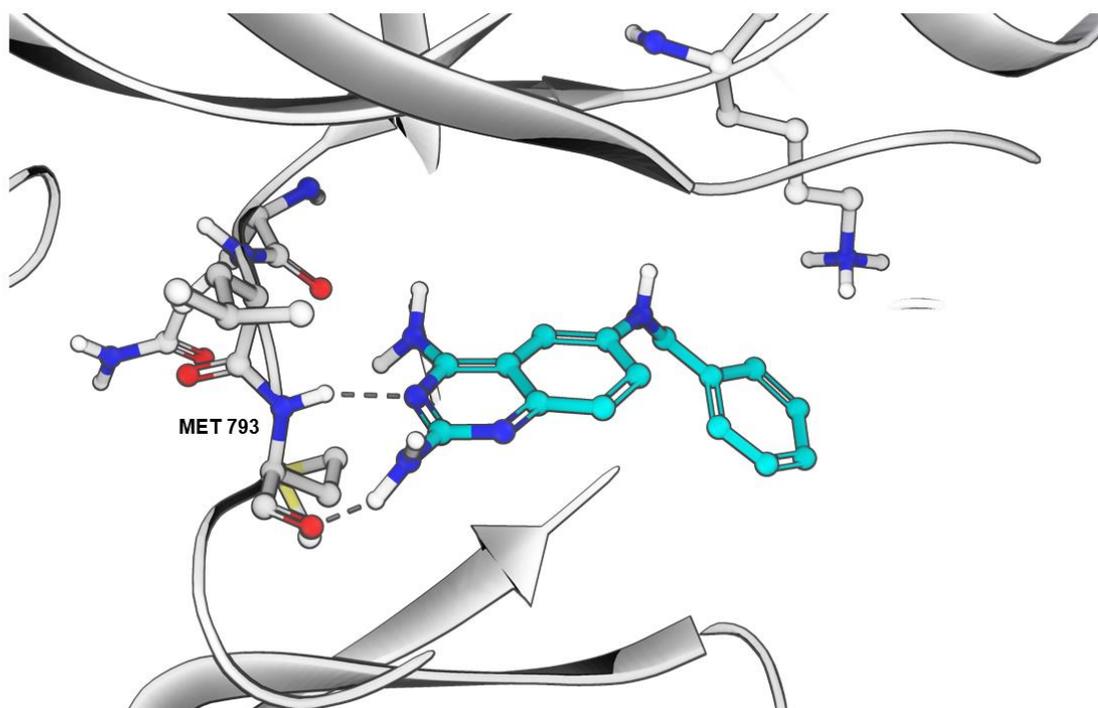


Figura 19. Visualización 3D de WK1.

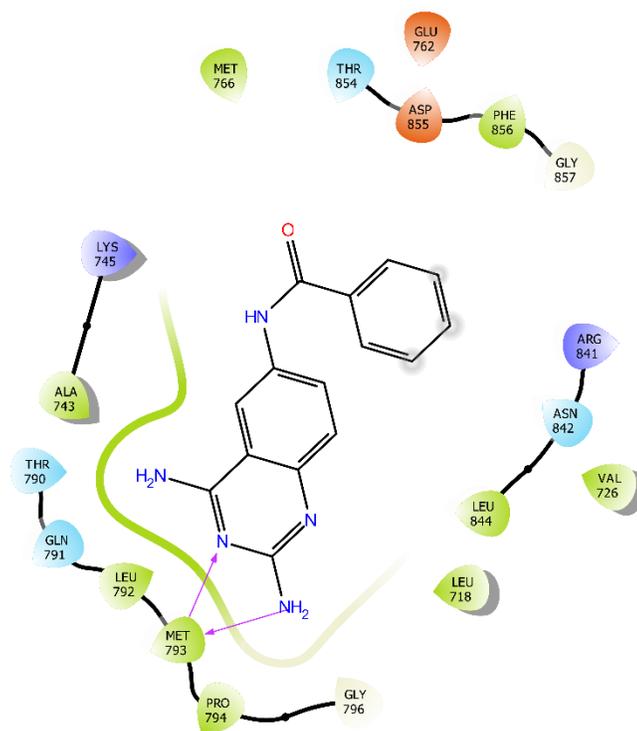


Figura 20. Visualización 2D de WK1.



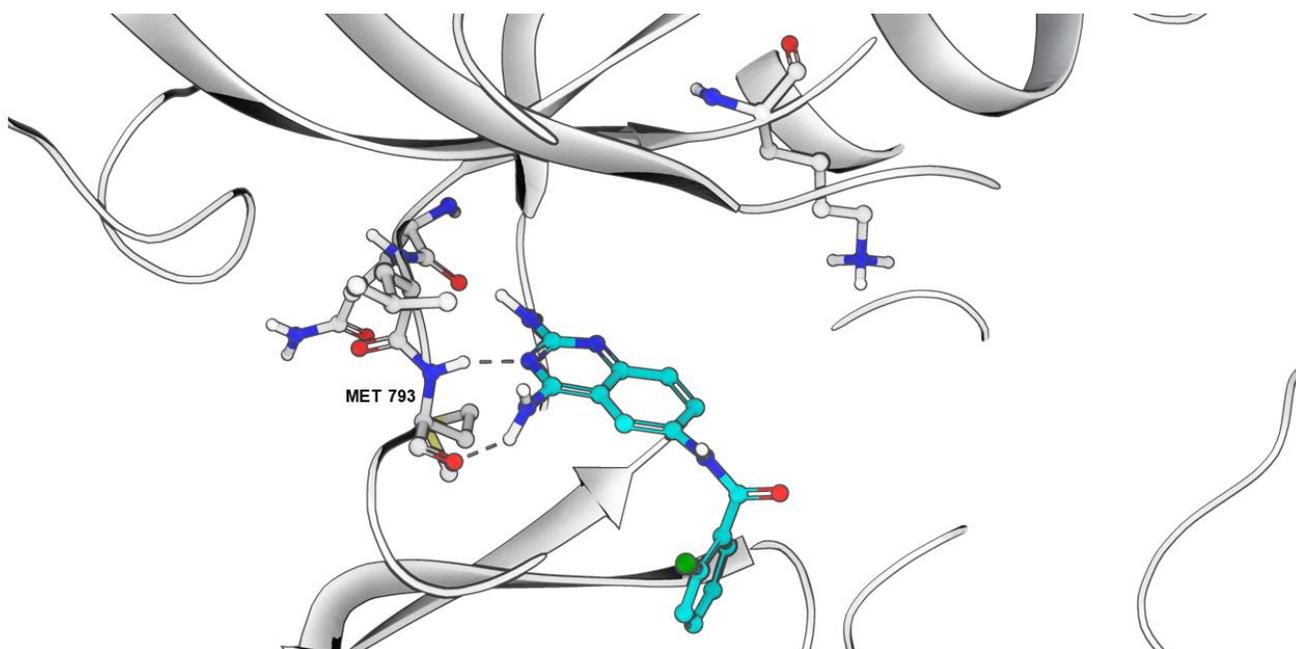


Figura 21. Visualización 3D de WK2.

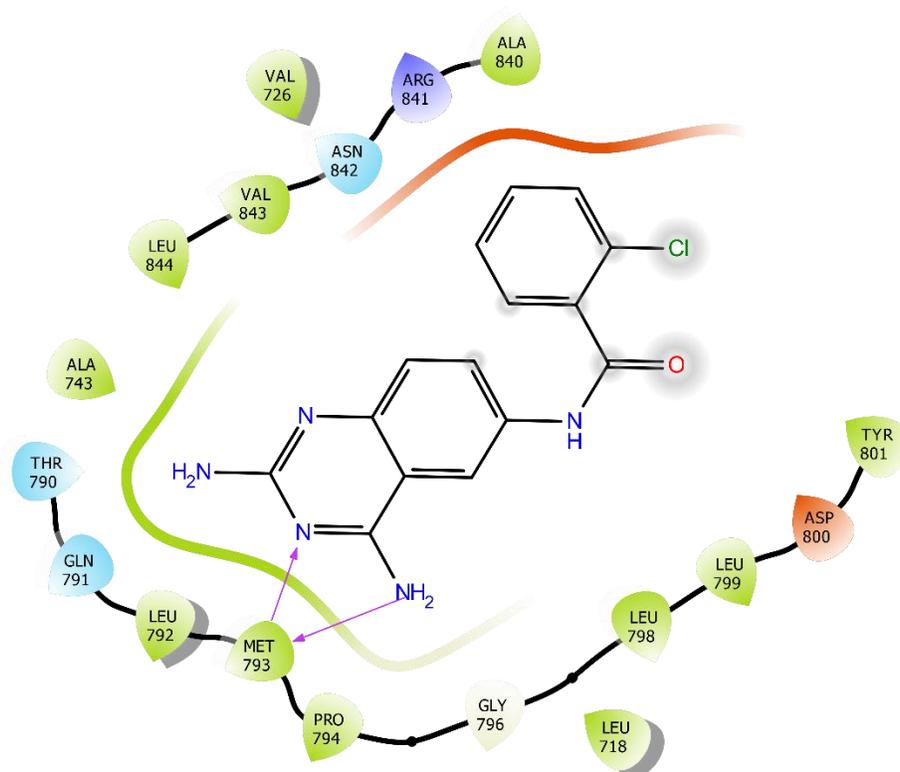


Figura 22. Visualización 2D de WK2.



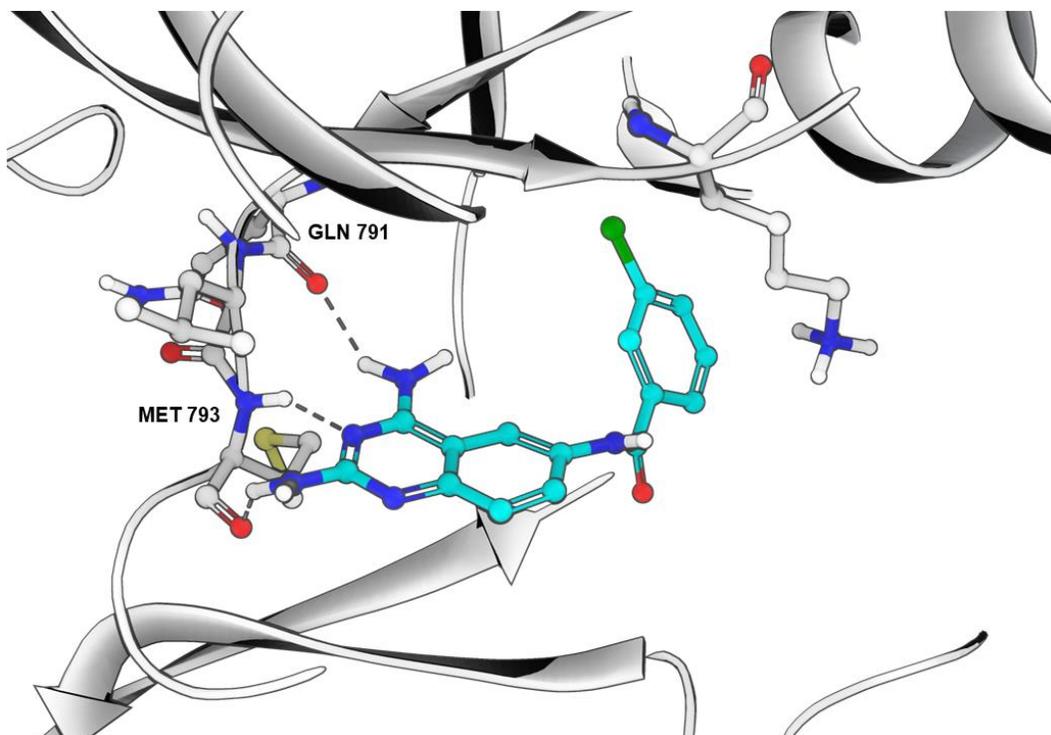


Figura 23. Visualización 3D de WK3.

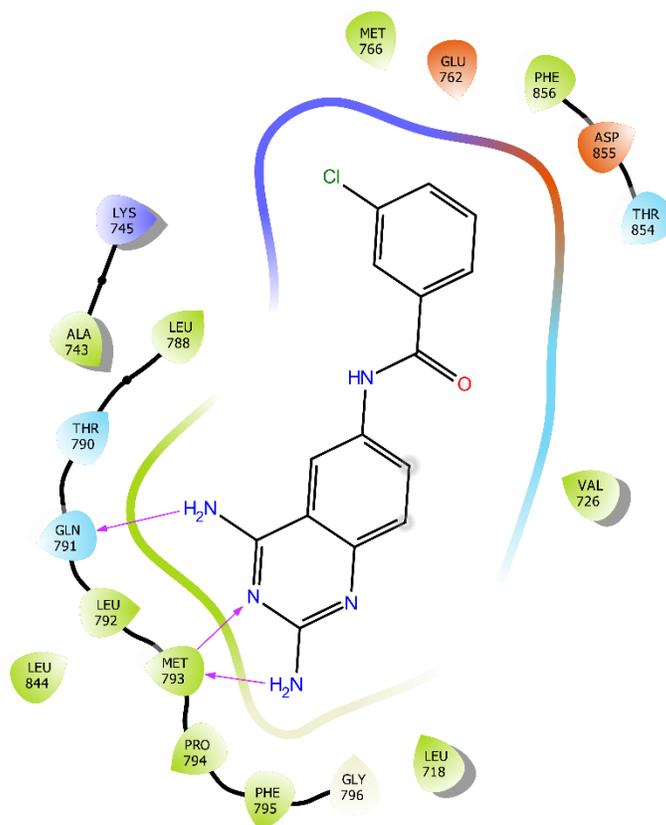


Figura 24. Visualización 2D de WK3.



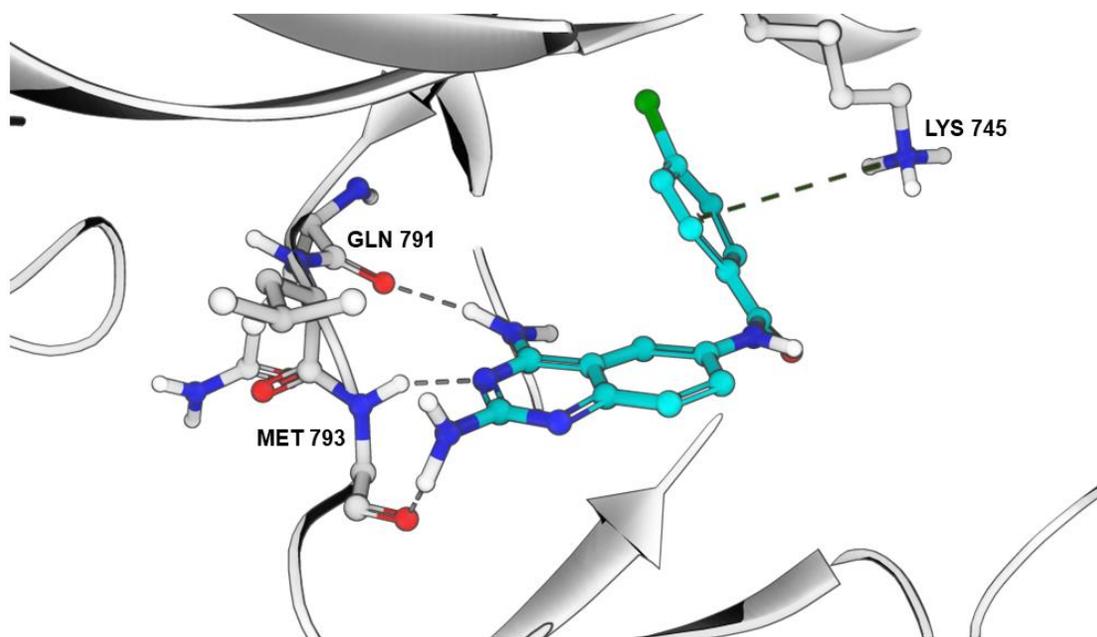


Figura 25. Visualización 3D de WK4.

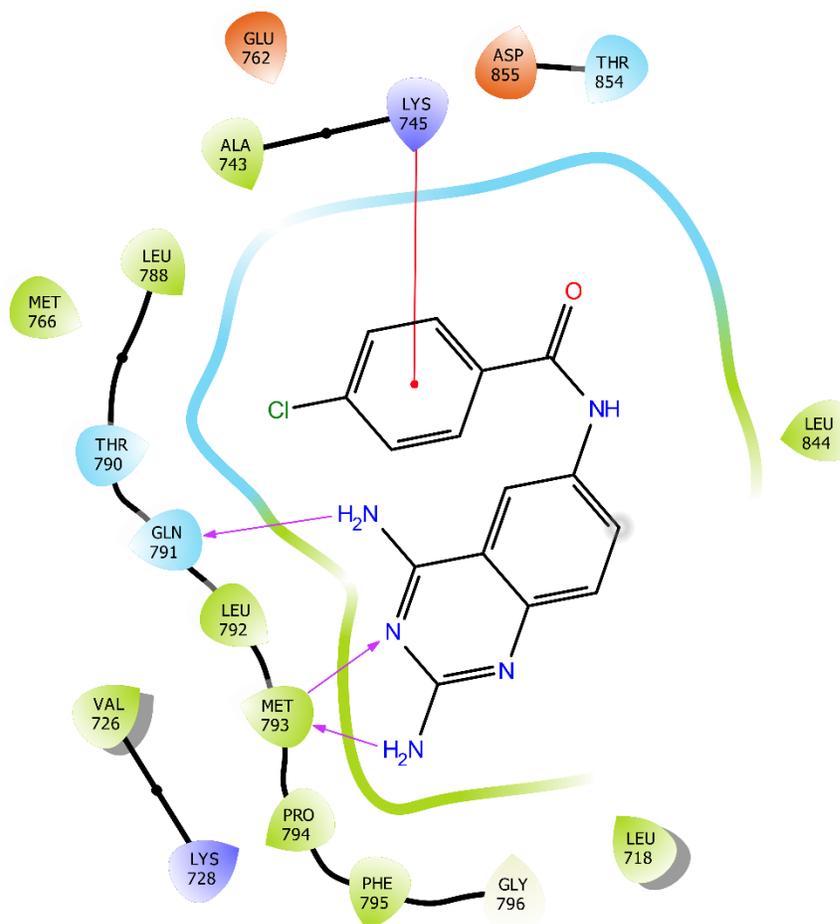


Figura 26. Visualización 2D de WK4.



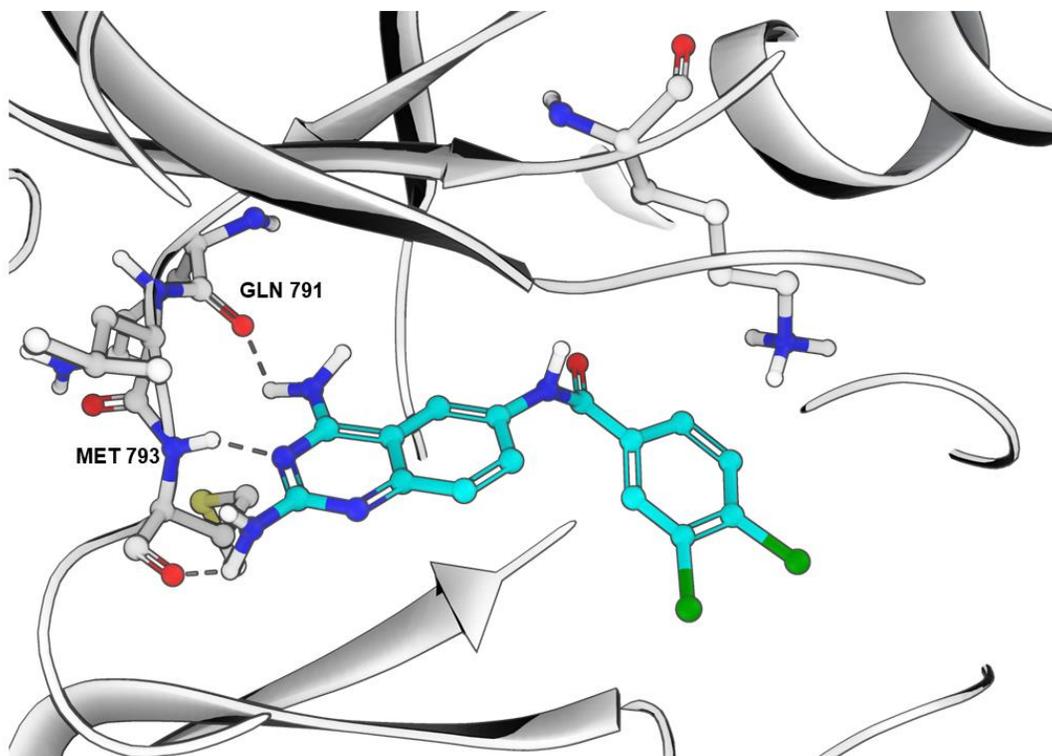


Figura 27. Visualización 3D de WK5.

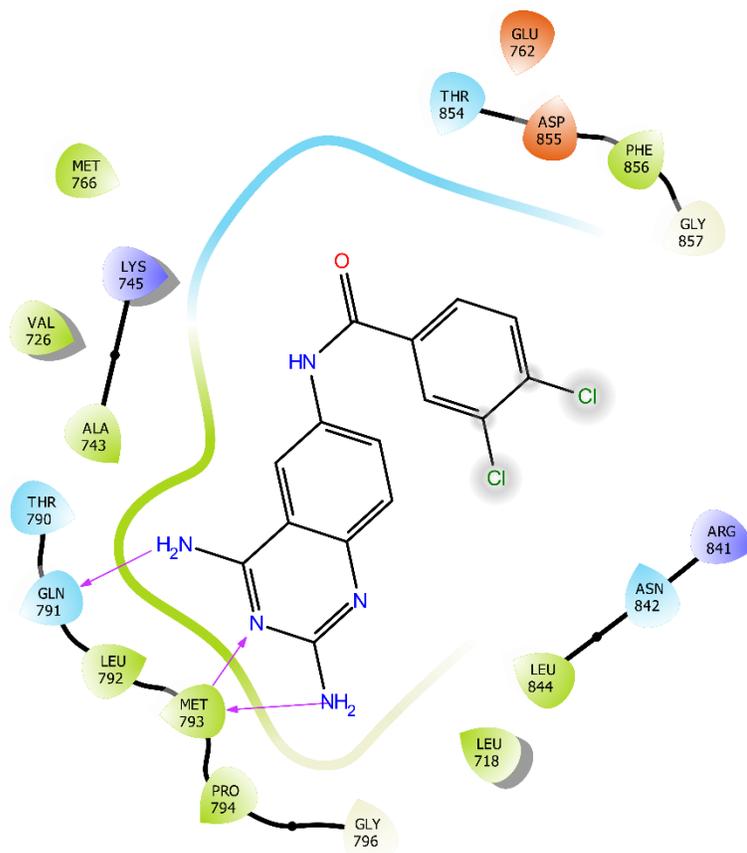
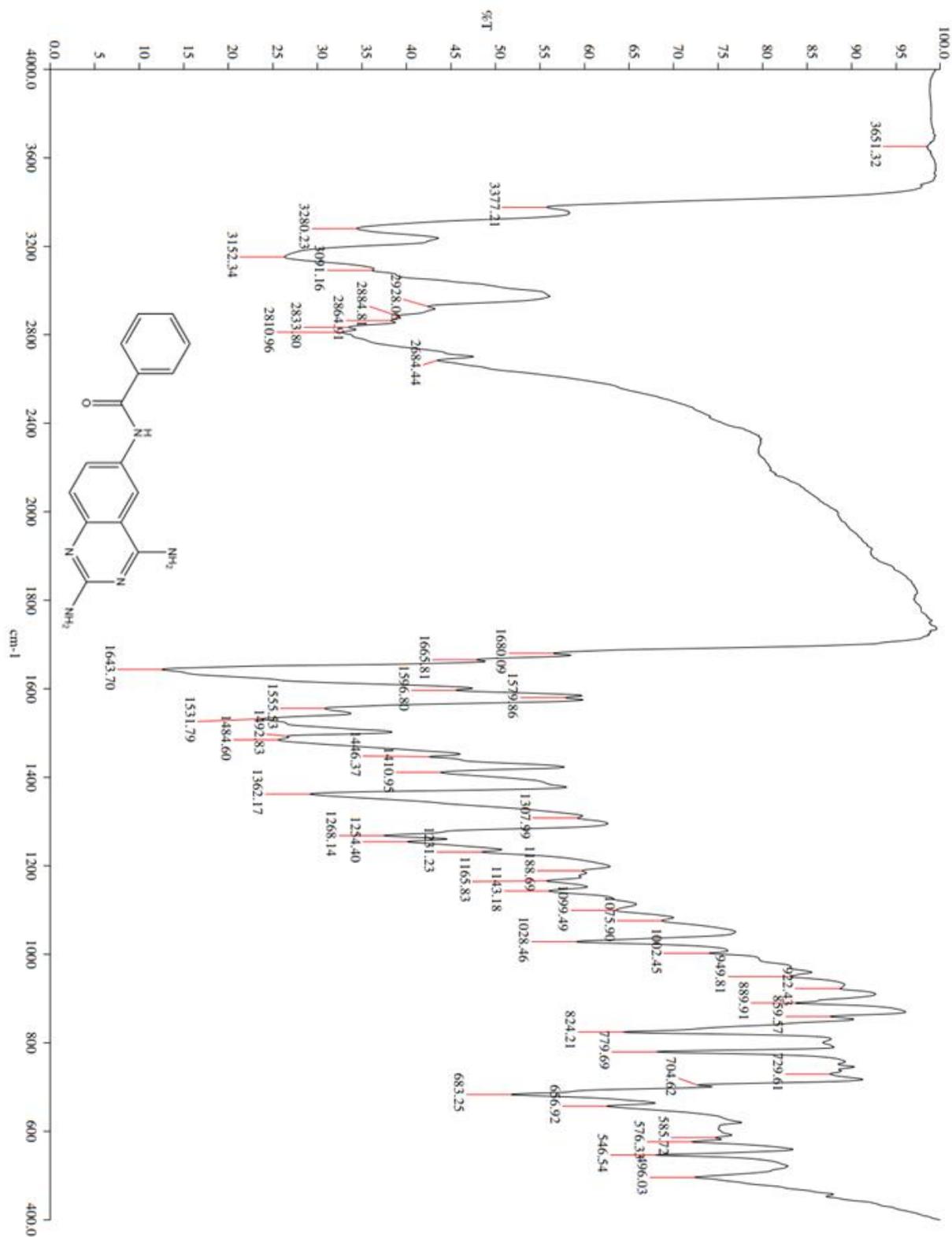


Figura 28. Visualización 2D de WK5.



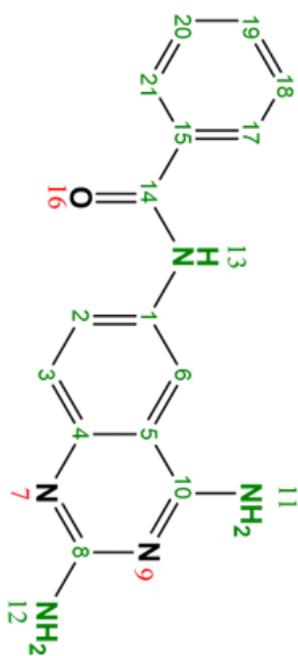
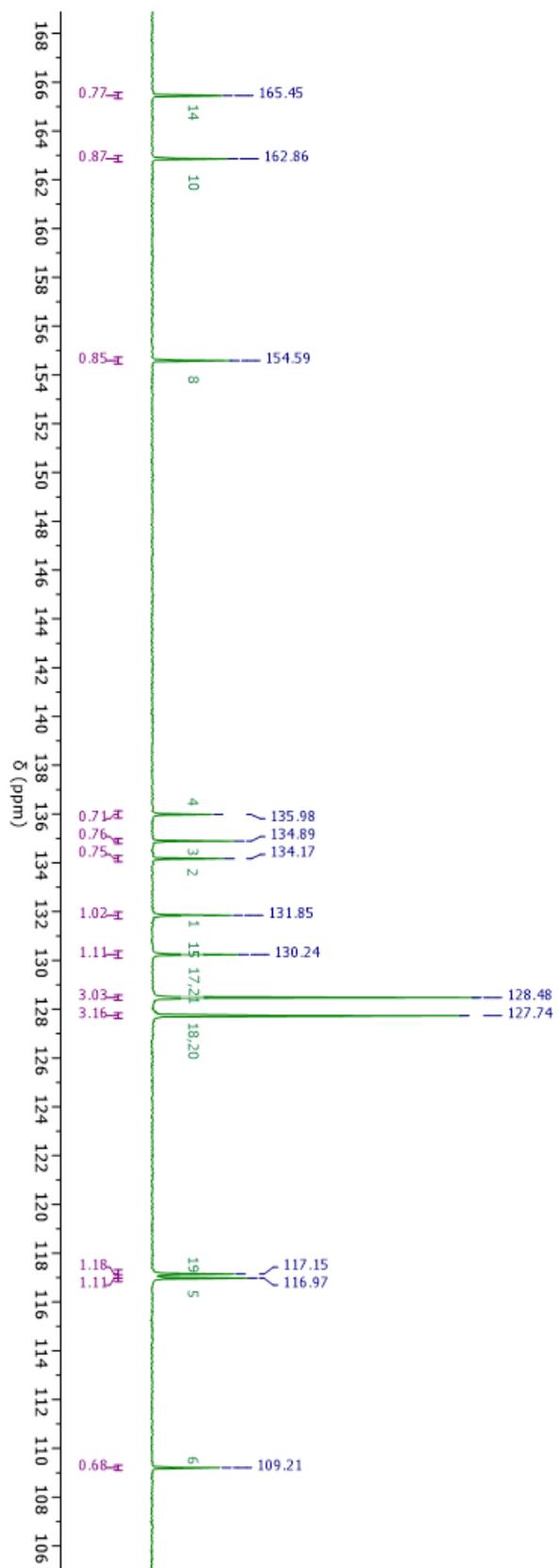


Espectros de IR, RMN-¹³C, RMN-¹H, NOESY Y EM



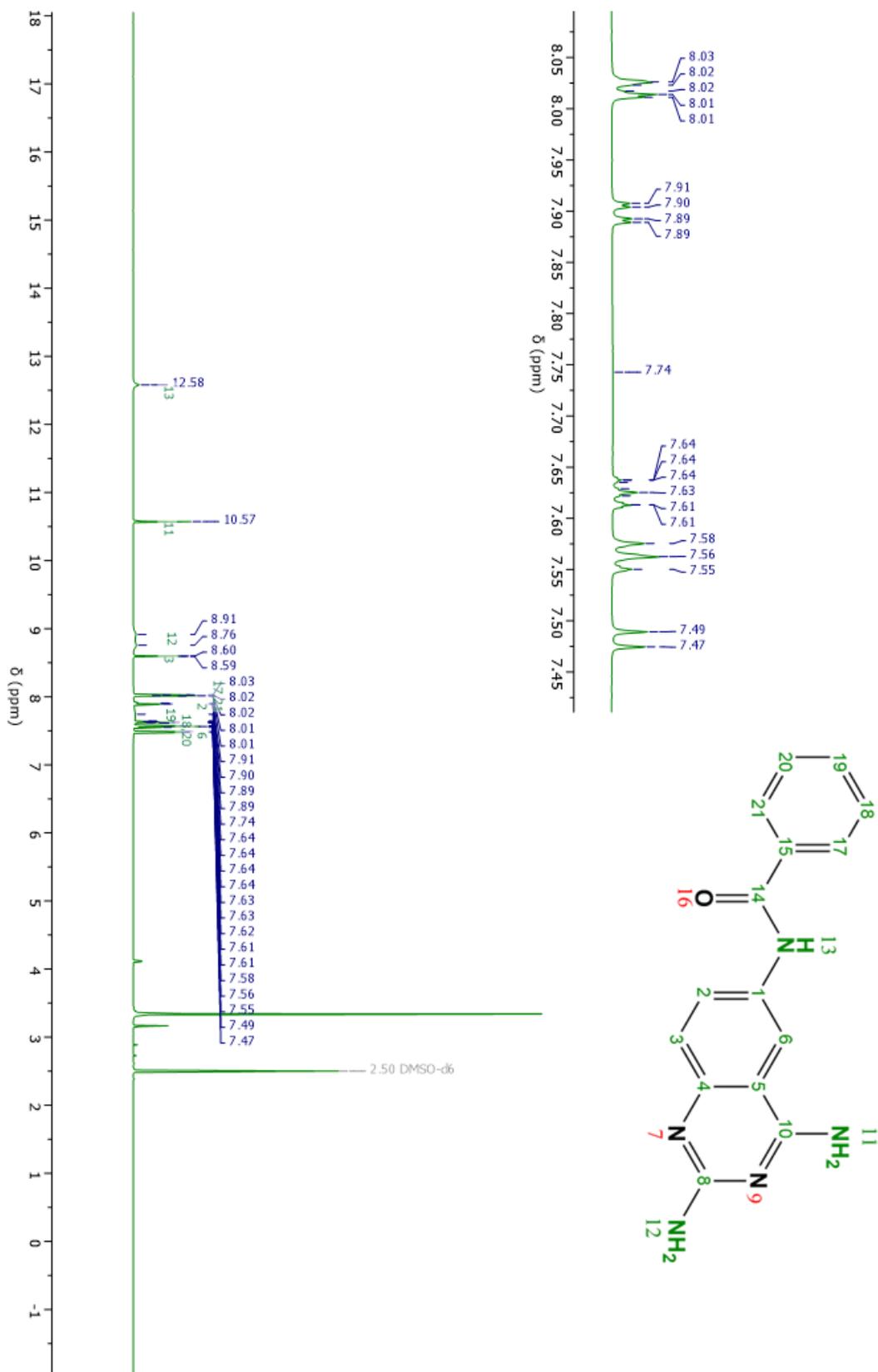
Espectro 1. Espectro de IR-ATR de WK1.





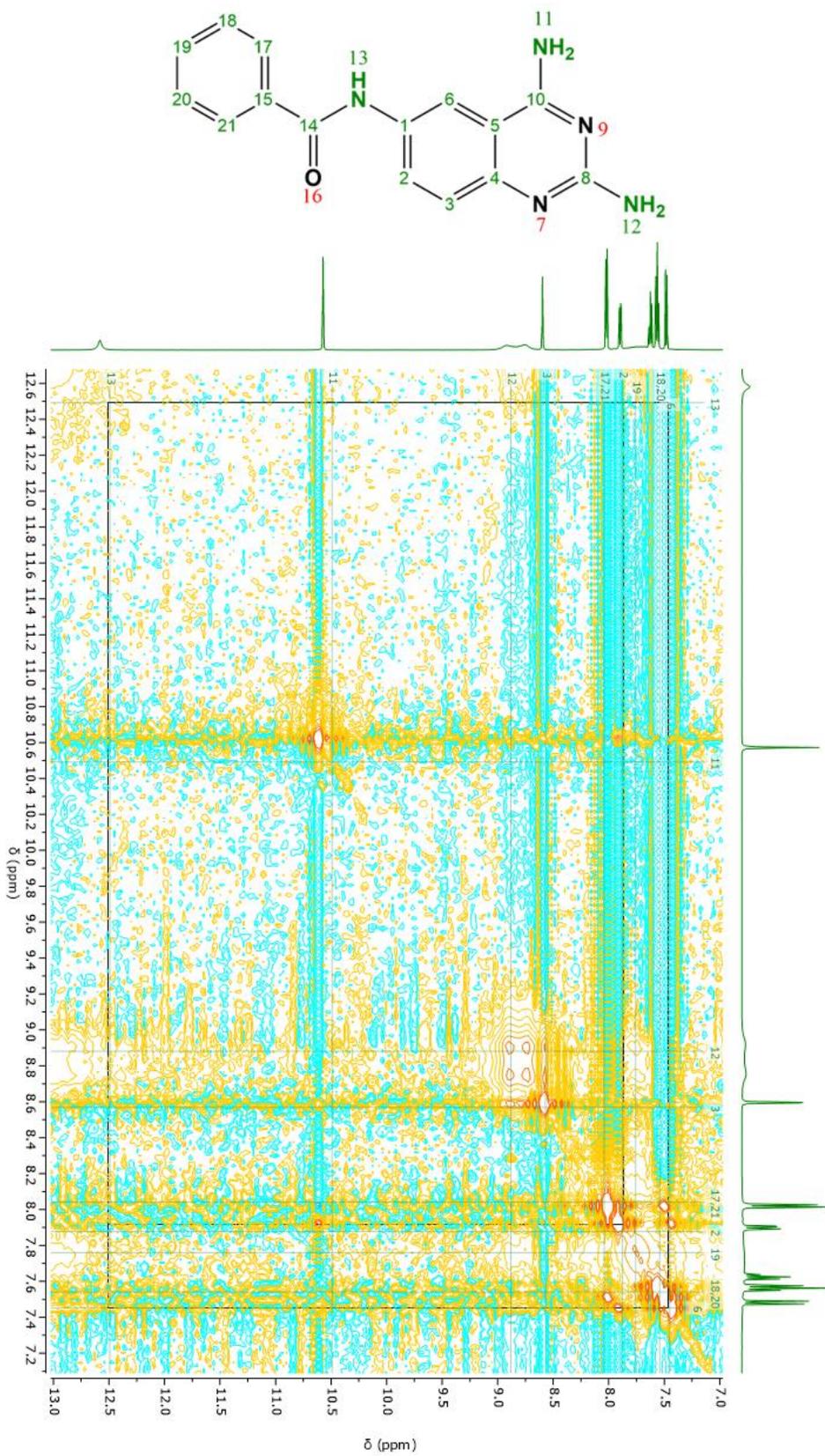
Espectro 2. Espectro de RMN-¹³C de WK1.





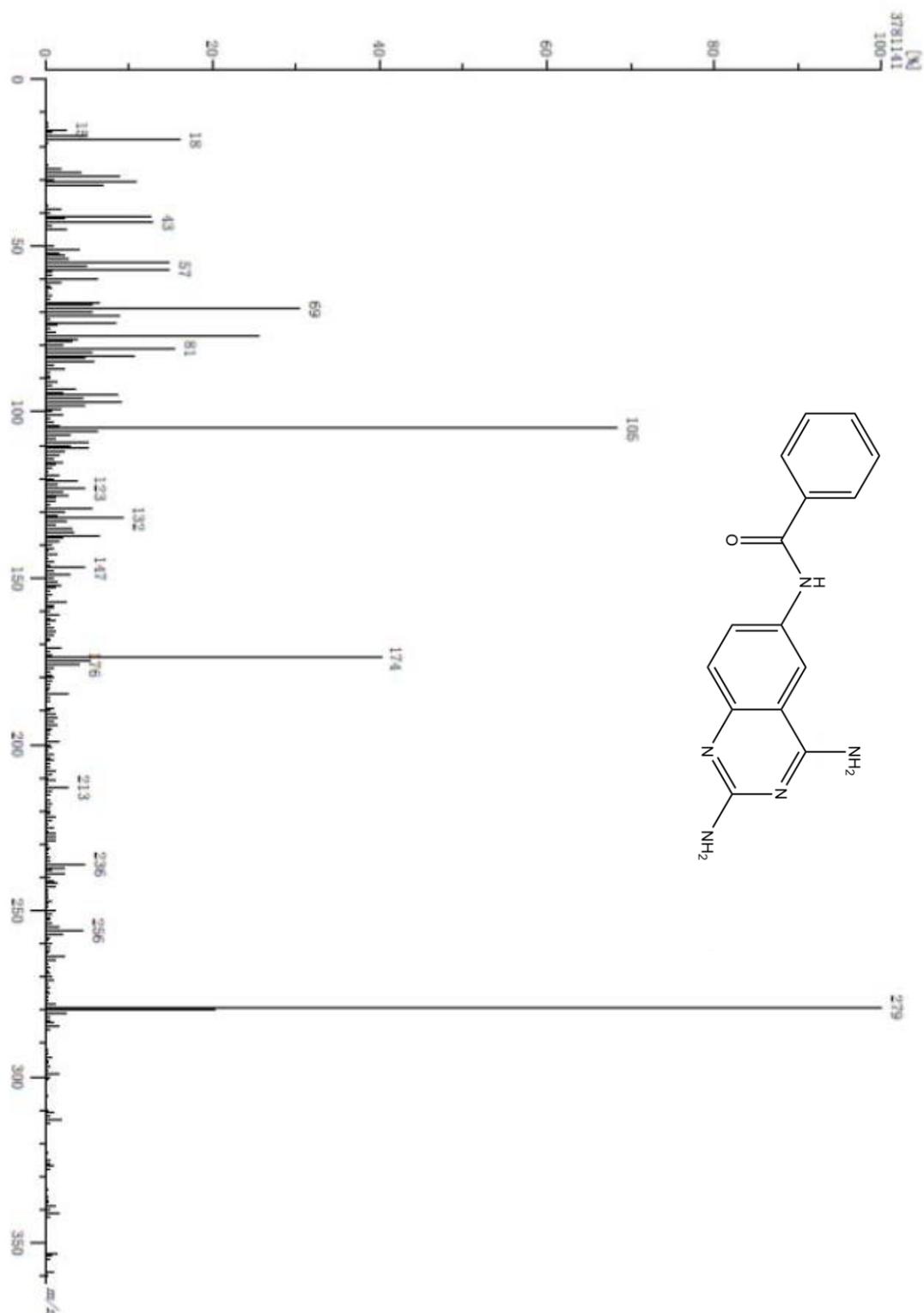
Espectro 3. Espectro de RMN-¹H de **WK1** (con ampliación de la zona aromática).





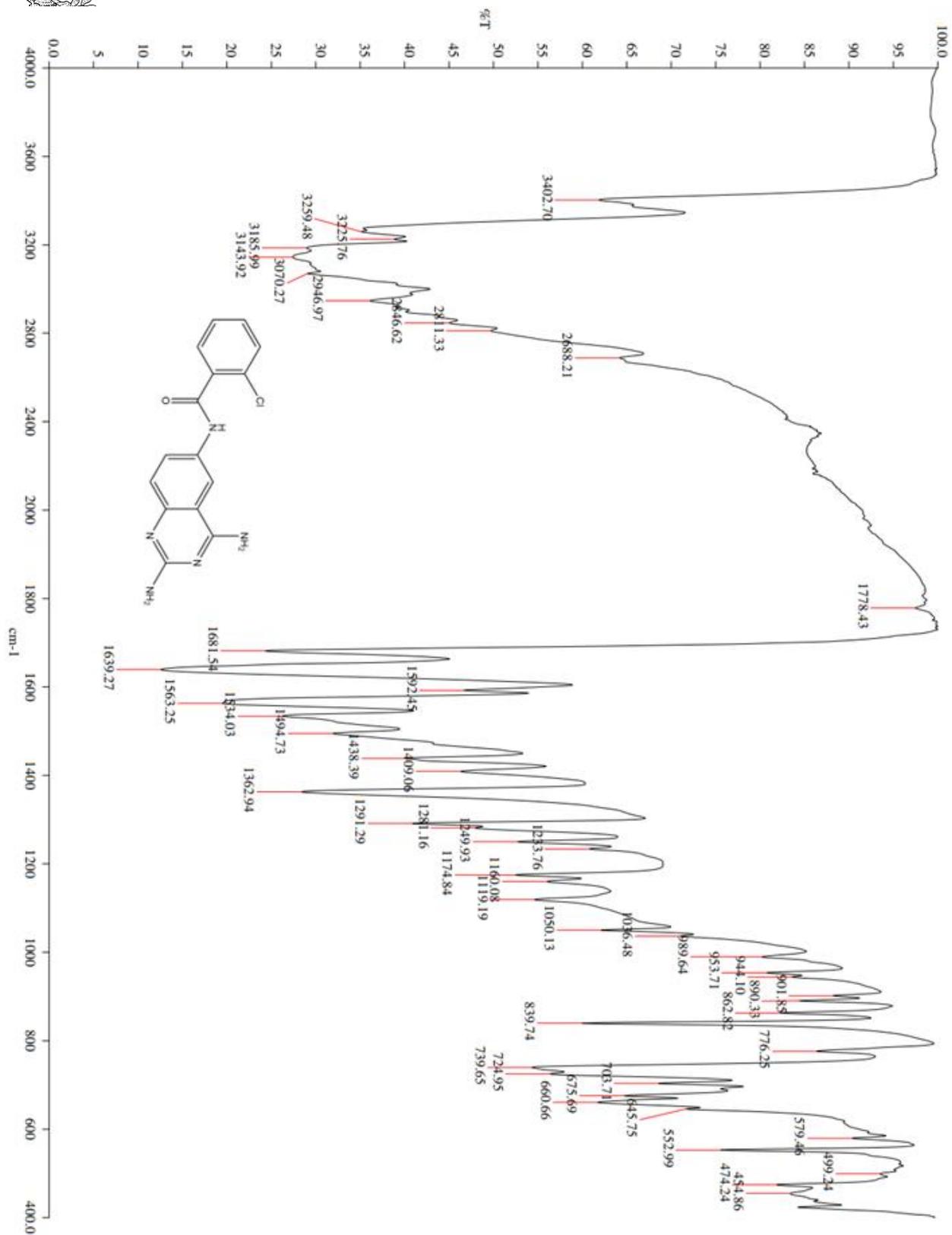
Espectro 4. Espectro RMN NOESY de WK1.





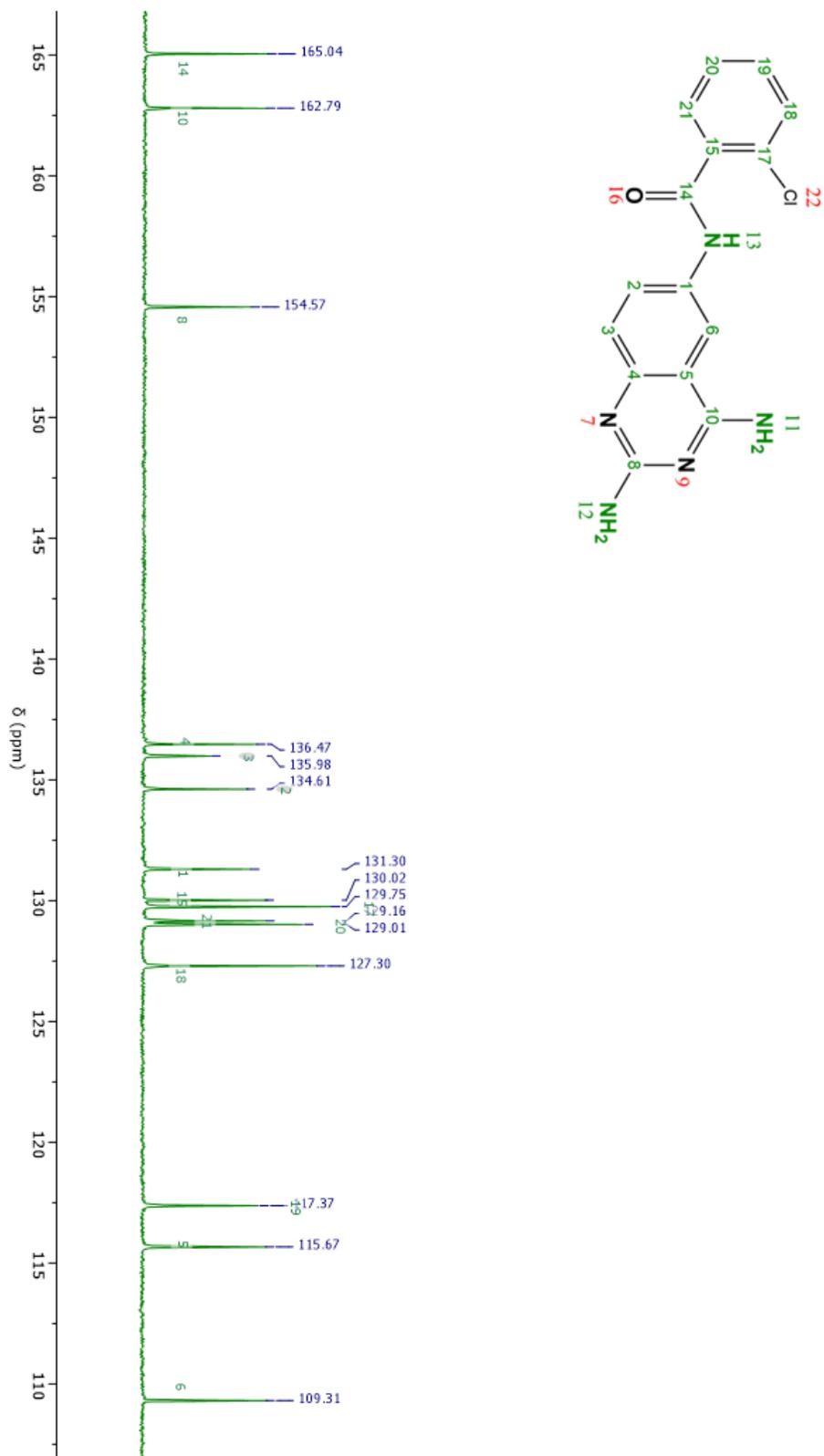
Espectro 5. Espectro de masas de **WK1** tomado del trabajo de Abril Nieto. [22]





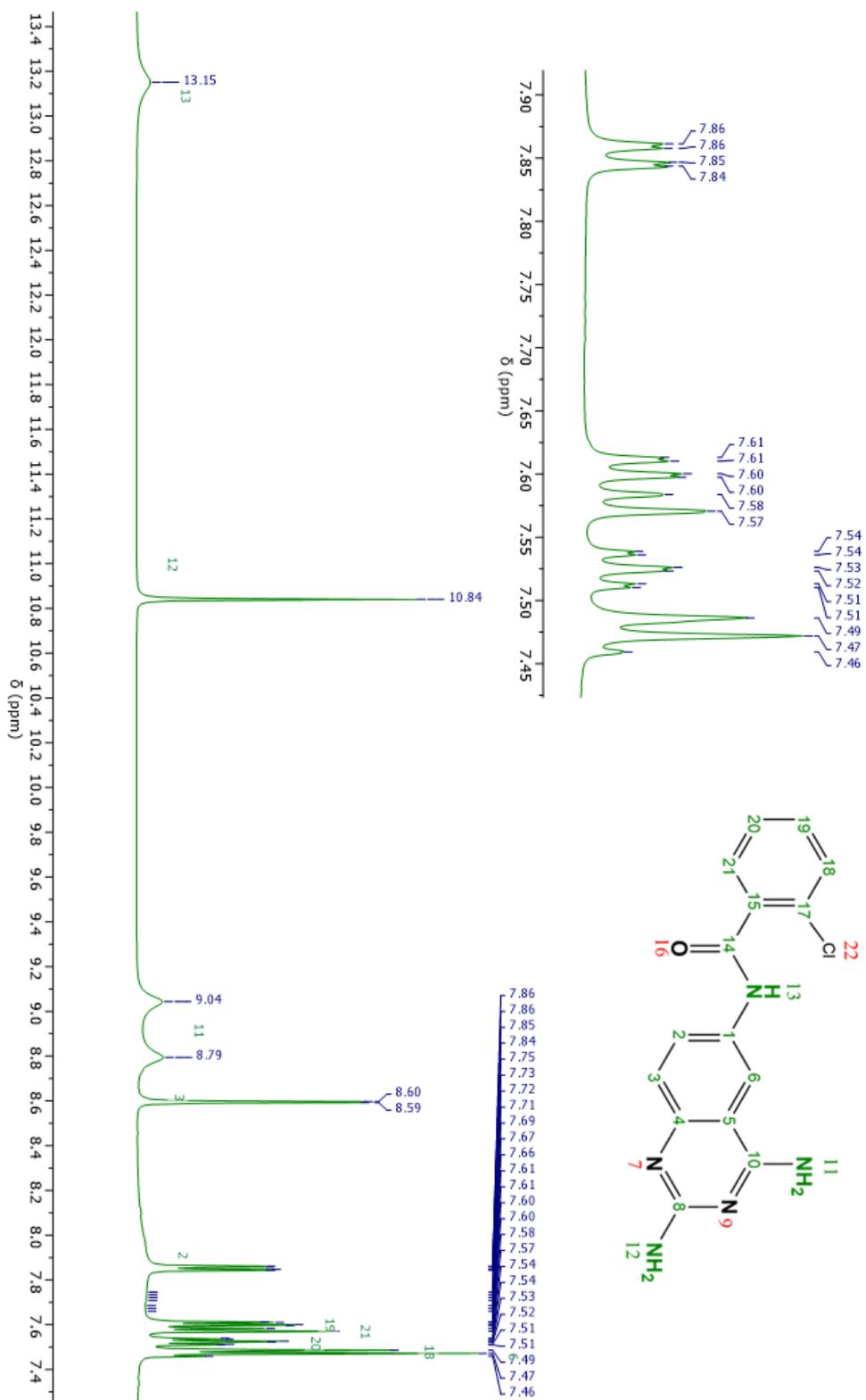
Espectro 6. Espectro de IR-ATR de WK2.





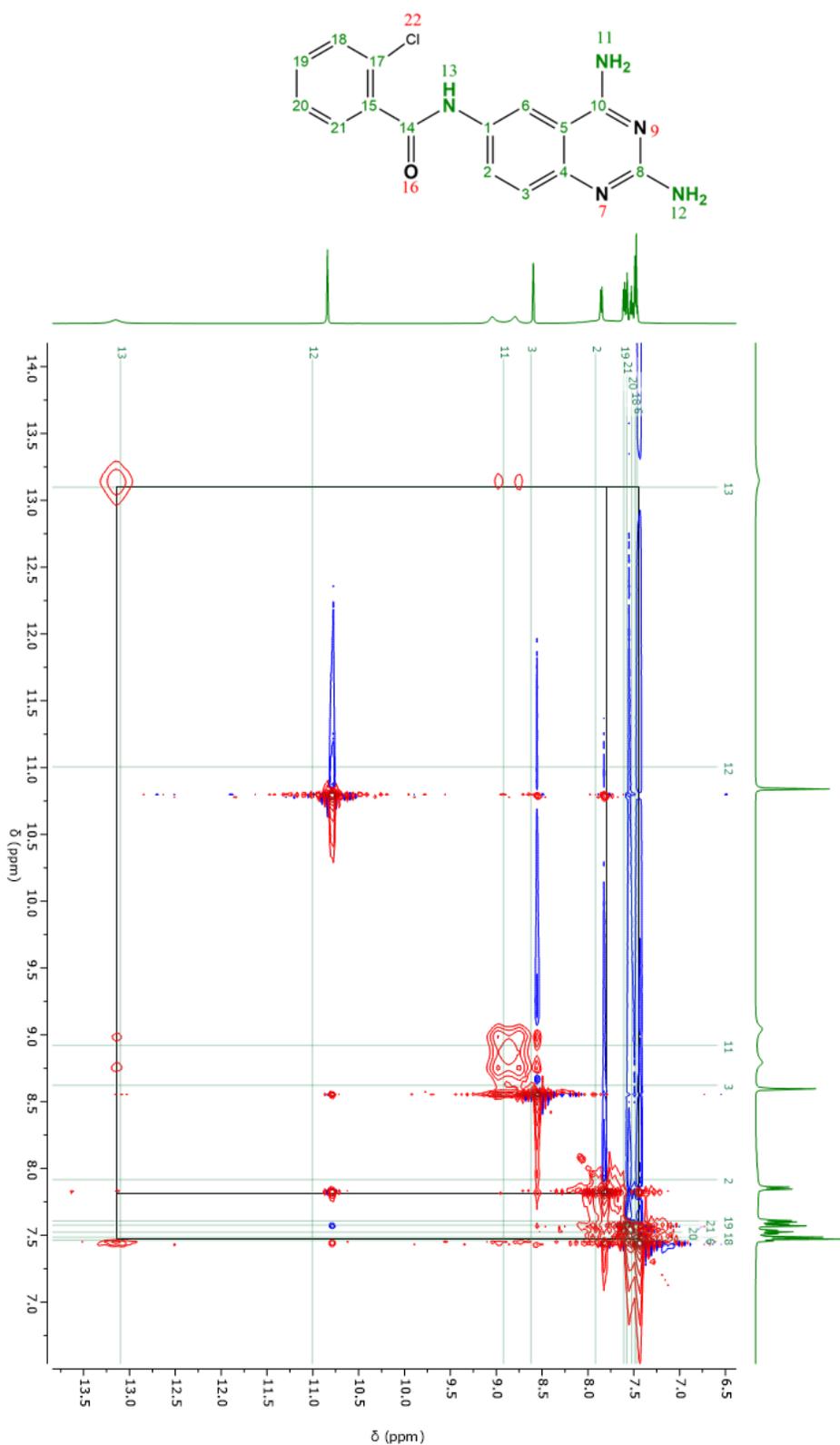
Espectro 7. Espectro de RMN- ^{13}C de WK2.





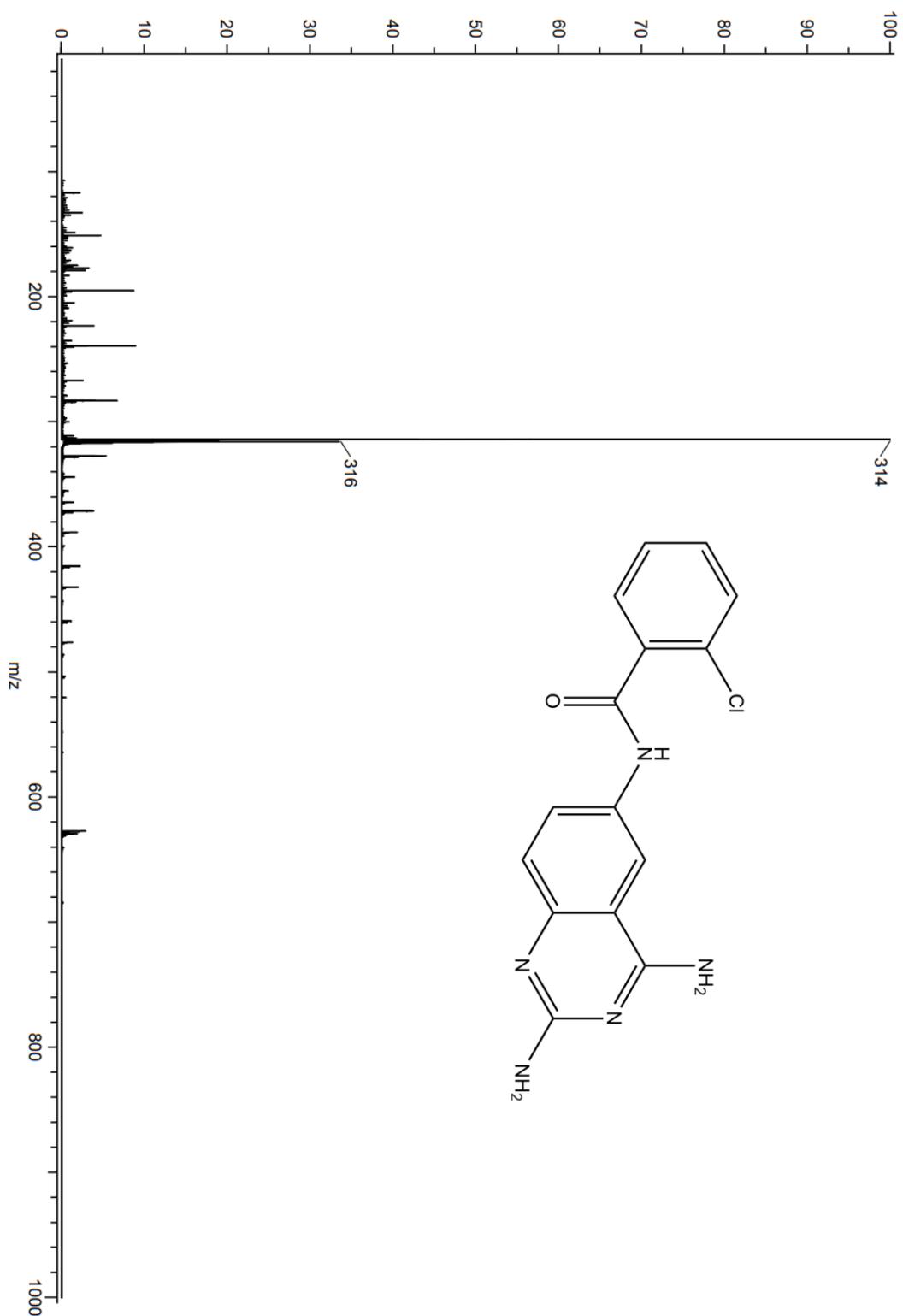
Espectro 8. Espectro de RMN-¹H de **WK2** (con ampliación de la zona aromática).





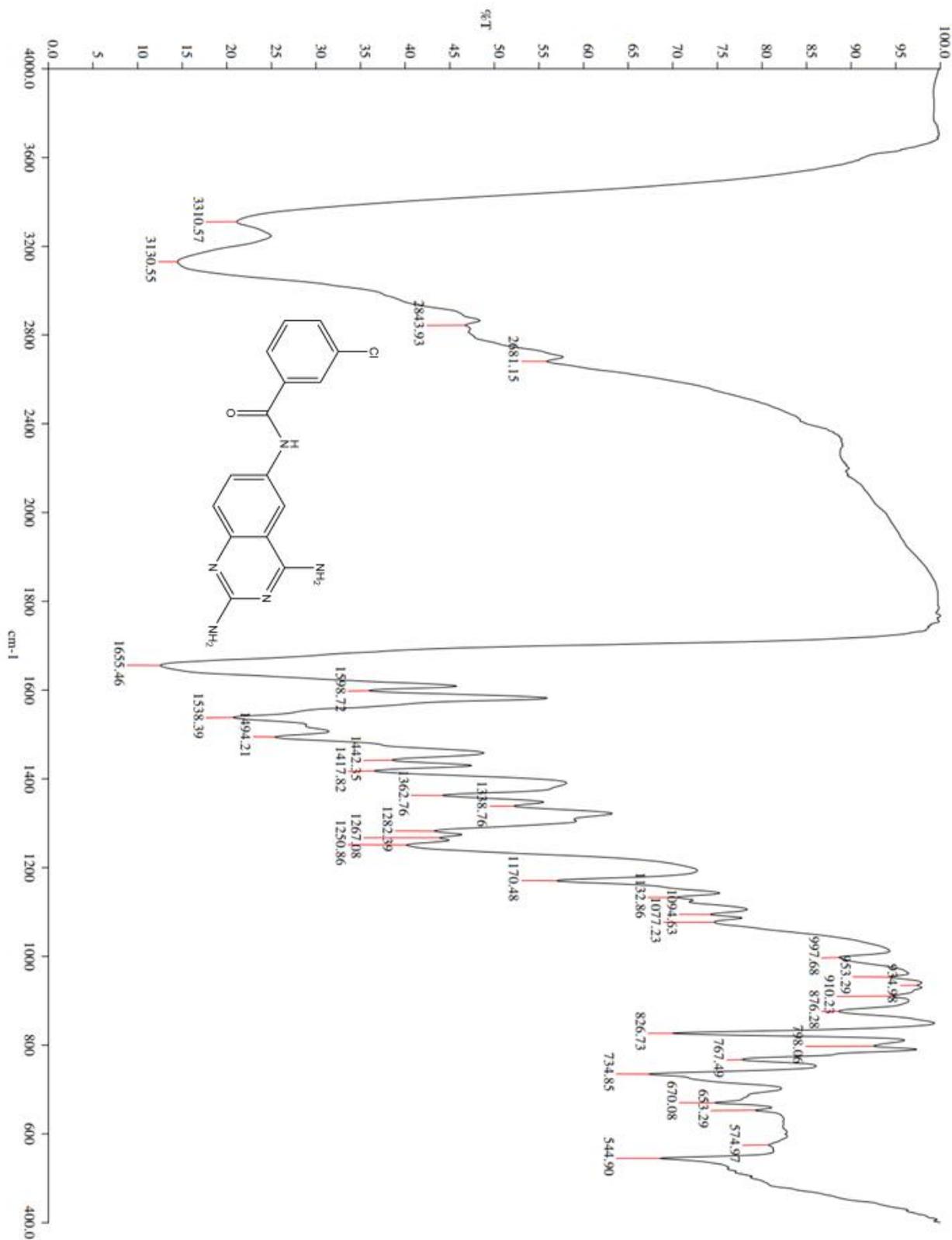
Espectro 9. Espectro de RMN NOESY de **WK2**.





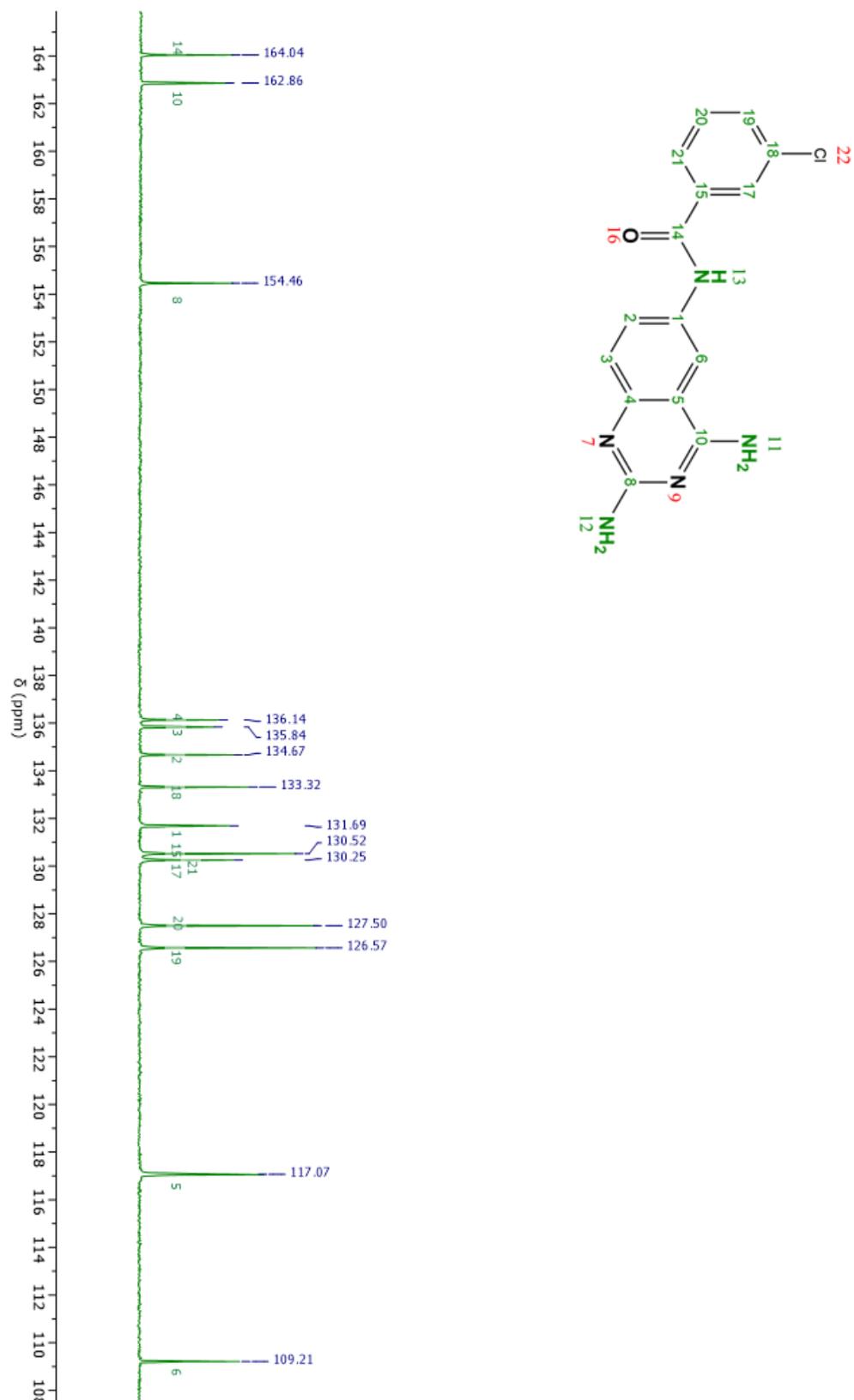
Espectro 10. Espectro de masas de **WK2**.





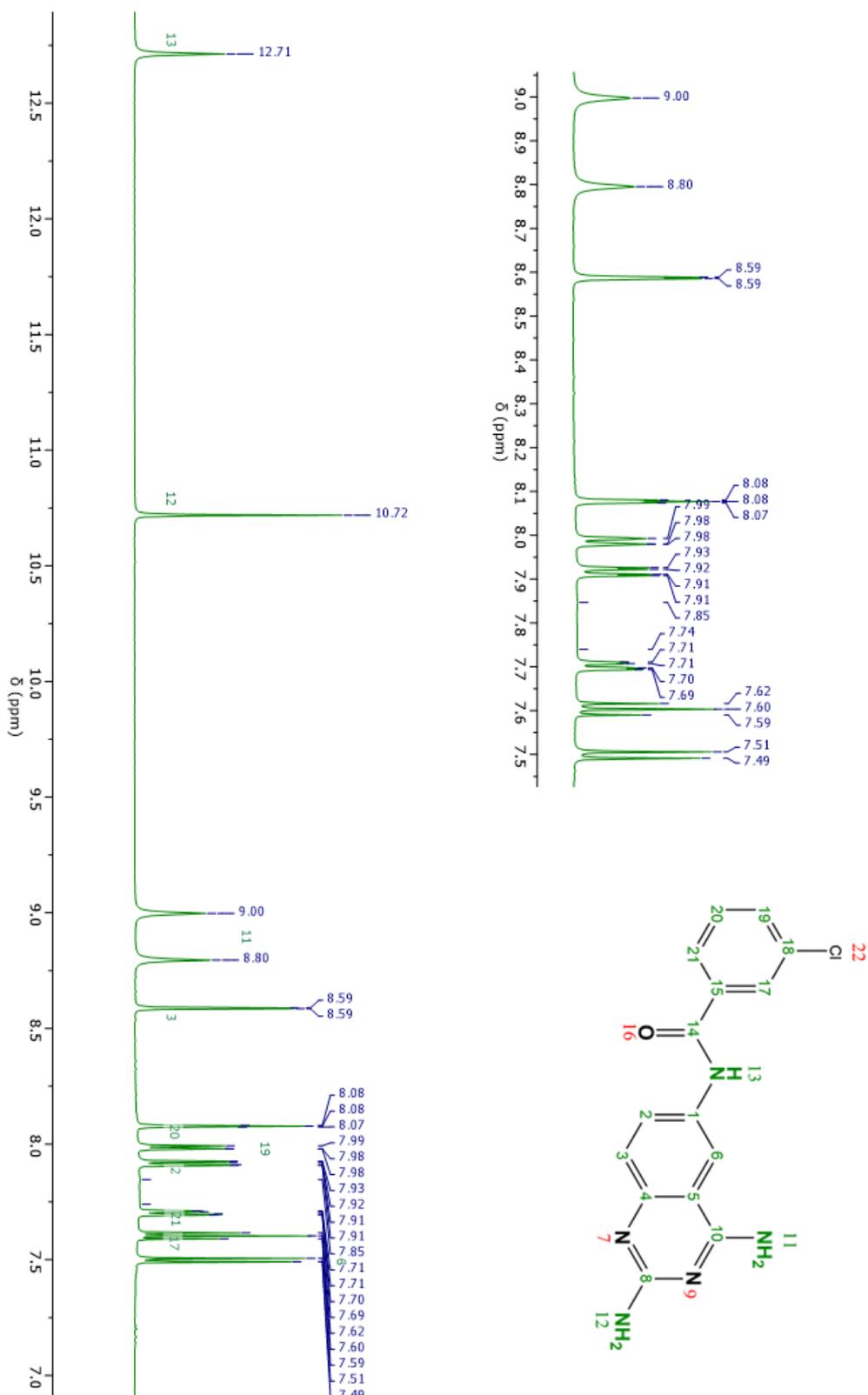
Espectro 11. Espectro de IR-ATR de WK3.





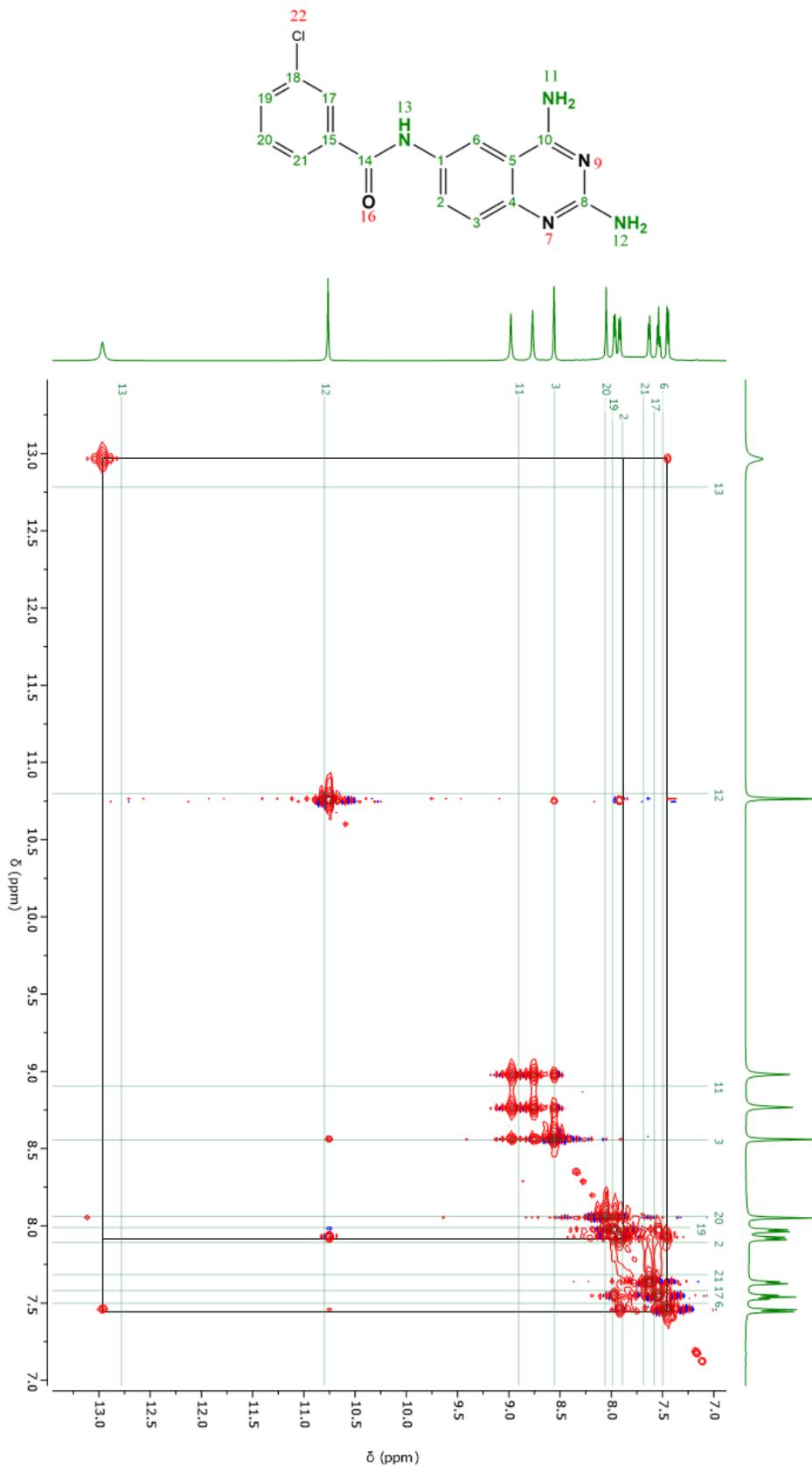
Espectro 12. Espectro de RMN-¹³C de WK3.





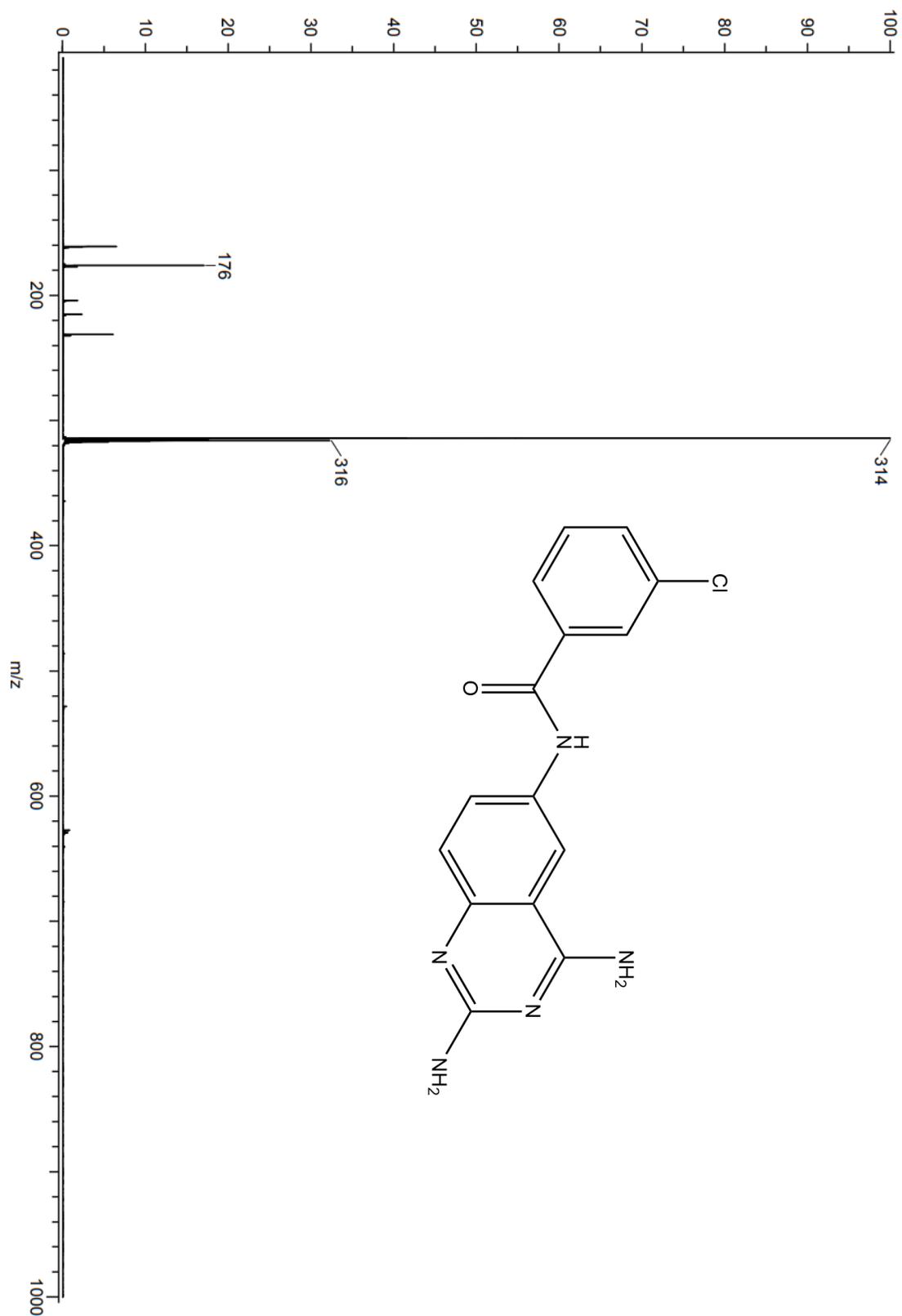
Espectro 13. Espectro de RMN- ^1H de **WK3** (con ampliación de la zona aromática).





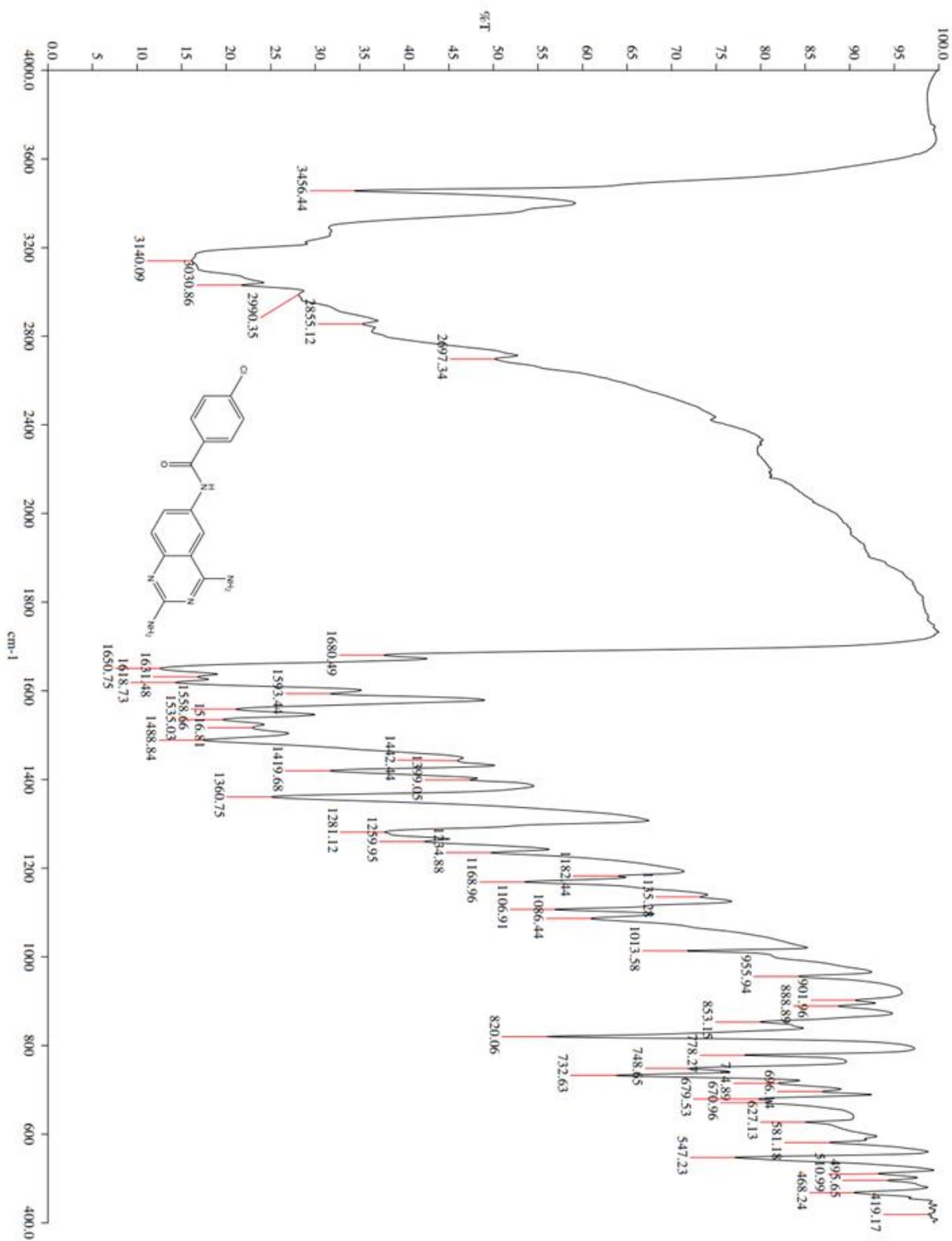
Espectro 14. Espectro de RMN NOESY de WK3.





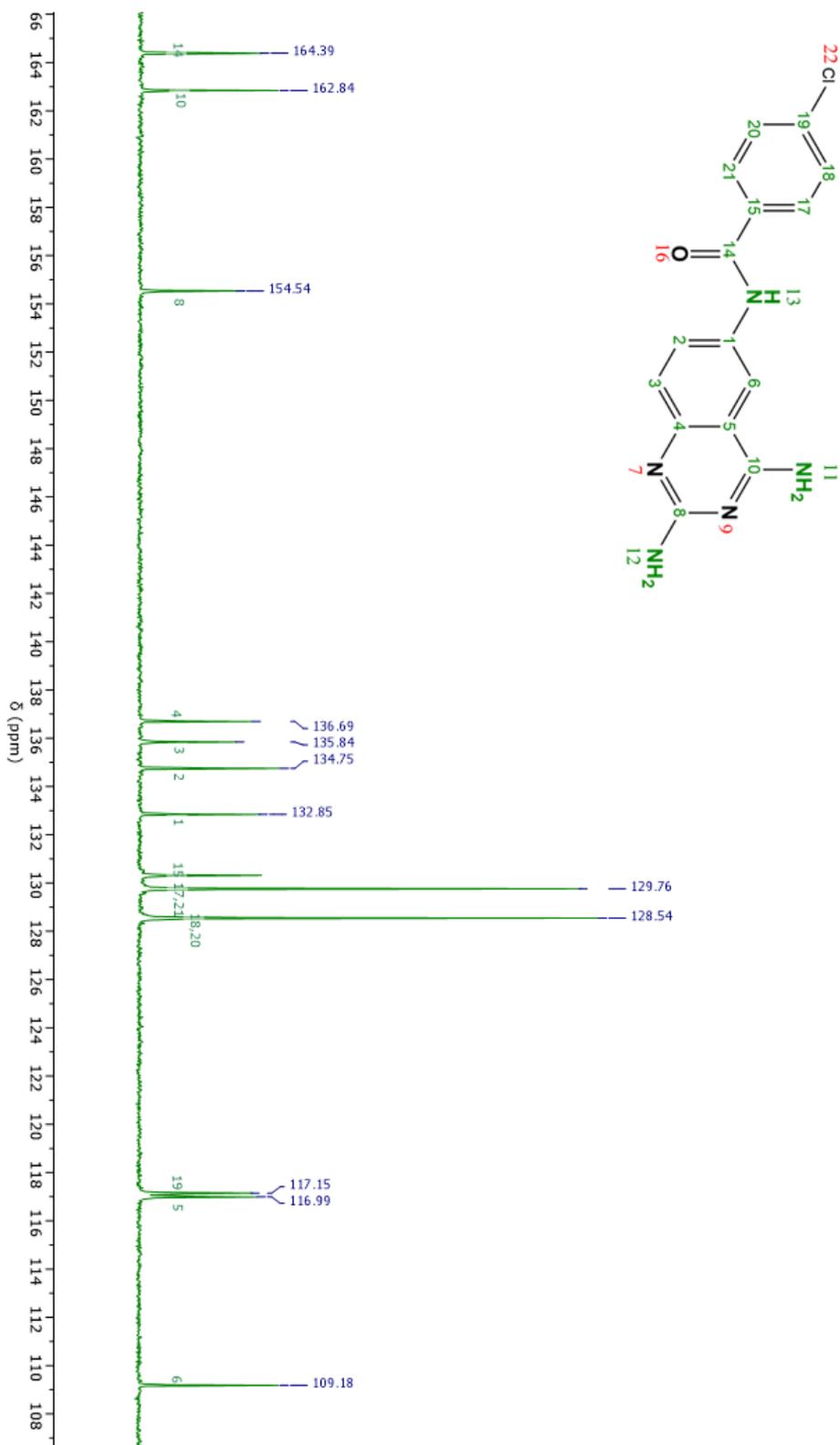
Espectro 15. Espectro de masas de WK3.





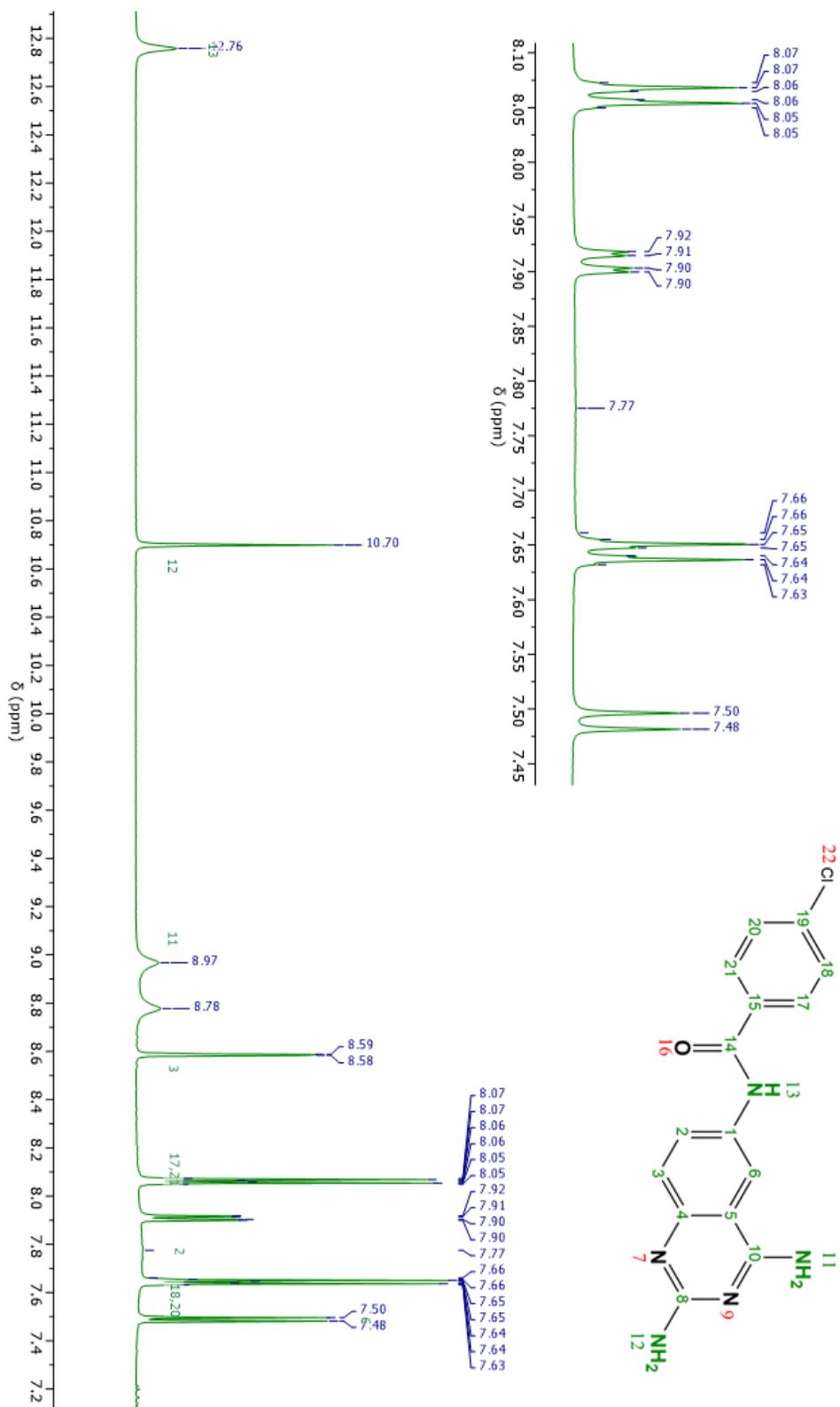
Espectro 16. Espectro de IR-ATR de WK4.





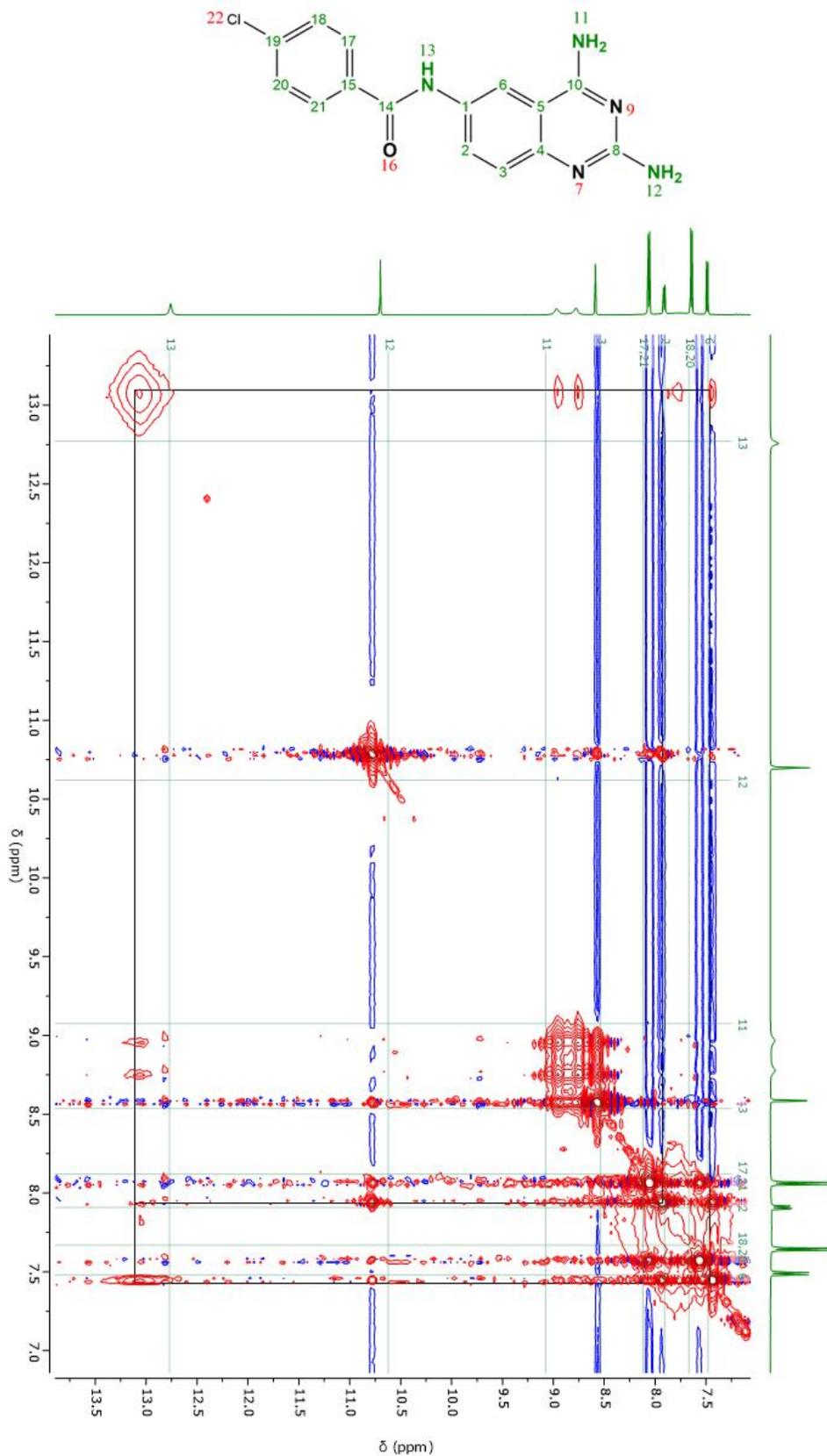
Espectro 17. Espectro de RMN-¹³C de WK4.





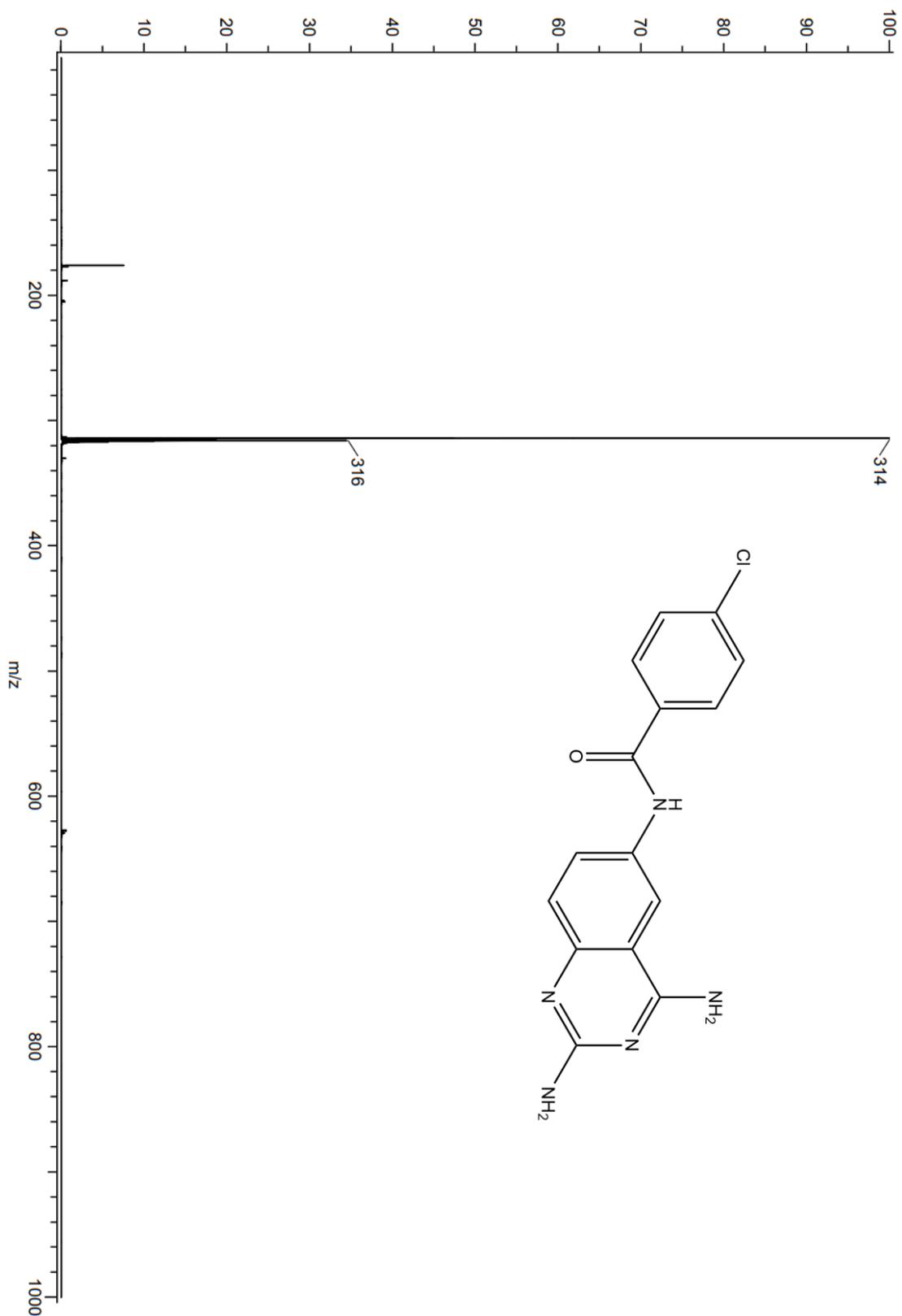
Espectro 18. Espectro de RMN-¹H de WK4.





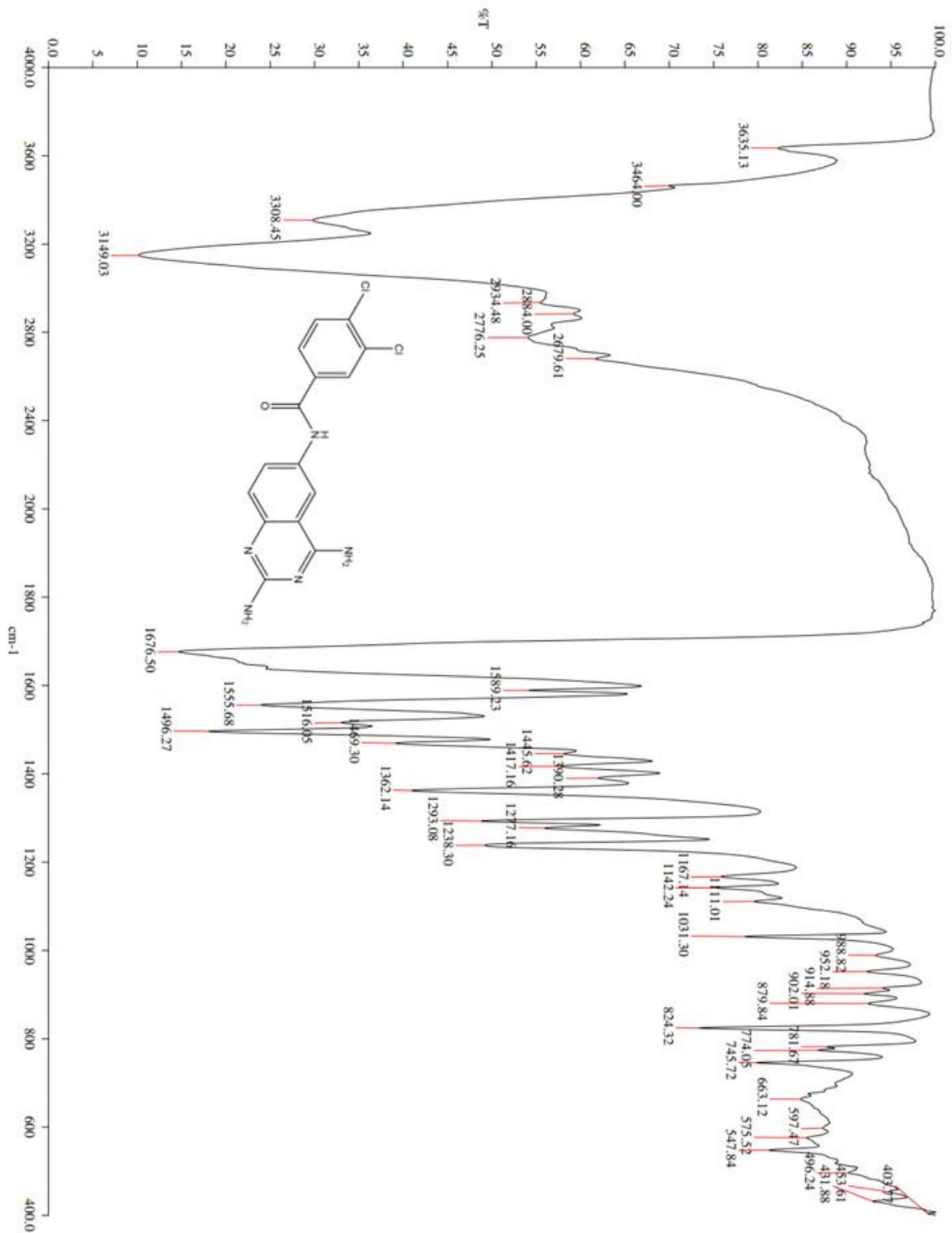
Espectro 19. Espectro de RMN NOESY de WK4.





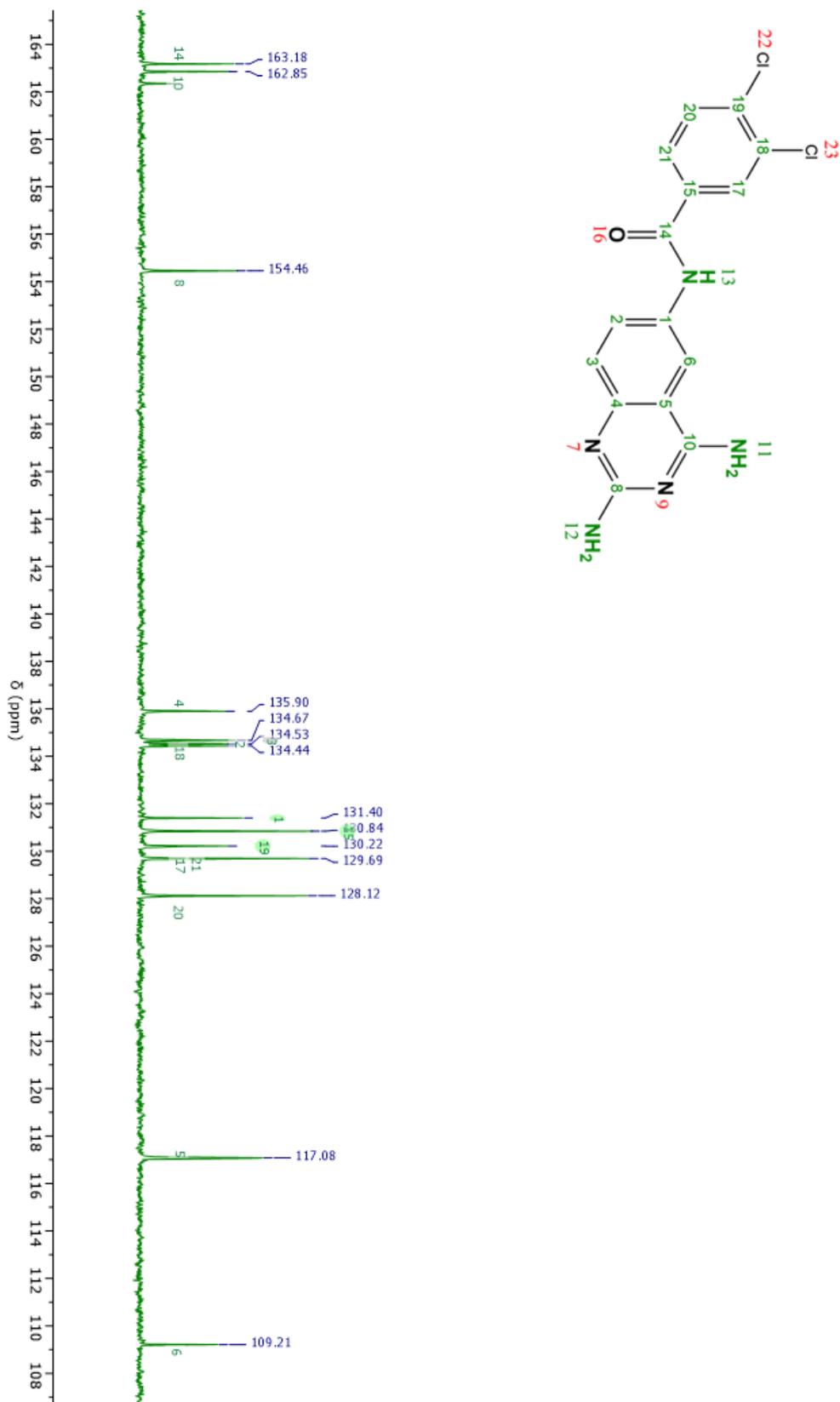
Espectro 20. Espectro de masas de **WK4**.





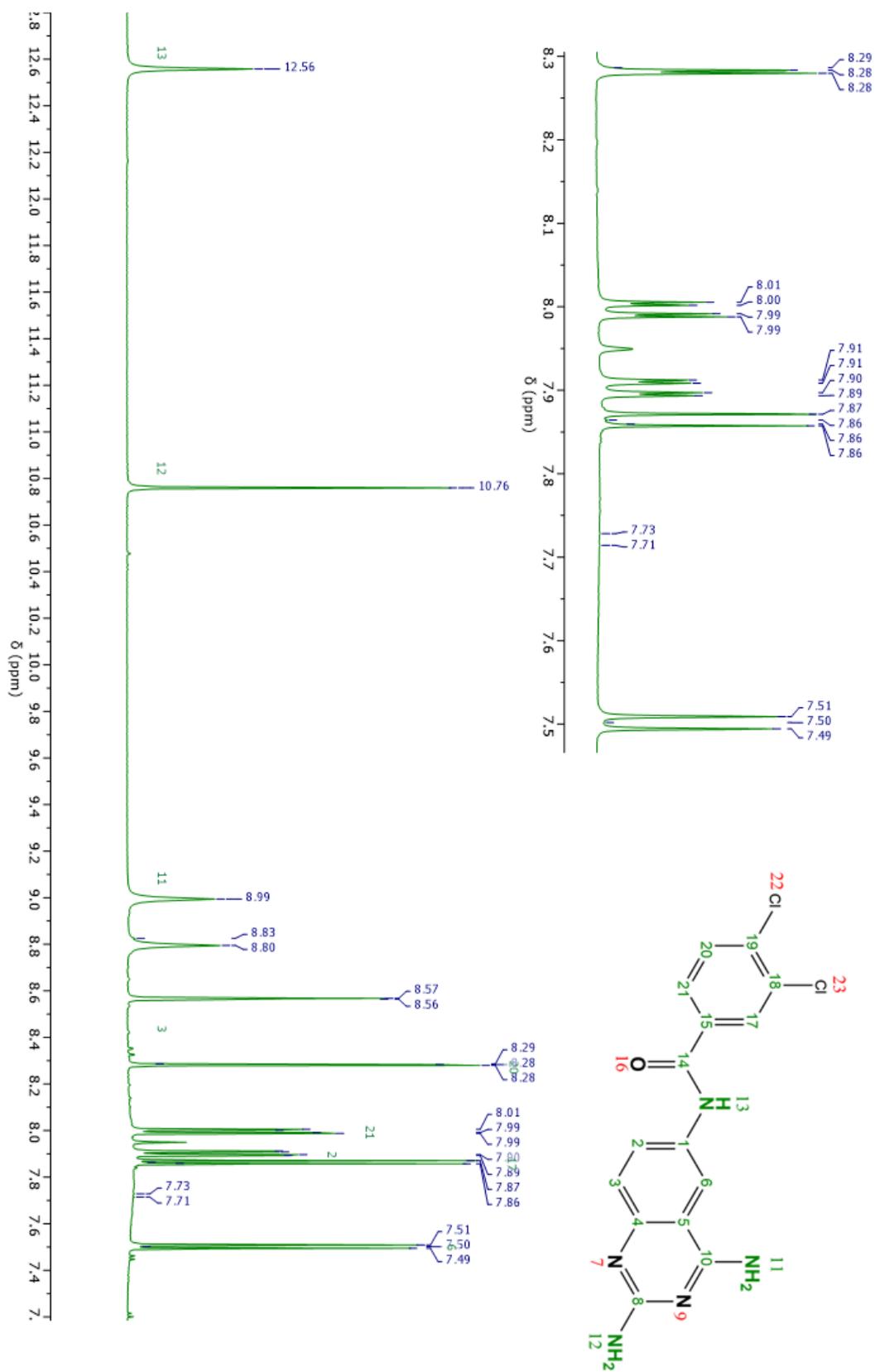
Espectro 21. Espectro de IR-ATR de WK5.





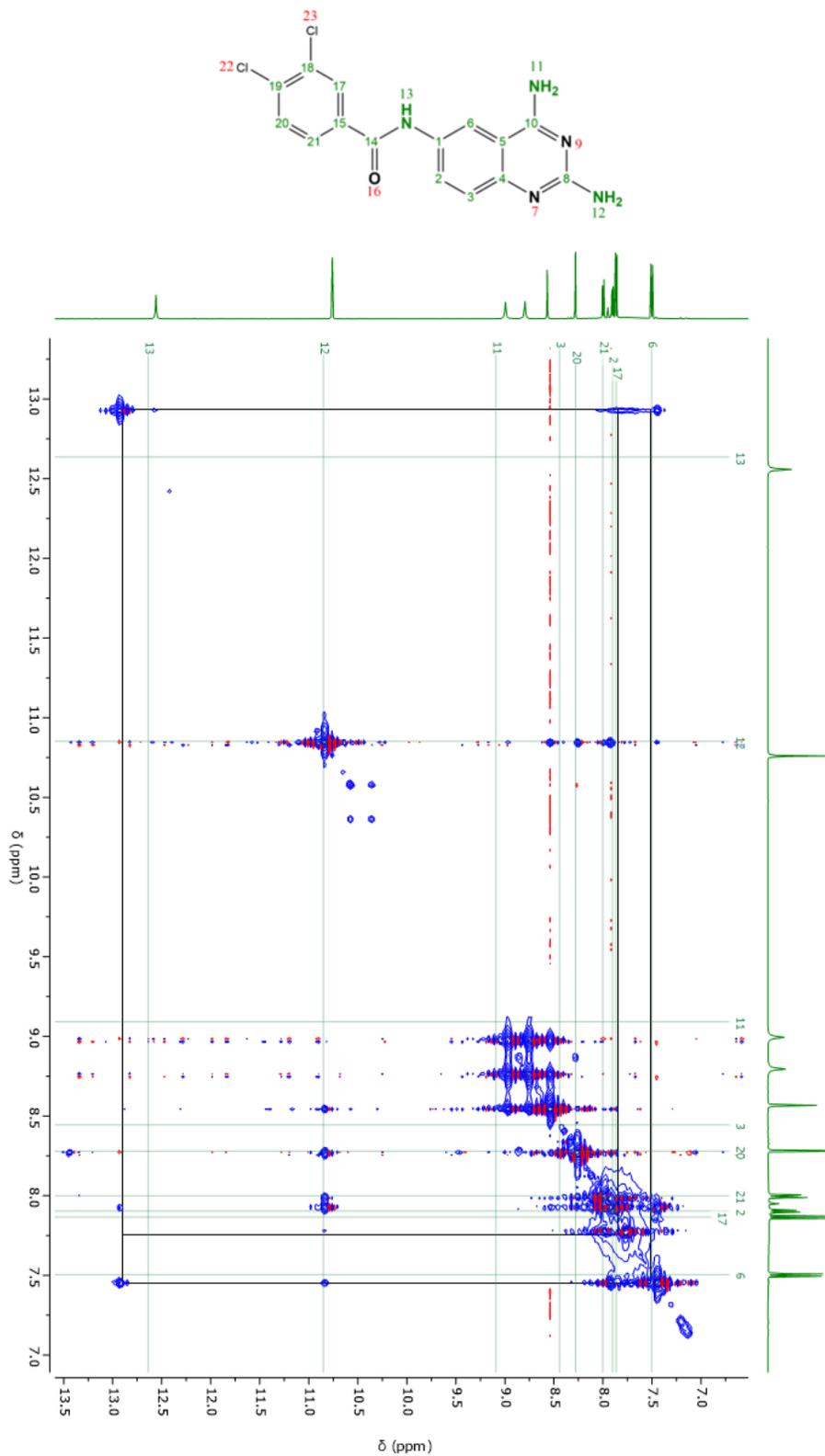
Espectro 22. Espectro de RMN- ^{13}C de WK5.





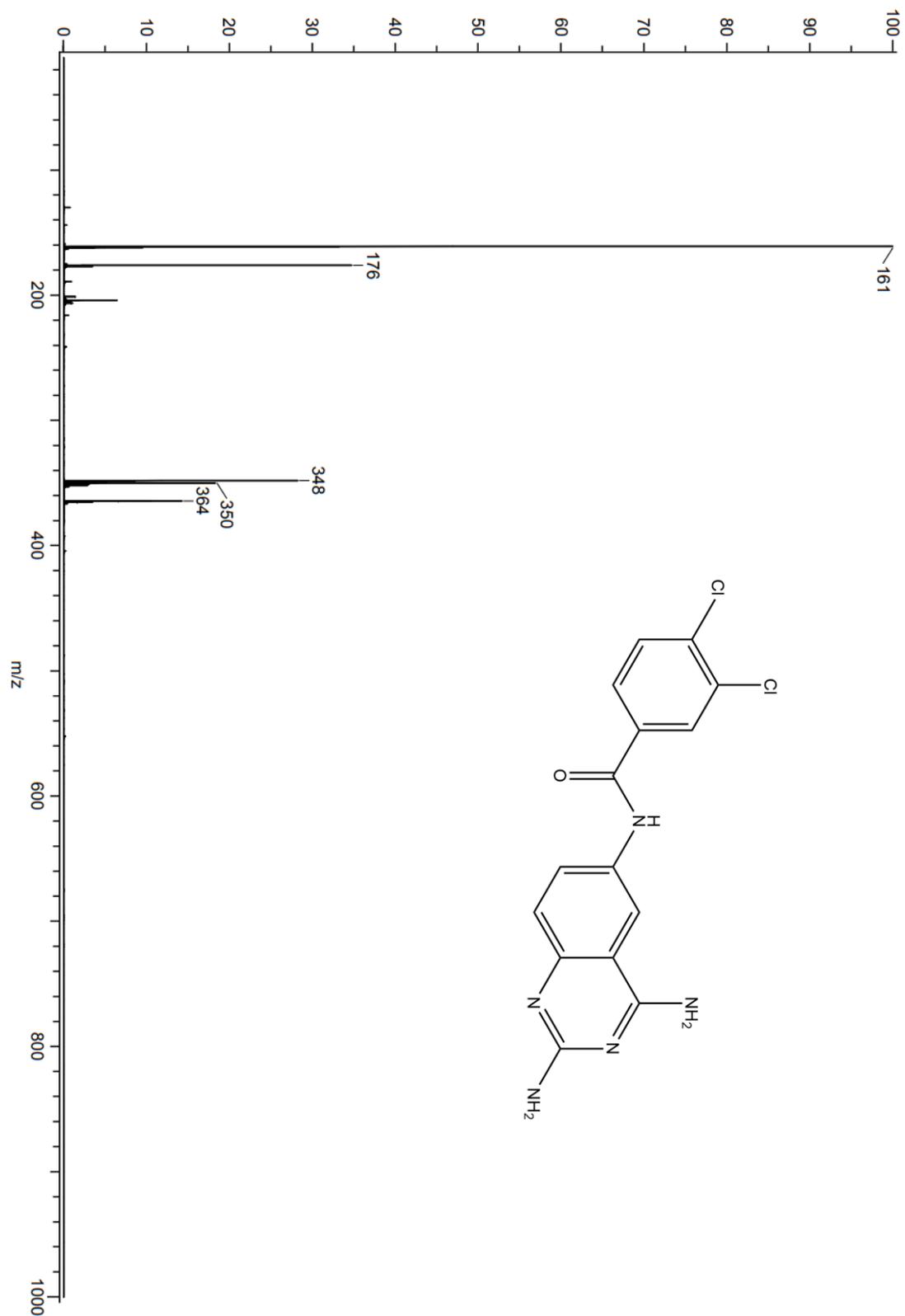
Espectro 23. Espectro de RMN-¹H de **WK5** (con ampliación de la zona aromática).





Espectro 24. Espectro de RMN NOESY de WK5.





Espectro 25. Espectro de masas de WK5.





Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de SRB tiene como fundamento determinar la viabilidad celular, esto es mediante la unión de la SRB a las proteínas celulares que fueron fijadas a una placa de 96 pozos con una disolución de ácido acético al 10% (m/v), siendo diferente a ensayos que dependen del metabolismo celular para su detección como lo es el ensayo de MTT, siendo esto una gran ventaja del ensayo de SRB al no depender del metabolismo. El principio de esta técnica para poder fijar la SRB a las proteínas se debe a una reacción de una formación de una sulfonamida con los grupos aminos presentes en la célula.

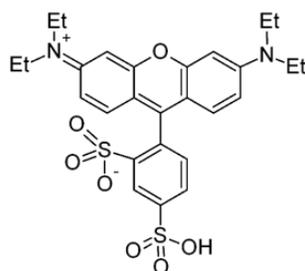


Figura 29. Estructura de la Sulforrodamina B.

Las líneas celulares son cultivadas en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), y una mezcla de antibióticos-antimicótico. En cada placa de 96 pozos, se depositaron 3 líneas celulares por triplicado en un volumen de 100 μ l/pozo. Se incubaron por 24 h a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ para favorecer que las células se adhirieran al fondo de la placa. Los compuestos se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO) a la concentración de 20 mM. Se tomó una alícuota del compuesto de prueba y se añadió a medio de cultivo. La placa fue incubada por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación, las células fueron fijadas *in situ* añadiendo 50 μ l de una solución de TCA frio al 50% e incubadas a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas con agua de la llave. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se efectuó añadiendo 100 μ l de una solución al 0.4% de sulforrodamina B e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas teñidas y secas se les adiciono 100 μ l de un buffer de tris y se agitaron por 10 min para favorecer la disolución del complejo. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados son el promedio de la DO de los 3 pozos/línea celular tratada con el compuesto (DOt), los 3 pozos tratados con DMSO (DOc) y 3 pozos de testigos, aquellos que no tiene células, pero si compuesto (DOb).

El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\%IC = 100 - (DOt - DOb / DOc - DOb) * 100$$

