



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio para la formación de complejos de inclusión de un bioprecursor del Albendazol/Hidroxiopropil- β -ciclodextrina y la evaluación de su comportamiento frente a células cancerosas

TESIS

Para obtener el título de

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

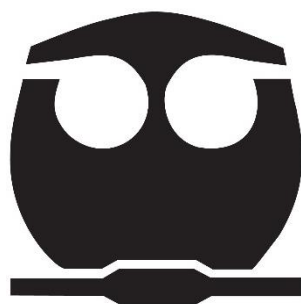
Julieta Giovana Roa Soto

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Hernández Luis

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Ulises Martínez Ortega



Ciudad Universitaria, CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Hernández Luis Francisco
VOCAL: Del Valle Perez Paulina
SECRETARIO: Centeno Llanos Sandra Maria
1er. SUPLENTE: Reyes Perez Valeria Itzel
2do. SUPLENTE: Velazquez Moyado Josue Arturo

**LABORATORIO 121, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

Dr. Francisco Hernández Luis

M. en C. Ulises Martínez Ortéga

SUSTENTANTE

Julieta Giovana Roa Soto

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

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

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la que me siento orgullosa de pertenecer.

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 Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química, UNAM por la distinción otorgada a mi persona durante el ciclo 2022-2023.

Al Conejo 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, masas e IR, dentro del programa PAIP 5000 9136.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química UNAM. A su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales, Nayeli López Balbiux); Espectroscopía de Infrarrojo (Marisela Gutiérrez Franco), Espectroscopía de Masas (Georgina Duarte Lisci) y Análisis Térmico (Lorena Martínez de La Cruz).

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. ANTECEDENTES..... | 2 |
| 1.1 Cáncer colorrectal | 2 |
| 1.2 Tratamiento del cáncer colorrectal empleando quimioterapia | 3 |
| 1.3 Albendazol, un agente anticanceroso | 4 |
| 1.4 Hidroxipropil- β -ciclodextrina | 6 |
| 1.5 Profármacos..... | 8 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 9 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 9 |
| 4. OBJETIVOS..... | 10 |
| 4.1 Objetivo general | 10 |
| 4.2 Objetivos particulares..... | 10 |
| 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 11 |
| 5.1 REACTIVOS..... | 11 |
| 5.2 LÍNEAS CELULARES | 11 |
| 5.3 METODOLOGÍAS | 12 |
| 5.3.1 Espectroscopía de absorción (UV-Vis) | 12 |
| 5.3.2 Reducción química | 12 |
| 5.3.3 Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión FHL-3CI | 14 |
| 5.3.3.1 Acoplamiento molecular | 14 |
| 5.3.3.2 Método de variación continua..... | 14 |
| 5.3.4 Formación del complejo de inclusión..... | 14 |
| 5.3.5 Caracterización de los complejos de inclusión | 15 |
| 5.3.5.1 Espectrometría infrarroja (IR) | 15 |
| 5.3.5.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 15 |
| 5.3.5.3 Dinámica molecular | 16 |
| 5.3.5.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 17 |
| 5.3.6 Determinación de la solubilidad intrínseca de FHL-3 y de FHL-3CI .. | 17 |
| 5.3.7 Ensayos de biorreducción..... | 18 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.3.8 | Evaluación biológica | 21 |
| 6. | RESULTADOS | 23 |
| 6.1 | Espectrometría de absorción (UV-Vis) | 23 |
| 6.2 | Reducción química..... | 24 |
| 6.2.1 | Reducción química empleando NaBH ₄ como agente reductor | 25 |
| 6.2.2 | Reducción química empleando SnCl ₂ como agente reductor..... | 25 |
| 6.3 | Determinación estequiométrica del complejo de inclusión | 26 |
| 6.3.1 | Acoplamiento molecular | 26 |
| 6.3.2 | Método de variación continua | 27 |
| 6.4 | Caracterización de los complejos de inclusión..... | 28 |
| 6.4.1 | Espectrometría Infrarroja (IR) | 28 |
| 6.4.2 | Calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 29 |
| 6.4.3 | Dinámica molecular | 30 |
| 6.4.4 | Resonancia magnética nuclear..... | 31 |
| 6.5 | Determinación de solubilidad intrínseca..... | 36 |
| 6.6 | Ensayos de biorreducción | 37 |
| 6.7 | Evaluación Biológica | 39 |
| 6.8 | Predicción de blanco biológico | 41 |
| 7. | DISCUSIÓN..... | 43 |
| 8. | CONCLUSIONES | 51 |
| 9. | PERSPECTIVAS | 51 |
| 10. | REFERENCIAS | 52 |
| | APÉNDICE | 62 |

INTRODUCCIÓN

Debido a los nuevos hábitos alimenticios en los últimos años, basados en un alto consumo de carnes rojas y alcohol, junto con un estilo de vida sedentario, han propiciado el alza en las tasas de mortalidad del cáncer colorrectal, tanto en hombres como en mujeres.¹

Los tratamientos para el cáncer colorrectal varían dependiendo del estadio en el que se encuentre. Sin embargo, la cirugía es el tratamiento primario para todos los estadios del cáncer colorrectal, mientras que en los estadios III, IV y recidivantes la cirugía va de la mano con la quimioterapia. Esto con la intención de brindarles mayor esperanza y calidad de vida.²

Los fármacos más recomendados para emplearse en las quimioterapias del cáncer colorrectal son: Cisplatino, Capecitabina, 5-Fluorouracilo, Irinotecán, Oxaliplatino, Trifluridina/Tipiracilok.³ Sin embargo, se ha observado que estos son muy agresivos para los pacientes ya que presentan muchos efectos secundarios, tales como, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, daño renal, entre muchos otros.^{14,15} Considerando lo anterior, es de gran interés encontrar nuevas moléculas que actúen con mayor preferencia sobre las células cancerosas respecto a las células sanas, y presenten una menor incidencia de efectos secundarios. En este contexto se encontró que el Albendazol produce muerte apoptótica sobre las células cancerosas; sin embargo, debido a su insolubilidad acuosa los resultados no son reproducibles.^{4,5}

Por ello, el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis del Laboratorio 121, de la Facultad de Química, UNAM, sintetizó un bioprecursor del Albendazol, nombrado **FHL-3**. Éste presentó un ligero aumento en su solubilidad acuosa en comparación con el Albendazol (1.7 veces), sin embargo, no fue un aumento drástico.⁶

En el campo farmacéutico uno de los recursos para tratar de incrementar la solubilidad acuosa de los compuestos activos es mediante la formación de complejos de inclusión con la ciclodextrina. En este ámbito, se ha observado que la Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), tiene una excelente capacidad de formación de complejos de inclusión.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo de tesis tuvo como objetivo principal estudiar la formación de complejos de inclusión entre **FHL-3** con HP- β -CD con la finalidad de aumentar la solubilidad acuosa del bioprecursor y evaluar el efecto de inducción de muerte en un modelo de células derivadas de cáncer de colon.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal se origina en el intestino grueso o el recto, este inicia con el crecimiento del tejido del revestimiento interno, el cual es nombrado pólipo. Este pólipo no es canceroso, sin embargo, con el paso de los años sigue creciendo y puede convertirse en cáncer, todo depende de la naturalidad del pólipo.^{7, 8}

Existen múltiples factores de riesgo para el cáncer colorrectal, entre los más alarmantes se encuentran la edad y el estilo de vida. Ya que se ha observado que se detecta con mayor frecuencia en los adultos mayores, es decir personas que se entren entre los 55 y 65 años. Por otro lado, llevar una dieta basada en el consumo de elevadas cantidades de carnes procesadas, así como de alcohol, junto con el sedentarismo y tabaquismo, propicia el desarrollo de cáncer colorrectal.^{1, 9}

Debido a este estilo de vida adoptado en los últimos años, se ha observado un aumento en la incidencia de casos de cáncer colorrectal en la población. En el año 2020 el cáncer colorrectal tuvo una incidencia de 1 931 590 casos nuevos, de los cuales se registraron 916 000 defunciones^{10, 11}

Si se detecta el cáncer colorrectal de manera temprana, existe una alta probabilidad de ser curado. La tasa de supervivencia a 5 años para aquellos pacientes que padecen cáncer colorrectal se sitúa en el 65%. No obstante, las tasas de supervivencia de esta enfermedad pueden variar en función de diversos factores, especialmente el estadio en el que se encuentre. Ya que la tasa de supervivencia a 5 años cuando el cáncer se ha diseminado hacia tejidos u órganos adyacentes es del 72%, sin embargo, cuando el cáncer ya se ha diseminado a otras partes del cuerpo disminuye a un 15%.¹²

1.2 Tratamiento del cáncer colorrectal empleando quimioterapia

El cáncer colorrectal tiene la capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo, por lo que se debe determinar el estadio de la enfermedad para planificar un tratamiento adecuado, ya que dependiendo del estadio que se encuentre el cual puede ir del estadio 0 al estadio IV. El tratamiento estándar para los estadios del 0 al II son la cirugía, sin embargo, en los estadios III, IV y casos recidivantes se considera la quimioterapia adyuvante.²

La quimioterapia hace uso de fármacos para el tratamiento del cáncer, mediante la interrupción de la proliferación o destruyendo las células cancerosas.⁹⁴ Los fármacos más recomendados para emplearse en el tratamiento con quimioterapia del cáncer colorrectal son el Cisplatino, Capecitabina, 5-Fluorouracilo, Irinotecán, Oxaliplatino, Trifluridina/Tipiracilok.³

Dichos fármacos tienen reportados diversos efectos secundarios los cuales no son muy gratos para los pacientes, unos cuantos que de los que se han reportado son la sensación de náuseas, vómitos, diarrea, cansancio, así como pueden llegar a padecer de anemia, daños renales agudos, hemorragias, trastornos gastrointestinales o la disminución de la respuesta inmunitaria a infecciones, pérdida de peso.^{13, 14, 15}

Dichos malestares, en especial el vómito frecuente, puede ocasionar que los pacientes prefieran abandonar el tratamiento a seguir presentando los síntomas de conlleva la quimioterapia.¹⁶

1.3 Albendazol, un agente anticanceroso

El Albendazol (ABZ) es un agente antihelmíntico de amplio espectro. El cual en la actualidad se usa predominantemente en el tratamiento de la equinocosis, un gusano parásito que causa quistes en el hígado y los pulmones.¹⁷

Se le atribuye su actividad antihelmíntica, debido a su capacidad de unión a la tubulina, ocasionando una inhibición en la polimerización de los microtúbulos ocasionando la despolimerización y la detención del ciclo celular, dicha actividad fue evaluada sobre tumores peritoneales de origen colorrectal humano para investigar su potencial anticancerígeno, concluyendo que tiene un potente efecto de supresión en el crecimiento de estos.^{18, 19}

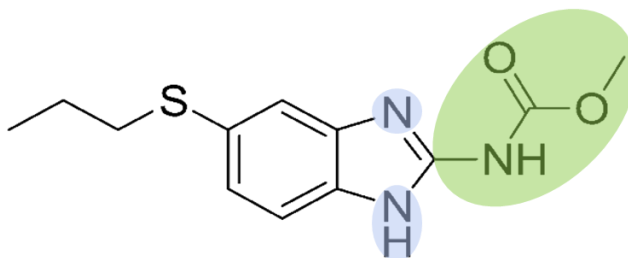


Figura 1. Estructura química de Albendazol, donde se encuentran identificados sus grupos funcionales.

Es un carbamato benzoimidazólico, el cual cuenta con los grupos funcionales de aminas y un carbamato, los cuales se pueden observar en la figura 1, de color azul y verde respectivamente, su capacidad de unión a la tubulina se les atribuye a estos grupos funcionales.^{20, 21}

En estudios recientes sobre la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 se ha demostrado que el Albendazol induce apoptosis clásica, a su vez se encontró la interrupción en la polimerización de la tubulina y se encontró una detención del ciclo celular en la fase G2/M.⁴

Sin embargo, el Albendazol es un compuesto prácticamente insoluble en agua,¹⁷ por lo que al momento de realizarse nuevos estudios para su evaluación este es un gran impedimento,⁵ tomando en cuenta lo anterior, el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis del Laboratorio 121, de la Facultad de Química, UNAM, sintetizó un bioprecursor del Albendazol con la finalidad de aumentar su solubilidad acuosa, dicho bioprecursor fue nombrado **FH-3**.⁶

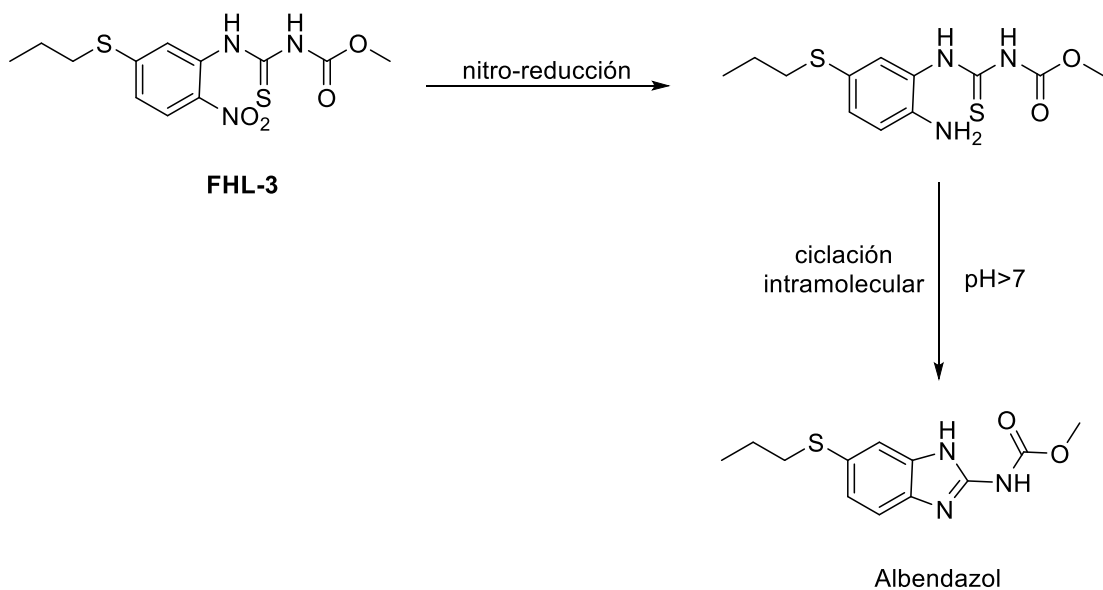


Figura 2. Biotransformación propuesta del compuesto **FHL-3** para obtener como producto final al Albendazol.⁶

En la figura 2 se observa la biotransformación del bioprecursor **FHL-3** a Albendazol, este bioprecursor demostró ser levemente más soluble en comparación al Albendazol (1.7 veces más), sin embargo, no rebasó la proporción de más de 100 veces para ser considerada una ganancia significativa en solubilidad acuosa.⁶

1.4 Hidroxipropil- β -ciclodextrina

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, formado por 6, 7 u 8 unidades (α -CD, β -CD, γ -CD) de residuos de glucopiranosas unidas mediante enlaces α (1,4). Tienen una forma similar a un cono truncado, el cual tiene una cavidad hidrofóbica y una superficie exterior hidrofílica, gracias a esta cavidad tienen la capacidad de formar complejos de inclusión albergando una molécula huésped. Al formar dichos complejos de inclusión se ha observado que distintas propiedades del huésped mejoran, por lo cual en la actualidad es utilizado como excipiente por las industrias farmacéuticas ya que aporta mayor solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad acuosa a los fármacos, incluso puede llegar a disminuir sabores no gratos y malos olores.^{16, 22, 23, 24, 25, 26, 27}

Debido a esto, se realizaron derivados de la ciclodextrina con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, como, por ejemplo, la β -CD tiene una baja solubilidad en agua, y se realizó un derivado de este el Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) el cual está parcialmente sustituido por grupos hidroxipropilo aumentando su solubilidad en agua, con baja toxicidad y capacidad de inclusión satisfactoria.^{28, 29}

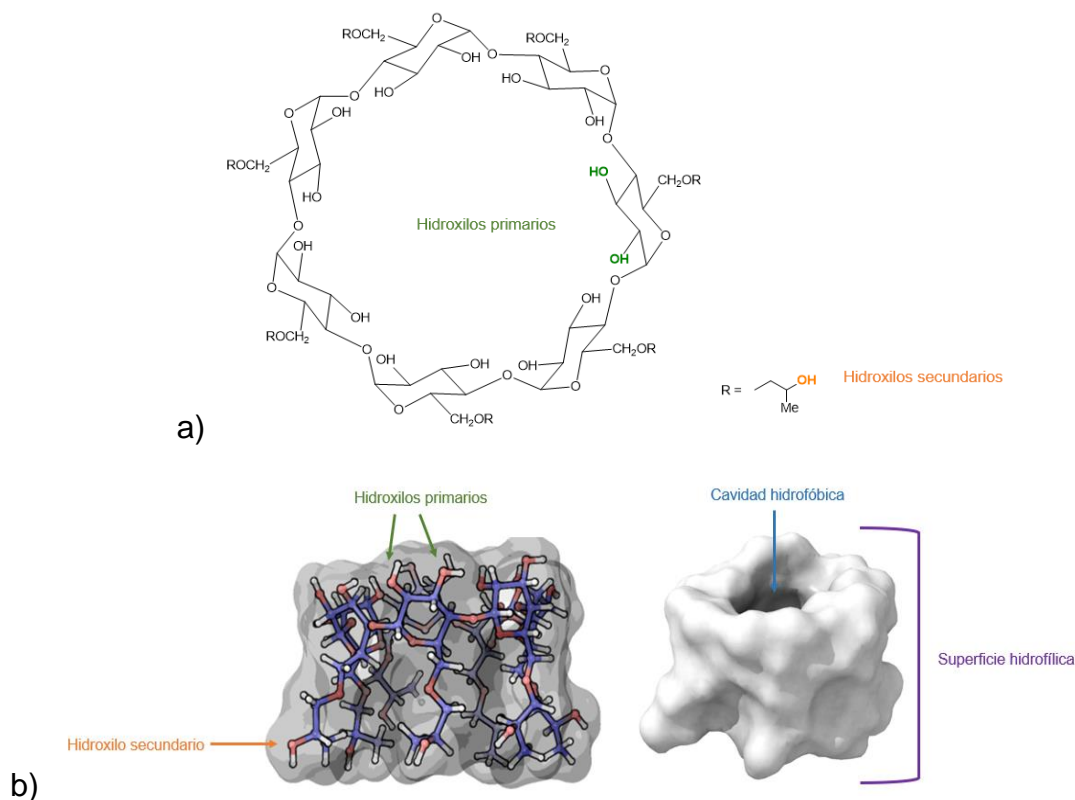


Figura 3. Estructura química de la molécula HP- β -CD. a) Fórmula estructural donde se indican los hidroxilos primarios y secundarios, b) Visualización de la estructura y posición de los hidroxilos primarios y secundarios en un modelo 2D.

Como se observa en la figura 3, los grupos hidroxilo primarios se ubican en el borde estrecho del cono truncado, los cuales tienen la capacidad de rotar y reducir el diámetro de este, mientras que los hidroxilos secundarios se ubican en el borde ancho, aportándole rigidez a la estructura mediante la formación de enlaces de hidrógeno.³⁰

La formación del complejo de inclusión se da mediante interacciones no covalentes entre el huésped y la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina, ya sean mediante interacciones de fuerza débiles como las fuerzas de van der Waals o interacciones dipolo-dipolo, lo que permite la administración de un fármaco de interés en forma de complejo de inclusión y dentro del organismo este se disocia liberando al huésped de forma rápida y uniformemente.²⁸

Este derivado se utiliza bastante en la industria farmacéutica debido a que es el primer derivado de la ciclodextrina aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos para uso humano,^{22, 76} ya que el derivado HP- β -CD ha mostrado un potencial de solubilización del colesterol menor respecto a otros derivados de la ciclodextrina, mostrando ser seguro con una $Cl_{50} > 200$ mM.²³

1.5 Profármacos

Un profármaco es una sustancia biológicamente inactiva al momento de ser administrada, posteriormente al ser metabolizada por el organismo se convierte en una sustancia farmacológicamente activa.^{31, 32} La síntesis de profármacos se realiza con el fin de aumentar la biodisponibilidad de un fármaco, mediante la mejora de su absorción intestinal pasiva o mediada por transportadores, reduciendo su rápido metabolismo y mejorando su solubilidad acuosa.

Los bioprecusores son profármacos que se caracterizan por realizar modificaciones moleculares del principio activo, generando un nuevo compuesto el cual es inactivo y requiere de ser metabolizado para dar lugar al principio activo original, siendo este un metabolito activo.^{33, 34}

Por ejemplo, el 5-Fluorouracilo se ha utilizado para el tratamiento del cáncer colorrectal, sin embargo, debido a su corta vida media o absorción en el tracto gastrointestinal superior, una concentración eficaz del fármaco no puede alcanzar el sitio de destino. Por lo que, se han sintetizado bioprecusores de éste para el tratamiento del cáncer de colon, denominados conjugados de 2-(5-fluorouracil-1-il) acetato de xilanoilo (xilo-5-FUAC).



Figura 4. Esquema del metabolismo de los profármacos Xilo-5-FUAC en el tracto del colon de ratón.

Como se observa en la figura 4 los conjugados Xilo-5-FUAC son inactivos al momento de la administración, el cual al momento de llegar al colon el biopolímero xilano es degradado por microorganismos de la microbiota y enzimas colónicas obteniendo así el metabolito activo 5-FU. Dichos profármacos mostraron una mejor estabilidad en el tracto gastrointestinal superior y en estudios de citotoxicidad *in vitro* mostraron una mayor actividad contra las líneas celulares cancerosas HCT-15 y HT-29, en comparación con el fármaco libre.³⁵

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando el problema actual del cáncer de colon y el aumento en sus cifras de incidencia, es de gran interés encontrar nuevas moléculas, las cuales induzcan apoptosis extrínseca en las células cancerosas, y que a su vez no generen efectos secundarios tan agresivos para los pacientes.

Por lo que, considerando la inducción de muerte celular mediante el mecanismo de apoptosis del Albendazol sobre células de adenocarcinoma colorrectal, el grupo de investigación del Laboratorio 121 de la Facultad de Química, UNAM, sintetizó un bioprecursor de éste (**FHL-3**), el cual resultó ser ligeramente más soluble en agua.

Con base en la información previa, ¿Será posible aumentar la solubilidad acuosa del bioprecursor **FHL-3** empleando una estrategia de preformulación farmacéutica y a su vez conservar la capacidad citotóxica en líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal?

3. HIPÓTESIS

La solubilidad acuosa del bioprecursor **FHL-3** aumentará al encontrarse en complejo de inclusión con la HP- β -CD, por lo cual al ser evaluado el compuesto preformulado en la línea celular cancerosa Caco-2 mediante el ensayo MTT, se observará una mayor reducción en la actividad metabólica de las células en comparación con el compuesto en su forma libre.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la formación de complejos de inclusión del bioprecursor **FHL-3** con HP- β -CD y su actividad citotóxica en líneas celulares de origen canceroso y sanas.

4.2 Objetivos particulares

- 4.2.1 Estudiar el proceso de reducción del bioprecursor **FHL-3**
- 4.2.2 Determinar la estequiometría del complejo de inclusión **FHL-3CI**
- 4.2.3 Producir el complejo de inclusión **FHL-3CI**
- 4.2.4 Caracterizar el complejo **FHL-3CI** mediante métodos analíticos, instrumentales y computacionales
- 4.2.5 Determinar de solubilidad intrínseca de **FHL-3** y **FHL-3CI**
- 4.2.6 Realizar estudios de biotransformación de **FHL-3** en presencia de probióticos
- 4.2.7 Evaluar al bioprecursor **FHL-3** y su complejo de inclusión **FHL-3CI** en las líneas celulares Caco-2 y J774.2 mediante el ensayo de MTT
- 4.2.8 Predecir del blanco biológico de los compuestos **FHL-3** y **FHL-3R** mediante el sistema STICH

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS

5.1.1 FHL-3

El bioprecursor de Albendazol se sintetizó en el Laboratorio 121 de la Facultad de Química, UNAM, la cual se realizó según el método descrito por el Dr. Francisco Hernández Luis.⁶

5.1.2 HP- β -CD

La 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina tiene un peso molecular de 1,460 g/mol con un grado de sustitución del 0.8. De la marca Sigma-Aldrich y su número de CAS es 128446-35-5.

5.2 LÍNEAS CELULARES

La actividad citotóxica de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI** y HP- β -CD se evaluaron sobre las líneas celulares Caco-2 y J774.2, la cuales tiene distintas características.

5.2.1 Caco-2

La línea celular Caco-2 proviene de un hombre caucásico de la edad de 72 años con adenocarcinoma colorrectal, las células se aislaron del tejido epitelial del colon.³⁶

5.2.2 J774.2

La línea celular J774.2 de monocitos/macrófagos, proviene del subclonaje de la línea celular J774, es decir se obtuvo al clonar a partir de la ascitis original y el tumor sólido J774.1, el cual proviene de células reticulares de la cepa de ratón BALB/c (ATCC).^{37, 38}

5.3 METODOLOGÍAS

5.3.1 Espectroscopía de absorción (UV-Vis)

Para la determinación de la longitud de onda (λ) de máxima absorción del **FHL-3**, se preparó una disolución de 1 mM en etanol 70°, posteriormente se determinaron sus valores de absorbancia en un rango de 250 a 700 nm cada 10 nm. La determinación se realizó en un espectrofotómetro BioTek Synergy HTX.

Para el ensayo de reducción biológica se realizaron dos curvas de calibración, una del bioprecursor **FHL-3** y otra del compuesto Sulfasalazina, la curva de calibración abarcó las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ M en etanol 70°, Las lecturas se realizaron a 350 y 340 nm, λ máx de absorción de **FHL-3** y Sulfasalazina respectivamente. Sulfasalazina del lote 2HM410A con fecha de caducidad en agosto del 2024.

Se preparó una segunda curva de calibración del complejo de inclusión de **FHL-3** para el ensayo de solubilidad intrínseca a las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, mg/mL en etanol 70°. De igual manera las lecturas se realizaron a 350 nm.

5.3.2 Reducción química

Para tener una idea preliminar de la reducción del bioprecursor y su comportamiento en el organismo, se llevaron a cabo estudios de reducción del grupo nitro del compuesto **FHL-3**. Se emplearon dos agentes reductores, el Borohidruro de sodio (NaBH_4) y el Cloruro de Estaño (SnCl_2), ambos en una proporción 1:6.

Reducción química empleando NaBH_4 como agente reductor

En un matraz de bola se colocó 1 equivalente de **FHL-3** (0.05 g), 6 equivalentes de NaBH_4 (0.0359 g) y 15 mL de etanol 70°. El sistema se colocó a reflujo de 80°C durante 24 h con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de reacción se realizaron extracciones líquido/líquido con 100 mL de Acetato de etilo (25 mL x 4). Posteriormente se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se rotaevaporó. El monitoreo del avance de la reacción y el sólido obtenido se identificó mediante cromatografía de capa fina (CCF), utilizando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5). Al sólido obtenido se le nombró **FHL-3R**.

Reducción química empleando SnCl_2 como agente reductor

En un matraz de bola se colocó 1 equivalente de **FHL-3** (0.05 g), 6 equivalentes de SnCl_2 (0.2082 g) y 15 mL de etanol 70°. El sistema se colocó a reflujo de 80°C durante 24 h con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de reacción se precipitó el estaño con una solución saturada de carbonato de potasio, obteniendo carbonato de estaño II como precipitado, se dejó reposando durante 30 min y posteriormente se decantó el sobrenadante, quedándonos con el sobrenadante libre de estaño, se le realizaron extracciones líquido/líquido con 100 mL de Acetato de etilo (25 mL x 4). Posteriormente se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se rotaevaporó. El monitoreo del avance de la reacción y el sólido obtenido se identificó mediante cromatografía de capa fina (CCF), utilizando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5). Al sólido obtenido se le nombró **FHL-R2**.

Se llevaron a cabo la determinación del Rf y punto de fusión para los compuestos **FHL-3R** y **FHL-R2**.

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

La concentración de mezclas de reacción y productos finales se llevó a cabo en un rota evaporador 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™. Los puntos de fusión de productos finales e intermediarios fueron determinados, mediante el uso de un aparato térmico digital de punto de fusión de la marca Electrothermal® modelo 9300.

El avance de reacción en todos los experimentos se hizo mediante cromatografía en capa fina, utilizando para ello, cromato placas de sílica gel de la marca SORTECH®, con indicador fluorescente a 240 nm. Las técnicas de revelado empleadas fueron tres: exposición a la luz UV (lámpara Spectroline®, modelo ENF-240C), ninhidrina como revelador de aminas y yodación.

5.3.3 Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión FHL-3CI

5.3.3.1 Acoplamiento molecular

Los ligandos fueron preparados utilizando Gaussian 16 31, con el método de DFT-B3LYP/6-31G.^{39, 40} Mediante el uso de la interfaz gráfica Pyrx⁴¹ se realizó el protocolo de acoplamiento molecular siguiendo las instrucciones proporcionadas por el programa para Autodock Vina.⁴² Se localizó la zona de acoplamiento molecular en el centro del poro de la ciclodextrina y se generó la rejilla.

5.3.3.2 Método de variación continua

Se llevó a cabo mediante el método de variación continua o método de Job's.⁴³

Se mezcló una solución de **FHL-3** en etanol 70° con una solución acuosa de HP-β-CD a diferentes proporciones (0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40: 60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0), manteniendo constante la concentración molar total (0.2 mM) mientras que la fracción molar varió de 0.1 a 0.9. Posteriormente, las muestras se analizaron en el espectrofotómetro a 350 nm. Se realizó el tratamiento de datos para posteriormente graficar la fracción mol de **FHL-3** con respecto a $\Delta\delta$ (Fracción molar * Δ Abs). El punto máximo de la curva corresponde a la relación estequiométrica entre el compuesto y la ciclodextrina.

5.3.4 Formación del complejo de inclusión

La formación del complejo de inclusión se llevó a cabo mediante el método de coevaporación.³⁶

Se disolvió en etanol 70° al bioprecursor **FHL-3** e HP-β-CD en una proporción estequiométrica huésped/hospedero de 1:1. La mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 7 días. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad a 45 °C al vacío, obteniendo el complejo de inclusión **FHL-3CI**.

La misma metodología fue empleada con los compuestos **FHL-3R** y **ABZ**, obteniéndolos complejos de inclusión **FHL-3RCI** y **ABZCI**, respectivamente.

5.3.5 Caracterización de los complejos de inclusión

Para la caracterización analítico-instrumental se hizo uso del servicio otorgado por la USAII, los cuales realizaron los estudios de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría Infrarroja y Calorimetría diferencial de barrido. También se caracterizaron los complejos de inclusión mediante la dinámica molecular, un método computacional. Más adelante se especifican las condiciones respectivas de cada método.

5.3.5.1 Espectrometría infrarroja (IR)

Para el estudio de espectroscopía por reflectancia ATR se llevó a cabo en un espectrofotómetro de FT-IR Spectrum RXI de Perkin-Elmer. Las mediciones de FT-IR se realizaron en el rango de exploración de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución óptica de 2 cm^{-1} .

5.3.5.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico se llevó a cabo en el equipo Mettler Toledo DSC 821, en un rango de temperatura de 40 a 200 $^{\circ}\text{C}$, a una velocidad de calentamiento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bajo un flujo constante de N_2 a 100 mL/min .

5.3.5.3 Dinámica molecular

5.3.5.3.1 Preparación de ligandos

La estructura inicial de **FHL-3** se extrajo del complejo **FHL-3/HP- β -CD** generado por acoplamiento molecular, las topologías de ligandos se generaron con el paquete ACPYPE.⁴⁴

5.3.5.3.2 Simulaciones de dinámica molecular

El sistema **FHL-3/HP- β -CD** se sometió a una simulación de dinámica molecular (MD) sin restricciones de 30 ns utilizando el campo de fuerza AMBER14SB³³ implementado en el software GROMACS 2019.6.⁴⁵

Los sistemas se solvataron con moléculas de agua TIP3P en una caja cúbica que se extendía al menos 5,0 nm desde la proteína. Se agregaron aleatoriamente iones de sodio y cloruro para neutralizar los sistemas y alcanzar una concentración de 0,15 M.

Cada sistema se minimizó y equilibró la energía durante 1,0 ns en conjuntos canónicos (NVT) e isotérmico-isobáricos (NPT) antes de las producciones de MD. Se aplicaron restricciones holonómicas a todos los enlaces con átomos de hidrógeno utilizando el algoritmo LINCS.⁴⁶ La temperatura se fijó en 300 K con el termostato de acoplamiento v-rescale,⁴⁷ mientras que la presión se mantuvo en 1,0 bar con el baróstato Parrinello-Rahman.⁴⁸ El radio de corte potencial de Lennard - Jones se truncó a 1,2 nm. Las interacciones electrostáticas de corto alcance (Coulombic) se establecieron en 1,2 nm, después de lo cual se utilizó el método Ewald de malla de partículas (PME) para las interacciones electrostáticas de largo alcance.

5.3.5.3.3 Análisis y visualización

La desviación cuadrática media (RMSD) de **FHL-3** se obtuvo con respecto a su posición inicial dentro del complejo utilizando la paquetería de análisis incluida en el programa.

5.3.5.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se realizaron estudios del protón unidimensional (^1H) y bidimensional (ROESY) a temperatura ambiente, en los espectrómetros marca Varian modelos VNMRs de 600 MHz y MR de 300 MHz, en disolución de dimetilsulfóxido deuterado con tetrametilsilano como estándar interno.

5.3.6 Determinación de la solubilidad intrínseca de FHL-3 y de FHL-3Cl

La solubilidad de **FHL-3** y su complejo se determinó mediante el método de agitación de matraz.⁴⁹ Se pesó una cantidad de 5 mg de **FHL-3** y la cantidad correspondiente del complejo equivalente a 5 mg del compuesto solo y se colocó en un matraz.

A cada matraz se adicionó una alícuota de 5 mL de Buffer de fosfato salino (pH=7.4). Las muestras permanecieron en agitación durante 48 h a 25 °C y posteriormente se dejaron reposar durante 24 h para permitir la sedimentación y separación de fases. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 μm (Millex GV) y se cuantificó la cantidad disuelta en cada muestra por espectroscopia UV a 350 nm.

El estudio se realizó por triplicado y se realizó un análisis t-student, se realizó con GraphPad Prism versión 9.5.1.733 para Windows.

5.3.7 Ensayos de biorreducción

Se emplearon distintos probióticos para simular la actividad reductora de la microbiota presente en el colon.

Tabla 1. Características de los probióticos utilizados.

| Probiótico | Microorganismo | Presentación farmacéutica | Lote | Fecha de caducidad |
|------------|--------------------------------|---------------------------|-------|--------------------|
| Sinuberase | <i>Bacillus clausii</i> | Suspensión | 21251 | MAY 24 |
| Pisalak | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Suspensión | JCO17 | MAR 24 |
| | <i>Bifidobacterium longum</i> | | | |
| | <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | | |
| Floratil | <i>Saccharomyces boulardii</i> | Cápsulas | 157 | SEP 24 |

Sin embargo, los probióticos Pisalak y Floratil presentaron demasiada interferencia al momento de realizar las mediciones de concentración del compuesto **FHL-3CI** mediante el espectro, por lo que se decidió continuar el experimento implementando solamente el probiótico Sinuberase.

En cada tubo cónico se colocó 1 mL del complejo de inclusión **FHL-3CI** en una concentración de 50 μ M, el ensayo se realizó en 5 condiciones distintas, sin embargo, manteniendo la concentración y el probiótico siempre, cada una de las condiciones se muestran en la figura 5.

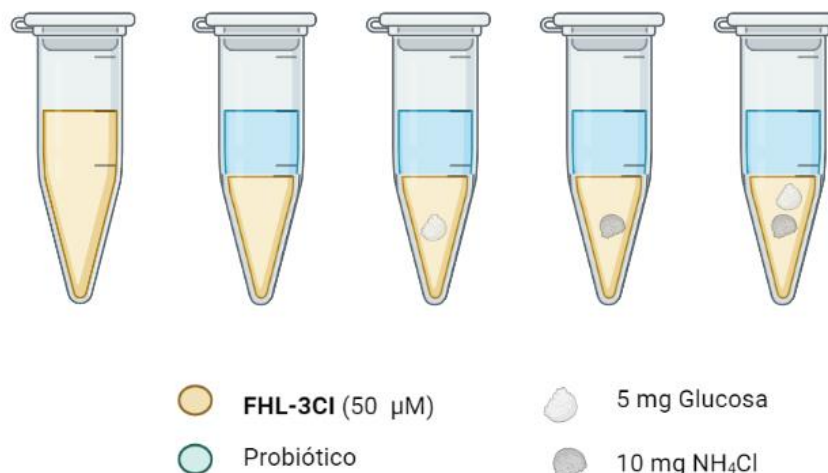


Figura 5. Condiciones en las que se encuentra cada uno de los tubos del ensayo de biorreducción. Tubo a) Solución de **FHL-3CI** en etanol 70° a 50 µM, b) Solución de **FHL-3CI** en Sinuberase a 50 µM, c) Solución de **FHL-3CI** en Sinuberase a 50 µM con 5 mg de Glucosa, d) Solución de **FHL-3CI** en Sinuberase a 50 µM con 10 mg de NH₄Cl y tubo e) Solución de **FHL-3CI** en Sinuberase a 50 µM con 5 mg de Glucosa y 10 mg de NH₄Cl.

Todos los tubos se mantuvieron en agitación constante a 34°C, transcurridos 15 min se midió la concentración inicial de **FHL-3CI** sin tratamiento, posteriormente se dejó en las mismas condiciones durante 24h. Después de reposar durante 30 min se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0.22 µm (Millex GV) y se cuantificó la cantidad de **FHL-3CI** presente en cada muestra por espectroscopia UV a 350 nm.

Este ensayo se validó empleando el fármaco Sulfasalazina, las mediciones se realizaron en su lambda máxima a 340 nm.

Se eligió dicho compuesto debido a que se ha reportado que la microbiota presente en el colon tiene la capacidad de metabolizar este bioprecursor reduciendo el grupo azo, liberando así sus dos principios activos, la Sulfapiridina la cual es usada para el tratamiento de dermatitis herpetiforme y el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o también conocido como Masalazina el cual se emplea en el tratamiento de colitis ulcerosa activa.^{50, 51, 52, 53, 54, 55}

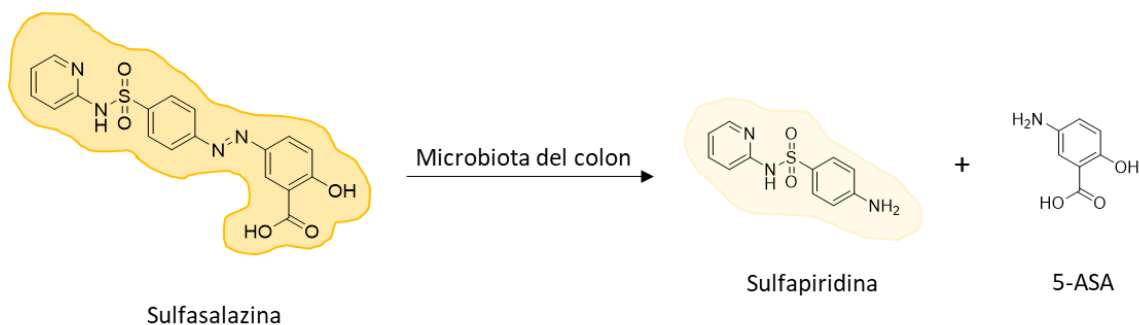


Figura 6. Biotransformación del fármaco Sulfasalazina mediante la reducción del grupo azo debido a la actividad de la microbiota presente en el colon.

La Sulfasalazina es un polvo color amarillo intenso, sin embargo, sus productos de la biorreducción no como se muestra en la figura 6, la Sulfapiridina es de color amarillo muy tenue, mientras que la Masalazina es de color blanco. Por lo que esta reducción en la intensidad del color permite monitorear la reducción del grupo azo mediante espectroscopia de absorción a una lambda de 340 nm.^{56, 57}

Considerando lo anterior, se eligió utilizar la Sulfasalazina para validar los ensayos de biorreducción, ya que el compuesto **FHL-3** igualmente es de color amarillo y su lambda máxima es a 350 nm, el bioprecursor al ser reducido su grupo nitro se ve favorecida la ciclación intramolecular obteniendo, así como producto final el Albendazol, el cual es un sólido de color blanco, por lo que de igual manera se puede seguir la biorreducción del compuesto **FHL-3** mediante espectroscopia de absorción.

El estudio se realizó por triplicado y se realizó un análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, el cual se realizó con GraphPad Prism versión 9.5.1.733 para Windows.

5.3.8 Evaluación biológica

El ensayo de citotoxicidad de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, **ALBZCI** y HP- β -CD, fueron realizados en colaboración con la Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. en el Laboratorio de estudios epidemiológicos, clínicos, diseños experimentales e investigación. Los compuestos fueron en dos modelos de líneas celulares Caco-2 y un cultivo celular no tumoral, J774.2. Empleando el compuesto Cisplatino como control positivo.

Las células de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, fueron cultivadas en medio DMEM HIGH GLUCOSE suplementado con SFB al 20% y antibiótico-antimicótico al 1%, en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Mientras que las células de macrófago de ratón J774.2, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%, en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Los medios de cultivo se reemplazaron en un intervalo de 2 a 3 días, considerando la confluencia celular.

Para efectuar la evaluación de la actividad metabólica de los compuestos se llevó a cabo el ensayo de MTT, el cual se basa en la capacidad de las células vivas y metabólicamente activas de reducción metabólica de la sal de tetrazolio MTT a su forma reducida formazan. Dicha reducción se debe a la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, principalmente la enzima succinato deshidrogenasa (SDH).^{58, 59, 60, 61, 62}

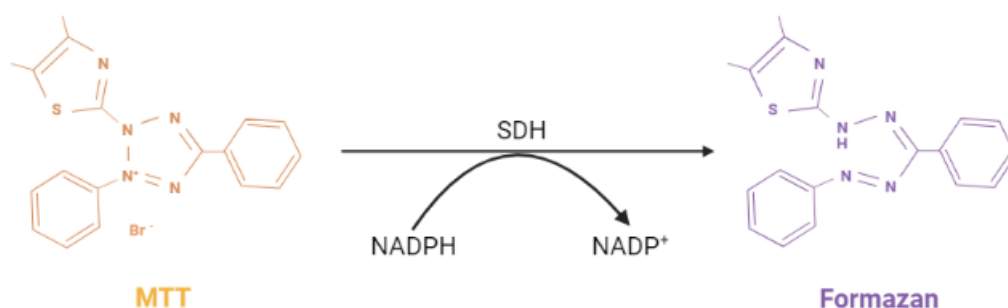


Figura 7. Mecanismo del ensayo de MTT en células vivas.^{60, 61, 62}

Se colocaron 1×10^4 células en una placa de 96 pozos, a continuación, se dejaron adherir por 24 horas a 37°C. Posteriormente se adicionaron cada una de las moléculas (**FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, **ABZCI**) a distintas concentraciones por triplicado, que fueron de 100 μ M a 12.5 μ M, mediante diluciones seriadas, aforadas a un volumen total de 200 μ L por pocillo, se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. respectivo medio,

colocando 10 μ l de MTT (concentración: 500 μ g/ml). Se incubaron las células durante 4h a 37°C para permitir la formación de cristales de formazan por las células viables metabólicamente activas, los cuales se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), la lectura de densidad óptica (DO) se realizó a una longitud de onda de 540 nm. El porcentaje de viabilidad se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

El estudio se realizó por triplicado en momentos diferentes, también se realizó un análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, el cual se realizó con GraphPad Prism versión 9.5.1.733 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1 Espectrometría de absorción (UV-Vis)

Se realizó un barrido espectral del compuesto **FHL-3**, disuelto en etanol 70° a una concentración de 0.1 mM, el rango de medición fue de 200-700 nm.

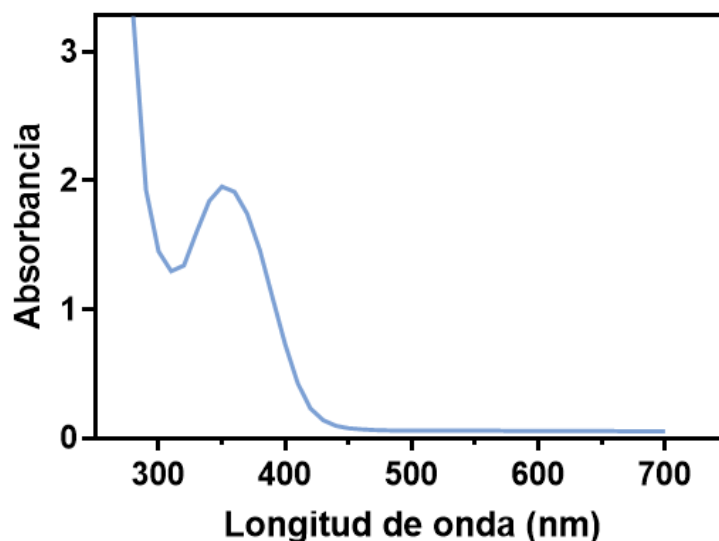


Gráfico 1. Espectro de absorción de **FHL-3**. A 350 nm se observa la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción del compuesto.

Se determinó que la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción del compuesto **FHL-3** se da a 350 nm como se muestra en el gráfico 1. Este dato es de gran ayuda para los siguientes ensayos, ya que permite determinar la longitud de onda a la cual se realizarán las mediciones de las concentraciones del compuesto **FHL-3**.

6.2 Reducción química

Se realizó la reducción química del grupo nitro a amino del bioprecursor **FH-3** con el fin de obtener el compuesto reducido. Se utilizó el borohidruro de sodio y el cloruro de estaño como agentes reductores, obteniendo dos productos distintos, dependiendo el agente reductor empleado. Las características de ambos sólidos obtenidos se concentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades físicas de los sólidos obtenidos empleando distintos agentes reductores.

| | FHL-3R | FHL-R2 |
|-----------------|--------------------------|------------------------|
| Agente reductor | NaBH ₄ | SnCl ₂ |
| Apariencia | Sólido de color amarillo | Sólido de color blanco |
| Rendimiento | 73.92% | 15.67% |
| Punto de fusión | 118 – 120 °C | 208 – 210 °C |
| Rf* | 0.7 | 0.4 |

*CH₂Cl₂/MeOH (95:5)

Se caracterizaron ambos productos con ayuda de Espectroscopía Infrarroja (IR), Espectrometría de masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C (RMN).

Los análisis por espectrometría de masas se efectuaron en los espectrómetros de masas marca LECO®, modelo Pegasus 4D, con analizador másico TOF (Tiempo de Vuelo) y ionización electrónica, acoplado a un cromatógrafo de gases de la marca Agilent®, modelo 6890N con columna capilar DB5; así como en el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo, marca Perkin Elmer®, modelo AxION 2 TOF.

6.2.1 Reducción química empleando NaBH_4 como agente reductor

Al analizar la EM del compuesto **FHL-3R** se observó una disminución en la masa molecular del compuesto, lo que sugiere que se llevó a cabo una hidrólisis del compuesto **FHL-3**. Complementado con el espectro de IR se observa la pérdida de la señal de los grupos éster. Por último, se confirmó lo anterior en el espectro de ^{13}C RMN. En el cual se observó la pérdida de la señal correspondiente al carbono del carbonilo.

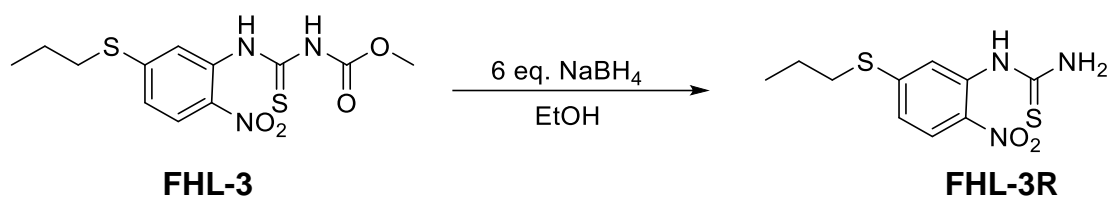


Figura 8. Reducción de **FHL-3** con NaBH_4 .

6.2.2 Reducción química empleando SnCl_2 como agente reductor

Se compararon los espectros, características físicas y pf del **FHL-R2** y se determinó que la estructura del compuesto corresponde al Albendazol.¹⁷

Lo anterior sugiere que el agente reductor, SnCl_2 , realizó la reducción del grupo nitro, sin embargo, la ciclación intramolecular está altamente favorecida por lo que no es posible obtener de manera directa al intermediario de interés.

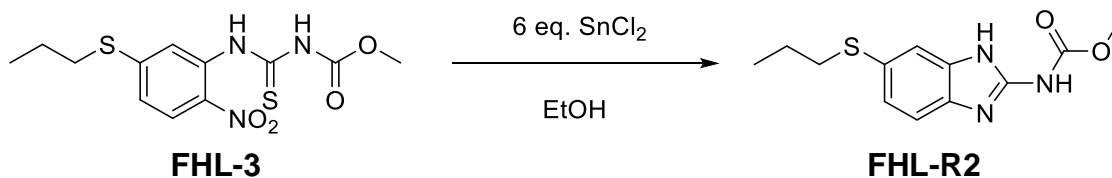


Figura 9. Reducción de **FHL-3** con SnCl_2 .

6.3 Determinación estequiométrica del complejo de inclusión

6.3.1 Acoplamiento molecular

Para realizar una predicción de la formación del complejo de inclusión entre el bioprecursor **FHL-3** y la ciclodextrina se realizó el acoplamiento molecular entre estos dos compuestos mediante el uso de la interfaz gráfica Pyrx,⁴¹ localizando la zona de acoplamiento molecular dentro de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina.

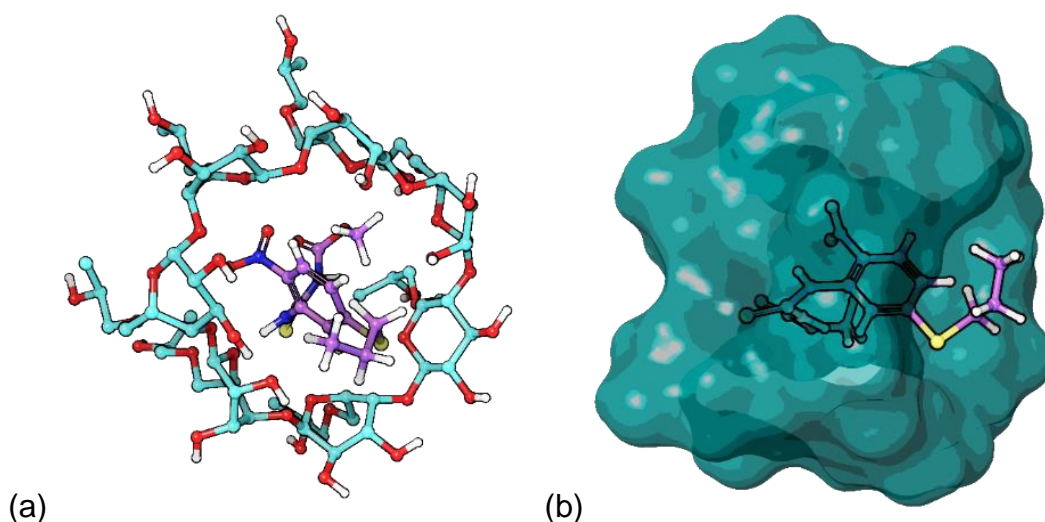


Figura 10. Acoplamiento molecular entre **FHL-3** e HP-β-CD. En la imagen (a) se observa el complejo de inclusión **FHL-3** en un modelo de bolas y palos, mientras que en la imagen (b) se observa el complejo de inclusión **FHL-3** en un modelo 3D.

La interfaz genera numerosas poses en las que se podría acoplar el **FHL-3** dentro de la cavidad, de las cuales se seleccionó la pose que se muestra en la figura 10, ya que dicha pose es la que más favorecida está, dada su energía de unión de -5.1 Kcal/mol.

En dicho acoplamiento se observa la internalización del bioprecursor en la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina en una estequiometría 1:1, se internaliza la estructura del compuesto **FHL-3** en su gran mayoría, dejando de fuera la ramificación correspondiente al tioéter y la cadena de carbonos.

6.3.2 Método de variación continua

Para realizar el método de variación continua (Jobs), las mediciones de absorbancia se realizaron a 350 nm, la cual es la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción del compuesto **FHL-3**, esto se determinó previamente en un barrido espectral.

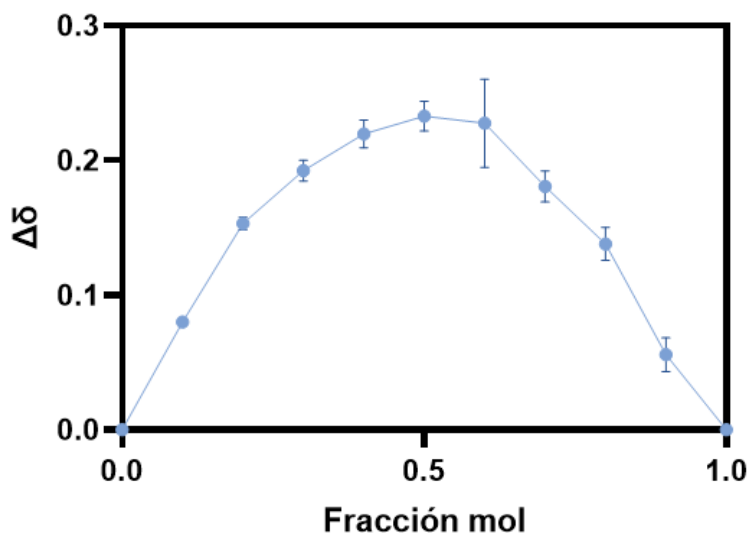


Gráfico 2. Resultado del método de variación continua del sistema **FHL-3/ HP- β -CD**. Los resultados se presentan como $\Delta\delta \pm DE$ ($n=3$).

Este método permite determinar de manera experimental la estequiometría del complejo de inclusión **FHL-3CI** entre el huésped (**FHL-3**) y el hospedero (HP- β -CD), en el gráfico 2 se observa el punto máximo en la fracción mol 0.5, lo que sugiere una estequiometría 1:1 entre el huésped y el hospedero.

6.4 Caracterización de los complejos de inclusión

6.4.1 Espectrometría Infrarroja (IR)

Se llevó a cabo el estudio de espectroscopía por reflectancia ATR en un espectrofotómetro de FT-IR para los compuestos **FHL-3**, **FHL-3Cl**, y HP- β -CD, los espectros de dicho compuesto se encuentran en la sección de APENDICE.

El espectro de **FHL-3** se caracterizó por la presencia de los picos del grupo nitro a 1592 cm^{-1} , mientras que las aminas se observan en la frecuencia de 3429 cm^{-1} . A 1234 cm^{-1} se observa el pico del acetato. Se observa un pico a 3179 cm^{-1} correspondiente a la tensión =C-H de la vibración del anillo aromático, de igual forma están presentes los picos de las tenciones -C=C- a 1574 , 1526 , 1485 y 1432 cm^{-1} .

En el espectro de HP- β -CD se observa el estiramiento característico del grupo OH a 3350 cm^{-1} los cuales se asignan a los modos de vibración de estiramiento de los grupos O-H secundarios. Las vibraciones de 2925 y 2968 cm^{-1} corresponde a CH_3 y CH respectivamente. El pico a los 947 cm^{-1} pertenece a grupo CH de anillo. La región a $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ contiene las bandas de vibración de C-C y C-O pertenecientes al anillo piranoide y enlaces glucosídicos, respectivamente, el pico se observa a 1022 cm^{-1} . Por último, se observa una banda a 1647 cm^{-1} en el espectro de HP- β -CD corresponde a la flexión δ -HOH de las moléculas de agua unidas a HP- β -CD.⁶³

Respecto al espectro de **FHL-3Cl**, se observa que varios picos de **FHL-3** están desplazados y la desaparición de las señales de las aminas, lo que sugería un cambio en el entorno debido a la formación de complejos de inclusión entre el **FHL-3** y la HP- β -CD. El enlace de estiramiento de OH de HP- β -CD puro cambió de frecuencia en la mezcla física y el complejo de inclusión a 3268 y 3359 cm^{-1} respectivamente, esto se debe a la participación de los grupos hidroxilo de HP- β -CD en los enlaces de hidrógeno con los grupos de **FHL-3**. La banda del esqueleto aromático también estuvo ausente del espectro del complejo de inclusión, lo que sugiere el atrapamiento del anillo aromático dentro de la cavidad HP- β -CD.⁶⁴

Por lo tanto, el análisis de los espectros FT-IR confirmó la interacción de los compuestos **FHL-3** e HP- β -CD y la formación del nuevo complejo.

6.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El gráfico 3 es un concentrado de los termogramas de los compuestos de **FHL-3**, **FHL-3CI** y HP- β -CD, los cuales se realizaron de 25 – 200°C. Los termogramas otorgan información de la estabilidad y comportamiento de los compuestos a lo largo del barrido de calor, así como un indicio de la formación del complejo de inclusión.

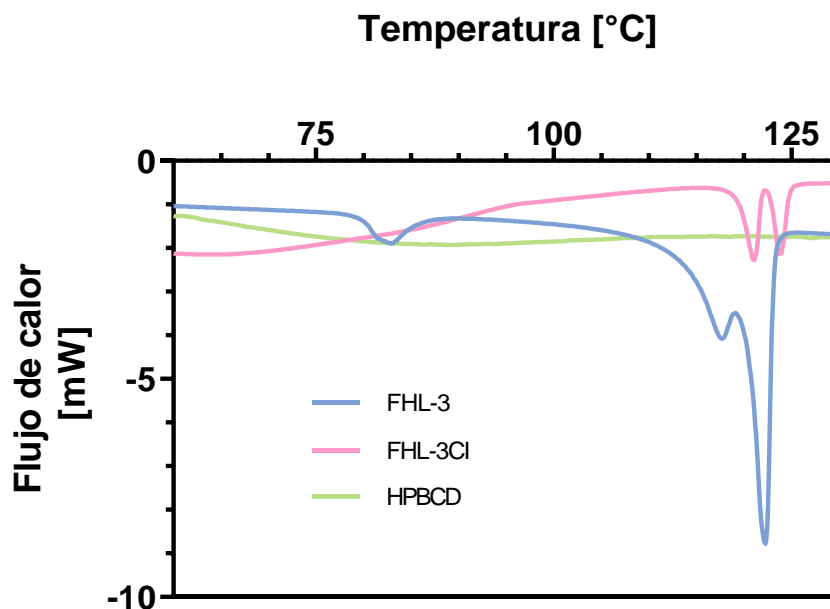


Gráfico 3. Termogramas DSC de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI** y HP- β -CD.

El compuesto **FHL-3** presenta dos endotermas de descomposición a 83 y 122 °C, mientras que la endoterma correspondiente a su punto de fusión se presentó a los 122 °C, respecto al termograma de la HP- β -CD se observa la presencia de una endoterma muy característica de las ciclodextrinas, la cual es una endoterma muy prolongada y estirada la cual se debe a los grupos hidroxilo y agua presentes en su estructura. En el termograma del compuesto **FHL-3CI** se ven disminuida la intensidad y desplazados los picos de descomposición y punto de fusión a 121 °C y 123 °C, respectivamente, a su vez se ve la inclusión de la endoterma característica de la ciclodextrina.

6.4.3 Dinámica molecular

El complejo generado a partir de GlideXP se estudió durante un periodo de 30 ns, las mediciones de RMSD se realizaron a partir de la pose inicial del compuesto **FHL-3** registrando su cambio de posición dentro de la cavidad de la ciclodextrina.

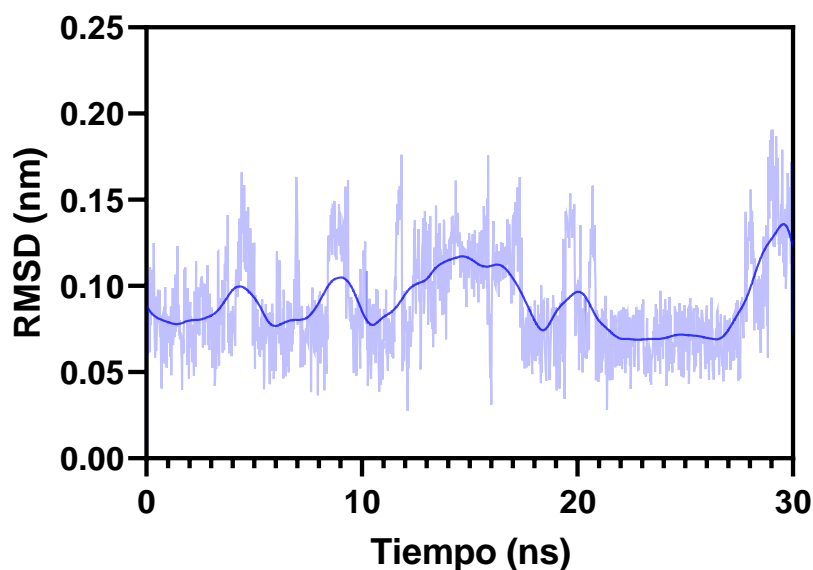


Gráfico 4. RMSD de **FHL-3** en la dinámica molecular sobre HP- β -CD. Donde se observa el movimiento del bioprecursor dentro de la cavidad de la ciclodextrina.

En el gráfico 4 se observa que el compuesto **FHL-3** se mantiene en movimiento constante dentro de la cavidad de la ciclodextrina, sin embargo, se mantiene la formación del complejo de inclusión.

6.4.4 Resonancia magnética nuclear

Esta técnica permite determinar la forma en que la molécula huésped (**FHL-3**) interactúa con la ciclodextrina, y a su vez también permite conocer la posición en la que se encuentran acopladas.

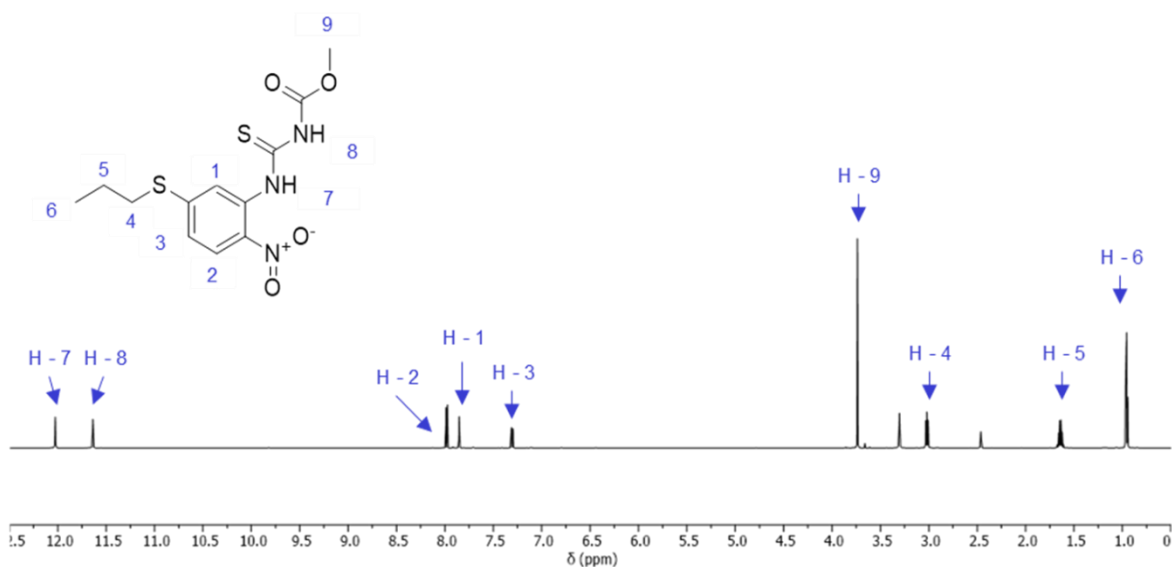


Figura 11. Espectro ¹H RMN de **FHL-3**. El singulete a 12.07 ppm integra para 1H y corresponde al H-7 de la amina, el singulete a 11.68 ppm integra para 1H corresponde al H-8 de la segunda amina, el doblete a 8.02 ppm integra para 1H corresponde a H-2, singulete a 7.89 ppm integra para 1H corresponde a H-1, doblete a 7.35 ppm integra para 1H corresponde a H-3, el singulete a 3.78 integra para 3H corresponde a H-9, el triplete a 3.10 – 3.03 integra para 2H corresponde a H-4, sextuplete a 1.68 integra para 2H corresponde al H-5, el triplete a 1.00 integra para 3H corresponde a H-6.

En la figura 11 se identificó y enumeró los protones presentes en la molécula del **FHL-3**, para más adelante identificar cuales son los hidrógenos que interactúan con la cavidad hidrofóbica de la Hidroxipropil-β-ciclodextrina para llevar a cabo la formación del complejo de inclusión.

A su vez, también se identificaron cada uno de los protones del macrociclo, los cuales se muestran en la Figura 12.

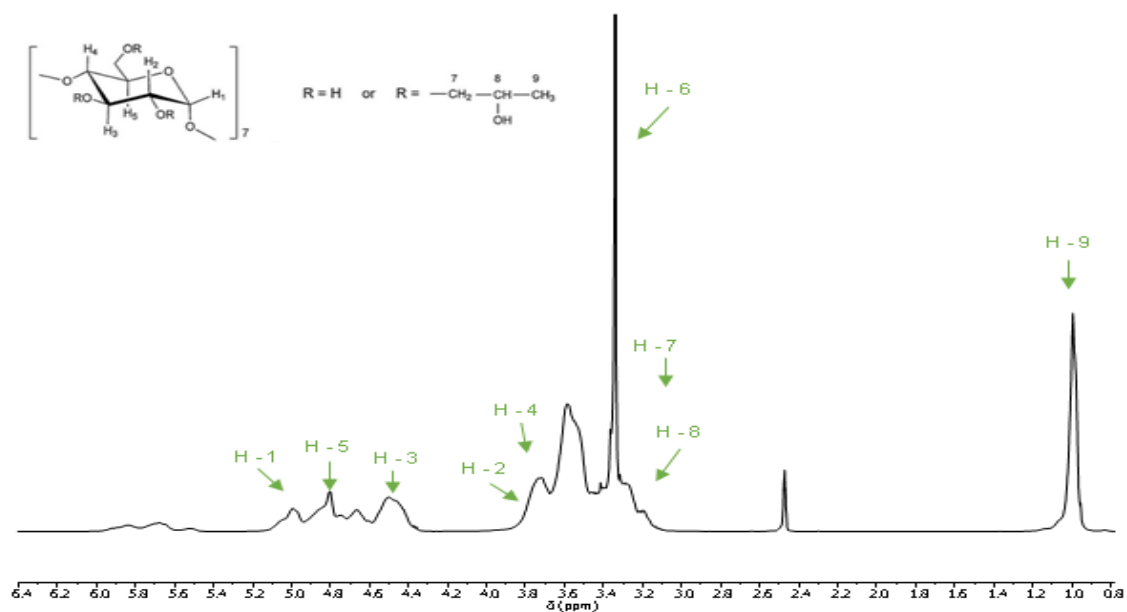


Figura 12. Espectro ¹H RMN de HP-β-CD. El singulete a 5.02 integra para 1H corresponde a H-1, singulete a 4.8 integra para 1H y corresponde a H-5, singulete a 4.5 integra para 1H y corresponde a H-3, singulete a 3.7 integra para 1H y corresponde a H-2, singulete a 3.5 integra para 1H y corresponde a H-4, singulete a 3.3 integra para 1H y corresponde a H-6, singulete a 3.3 integra para 1H y corresponde a H-7, singulete a 3.2 integra para 1H y corresponde a H-8, singulete a 1.0 integra para 1H y corresponde a H-9.

Una vez identificados los protones presentes tanto en el espectro del bioprecursor como en el de la ciclodextrina, se procedió a buscar estos mismos en el espectro del complejo de inclusión, como se muestra en la figura 13.

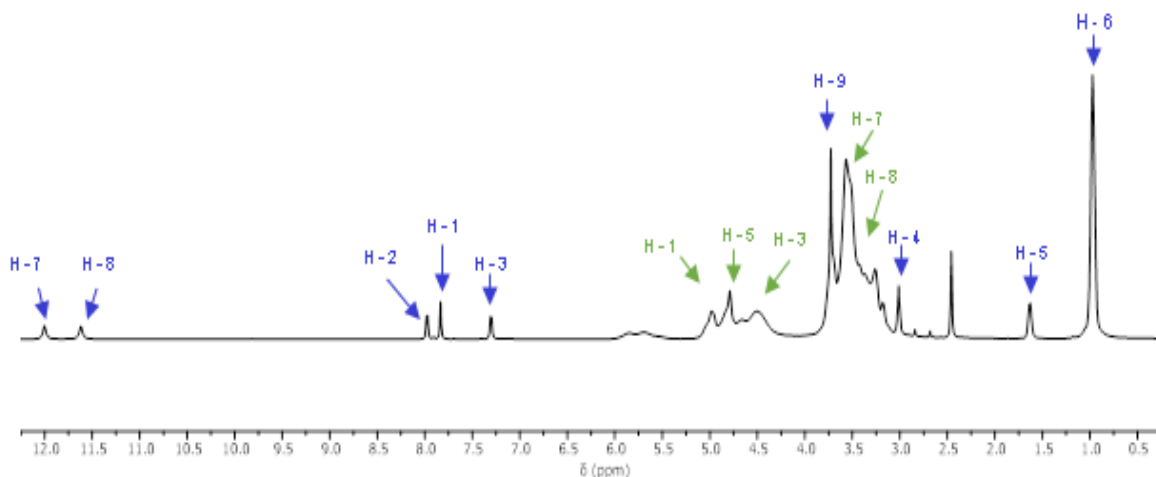


Figura 13. Espectro ^1H RMN de **FHL-3CI**. Señales correspondientes al compuesto **FHL-3**: El singulete a 12.07 ppm integra para 1H y corresponde al H-7 de la amina, el singulete a 11.68 ppm integra para 1H corresponde al H-8 de la segunda amina, el doblete a 8.02 ppm integra para 1H corresponde a H-2, singulete a 7.89 ppm integra para 1H corresponde a H-1, doblete a 7.35 ppm integra para 1H corresponde a H-3, el singulete a 3.78 integra para 3H corresponde a H-9, el triplete a 3.10 – 3.03 integra para 2H corresponde a H-4, sextuplete a 1.68 integra para 2H corresponde al H-5, el triplete a 1.00 integra para 3H corresponde a H-6. Señales correspondientes al compuesto HP- β -CD: El singulete a 5.02 integra para 1H corresponde a H-1, singulete a 4.8 integra para 1H y corresponde a H-5, singulete a 4.5 integra para 1H y corresponde a H-3, singulete a 3.6 integra para 1H y corresponde a H-6, singulete a 3.3 integra para 1H y corresponde a H-7, singulete a 3.3 integra para 1H y corresponde a H-8, singulete a 1.0 integra para 1H y corresponde a H-9.

En la figura 13 se observa la integración de las señales de los protones de ambos compuestos, así como la disminución en la intensidad de los picos correspondientes a los protones del compuesto **FHL-3**, a su vez, las señales correspondientes a los protones de la ciclodextrina se vieron desplazadas a campo alto y también se observa la desaparición de las señales de los protones 2 y 4, lo cual sugiere la formación del complejo de inclusión.

Para complementar el estudio del complejo de inclusión se realizó el análisis ROESY, del complejo de inclusión mostrado en la siguiente figura 14.

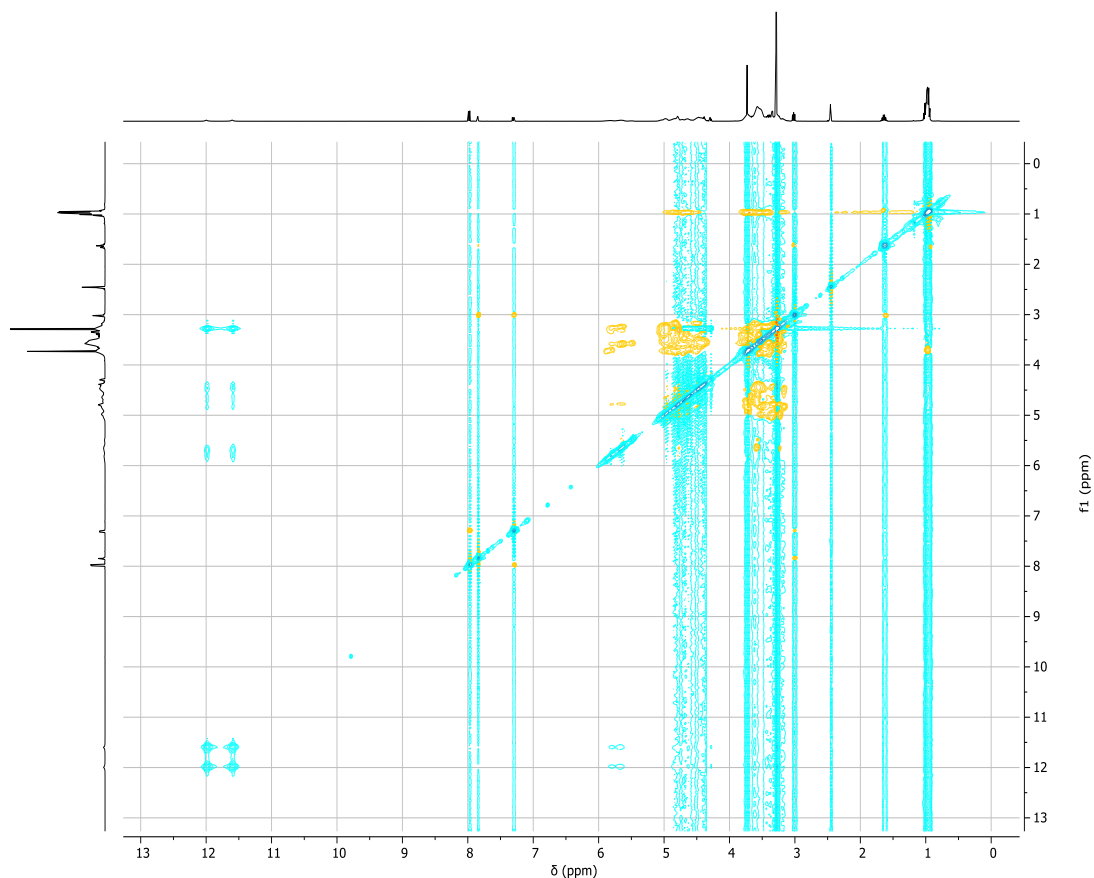


Figura 14. Espectro ROESY de **FHL-3/HP-β-CD**, donde se observan las interacciones intra e intermoleculares de los compuestos **FHL-3** y **HP-β-CD**.

Las señales que se muestran en la figura 14 corresponde a interacciones intramoleculares de los compuestos **FHL-3** e **HP-B-CD** y a su vez, las interacciones intermoleculares entre estos dos compuestos, estas últimas son las señales de nuestro interés.

Después de descartar las interacciones intramoleculares de los compuestos **FHL-3** e HP- β -CD, como se muestra en a figura 15, se identificaron 2 interacciones intermoleculares.

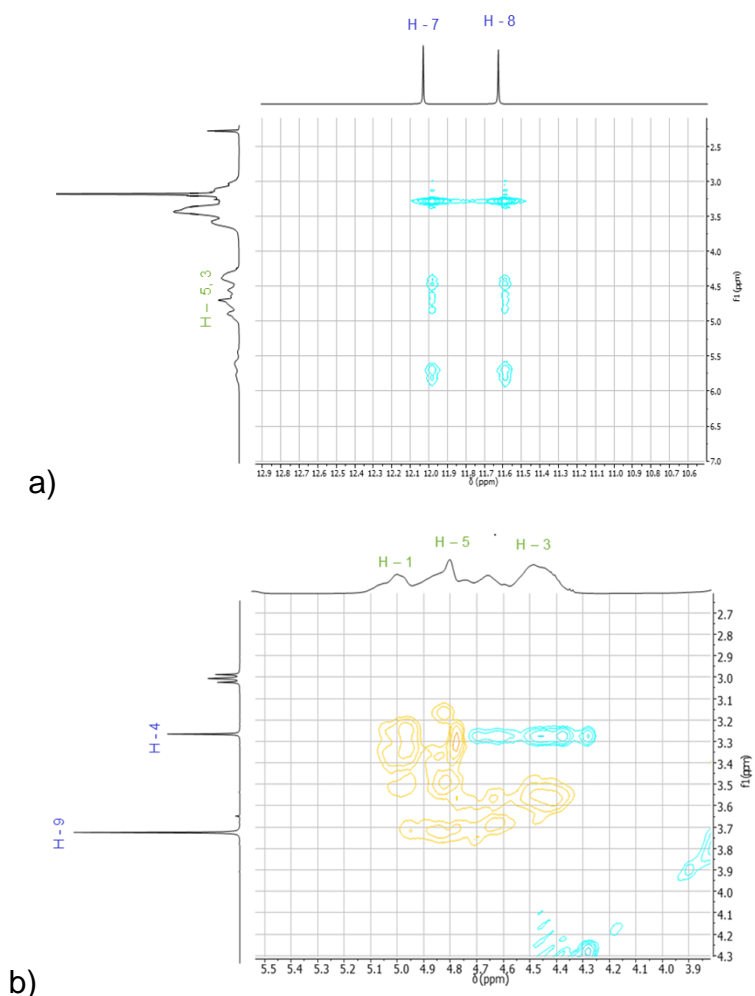


Figura 15. Sección del espectro ROESY con picos cruzados entre el bioprecursor **FHL-3** e Hidroxipropil- β -ciclodextrina. a) Interacción entre los protones H-3 y H-5 de la HP- β -CD y con los H-7 y H-8 del bioprecursor **FHL-3**, b) Interacción entre los protones H-1, H-3 y H-5 de la HP- β -CD y con los H-4 y H-9 del bioprecursor **FHL-3**.

Dado que los protones H-3 y H-5 de la ciclodextrina son los que interactúan con el huésped como lo indica la figura 15, se puede afirmar la internalización del bioprecursor en la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina, formando así el complejo de inclusión. Las señales H-7 y H-8 del bioprecursor corresponden a las aminas lo que sugiere que está internalizado del lado más sustituido del anillo aromático, sin embargo, también se observa que interactúan los protones H-4 y H-9, lo cual significa que tiene más de un acomodo de internalizarse.

6.5 Determinación de solubilidad intrínseca

Los valores de solubilidad acuosa del bioprecursor **FHL-3** y su complejo de inclusión con la Hidroxipropil- β -ciclodextrina (**FHL-3CI**) presentados en la Tabla 3, se determinaron a partir del método de agitación de matraz.

Taba 3. Solubilidad de **FHL-3** y su complejo de inclusión.

| Compuesto | Solubilidad (mg/mL) (media \pm DE) | *S _{CD} / **S_{FHL-3} |
|----------------|--------------------------------------|---|
| FHL-3 | 0.008 \pm 0.001 | — |
| FHL-3CI | 0.024 \pm 0.004 | 2.91 |

*S_{FHL-3}: Solubilidad de **FHL-3**

*S_{CD}: Solubilidad del complejo **FHL-3CI**

El compuesto **FHL-3** mostró un aumento significativo en su solubilidad acuosa (2.91 veces) estando en complejo de inclusión respecto al compuesto por sí solo, en el gráfico 5 se muestran los datos en formato de barras. Las concentraciones disueltas se calcularon interceptando las absorbancias medidas de cada una de las muestras en la curva de calibración, la cual se encuentra en la sección de APENDICE.

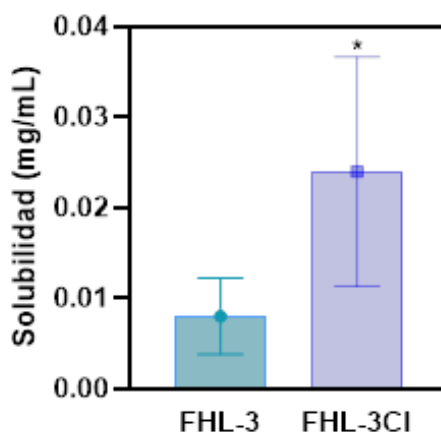


Gráfico 5. Solubilidad intrínseca de los compuestos **FHL-3** y **FHL-3CI**., Los datos se presentan como SI \pm DE (n=3). Análisis estadístico t-student, con un $\alpha = 5\%$, $p < 0.05$, la diferencia significativa se indica con un *.

6.6 Ensayos de biorreducción

Una vez transcurridas las 24 h del tratamiento de las muestras, se filtraron las y se midió su absorbancia a 350 nm, posteriormente se calculó la concentración de **FHL-3CI** presente en cada una de las muestras con la ayuda de las curvas de calibración previamente realizadas, las cuales se encuentran en la sección de APENDICE.

Tabla 4. Concentración de **FHL-3CI** presente en cada muestra tratadas tratados con los probióticos Sinuberase, Pisalak y Floratil.

| Probiótico | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| | Sin tratamiento (FHL-3CI) | Tratamiento | | | |
| | | Agua | Glucosa | NH ₄ Cl | Glucosa y NH ₄ Cl |
| Sinuberase | 33.35 \pm 0.045 | 4.37 \pm 0.021 | 0.44 \pm 0.008 | 1.38 \pm 0.004 | 5.47 \pm 0.004 |
| Pisalak | 33.35 \pm 0.045 | -12.05 \pm 0.307 | -48.71 \pm 0.343 | -1.59 \pm 0.145 | -8.99 \pm 0.641 |
| Floratil | 33.35 \pm 0.045 | -0.30 \pm 0.125 | -3.48 \pm 0.140 | -7.74 \pm 0.234 | -4.13 \pm 0.463 |

En la tabla 4 se muestran las concentraciones obtenidas en cada una de las condiciones con el respectivo probiótico que se utilizó para su tratamiento. Sin embargo, se observa que las concentraciones obtenidas a partir de los tratamientos con los probióticos Pisalak y Floratil son negativas, esto se debe a una alta interferencia del probiótico a pesar del tratamiento de la muestra. Por lo cual, se descartaron estos datos, conservando solo los obtenidos con el tratamiento de Sinuberase.

En el gráfico 6 se muestra un gráfico de barras en donde se representa la concentración presente de **FHL-3CI**, en cada uno de los tubos después del tratamiento con el probiótico Sinuberase.

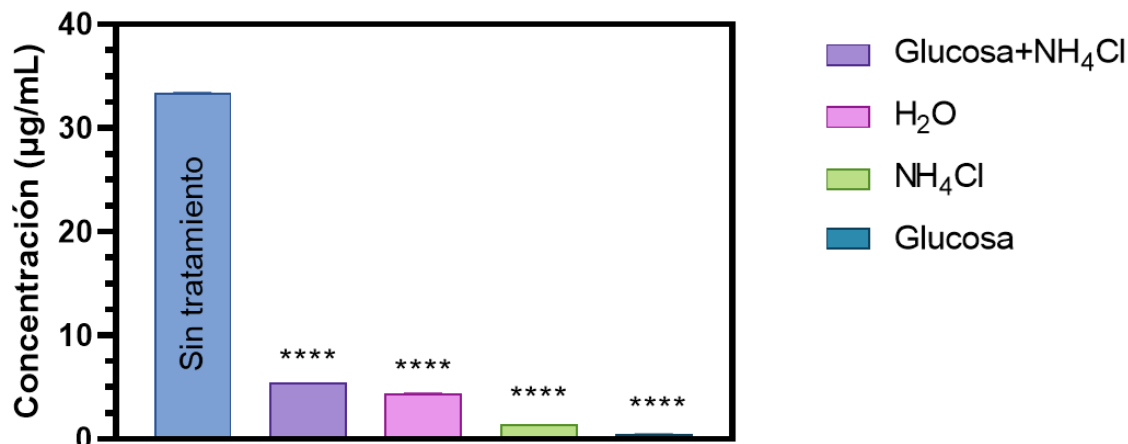


Gráfico 6. Biorreducción utilizando el probiótico Sinuberase. Análisis estadístico ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los **** indican una diferencia significativa. Los datos se presentan como Concentración (µg/mL) ± DE (n=3).

Se observa la disminución de la concentración del **FHL-3CI** en el tubo control, ya que el complejo de inclusión se encuentra en un equilibrio entre su complejo y el compuesto libre, por lo que llega a su equilibrio a los 15 min de estar en un medio acuoso, partiendo así de una concentración inicial de 33.4 µg/mL, en todos los tubos.

Transcurridas las 24 h de tratamiento se observa una reducción significativa de la presencia del compuesto **FHL-3CI** en cada una de las condiciones, lo cual sugiere que se llevó a cabo la biorreducción de este. Sin embargo, en el tubo que presentó una mayor disminución de este fue el tubo enriquecido únicamente con glucosa.

6.7 Evaluación Biológica

Mediante el ensayo MTT⁵⁸ se llevó a cabo la determinación de la actividad metabólica de las células cancerosas y no cancerosas, con la ayuda del análisis PROBIT se cuantificó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, **ALBZCI**, HP-β-CD y Cisplatino en las líneas celulares J774.2 y Caco-2.

Se utilizó el compuesto Cisplatino como control positivo en la disminución de la actividad metabólica de la línea celular cancerosa, debido a que es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de cáncer dada su actividad citotóxica sobre las células cancerosas.

Tabla 5. Concentraciones inhibitorias medias de los compuestos evaluados en las líneas celulares J774.2 y Caco-2. Los datos se presentan como CI₅₀ ± DE (n=3).

| Molécula | CI ₅₀ (μM) | |
|-----------------|-----------------------|-------------|
| | J774.2 | Caco - 2 |
| FHL-3 | > 100 | 42.7 ± 0.7 |
| FHL-3CI | 110.5 ± 0.2 | 118.2 ± 6.7 |
| FHL-3R | 204.2 ± 17.0 | 1.4 ± 0.5 |
| FHL-3RCI | 27.8 ± 3.8 | 1.9 ± 0.8 |
| ALBZCI | 40.5 ± 4.6 | 4.0 ± 0.8 |
| HP-β-CD | 47.8 ± 3.2 | 16.7 ± 2.4 |
| Cisplatino | 7.4 ± 0.0 | 25.0 ± 1.3 |

Posteriormente se realizó un análisis estadístico ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, para determinar si la disminución en la actividad metabólica en los compuestos de prueba (**FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, **ALBZCI**, HP-β-CD) es significativa comparada al efecto inducido por el fármaco control Cisplatino en la línea celular cancerosa y en la sana.

En la figura 16 se muestran 2 gráficos de barras en los cuales se muestran las concentraciones inhibitorias medias de los compuestos evaluados, en el gráfico a) se evaluaron sobre la línea celular J774.2 y en el gráfico b) sobre la línea celular Caco-2, se observa que los compuestos HP-β-CD, **ALBZCI**, **FHL-3RCI** y **FHL-3R** requirieron una menor concentración para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en un 50%, en comparación al fármaco de referencia Cisplatino.

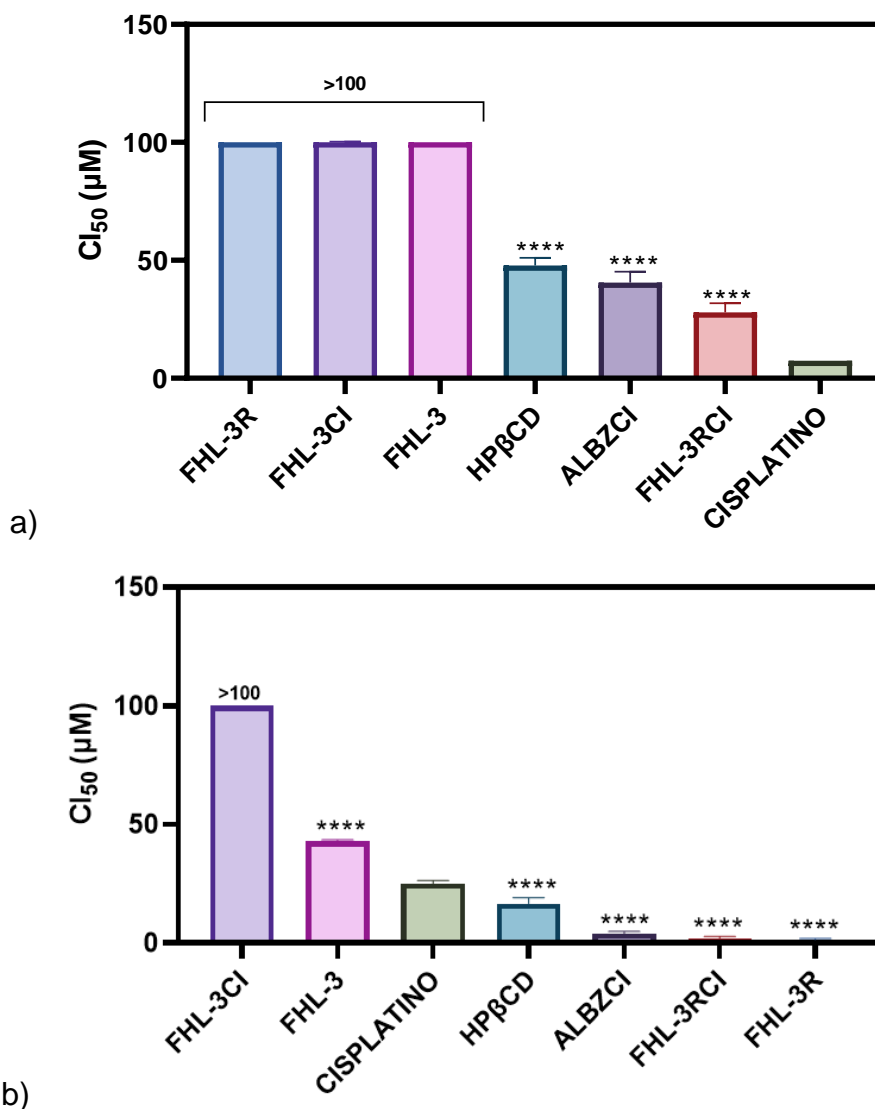


Figura 16. Gráficas de barras de las concentraciones inhibitorias 50 de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, HP-β-CD, **ALBZCI** y Cisplatino, a) Evaluación biológica sobre la línea celular J774. 2 y b) Evaluación biológica sobre la línea celular Caco-2. Análisis estadístico ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los **** indican una diferencia significativa. Los datos se presentan como CI₅₀ ± DE (n=3).

6.8 Predicción de blanco biológico

Se hizo uso del sistema STITCH (Herramienta de búsqueda de productos químicos que interactúan) ⁶⁵ para proponer las posibles dianas biológicas de los compuestos **FHL-3** y **FHL-3R**.

En el sistema se consideraron el Albendazol junto con sus metabolitos Albendazol sulfona y el Albendazol sulfóxido, ya que se considera que se llevó a cabo la biotransformación del bioprecursor, el cual se confirmó mediante la reducción química, al momento de reducirse el grupo nitro se ve favorecida la ciclación intramolecular, y mediante el ensayo de biorreducción se observó que la microbiota logra reducir el grupo nitro.

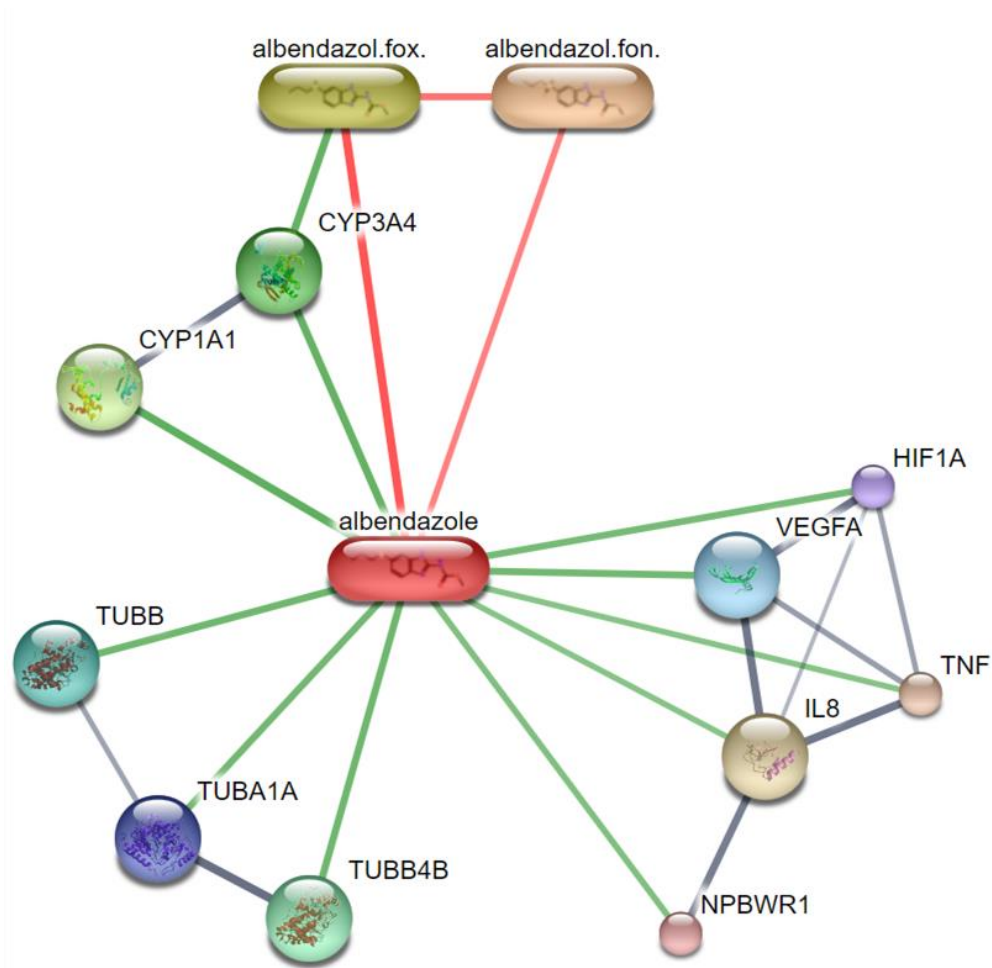


Figura 17. Interacciones del Albendazol en el organismo *Homo sapiens*.⁶⁵

En la tabla 6, se enlistan las interacciones del Albendazol en el organismo *Homo sapiens* y sus puntajes.

Tabla 6. Posibles dianas biológicas de los compuestos FHL-3 y FHL-3R.

| Blanco | Tipo de interacción | Puntuación * |
|---------------|---------------------|--------------|
| CYP34A | Activación | 0.900 |
| CYP1A1 | | 0.938 |
| TUBB4B | | 0.998 |
| TUBB | Inhibición | 0.840 |
| TUBA1A | | 0.821 |
| TNF- α | Activación | 0.700 |

*Bajo (0.150), medio (0.400), buena (0.700), muy buena (0.900)

7. DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la reducción del grupo nitro a amino del bioprecursor se implementaron dos agentes reductores, el NaBH_4 y SnCl_2 , esperando obtener el mismo producto de ambas reacciones, sin embargo, se obtuvieron dos productos distintos, el **FHL-3R** y **FHL-3R2** respectivamente.

El compuesto **FHL-3R** se obtuvo de la reacción implementando Borohidruro de sodio como agente reductor, sin embargo, no se logró reducir el grupo nitro mediante este. Al caracterizar la molécula obtenida se observa la hidrólisis de la molécula **FHL-3**, perdiendo el grupo funcional éster.

El Cloruro de estaño II es un agente reductor fuerte, por lo que su mecanismo de reducción se da mediante la donación de electrones, el mecanismo de reducción del grupo nitro se muestra en la figura 18.

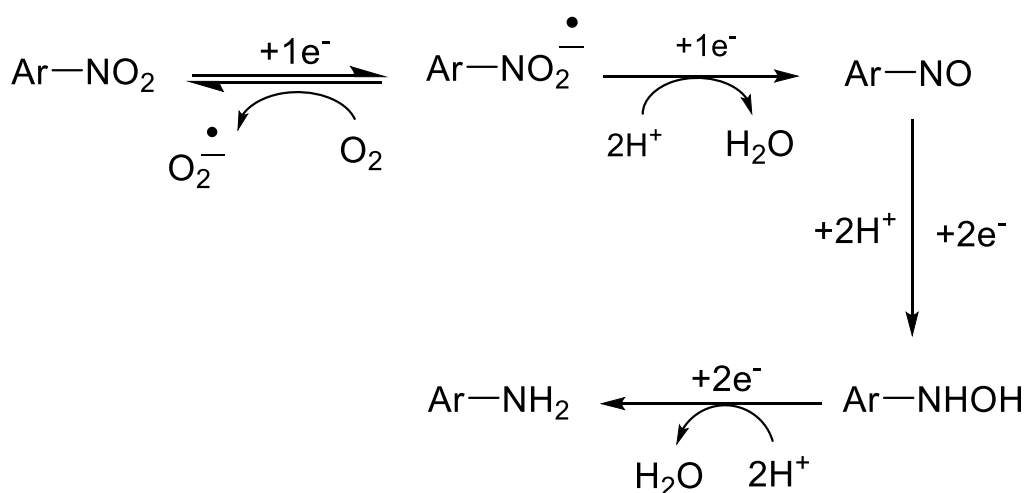


Figura 18. Mecanismo de reducción del grupo nitro a amino, donde se requiere la transferencia de 6 electrones.⁶

Posteriormente a la reducción del grupo nitro del bioprecursor, se llevó a cabo inmediatamente la ciclación intramolecular obteniendo el compuesto **FHL-R2**, el cual después de su caracterización se identificó como el Albendazol.

Por lo que no fue posible obtener el intermediario de interés mediante ninguno de los agentes reductores implementados. Sin embargo, se observó que la ciclación intramolecular está bastante favorecida, por lo que de ser reducido el grupo nitro del bioprecursor mediante la actividad reductora de la microbiota presente en el colon se podría obtener al Albendazol *in situ*.

Previa a la formación del complejo de inclusión se realizó una predicción de la estequiometría mediante un método computacional y uno analítico, el acoplamiento molecular y el método de variación continua. El acoplamiento molecular se realizó en una estequiometría 1:1, en el cual se observa la internalización del bioprecursor en la cavidad de la ciclodextrina, esta interacción tiene una energía de unión de -5.9 Kcal/mol, al ser negativa indica que es favorable su formación, lo cual se confirmó posteriormente con el método de variación continua.

Se realizó la formación del complejo de inclusión entre el bioprecursor **FHL-3** y la HP- β -CD en una estequiometría 1:1 mediante el método de coevaporación, posteriormente se caracterizó mediante distintos métodos instrumentales y analíticos.

El primer análisis instrumental que se realizó fue mediante espectrometría infrarroja, en el espectro del complejo se muestra la señal característica de las ciclodextrinas debido al estiramiento de los grupos OH y la desaparición de las señales correspondientes al esqueleto del anillo aromático del bioprecursor y de las aminas, debido a la internalización del **FHL-3** en la ciclodextrina.

Posteriormente se realizó el análisis de calorimetría diferencial de barrido para los compuestos **FHL-3**, HP- β -CD y el complejo de inclusión **FHL-3Cl**. En el termograma del complejo de inclusión se observa la disminución y desplazamiento de las endotermas del punto de descomposición y punto de fusión, así como la aparición de la endoterma curva y alargada característica de las ciclodextrinas.

Mediante la espectroscopía infrarroja y la calorimetría diferencial de barrido se confirmó la formación del complejo de inclusión, sin embargo, no se tiene información hasta el momento con la cual se pueda determinar la manera en que se comporta el bioprecursor dentro del hospedero, por lo que se realizó una dinámica molecular para predecir como están interaccionando ambos compuestos entre sí.

Durante los 30 ns de la dinámica molecular se observó que el compuesto **FHL-3** se mantiene en constante movimiento dentro de la cavidad de la ciclodextrina, en un movimiento constante de “entra y sale”, pero siempre manteniendo el complejo de inclusión. Para lograr esto quiere decir que existen varias formas en las cuales están interaccionando el huésped y el hospedero.

Para determinar las interacciones que permiten la formación del complejo de inclusión se realizó un análisis ROESY, en el cual se observan las interacciones intramoleculares e intermoleculares de los compuestos **FHL-3** y HP- β -CD, sin embargo, solo estas últimas son de nuestro interés.

Previamente se identificaron y enumeraron los protones de ambos compuestos por separado mediante espectros de ^1H -RMN, los cuales permitirán determinar cuáles de los protones son los que interaccionan para que se lleve a cabo el complejo de inclusión.

En el espectro ROESY se observaron dos señales intermoleculares, una entre los protones H-3 y H-5 de la HP- β -CD y H-7 y H-8 del **FHL-3**, la segunda interacción es entre los mismo protones de la ciclodextrina y además el H-1, sin embargo, en esta ocasión interaccionan los protones H-4 y H-9 del bioprecursor.

Al tener más de una interacción coincide con la predicción de la dinámica molecular, ya que existe más de una forma de acoplamiento entre el bioprecursor y la ciclodextrina por lo que se mantiene en constante movimiento.

En la figura 19 se muestra una representación de la primera señal con las estructuras de ambos compuestos para poder visualizar de mejor manera la forma en que se acoplan entre sí ambos compuestos.

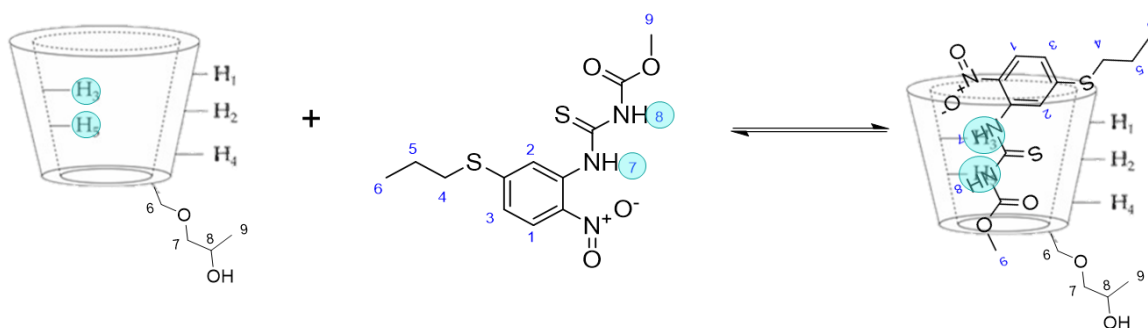


Figura 19. Representación de la interacción entre los protones H-3 y H-5 de la HP- β -CD y H-7 y H-8 del bioprecursor **FHL-3**.

Dado que los protones H-3 y H-5 de la ciclodextrina se encuentran en la cavidad interna de la ciclodextrina, y ya que esta interaccionando con los protones H-7 y H-8 del bioprecursor que corresponden a las aminas estas se encuentran internalizadas, este acomodo coincide con la pose predicha en el acoplamiento molecular.

Al igual que con la primera señal se realizó una representación con las estructuras de ambas moléculas, la cual se muestra en la figura 20.

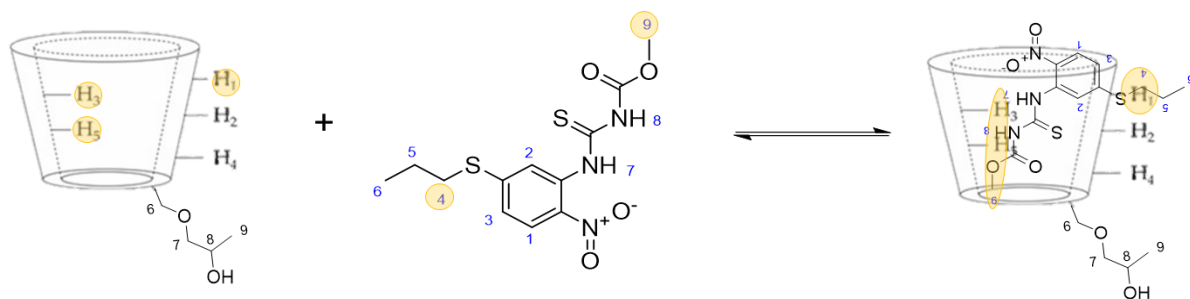


Figura 20. Representación de la interacción entre los protones H-1, H-3 y H-5 de la HP- β -CD y H-4 y H-9 del bioprecursor **FHL-3**.

Si bien siguen interaccionando los mismo protones internos de la ciclodextrina se muestra una nueva, la del protón 1 el cual se encuentra por fuera, y en esta ocasión interacciona el H-4 y H-9 del bioprecursor, las cuales se encuentran en lados opuestos de la molécula. Para que se lleve a cabo esta interacción es necesario que el **FHL-3** se internaliza aún más en la estructura para que el H-4 del bioprecursor logre interaccionar con los protones internos de la ciclodextrina, y a su vez permite también la interacción del H-9 con la superficie exterior.

Una vez formado y caracterizado el complejo de inclusión se determinó su solubilidad intrínseca, concluyendo que la solubilidad acuosa del bioprecursor en complejo de inclusión aumentó significativamente 2.9 veces respecto al compuesto por sí solo.

Dado que ya se comprobó que la transformación del bioprecursor a Albendazol surgió la siguiente pregunta ¿La microbiota presente en el tracto gastrointestinal será capaz de reducir el grupo nitro del bioprecursor **FHL-3** a grupo amino?

Para responderla se realizó un estudio preliminar de biorreducción implementando el probiótico Sinuberase, el cual contiene la bacteria *Bacillus clausii*, dicha bacteria simulará la actividad de uno de los tipos de bacterias presentes en la microbiota del tracto gastrointestinal de una persona sana, se realizó el estudio de biorreducción con el bioprecursor en complejo de inclusión, es decir el compuesto **FHL-3CI**, ya que al presentar una mayor solubilidad acuosa es posible preparar y medir las concentraciones presentes del compuesto **FHL-3** en las soluciones de cada tubo.

Se incluyó el cloruro de amonio al ensayo debido a que la microbiota presente en el colon produce amonio en altas concentraciones,⁸³ y el cloruro de amonio al encontrarse en medio acuoso se disocia en los iones amonio y cloruro, los cuales producen disoluciones ligeramente ácidas, por lo que ayudan a simular el pH del colon, el cual varía entre 4.5 – 7.5. Por otro lado, se añadió la glucosa dado que en todo proceso de reducción de un compuesto se requiere que otro se oxide, por lo que permite mantener el equilibrio ya que mientras el **FHL-3** se reduce, la glucosa se oxida.

Dado que las mediciones siguen la presencia de **FHL-3** mediante espectroscopía de absorción ya que las mediciones se realizaron en la $\lambda_{\text{máx}}$ de dicho compuesto, la disminución de la concentración del compuesto **FHL-3** en los medios es indicativo de que se llevó la biotransformación del bioprecursor a Albendazol, ya que el Albendazol al ser un sólido blanco no absorbe en esta longitud de onda.

En el tubo que fue tratado con Glucosa y Cloruro de amonio se observó una disminución considerable de la concentración de **FHL-3CI** presente, disminuyó de 33.4 $\mu\text{g/mL}$ a 5.47 $\mu\text{g/mL}$. En los tubos restantes con Agua, Cloruro de amonio y Glucosa por sí solos se obtuvieron concentraciones de 4.37, 1.38 y 0.44 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En todas las condiciones se observó una reducción significativa, sin embargo, en el tubo donde se presentó una mayor reducción del bioprecursor fue en el que solamente estaba enriquecido con glucosa, la glucosa indujo una mayor reducción del bioprecursor, debido a que permite este equilibrio óxido-reducción.

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de biorreducción, se espera que la microbiota presente en el tracto colorrectal tenga la capacidad de biotransformar el compuesto **FHL-3** a Albendazol.

Por lo cual se procedió a evaluar la actividad metabólica de las líneas celulares J774.2 y Caco-2 en presencia de los compuestos **FHL-3**, **FHL-3CI**, **FHL-3R**, **FHL-3RCI**, **ALBZCI** y HP- β -CD mediante el ensayo de MTT.

El ensayo de MTT puede indicar la viabilidad celular y la actividad metabólica de las células en un cultivo, pero no proporciona información específica sobre el mecanismo de muerte celular inducidos por los compuestos evaluados. Por lo que las concentraciones inhibitorias medias obtenidas en la evaluación biológica indica la concentración del compuesto evaluado que reduce en un 50% la conversión del MTT a formazan.

Idealmente se busca que las moléculas evaluadas tengan una preferencia en la inhibición de la actividad metabólica sobre las células cancerosas, en comparación a las células sanas.

Los compuestos **FHL-3**, **FHL-3R** y **FHL-3CI** se reportaron con una $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ sobre la línea celular J774.2, lo cual indica que se requirió de una concentración elevada para poder observar una inhibición en la actividad metabólica, este dato es bueno considerando que se trata de las células sanas. Mientras que los compuestos **FHL-3RCI**, **ALBZCI** y HP- β -CD presentaron una concentración inhibitoria del 50% de la actividad metabólica a las concentraciones de 27.8, 40.5 y 47.8 μM respectivamente, si bien inhibieron la actividad metabólica de las células sanas, su efecto fue significativamente menor en comparación del Cisplatino, por lo que, aunque generan daño sobre las células sanas no cuentan con la misma potencia que el fármaco de referencia.

En la línea celular Caco-2 los compuestos HP- β -CD, **ALBZCI**, **FHL-3RCI**, **FHL-3R** presentaron mayor potencia respecto al Cisplatino inhibiendo la actividad metabólica de las células cancerosas. Mientras que el **FHL-3** presentó una inhibición metabólica significativamente menor al Cisplatino.

Se esperaba que la inhibición de la actividad metabólica de las células tratadas con el bioprecursor se viera aumentada al encontrarse en complejo de inclusión respecto al compuesto por sí solo, sin embargo, en ambas líneas celulares el compuesto **FHL-3CI** presentó una $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$, en la línea celular el **FHL-3** y su complejo de inclusión se comportaron muy similares lo cual es bueno ya que ninguno de los dos inhibió en gran medida la actividad metabólica de las células sanas, sin embargo, sobre las células cancerosas el compuesto **FHL-3** presentó una CI_{50} de 42.7 μM mientras que el complejo de inclusión no presentó actividad inhibitoria del metabolismo celular.

Lo cual sugiere que la potencia del bioprecursor se ve afectada al encontrarse en complejo de inclusión, esto se podría deber a que el equilibrio del complejo se encuentra desplazado a los productos, por lo que no se libera del hospedero interfiriendo así en su actividad sobre las células.

Por parte de la HP- β -CD no se esperaba que presentara una inhibición en el metabolismo de las células sanas ni cancerosas, dado que se ha reportado que tiene una $CI_{50} > 200 \text{mM}$, sin embargo, los resultados de la evaluación biológica mostraron que la HP- β -CD inhibió la actividad metabólica en un 50% a concentraciones de 47.8 y 16.7 μM en las líneas celulares J774.2 y Caco-2 respectivamente. Estas variaciones en las CI_{50} pueden deberse a las distintas condiciones en las cuales se realizaron los ensayos o líneas celulares utilizadas en el estudio.

Es importante considerar que las líneas celulares no cuentan con la presencia de la microbiota intestinal, por lo cual no se llevaría a cabo la biotransformación del bioprecursor, para obtener el Albendazol. Lo cual explica porque el hecho de que

el Albendazol presento una mayor inhibición de la actividad metabólica en las células comparado al bioprecursor, ya que se está colocando directamente *in situ* y no requiere de una biotransformación como el bioprecursor.

El compuesto **FHL-3R** resultó ser de gran interés ya que requirió una gran concentración para presentar una inhibición en la actividad metabólica de las células sanas, sin embargo, en las células cancerosas fue el compuesto que requirió una menor concentración para inhibir el 50% de la actividad metabólica de estas, mostrando una preferencia en inhibir la actividad metabólica de las células de adenocarcinoma colorrectal respecto a las sanas.

Con base en la información obtenida anteriormente, es de gran interés saber el ligando sobre el cual actúa el compuesto **FHL-3R**, por lo cual se realizó una predicción del blanco biológico mediante el sistema STITCH.

Se realizó la predicción de interacciones en el organismo *Homo sapiens* con el compuesto Albendazol, ya que este sistema se basa en la recopilación de datos experimentales e información reportada en la literatura, considerando que el compuesto **FHL-3** y sus derivados son nuevos en el área de investigación no se puede realizar una predicción directa de ellos. Sin embargo, considerando que el bioprecursor y el **FHL-3R** conservan grupos funcionales del Albendazol, se espera que presenten las mismas interacciones que este.

La interacción con mayor puntaje que nos dice el sistema es la activación de la superfamilia de enzimas CYP450, el CYP1A1 y CYP3A4 específicamente, los cuales se encuentran tejidos extrahepáticos⁶⁸ y la mucosa del intestino delgado⁶⁶, respectivamente. Dicha interacción sugiere la metabolización del Albendazol a Albendazol sulfóxido y sulfona.

Con un puntaje de 0.840 se indica la actividad inhibitoria del Albendazol sobre la tubulina, con una muy buena puntuación. Al inhibir la tubulina se está generando un daño estructural en la célula, ya que esta es el elemento fundamental de los microtúbulos, los cuales ayudan a mantener la forma de la célula, a su vez también ayudan a los cromosomas a desplazarse durante la división celular.⁶⁷ Por lo tanto, al inhibirla se genera un efecto antimitótico, ya que impide la proliferación de las células y a su vez generando un daño estructural.

Dicha interacción es de gran interés, ya que recientemente se ha reportado la interacción del Nocodazol, interactúa con los residuos E198 y V236 de la tubulina mediante las aminas,²⁰ dichos grupos funcionales se conservan en el compuesto **FHL-3R** a pesar de la hidrólisis en su estructura, por lo que podría estar generando su actividad inhibitoria sobre la tubulina mediante la interacción con dichos residuos.

También se detectó la activación del factor de necrosis tumoral (TNF- α), este es un tipo de citocina la cual provoca muerte celular en algunos tipos de células tumorales, dicho efecto ya ha sido anteriormente reportado que es inducido por el Albendazol,^{69, 70} esta activación puede llegar a desencadenar una apoptosis extrínseca.⁷¹

La disminución de la actividad metabólica en las líneas celulares J774.2 y Caco-2 tratadas con **ALBZCI**, **FHL-3** y **FHL-3R** podría deberse a las interacciones anteriormente mencionadas, sin embargo, es necesario realizar ensayos bioquímicos para confirmar cada una de ellas.

Por lo que hasta el momento solo se puede afirmar que los compuestos generan una disminución en la actividad metabólica de las células cancerosas, mas no se puede afirmar la muerte celular.

8. CONCLUSIONES

Se intentó reducir el bioprecursor **FHL-3** mediante los agentes reductores NaBH_4 y SnCl_2 , sin embargo, no fue posible obtener dicho intermediario dado que la ciclación intramolecular está altamente favorecida.

Se determinó la estequiometría 1:1 del complejo de inclusión **FHL-3CI**, el cual posteriormente se produjo mediante el método de coevaporación. Dicho complejo fue caracterizado mediante las técnicas IR, DSC, Dinámica molecular, RMN- ^1H y RMN ROESY. También se determinó la solubilidad intrínseca de **FHL-3** y **FHL-3CI**, observando un aumento de 2.9 veces en la solubilidad acuosa del bioprecursor preformulado respecto a su forma libre.

Se evaluó la biotransformación del **FHL-3CI** implementando el probiótico Sinuberase concluyendo que la bacteria *Bacillus clausii* tiene la capacidad de biotransformar el bioprecursor **FHL-3** a Albendazol, por lo que se espera que la microbiota presente en el tracto colorrectal también lo sea.

De la evaluación biológica se concluye que el compuesto **ALBZCI** mostró una mayor inhibición del metabolismo celular respecto a el FHL-3, resaltando así la importancia de la microbiota en el proceso de biotransformación del bioprecursor. Por otro lado, se observó que el FHL-3 al encontrarse en complejo de inclusión pierde su actividad inhibitoria del metabolismo celular, por lo que se refuta la hipótesis. Sin embargo, el compuesto **FHL-3R** resultó tener una mayor potencia inhibiendo la actividad metabólica en comparación al fármaco de referencia Cisplatino sobre la línea celular Caco-2.

Finalmente se realizó la predicción del blanco biológico de los compuesto **FHL-3** y **FHL-3R** mediante el sistema STITCH, determinando que su actividad inhibitoria del metabolismo se debe principalmente a su unión con la tubulina y la activación del factor de necrosis tumoral.

9. PERSPECTIVAS

9.1 Estudiar la actividad biológica *in vivo* del compuesto **FHL-3** en ratones libres de gérmenes y con microbiota, ambos con adenocarcinoma colorrectal.

9.2 Caracterizar el complejo de inclusión del compuesto **FHL-3R**

9.3 Realizar estudios toxicológicos *in vitro* del compuesto **FHL-3R** y su complejo de inclusión sobre distintas líneas cancerosas de colon.

10. REFERENCIAS

1. Islam, M. R., Akash, S., Rahman, M. M., Nowrin, F. T., Akter, T., Shohag, S., Rauf, A., Aljohani, A. S. M., & Simal-Gandara, J. (2022). Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. *Chemico-Biological Interactions*, 368, 110170. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2022.110170>
2. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ®)–Versión para pacientes - NCI. (2022). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>
3. Aranda Aguilar, E. (2004). Tratamiento del cáncer de colon estadios II, III y IV. *Revista Barcelona de Oncología*, 27(4), 130-133. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352004000400027&lng=es&tlng=es.
4. Petersen, J. S. S. M., & Baird, S. K. (2021). Treatment of breast and colon cancer cell lines with anti-helminthic benzimidazoles mebendazole or Albendazole results in selective apoptotic cell death. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(10), 2945–2953. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03698-0>
5. Yépez-Mulia, L., Morales-Hurtado, R., Viveros-Guzmán, N., Cedillo-Rivera, R., Hernández-Luis, F., Castillo, R., Hernández-Campos, A., & Muñoz, O. (1999). Evaluation of Albendazole prodrugs in experimental trichinellosis. *Archives of medical research*, 30(5), 368–374. [https://doi.org/10.1016/s0188-0128\(99\)00054-8](https://doi.org/10.1016/s0188-0128(99)00054-8)
6. Hernández, F. (1999). Preparación de derivados hidrosolubles del Albendazol. [Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Farmacia)]. Universidad Autónoma de México.
7. Definición de cáncer colorrectal - Diccionario de cáncer del NCI - NCI. (2021). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cancer-colorrectal>
8. Cáncer de Colon y Recto. (2015). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-colon>
9. En México cada Año se Diagnostican Cerca de 15 Mil Nuevos Casos de Personas con Cáncer de Colon | Sitio Web “Acercando el IMSS al Ciudadano.” (2019). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201903/070>

-
-
10. **Cáncer.** (2022). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
 11. **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
 12. **Cáncer colorrectal: Estadísticas | Cancer.Net.** (2023). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-colorrectal/estad%C3%ADsticas>
 13. **Mattar, D., Lares, H., Parra, J. F., Pasquale, G., Bolívar, E., Gil, A., & Brito, V.** (2007). 5-Fluorouracilo y Cisplatino en carcinoma localmente avanzado del conducto anal: Resultados preliminares. *Revista Venezolana de Oncología*, 19(4), 277–286. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-05822007000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 14. **Cisplatin.** (2021), Recuperado el 17 de agosto de 2023 de <https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/oncolink-rx/cisplatin-platinol-r>
 15. **Fluorouracil (Adrucil®, 5-FU) | OncoLink.** (2023). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://es.oncolink.org/tratamiento-del-cancer/oncolink-rx/fluorouracil-adrucil-r-5-fu>
 16. **Arshad, M. S., Zafar, S., Yousef, B., Alyassin, Y., Ali, R., Alasiri, A., Chang, M.-W., Ahmad, Z., Elkordy, A. A., Faheem, A., & Pitt, K.** (2021). A review of emerging technologies enabling improved solid oral dosage form manufacturing and processing. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113840>
 17. **National Center for Biotechnology Information** (2023). PubChem Compound Summary for CID 2082, Albendazole. Recuperado el 27 de marzo de 2023 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole>.
 18. **Lacey, E.** (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6(4), 112–115. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90227-U](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-U)
 19. **Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y., & Morris, D. L.** (2005). Antitumor activity of Albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: In vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55(5), 425–432. <https://doi.org/10.1007/S00280-004-0927-6/METRICS>
 20. **Colorado, F.** (2023). Inhibidores de la polimerización de la tubulina acoplados al sitio de la colchicina: Una revisión crítica de la información cristalográfica. [Trabajo Monográfico de Actualización, Universidad Nacional
-
-

Autónoma de México]. Repositorio institucional de la UNAM.
<http://132.248.9.195/ptd2023/abril/0837847/Index.html>

21. ALBENDAZOL EN VADEMECUM. (2010). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a031.htm>

22. Li, Z., Li, K., Teng, M., Li, M., Sui, X., Liu, B., Tian, B., & Fu, Q. (2022). Functionality-related characteristics of hydroxypropyl- β -cyclodextrin for the complexation. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120105. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.120105>

23. Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, E., Iványi, R., Szente, L., Tósaki, A., & Vecsernyés, M. (2010). Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40(4), 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>

24. Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2017). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.15761/bem.1000108>

25. Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10), 1017–1025. <https://doi.org/10.1021/JS950534B>

26. Palcsó, B., & Zelkó, R. (2018). Different types, applications and limits of enabling excipients of pharmaceutical dosage forms. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.04.002>

27. Szejtli, J. (1994). Medicinal Applications of Cyclodextrins. *Medicinal Research Reviews*, 14(3), 353–386. <https://doi.org/10.1002/MED.2610140304>

28. Cheirsilp, B., & Rakmai, J. (2017). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.15761/bem.1000108>

29. Uekama, K., & Otagiri, M. (1987). Cyclodextrins in drug carrier systems. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 3(1), 1–40.

30. Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J. C., Simal-Gandara, J., & Astray, G. (2022). Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry*, 384, 132467. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132467>

-
-
31. Drago, D., Pacifici, E., & Bain, S. (2018). Drugs. An Overview of FDA Regulated Products: From Drugs and Cosmetics to Food and Tobacco, 45–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811155-0.00003-X>
32. Profármaco. Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra. (2023). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/profarmaco>
33. Cabrera, S., & Díez-Torrubia, A. (2010). Profármacos: pasado, presente y futuro (Vol. 106, Issue 3). www.rseq.org
34. Wermuth, C. G. (2008). Designing Prodrugs and Bioprecursors. The Practice of Medicinal Chemistry, 721–746. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374194-3.00036-6>
35. Sauraj, Kumar, S. U., Gopinath, P., & Negi, Y. S. (2017). Synthesis and bio-evaluation of xylan-5-fluorouracil-1-acetic acid conjugates as prodrugs for colon cancer treatment. Carbohydrate Polymers, 157, 1442–1450. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.09.096>
36. Caco-2 [Caco2] - HTB-37 | ATCC. (2023). Retrieved May 24, 2023, from <https://www.atcc.org/products/htb-37>
37. J774.2 Cell Line from mouse BALB/C monocyte macrophage, 85011428. (2023). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/cb_85011428?gclid=Cj0KCQjwnrmlBhDHARIsADJ5b_kyU6WRF9UP-0zZKE8wRULnU6ulS_zNPrMVvXZGp7t16mT4-CkKPiQaAhvqEALw_wcB&gclsrc=aw.ds
38. Santos, S. (2020). Papel de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en la activación de macrófagos. [Máster en Biomedicina]. Universidad de la Laguna.
39. Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Desarrollo de la correlación Colle-Salvetti -fórmula de energía en un funcional de la densidad electrónica. Physical Review B, 37(2), 785. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
40. Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. The Journal of Chemical Physics, 98(7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>
41. Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
-
-

-
-
- 42.** Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- 43.** Huang, C. Y. (1982). [27] Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: The job plot. *Methods in Enzymology*, 87(C), 509–525. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)87029-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)87029-8)
- 44.** Sousa da Silva, A. W., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC research notes*, 5, 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
- 45.** Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindah, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06>.
- 46.** Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- 47.** Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, 126(1), 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
- 48.** Parrinello, M., & Rahman, A. (1982). Strain fluctuations and elastic constants. *The Journal of Chemical Physics*, 76(5), 2662–2666. <https://doi.org/10.1063/1.443248>
- 49.** Baka, E., Comer, J. E., & Takács-Novák, K. (2008). Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(2), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.030>
- 50.** Ji, Y., Yang, Y., Zhou, L., Wang, L., Lu, J., Ferronato, C., & Chovelon, J. M. (2018). Photodegradation of sulfasalazine and its human metabolites in water by UV and UV/peroxydisulfate processes. *Water Research*, 133, 299–309. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.01.047>
- 51.** Beeck, R., Glöckl, G., Krause, J., Schick, P., & Weitschies, W. (2021). Mimicking the dynamic Colonic microbiota in vitro to gain a better understanding on the in vivo metabolism of xenobiotics: Degradation of sulfasalazine. *International Journal of Pharmaceutics*, 603, 120704. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120704>
-
-

-
-
- 52.** Chebion, G., Estelle, B., Gerin, V., Daudon, M., & Castiglione, V. (2021). Drug-induced nephrolithiasis and crystalluria: The particular case of the sulfasalazine derivatives. *Comptes Rendus. Chimie*, 24, 1–12. <https://doi.org/10.5802/crchim.109>
- 53.** Sulfasalazine: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (2023). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00795>
- 54.** Sulfapyridine: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (2021). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00891>
- 55.** Mesalazine: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online. (2023). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00244>
- 56.** Sulfasalazine CAS 599-79-1 Fabricantes, proveedores, fábrica - Home Sunshine Pharma. (2015). Recuperado el 4 de agosto de 2023, de <http://www.hspchem.com/apis-and-intermediates/sulfasalazine-cas-599-79-1.html>
- 57.** Fichas de información técnica mesalazina (ácido 5-aminosalicílico). (2014). Recuperado el 4 de agosto de 2023 de <https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f866e8971468540a.pdf>
- 58.** Castro, C. (2006). Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the MTT test, Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia. Recuperado el 29 de abril de 2023 de https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
- 59.** Uday Kumar, S., Gopinath, P., & Singh Negi, Y. (2017). Synthesis and bio-evaluation of xylan-5-fluorouracil-1-acetic acid conjugates as prodrugs for colon cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1442–1450. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.096>
- 60.** Dirigido, T., Diana, T., Rodríguez Burbano, C., Oyono, A., Méndez, O., & Rosario, U. Del. (2021). Evaluación de la citotoxicidad de puntos de carbono (CD) en las líneas celulares tumorales U-87 y MCF-7 Yoly Carolina Rodríguez Rojas.
- 61.** Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT. (2008). Recuperado el 4 de agosto de 2023 de <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
- 62.** Chen, C.-H., Tsao, Y.-T., Yeh, P.-T., Liao, Y.-H., Lee, Y.-T., Liao, W.-T., Wang, Y.-C., Shen, C.-F., & Cheng, C.-M. (2021). Detection of Microorganisms in Body
-
-

Fluids via MTT-PMS Assay. *Diagnostics*, 12(1), 46.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12010046>

63. Celitan, E., Gruskiene, R., Kavleiskaja, T., & Sereikaite, J. (2022). β -Carotene - 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes coated with pectin. *Food Hydrocolloids*, 133, 107990. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.107990>

64. Negi, J. S., & Singh, S. (2013). Spectroscopic investigation on the inclusion complex formation between amisulpride and γ -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1835–1843. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.11.082>

65. Szklarczyk, D., Santos, A., Von Mering, C., Jensen, L. J., Bork, P., & Kuhn, M. (2016). STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380–D384. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1277>

66. El CYP3A4. (2008). Recuperado el 4 de agosto de 2023 de https://formacion.sefh.es/curso_interacciones/modulo1/2-2-4-1-1.html#:~:text=Es%20uno%20de%20los%20enzimas,realizan%20en%20el%20h%C3%ADgado22.

67. La célula. 7. Citosol. Citoesqueleto. MICROTÚBULOS. (2023). Recuperado el 4 de agosto de 2023 de <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/7-microtubulos.php>

68. Modulación de la expresión de enzimas del citocromo p450 hepáticas durante las etapas fetal y pediátrica. (2012). Recuperado el 17 de agosto de 2023 de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb122d.pdf>

69. Definición de factor de necrosis tumoral - Diccionario de cáncer del NCI - NCI. (2022). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/factor-de-necrosis-tumoral>

70. Wang, L. J., Lee, Y. C., Huang, C. H., Shi, Y. J., Chen, Y. J., Pei, S. N., Chou, Y. W., & Chang, L. Sen. (2019). Non-mitotic effect of Albendazole triggers apoptosis of human leukemia cells via SIRT3/ROS/p38 MAPK/TTP axis-mediated TNF- α upregulation. *Biochemical Pharmacology*, 162, 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.003>

71. ¿Qué es el cáncer? - NCI. (2021). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

-
-
- 72.** Diagnóstico y Etapificación: Clínica Ciudad del Mar. (2022). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://www.ccdm.cl/cancer-de-colon-2/diagnostico-y-etapificacion/>
- 73.** Michel, B., Heggset, E. B., Syverud, K., Dufresne, A., & Bras, J. (2022). Inclusion complex formation between sulfadiazine and various modified β -cyclodextrins and characterization of the complexes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76, 103814. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103814>
- 74.** 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (CAS 128446-35-5). (2007). Recuperado el 15 de marzo de 2023 de <https://www.scbt.com/es/p/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-128446-35-5>
- 75.** Jug, M., & Mura, P. A. (2018). Grinding as solvent-free green chemistry approach for cyclodextrin inclusion complex preparation in the solid state. In *Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040189>
- 76.** Serra, J., (2016). Trabajo de fin de máster módulo de química orgánica estructura, propiedades y aplicaciones de las ciclodextrinas y derivados universidad nacional de educación a distancia facultad de ciencias máster en ciencia y tecnología química. [Trabajo de fin de máster módulo de química orgánica, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Facultad de Ciencias. Repositorio institucional de la UNED. http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Jserra/Serra_Massana_Joan_TFM.pdf
- 77.** Przybyla, M. A., Yilmaz, G., & Remzi Becer, C. (2020). Natural cyclodextrins and their derivatives for polymer synthesis. *Polymer Chemistry*, 11(48), 7582–7602. <https://doi.org/10.1039/D0PY01464H>
- 78.** Davis, M. E., & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004 3:12, 3(12), 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>
- 79.** Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L. et al. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 89, 39–58 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10847-017-0744-2>
- 80.** Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
-
-

-
-
- 81.** Qiu, N., Cheng, X., Wang, G., Wang, W., Wen, J., Zhang, Y., Song, H., Ma, L., Wei, Y., Peng, A., & Chen, L. (2014). Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and in vitro evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 623–630. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.09.035>
- 82.** j774 cells Cells | Thermo Fisher Scientific - MX. (2023). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/cell-lines/j/cell-lines-detail-500.html?gclid=EAlaIQobChMlv6fYwuLP_gIV5Qh9Ch0BMg8xEAYASAAEgL1EfD_BwE&ef_id=EAlaIQobChMlv6fYwuLP_gIV5Qh9Ch0BMg8xEAYASAAEgL1EfD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!541399016552!!!g!!!382790548!126051992563&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&s_kwcid=AL!3652!3!541399016552!!!g!!
- 83.** Urdaneta Urdaneta, Y. M. (2008). Relación del amonio sérico con la severidad de la encefalopatía hepática. *Gen*, 62(1), 44–48. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032008000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- 84.** Bravo, B., Fernández de Castro, L., Buendía, I., Santos, X., & Gortázar, A. (2017). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and the N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) regulate the proliferation of human mesenchymal stem cells. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 9(1), 5–12. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100002>
- 85.** Ghalehbandi, S., Yuzugulen, J., Pranjol, M. Z. I., & Pourgholami, M. H. (2023). The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *European Journal of Pharmacology*, 175586. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586>
- 86.** Orellana B, Myriam, & Guajardo T, Viviana. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000100014>
- 87.** Stojančević, M., Bojić, G., Al Salami, H., & Mikov, M. (2013). The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs. <http://www.horizonpress.com/cimb>
- 88.** Cisplatino: usos, interacciones, mecanismo de acción | Banco de medicamentos en línea. (2023). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00515>
- 89.** Mitomicina: usos, interacciones, mecanismo de acción | Banco de medicamentos en línea. (2023). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00305>
-
-

-
-
- 90.** Fluorouracilo: usos, interacciones, mecanismo de acción | Banco de medicamentos en línea. (2023). Recuperado el 24 de mayo de 2023 de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00544>
- 91.** Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud., B. (2013). Salus: revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. In Salus (Vol. 17, Issue 2). Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382013000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- 92.** Macpherson, AJ, Sauer, U. Secretos del metabolismo farmacológico de la microbiota. *Nat Med* 29, 537–538 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02227-5>
- 93.** ¿Qué es la quimioterapia? | Cancer.Net. (2022). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/quimioterapia/qu%C3%A9-es-la-quimioterapia>
- 94.** Tratamiento del cáncer de colon - NCI. (2022). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq>
- 95.** ¿Qué es el cáncer colorrectal? | ¿Cómo se origina el cáncer colorrectal? | American Cancer Society. (2023). Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/acerca/que-es-cancer-de-colon-o-recto.html>
- 96.** Lemech, C., & Arkenau, H. T. (2012). Novel treatments for metastatic cutaneous melanoma and the management of emergent toxicities. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 6, 53–66. <https://doi.org/10.4137/CMO.S5855>
- 97.** Pourgholami, M. H., Cai, Z. Y., Lu, Y., Wang, L., & Morris, D. L. (2006). Albendazole: a Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor and Malignant Ascites Formation in OVCAR-3 Tumor-Bearing Nude Mice. *Clinical Cancer Research*, 12(6), 1928–1935. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1181>
- 98.** Química Orgánica, Universitates Chemia. (2016). Recuperado el 4 de agosto de 2023 de <https://www.quimicaorganica.org/foro/95-sintesis-organica/9648-%C2%BFmecanismo-de-la-reacci%C3%B3n.html>
-
-

APÉNDICE

Espectros de IR, RMN-¹³C, RMN-¹H, y EM

➤ FHL-3

EM, APCI (m/z): 329.0581 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.07 (s, 1H), 11.68 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.10 – 3.03 (m, 2H), 1.68 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 180.40, 154.22, 146.48, 140.19, 133.56, 126.00, 125.94, 125.90, 124.67, 124.54, 53.75, 53.69, 53.66, 33.15, 33.01, 22.33, 22.22, 22.10, 13.69.

IR, ATR (cm⁻¹): 1732 (C=O), 1592 (N=O), 3429 (R-NH-(C=O)-R), 1234 (R-(C=O)-O-R), 3179 (=C-H Anillo), 1574, 1526, 1485, 1432 (C=C), 649 (C=S).

➤ FHL-3R

EM, APCI (m/z): 208.0908 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.87 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 3.08 – 2.85 (m, 2H), 1.64 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.58, 146.32, 138.89, 135.11, 125.94, 124.30, 122.73, 33.21, 33.17, 22.27, 13.72.

IR, ATR (cm⁻¹): 1574, 1526, 1485, 1432 (C=C), 1584, 1631, 3369, 3112 (N-H), 658 (C=S), 3183 (=C-H Anillo).

➤ FHL-R2

EM, APCI (m/z): 266.0944 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.78 (s, 2H), 7.43 (dd, *J* = 3.1, 1.7 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.50 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.16, 154.61, 148.29, 148.24, 127.34, 127.30, 124.52, 61.80, 52.94, 52.92, 37.13, 37.11, 22.52, 14.83, 13.48.

IR, ATR (cm^{-1}): 3328, 1584 (N-H), 1615 (C=O), 1092 (C-O), 1523 (C=C), 2958, 1460 (CH_2), 1359 (CH_3).

➤ **FHL-3CI**

IR, ATR (cm^{-1}): 3359 (OH), 2922, 2956 (CH_2 Y CH), 1644 (δ -HOH), 1593 (N=O), 1238 (R-(C=O)-O-R), 3198 (=C-H Anillo)

➤ **HP- β -CD**

IR, ATR (cm^{-1}): 3350 (OH), 2925, 2968 (CH_2 Y CH), 947 (CH anillo), 1200-100 (C-C y C-O anillo) 1022 (enlace glucosídico), 1647 (δ -HOH)

Curvas de calibración del ensayo de biorreducción.

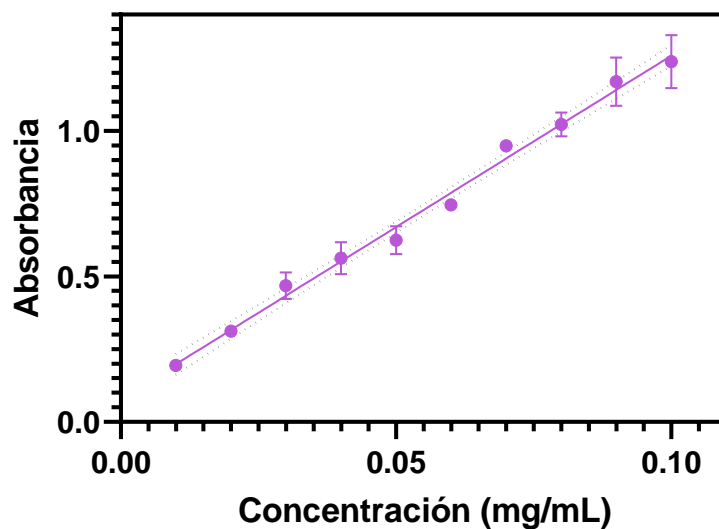


Gráfico 7. Curva de calibración de **FHL-3CI**. Pendiente = 11.78, ordenada al origen de 0.08047 y una r^2 de 0.979. Los resultados se presentan \pm DE (n=3).

➤ Sulfasalazina

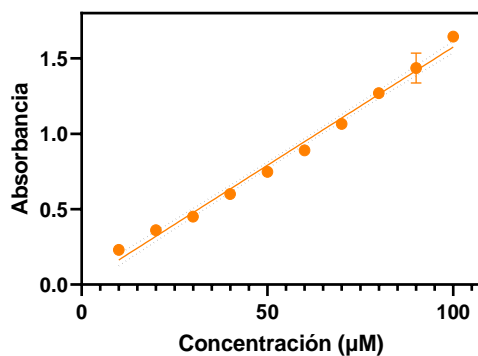
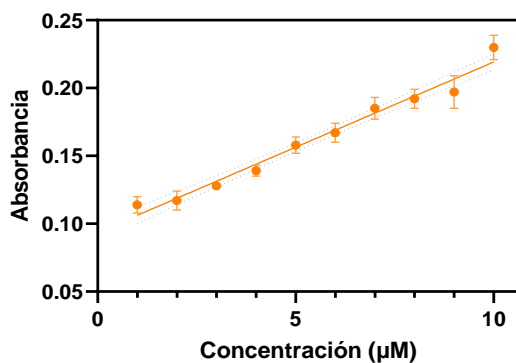


Gráfico 8 y 9. Curvas de calibración Sulfasalazina. Se obtuvieron los datos del gráfico 8 ($m = 0.01255$, $b = 0.09367$, $r^2 = 0.9501$) y del gráfico 9 ($m = 0.01569$, $b = 0.006267$, $r^2 = 0.986$), respectivamente.

➤ FHL-3

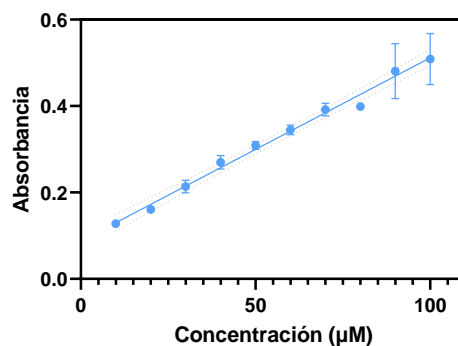
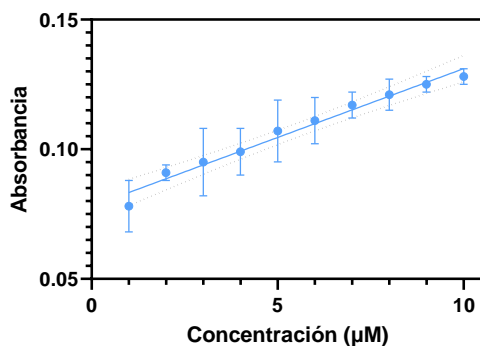


Gráfico 10 y 11. Curvas de calibración **FHL-3CI**. Se obtuvieron los datos del gráfico 10 ($m = 0.00531$, $b = 0.078$, $r^2 = 0.8236$) y del gráfico 11 ($m = 0.00424$, $b = 0.0876$, $r^2 = 0.9549$), respectivamente.

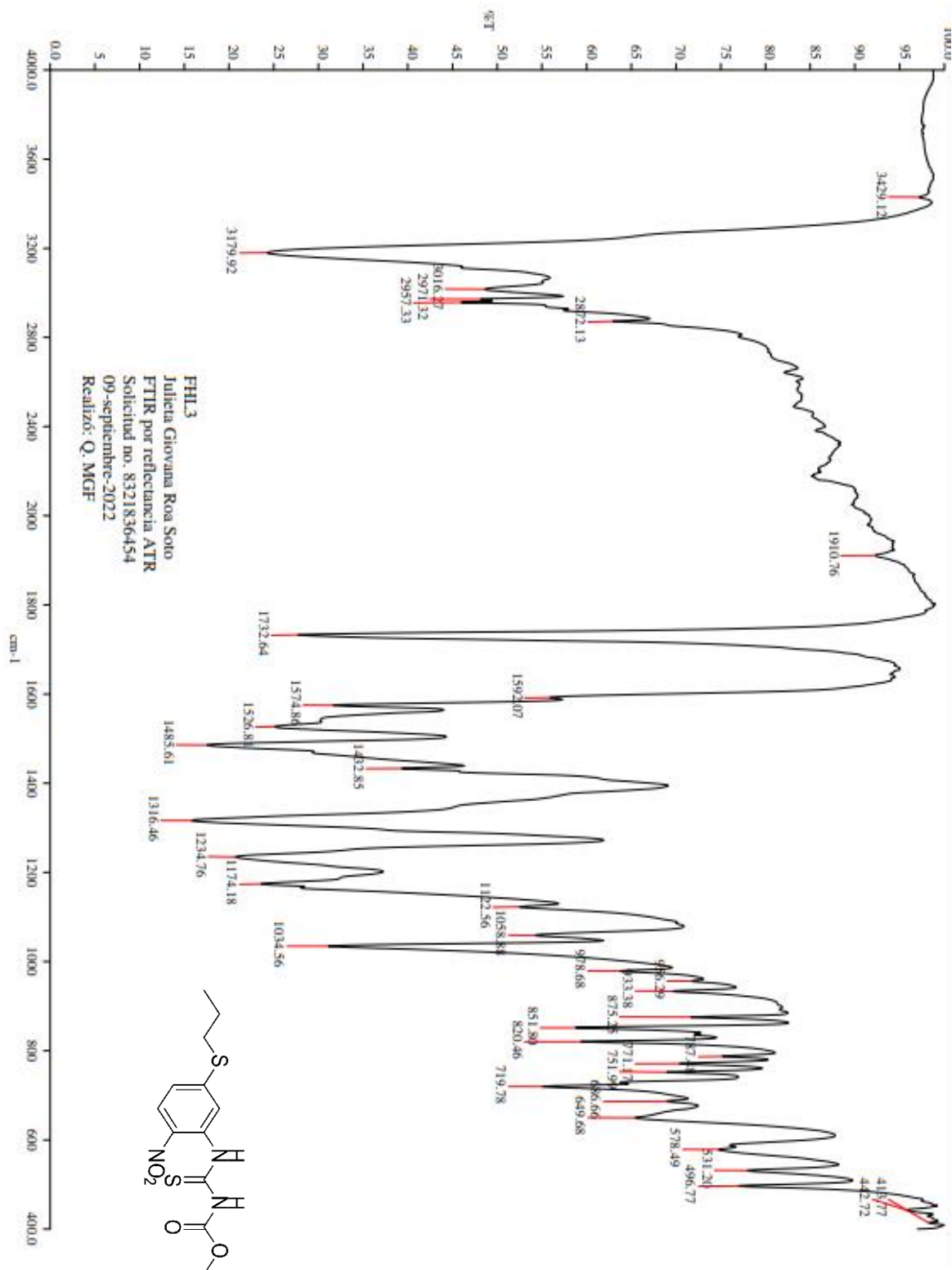


Figura 21. Espectro IR de FHL-3.

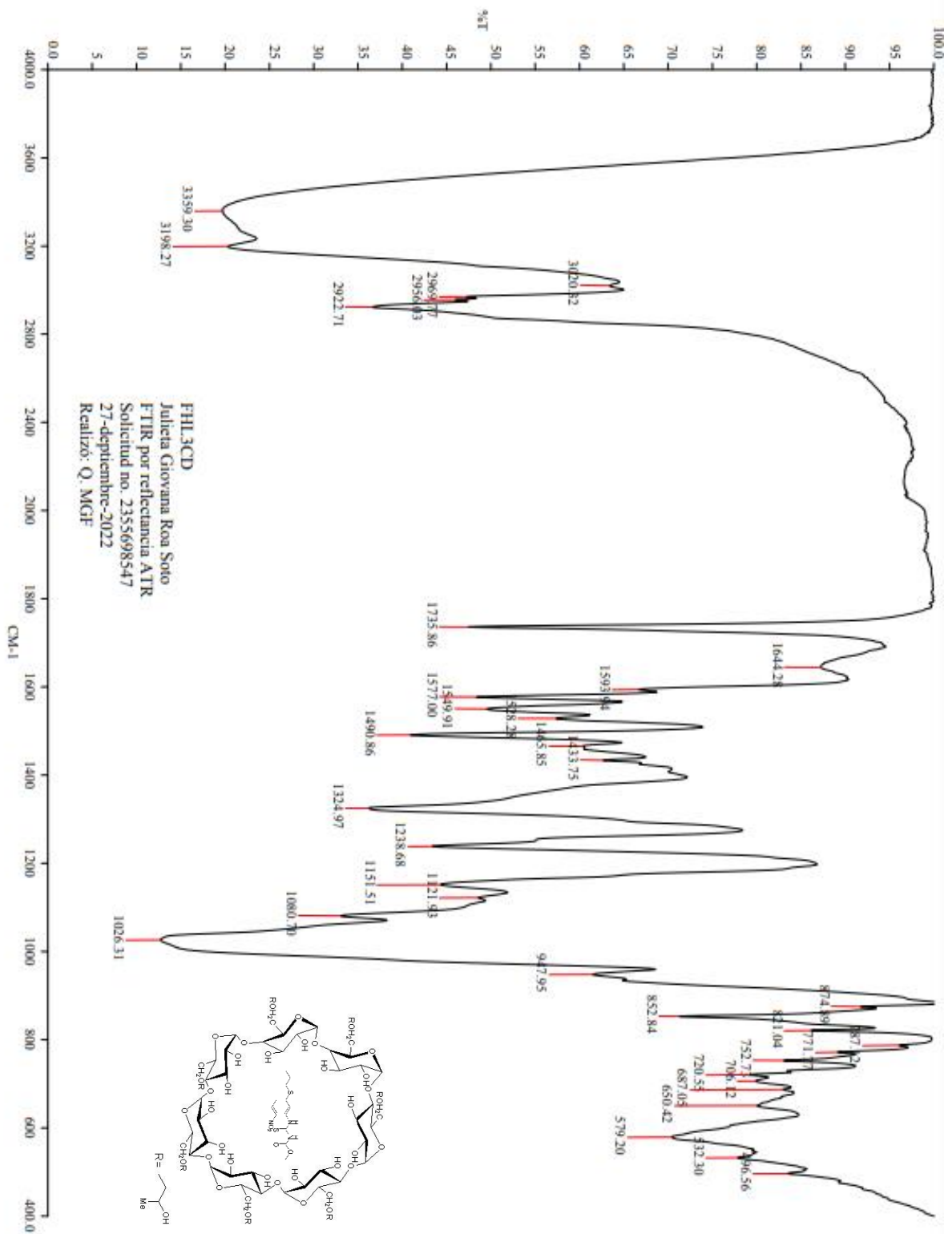


Figura 22. Espectro IR de FHL-3Cl.

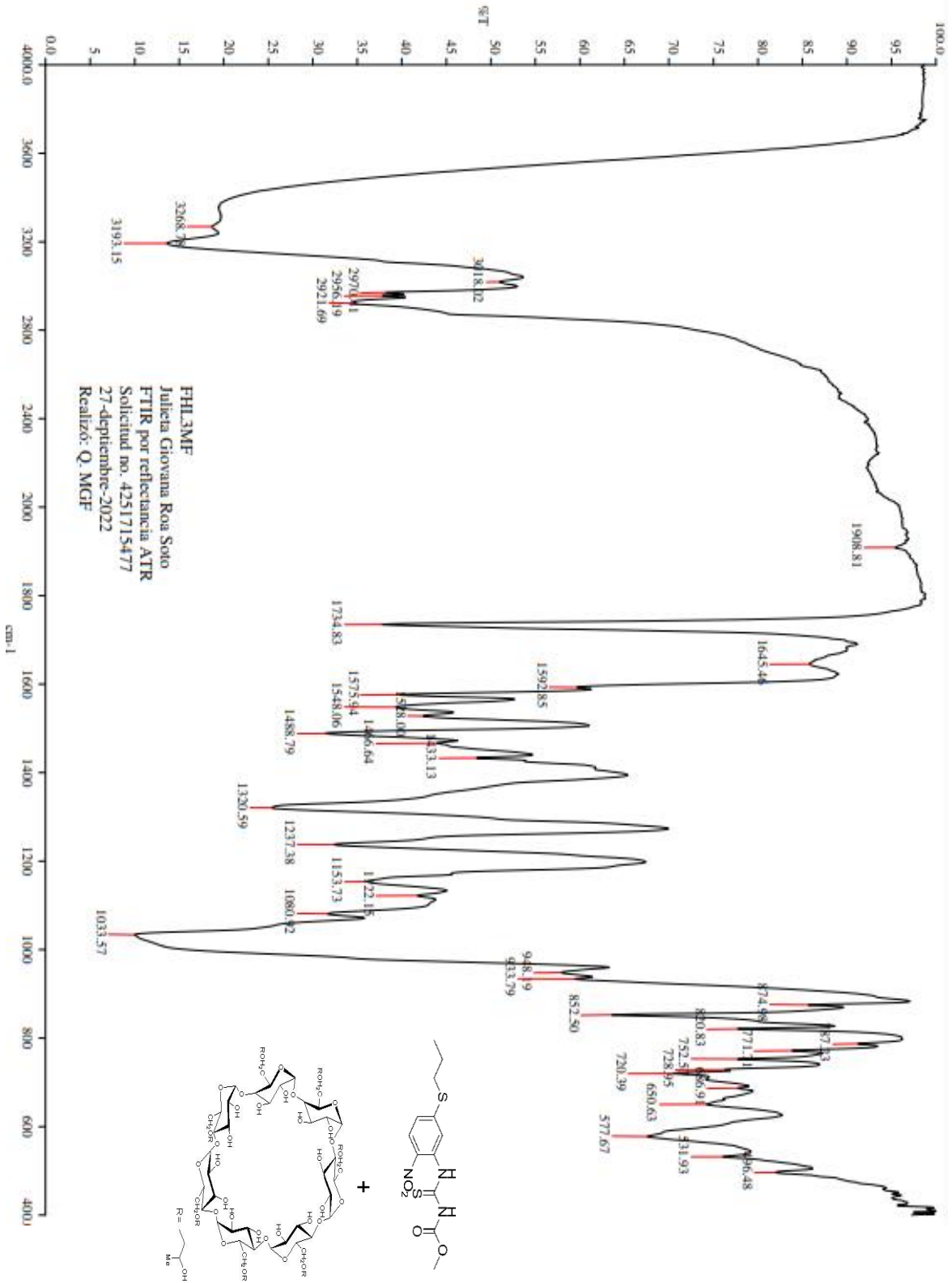


Figura 23. Espectro IR de **FHL-3MF**.

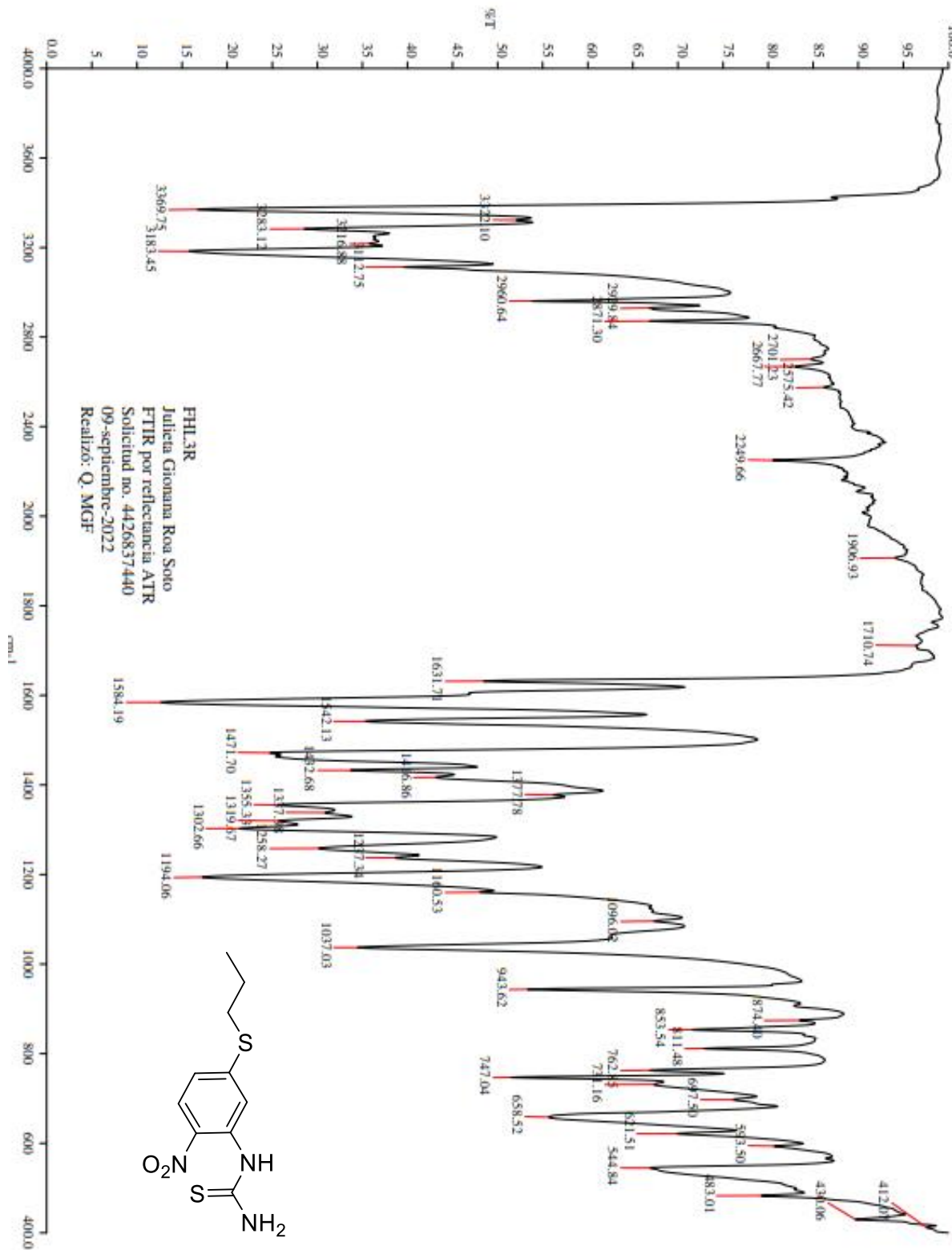


Figura 24. Espectro IR de FHL-3R.

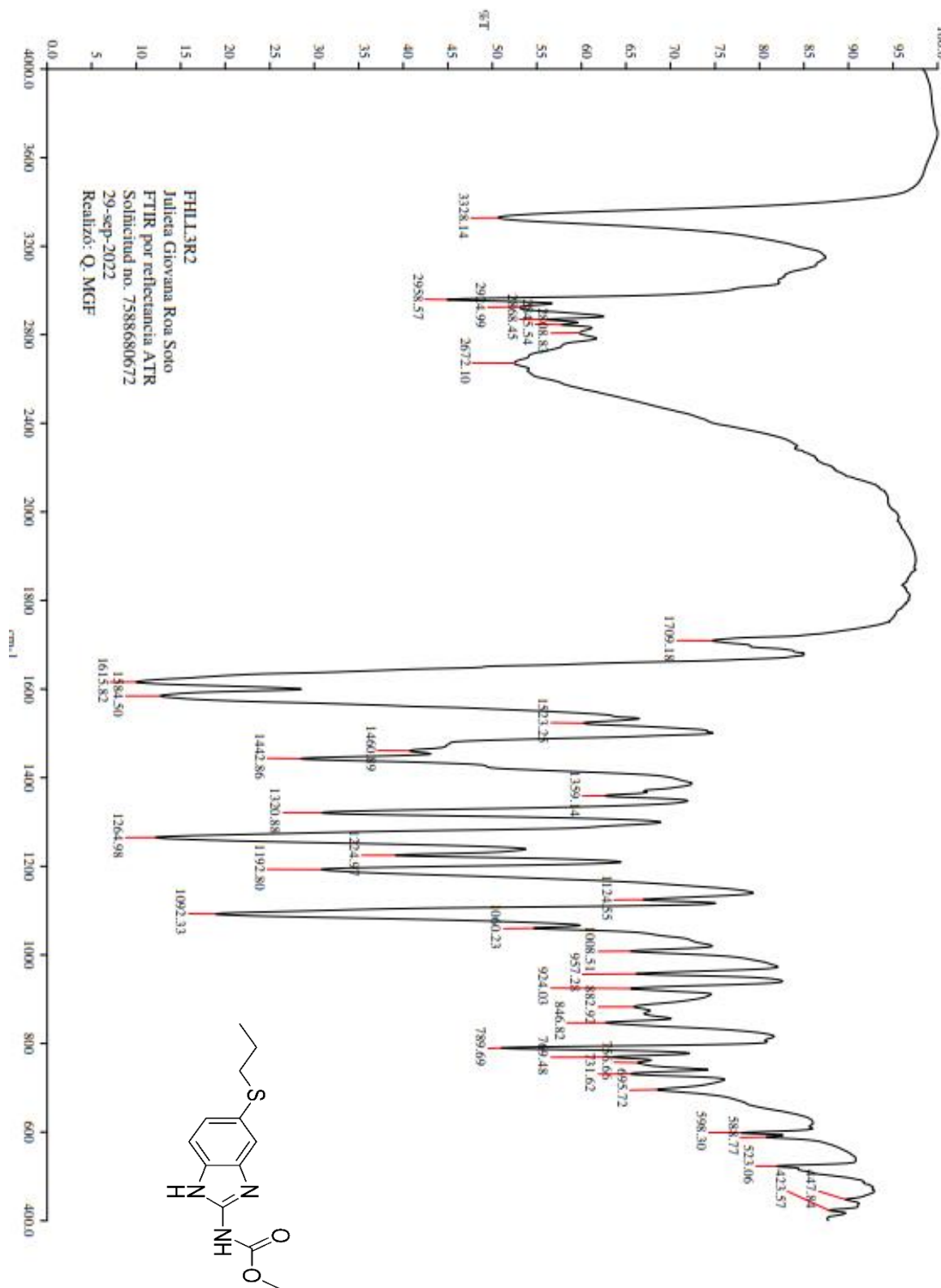


Figura 25. Espectro IR de FHL-R2.

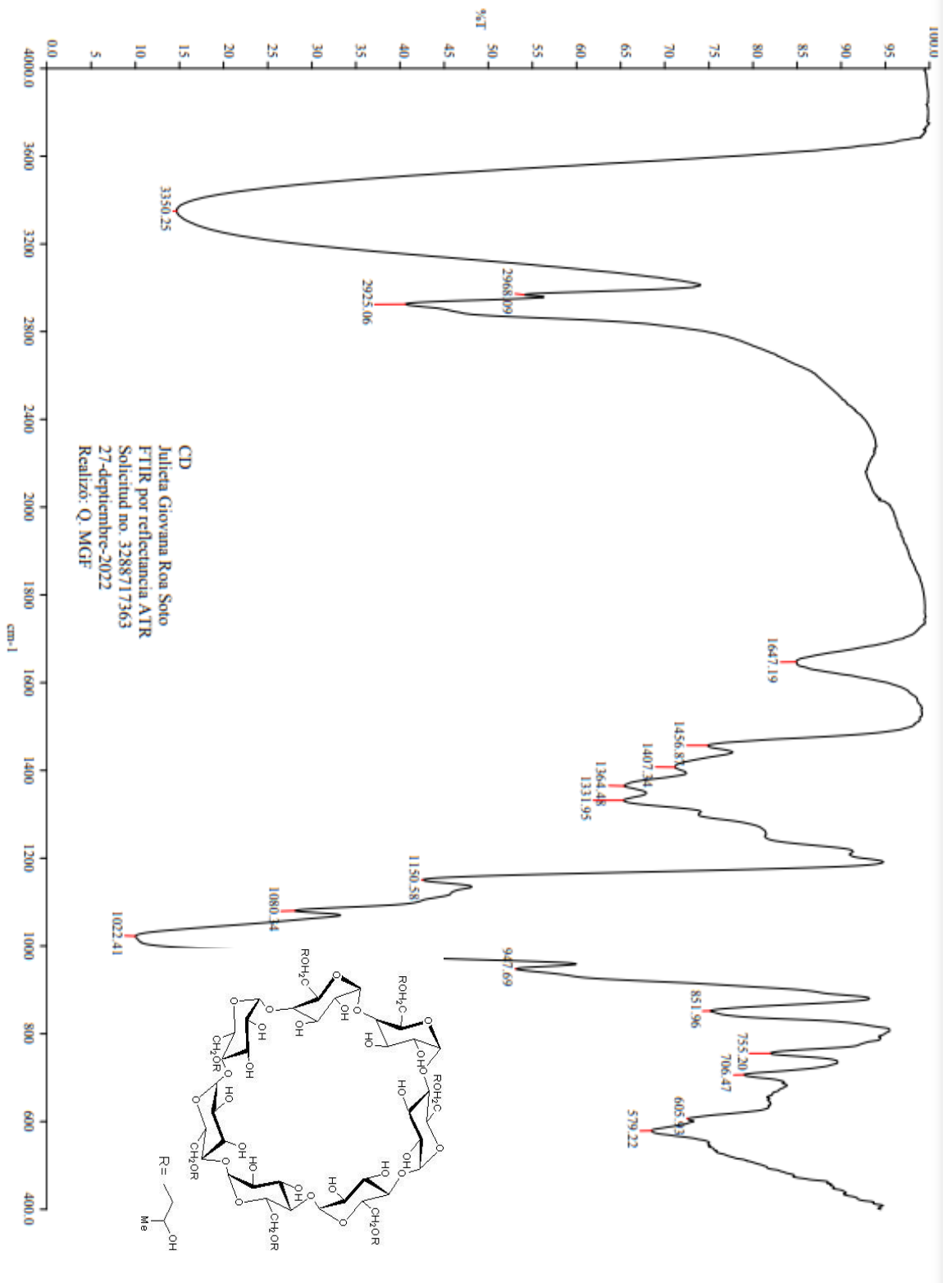


Figura 25. Espectro IR de HP-β-CD.

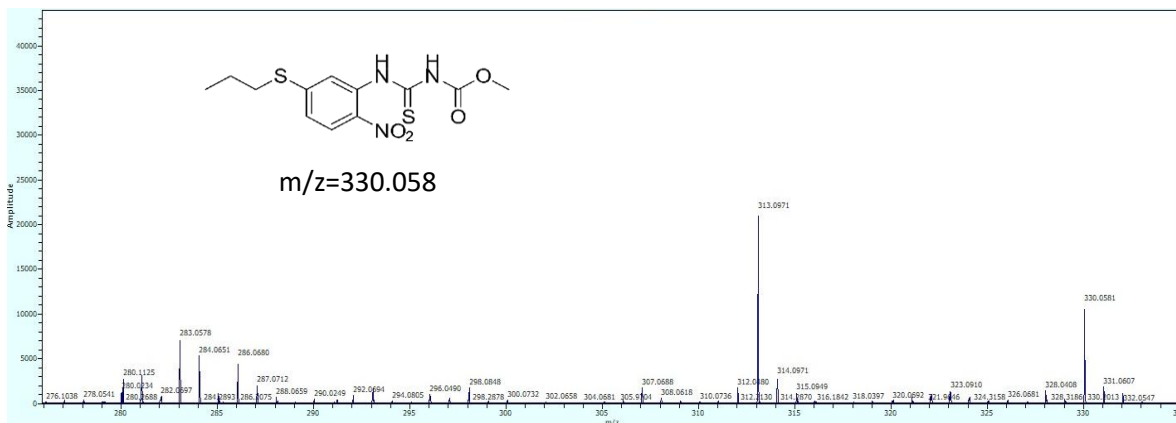


Figura 28. Espectro de EM de FHL-3.

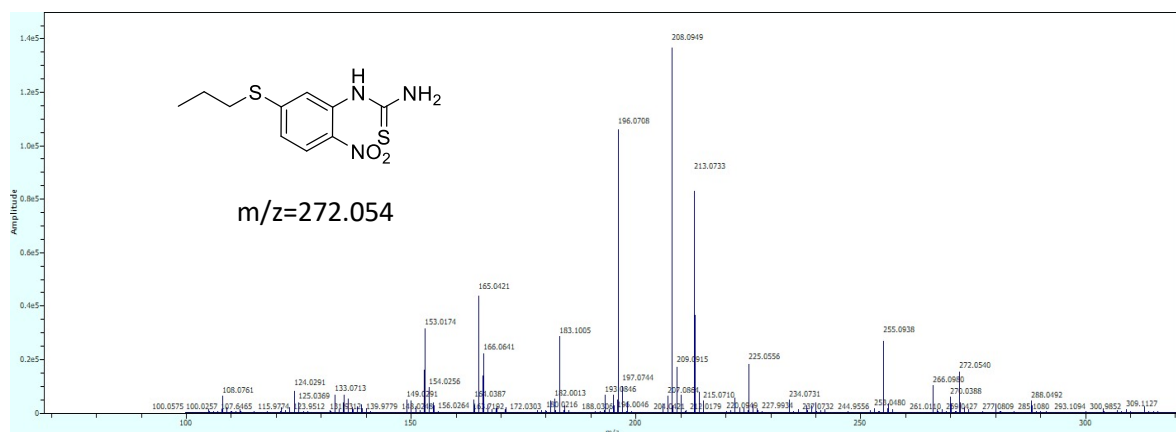


Figura 29. Espectro de EM de FHL-3R.

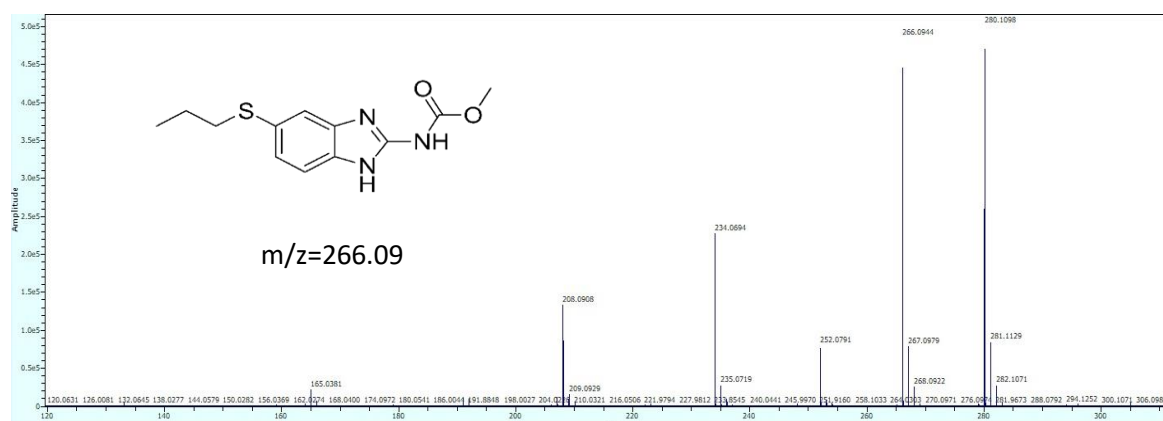


Figura 30. Espectro de EM de FHL-R2.

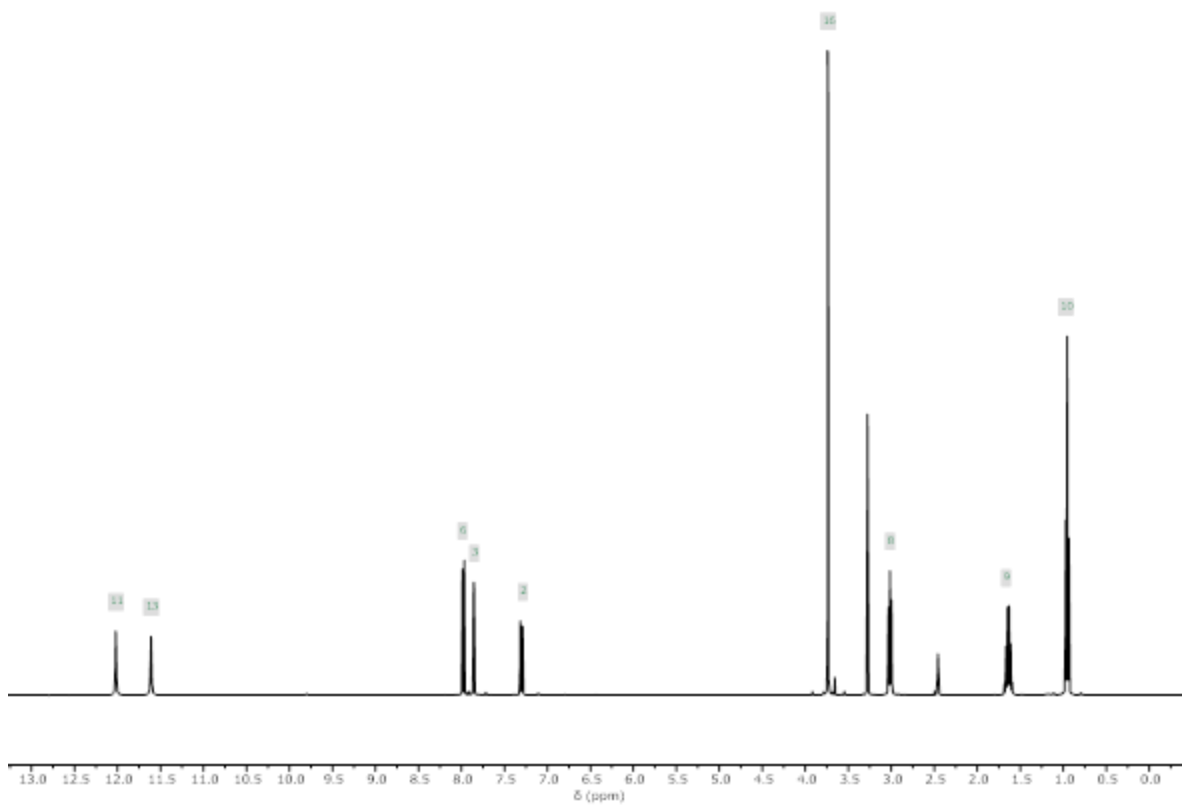
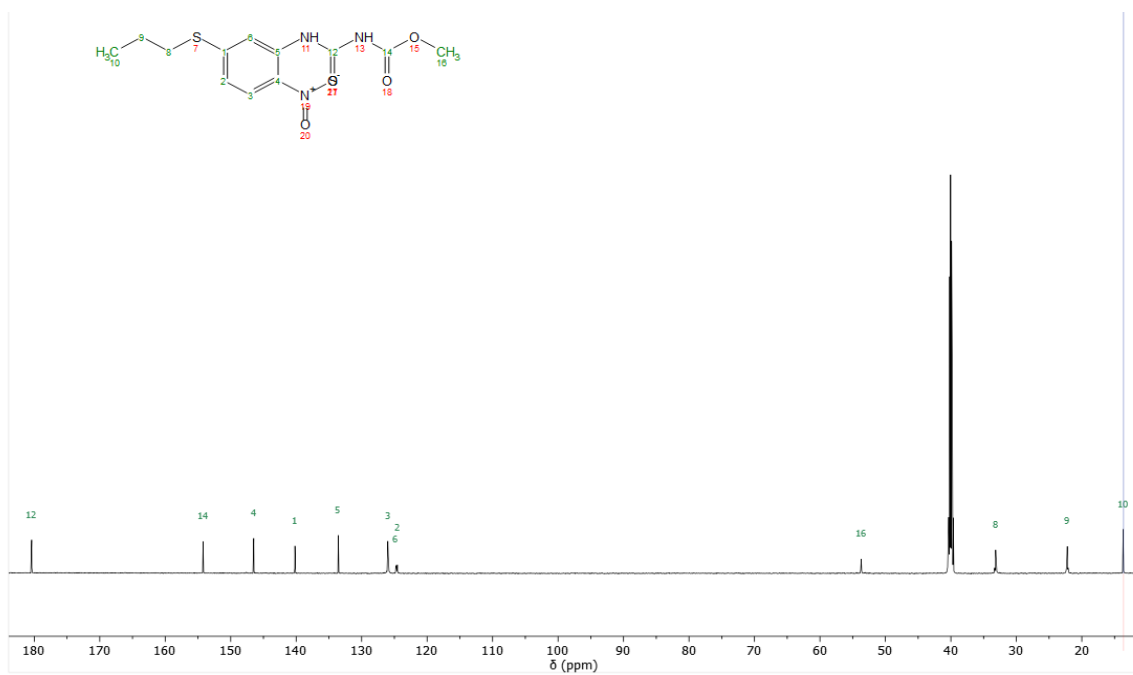


Figura 31. Espectro de ^{13}C – ^1H RMN de **FHL-3**.

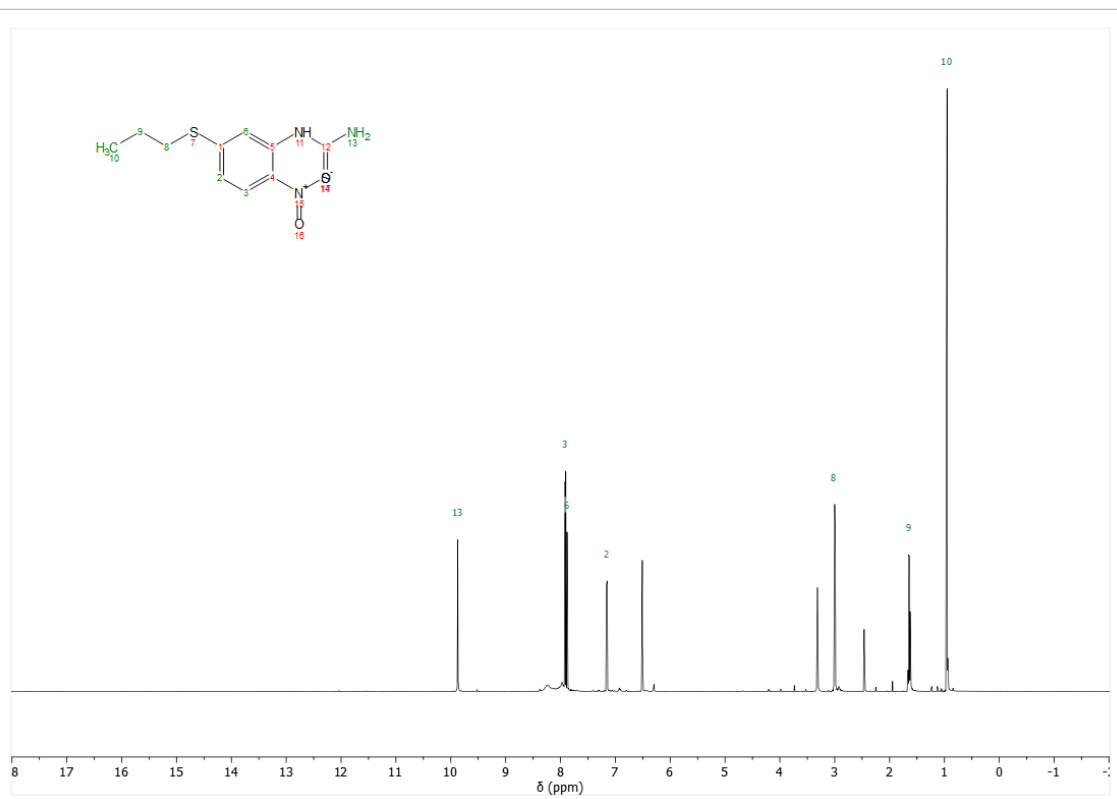
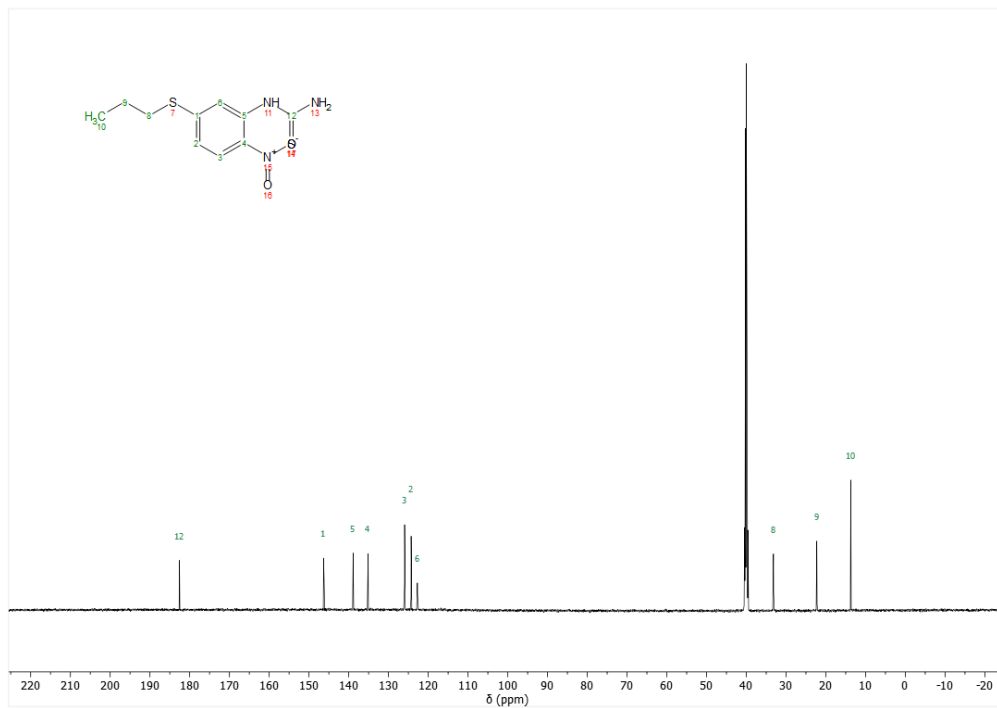


Figura 32. Espectro de ^{13}C – ^1H RMN de **FHL-3R**.

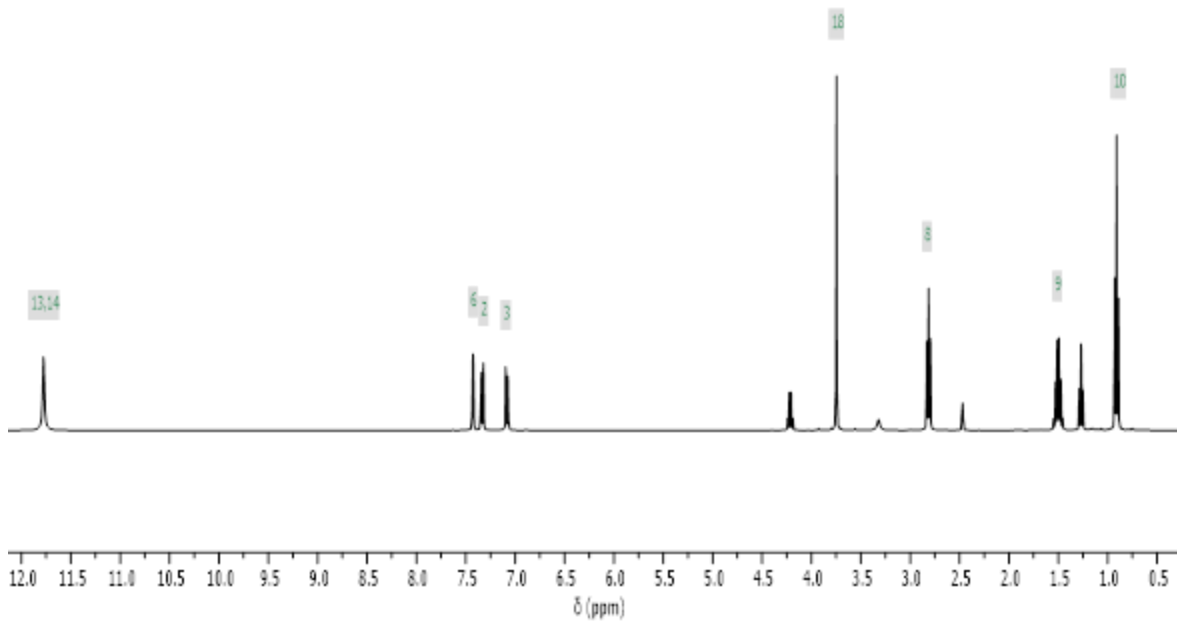
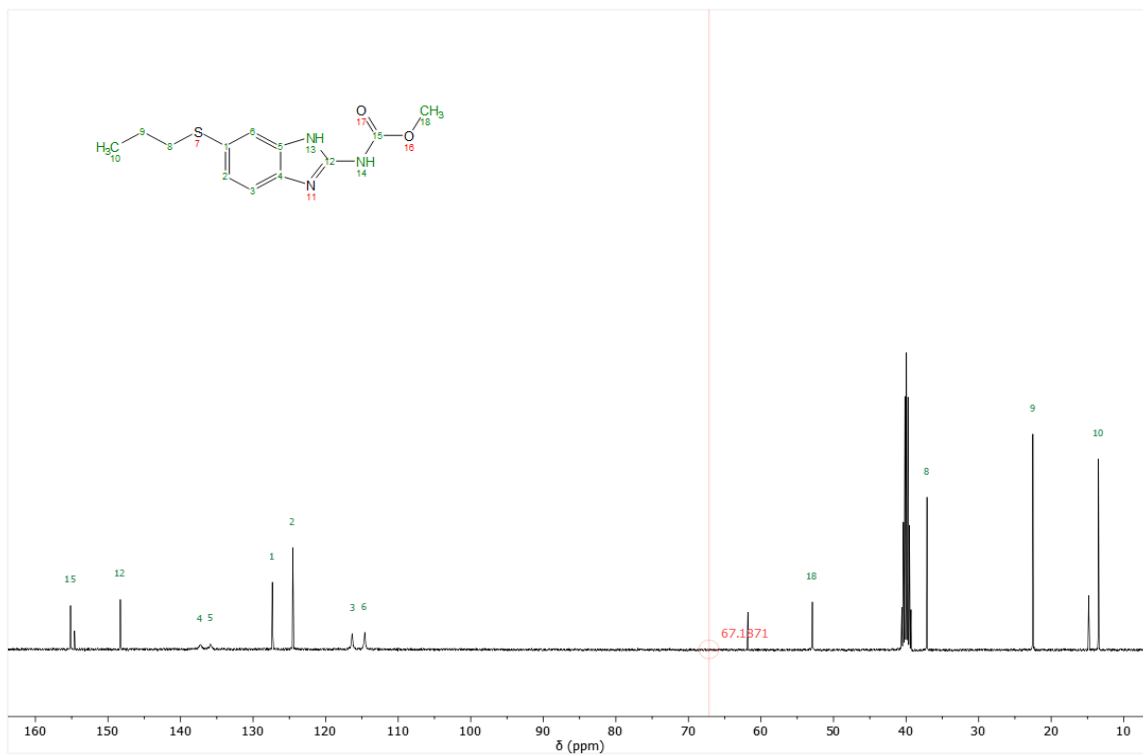


Figura 33. Espectro de ^{13}C – ^1H RMN de **FHL-R2**.