



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO

---

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DISEÑO Y SÍNTESIS DE AGENTES RECONOCEDORES  
DE DNA”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:  
Q.F.B. VIRIDIANA AGUILERA SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS. LUIS CHACÓN GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN. MARZO, 2014



El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Diseño Molecular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Luis Chacón García. Los ensayos electroforéticos se realizaron en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas Dr. Ignacio Chávez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Carlos Cortés Penagos.

Con apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 268681.

## ÍNDICE GENERAL

### CONTENIDO

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
<b>I.</b> Resumen.....	1
<b>II.</b> Abstract.....	2
<b>III.</b> Introducción.....	3
<b>IV.</b> Antecedentes.....	6
<b>V.</b> Justificación.....	19
<b>VI.</b> Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos específicos.....	20
<b>VII.</b> Materiales y Métodos.....	22
7.1 Metodología QSAR.....	22
7.2 Metodología de anclaje molecular.....	25
7.3 Metodología síntesis.....	26
7.3.1 Procedimiento general para la preparación de los compuestos de la Serie 1 ( <b>1-16</b> ).....	26
7.3.2 Procedimiento general para la preparación de los compuestos de la Serie 2 ( <b>17-31</b> ).....	29
7.4 Metodología ensayos en DNA.....	31
7.4.1 Ensayo. Efecto del metanol sobre los fragmentos de DNA.....	31
7.4.2 Ensayo. Determinación de la concentración de $\lambda$ DNA.....	32
7.4.3 Ensayo. Efecto de los compuestos sobre el DNA.....	32
7.4.4 Ensayo con diferentes diluciones de los compuestos <b>20</b> y <b>21</b> sobre el DNA.....	33
7.4.5 Ensayo variando las diferentes diluciones y el tiempo de <b>20</b> sobre el DNA.....	33

<b>VIII.</b>	Resultados y Discusión.....	35
	8.1 QSAR.....	35
	8.2 Estudio "Docking" o anclaje molecular.....	47
	8.3 Síntesis.....	60
	8.3.1 Síntesis de los compuestos análogos a alquendiamidas.....	60
	8.3.1.1 Síntesis de las maleimidas.....	60
	8.3.1.2 Síntesis de los compuestos <b>A</b> y <b>B</b> .....	61
	8.3.1.3 Síntesis del compuesto <b>A</b> .....	62
	8.3.1.4 Síntesis del compuesto <b>B</b> .....	64
	8.3.2 Síntesis de los compuestos análogos a maleimidas y succinimidas.....	69
	8.3.2.1 Síntesis de 3-(1-azetidil)-1-(2,4,6-trimetilfenil) 2, 5 pirrolidindiona ( <b>17</b> ).....	69
	8.3.2.2 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-(4-metilpiperazinil)pirrolidin-2,5-diona ( <b>18</b> ).....	69
	8.3.2.3 Síntesis de 3-(aziridinil)-1-( <i>m</i> -tolil)pirrolidin-2,5-diona ( <b>19</b> ), 3-(aziridinil)-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona ( <b>20</b> ), 3-(aziridinil)-1-mesitilpirrolidin-2,5-diona ( <b>21</b> ).....	71
	8.3.2.4 Síntesis de 3-(aziridinil)-4-cloro-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona ( <b>22</b> ).....	72
	8.3.2.5 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-(3,5-dimetilpiperidinil)pirrolidin-2,5-diona ( <b>23</b> ).....	73
	8.3.2.6 Síntesis de 3-cloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona ( <b>24</b> ), 3-cloro-1-(4-metoxifenil)-1-pirrol-2,5-diona ( <b>25</b> ).....	73
	8.3.2.7 Síntesis de 3,4-dicloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona ( <b>26</b> ), 3,4-dicloro-1-(4-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona ( <b>27</b> ).....	74
	8.3.2.8 Síntesis de 1-(3-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona ( <b>28</b> ).....	74
	8.3.2.9 Síntesis de 3,3'-(piperazin-1,4-di)bis(1-mesitilpirrolidin-2,5-diona ( <b>29</b> )).....	75
	8.3.2.10 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-((2-(dimetilamino)etil)amino)pirrolidin-2,5-diona ( <b>30</b> ).....	75

8.3.2.11 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-((2,2-dimetoxietil)amino)pirrodin-2,5-diona( <b>31</b> ).....	76
8.4 Ensayos en DNA.....	80
<b>IX.</b> Conclusiones.....	91
<b>X.</b> Bibliografía.....	92
Anexos.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
1 Estructura química de la distamicina A.....	7
2 Interacciones de la distamicina en el DNA.....	8
3 Estructura química de la acridina.....	8
4 Estructura química de DACA.....	9
5 Interacciones de la estructura cristalográfica de DACA.....	10
6 Estructura química de amonafida y azonafida.....	10
7 Reacción de Michael sobre carbonilo $\alpha$ , $\beta$ -insaturado.....	11
8 Mecanismo de adición tipo Michael para los grupos carbonilo $\alpha$ , $\beta$ - insaturados con cloro en posición 2.....	12
9 Cambios de energía en la formación del complejo acoplado.....	15
10 Modelo de acoplamiento molecular.....	15
11 Esquema de las características del DNA que dan lugar al descriptor $D_{CL}$ .....	17
12 Estructura general de la Serie 1 (1-16).....	20
13 Serie 1 de compuestos propuestos.....	21
14 Serie de exploración de A-ZA.....	24
12 Estructura general de la Serie 1 (1-16).....	26
15 Estructura general de los compuestos de la Serie 1 (1-16).....	27
16 Esquema general de la síntesis de los compuestos (17-31).....	29
14 Estructura general de la Serie 1 (1-16).....	37
17 Serie 1 de compuestos para el estudio.....	45
18 Reconocedor de surco sobre el DNA.....	50
19 Interacciones que presenta el compuesto 4 con el DNA.....	50
20 Compuestos propuestos para sintetizarlos.....	53
21 Comparación de reconocimiento del mismo sitio entre 4 y 2'-(3-metil-4- dimetilaminofenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-benzimidazol.....	54

22	Reconocedor de surco sobre el DNA.....	56
23	Interacciones que presenta el compuesto <b>18</b> sobre el DNA.....	56
24	Interacción del anillo de aziridina del compuesto <b>20</b> con el grupo amino de la guanina.....	58
25	Comparación entre tetrahidropirimidin-2-bifenil-4-1-indol obtenido por el Docking y tetrahidropirimidin-2-bifenil-4-1-indol obtenido por PDB.....	59
26	Síntesis de N-fenilmaleimida ( <b>1.1</b> ).....	60
27	Síntesis de los compuestos <b>A y B</b> .....	62
28	Síntesis del compuesto <b>A</b> .....	62
29	Mecanismo propuesto para la reacción de la N-fenilmaleimida con una amina aromática.....	64
30	Síntesis del compuesto <b>B</b> .....	65
31	Reacción de apertura del anillo de maleimida en presencia de una amina...	65
32	Isomerización del Compuesto <b>C a D</b> .....	66
33	Serie de compuestos <b>1- 4, 32</b> .....	67
34	Síntesis de <b>17</b> .....	69
35	Serie <b>2</b> de compuestos <b>11-31</b> .....	70
36	Síntesis de <b>18</b> .....	71
37	Síntesis de <b>19- 21</b> .....	72
38	Síntesis de <b>22</b> .....	72
39	Síntesis de <b>23</b> .....	73
40	Síntesis de <b>24, 25</b> .....	74
41	Síntesis de <b>26, 27</b> .....	74
42	Síntesis de <b>28</b> .....	74
43	Síntesis de <b>29</b> .....	75
44	Síntesis de <b>30</b> .....	75
45	Síntesis de <b>31</b> .....	76
46	Efecto de la concentración de los compuestos sobre el DNA.....	80
47	Efecto de <b>17 y 20</b> sobre el DNA.....	81
48	Electroforesis en gel de agarosa, efecto de <b>17, 18, 20, 21, 26</b> sobre el DNA, a	82

distintos tiempos.....	
<b>49</b> Electroforesis en gel de agarosa, efecto de <b>17, 18, 20, 21, 26</b> sobre el DNA, a distintos tiempos.....	83
<b>50</b> Electroforesis en gel de agarosa, efecto de <b>20, 21</b> sobre el DNA, a distintas concentraciones.....	84
<b>51</b> Efecto de la concentración de <b>20</b> .....	85
<b>52</b> Estructuras químicas de los Compuestos <b>1, 3, 4 y 32</b> .....	87
<b>53</b> Electroforesis en gel de agarosa para estudiar el efecto de la distamicina...	87
<b>54</b> Electroforesis en gel de agarosa, efecto de los compuestos <b>1, 3, 4, 32</b> sobre el DNA, a distintos tiempos.....	88
<b>55</b> Electroforesis en gel de agarosa, efecto de los compuestos <b>1, 3, 4, 32</b> sobre el DNA, a distintos tiempos.....	89
<b>56</b> Estudio de varios Reconocedores el surco menor sobre el DNA y su posible efecto inhibitorio de la topoisomera.....	89
<b>57</b> Electroforesis en gel de agarosa de la fragmentación del etopósido sobre el DNA.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
1 Sustituyentes de <b>1-16</b> .....	28
2 Sustituyentes de <b>17-31</b> de la Serie <b>2</b> .....	30
3 Familias de Descriptores.....	38
4 Valores de los mejores descriptores.....	39
5 Correlación de Pearson entre los descriptores del modelo <b>8</b> .....	39
6 Modelos seleccionados de acuerdo a las restricciones estadísticas establecidas.....	40
7 Validación de los mejores modelos.....	41
8 Comparación de los dos mejores modelos para predecir la actividad.....	42
9 Actividades predichas utilizando el modelo <b>26</b> .....	46
10 Características de las diferentes estructuras cristalográficas.....	48
11 Energía de formación del Complejo de <b>1-16</b> .....	49
12 Distancias de Puentes de hidrogeno, donador de H---aceptor (Å) de <b>1-16</b> .....	51
13 Comparación de resultados de QSAR y Docking.....	52
14 Valores de afinidad de <b>17-31</b> de la serie <b>2</b> .....	57
15 Distancias de Puentes de hidrogeno, donador de H---aceptor (Å) de <b>17-31</b> .....	57
16 Espectroscopia de RMN de <sup>1</sup> H de las maleimidias <b>1.1-1.4</b> .....	61
17 Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H y RMN de <sup>13</sup> C de <b>1-4, 32</b> .....	68
18 Espectroscopia de RMN de <sup>1</sup> H y RMN de <sup>13</sup> C de <b>1-15</b> .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	microlitros.
<b>A</b>	adenina.
<b>DACA</b>	N-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida.
<b>DFT</b>	teoría de funcionales de la densidad.
<b>DMF</b>	dimetilformamida.
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico.
<b>IA</b>	inteligencia artificial.
<b>KA</b>	constante de afinidad.
<b>Kcal</b>	kilocalorias.
<b>LD<sub>50</sub></b>	dosis letal 50.
<b>mg</b>	miligramos.
<b>MHz</b>	megaHertz.
<b>mL</b>	mililitros.
<b>OMS</b>	organización mundial de la salud.
<b>pb</b>	pares de bases.
<b>PDB</b>	protein data bank.
<b>QSAR</b>	qualitative structure activity relationship.
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	resonancia magnética nuclear de hidrogeno.
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	resonancia magnética nuclear de carbono 13.
<b>RMSD</b>	raíz cuadrada de la distancia media.
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto.
<b>SAR</b>	estudio de estructura actividad.
<b>SSA</b>	secretaría de la salud de México.
<b>T</b>	timina.
<b>TBE</b>	tris-borax-EDTA.
<b>TMS</b>	tetra metil silano.
<b>UV</b>	ultravioleta.
<b>ΔG<sub>union</sub></b>	cambio de energía total del sistema.
<b>ΔH</b>	entalpía.

## **I. RESUMEN**

Palabras clave: cáncer, QSAR, docking, maleimidas.

El cáncer es una enfermedad que se presenta a nivel mundial con un alto índice de mortalidad. Actualmente se está en la búsqueda de compuestos novedosos que sean efectivos, selectivos y poco tóxicos contra dicha enfermedad.

En este proyecto de tesis se realizó el diseño de compuestos con potencial actividad citotóxica análogos a maleimidas, succinimidas y alquendiamidas. A partir de estudios QSAR y de anclaje molecular “Docking” se encontró que estos análogos interactúan en el surco menor, las interacciones que presentan con el DNA son principalmente con la guanina, citosina y la desoxirribosa. Las energías de formación del complejo indican que la interacción puede presentar cierta reversibilidad, lo que le confiere al compuesto una toxicidad menor.

Las maleimidas presentan dos centros reactivos dando adiciones 1,2 y 1,4, dicha reactividad está en función del electrófilo y del medio donde se realiza la reacción, es decir, del solvente y la temperatura. Empleando un solvente de carácter duro como el etanol se realizó la síntesis de las alquendimidas y al utilizar un solvente como el tolueno y el acetonitrilo de carácter blando se obtuvieron las maleimidas sustituidas en posición 1,4, estos resultados corroboran las teorías descritas por Méndez y Person.

Ensayos electroforéticos demostraron que los compuestos análogos a succinimidas sustituidos con grupos como aziridinas y azetidinas presentan un efecto alquilante al interactuar con el DNA.

Dado el efecto alquilante que presentan estos compuestos, demostrado mediante el diseño molecular y las pruebas electroforéticas resultan buenos candidatos para ser probados en diferentes líneas celulares contra el cáncer.

## **II. ABSTRACT**

Keywords: cancer, QSAR, docking, maleimide.

Cancer is a disease with a high mortality rate that occurs worldwide. Nowadays research is based on finding novel compounds that are effective, selective and low toxicity against the disease.

In this thesis project compounds with potential cytotoxic activity analogous to maleimides, succinimides and alquendiamidas were design. Using QSAR studies and molecular anchoring "Docking" was found to interact in the minor groove interaction with the DNA that is present mainly with guanine, cytosine and deoxyribose. The energies of complex formation indicate that the interaction may have some reversibility, which gives the compound less toxicity.

Maleimides having two reactive centers additions giving 1.2 and 1.4, reactivity depends on the electrophile, where in the reaction medium is performed, the solvent and temperature. Using a hard character solvent such as ethanol alquendimidias synthesis was performed and using a soft character solvent such as toluene and acetonitrile maleimides substituted in the position 1.4 were obtained, these results corroborate the theories described by Mendez Person.

Electrophoretic studies showed that the analogues succinimides substituted with groups such as aziridines and azetidines have an alkylating effect by interaction with the DNA.

As the alkylating effect presented by these compounds, demonstrated by the electrophoretic molecular design and test results that these compounds are good candidates to be tested in different cancer cell lines.

### III. INTRODUCCIÓN

El cáncer, es uno de los principales problemas de salud en el mundo entero y en México representa un problema de salud pública, por ejemplo el cáncer cervical y de mama en mujeres mexicanas registra cada año más de 4,000 muertes por esta enfermedad (Lazcano *et al.*, 1996). El cáncer no es una sola enfermedad sino que es un grupo de más de 100 enfermedades diferentes. Puede describirse generalmente como un crecimiento y una propagación descontrola de células anormales en el cuerpo. Cuando esto sucede, se forma una masa de tejido que se denomina tumor. Los tumores se encuentran en todos tipos de tejidos y pueden ser benignos o malignos dependiendo de sus características como calcificación y capacidad de ser extirpado sin diseminación. Un gen supresor de tumor en particular codifica la proteína conocida como "p53" (proteína humana localizada en el cromosoma 17 p), que actúa como un "freno" deteniendo el crecimiento y la división de las células. En caso que no poder reparar el daño, se inicia el "suicidio celular" o muerte celular programada conocida como apoptosis, previniendo así el crecimiento descontrolado de las células genéticamente dañadas (Vogelstein *et al.*, 2004).

El tratamiento del cáncer está determinado por su localización y el grado de avance al momento de diagnosticar la enfermedad. Las principales formas de tratarlo son:

- Cirugía: Consiste en la extirpación del tumor o tejido afectado.
- Radioterapia: Consiste en el uso de rayos X, en altas dosis, para eliminar células cancerosas y reducir el tamaño tumor. La radiación anula la capacidad de las células cancerosas de crecer y multiplicarse.
- Quimioterapia: Se trata de un tratamiento en el que se emplean medicamentos dirigidos a las células neoplásicas. Existen varias clases de medicamentos anticancerosos que actúan de diferentes formas dentro del cuerpo.

En la actualidad existen en el mercado una gran variedad de medicamentos antineoplásicos, sin embargo, la mayoría de estos compuestos tienen efectos secundarios graves. Aunque hay varios blancos moleculares, existe un gran reto para diseñar compuestos dirigidos de manera específica al DNA, es decir, que no interfieran con las funciones de las células normales actuando sobre otros blancos moleculares pues cabe

señalar que los tratamientos con agentes quimioterapéuticos son invasivos dada su baja especificidad, ocasionando daño células sanas.

La resistencia oncológica se considera una de las mayores causas de fallo clínico de la quimioterapia (Johnson *et al.*, 1994). Casi el 50 % de los pacientes con cáncer presentan tumores que son resistentes a los fármacos empleados, los cuales han desarrollado resistencia durante el curso del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta inicial al mismo (Kirschner *et al.*, 1992).

Con la tecnología moderna, gracias a los avances en la computación, es posible diseñar estructuras con características estructurales y fisicoquímicas que tengan posibilidades de éxito como agentes farmacéuticos. Tal es el caso del análisis de Relación Estructura-Actividad (QSAR) por sus siglas en inglés (Quantitative Structure-Activity Relationship), que se basa en un proceso por el cual la estructura química está matemáticamente correlacionada con su actividad biológica. Un estudio QSAR está fundamentado en la premisa de que la actividad está en función de las propiedades estructurales del compuesto activo. Un buen modelo QSAR puede ser capaz de hacer predicciones de la actividad biológica de compuestos aun no sintetizados, llevando consigo la ventaja de reducir el número de compuestos a sintetizar y reduciendo costos y aumentando la posibilidad de obtener compuestos exitosos.

La inteligencia artificial (IA) es un área inmensa de conocimiento, tan profunda en sus cimientos matemáticos, como extensa en sus alcances y cruces con otras áreas. Aunque puede utilizar diversos procedimientos matemáticos uno de los más relevantes son los algoritmos genéticos que son métodos adaptativos que pueden usarse para resolver problemas de búsqueda y optimización. De acuerdo al principio Darwiniano de reproducción y supervivencia del más apto, dicho evento se ha presentado de forma natural como una serie de operaciones genéticas, de entre las que se destaca, la recombinación sexual. Por imitación de este proceso, los Algoritmos Genéticos son capaces de ir creando soluciones para problemas del mundo real. La evolución de dichas soluciones hacia valores

óptimos del problema depende en buena medida de una adecuada codificación de las mismas (Ambati, Ambati, y Mokhtar, 1991).

Los algoritmos genéticos no son recientes, es posible rastrear sus orígenes desde los años 50 y 60, hasta la publicación del libro que prácticamente fundó una nueva área del conocimiento: *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, de John Holland, desde entonces conocido como padre de los algoritmos genéticos. En el método QSAR según el modelo en el que se basan reciben su nombre: realiza una aproximación extratermodinámica, modelo de Free-Wilson (Free y Wilson, 1964), modelo Fujita-Ban (Hansch *et al.*, 1995; Hernández-Gallegos y Lehmann, 1990) realiza una aproximación estructural; los no lineales, y los que realizan una regresión lineal multivariable (Burger y Wolff, 1995).

El diseño de reconocedores de surco del DNA con uso potencial como agentes anticancerígenos se encuentra limitado a obtención de compuestos de manera empírica.

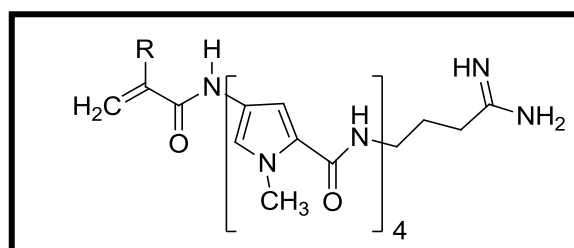
## **IV. ANTECEDENTES**

Existen compuestos capaces de interactuar con la molécula de DNA y lo hacen a través de diversos mecanismos. A estos compuestos se les conoce como agentes reconocedores de DNA. El conocimiento de cómo lo hacen y la especificidad que presentan, constituye uno de los objetivos principales para el posterior diseño de agentes reconocedores de DNA más afines y más selectivos (García y Pascual-Teresa, 2004). El papel de estos agentes reconocedores de DNA en el control de las funciones celulares los sugirió de inmediato como excelentes objetivos en el tratamiento de origen contra el cáncer. Después de que Lerman informara del descubrimiento de una interacción no covalente entre acridina y el DNA, sugiriendo un proceso interactivo, dicho proceso estableció que algunos de estos agentes interactúan con el DNA y serían candidatos contra el cáncer (Martínez y Chacón-García, 2005). Estos agentes reconocedores de DNA se clasifican por su mecanismo de acción si es reversible con el DNA o si es irreversible la interacción. Se sabe que una interacción reversible es aquella donde el ligando se une al DNA mediante interacciones intermoleculares débiles como lo son los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, etc. Por su parte, los que se unen covalentemente al DNA son conocidos como agentes alquilantes. Dentro de los compuestos reversibles se pueden encontrar a los:

**Reconocedores de surco:** Estos compuestos pueden reconocer y establecerse de manera no covalente en el surco menor o mayor del DNA. De acuerdo a la disposición en doble hélice de las cadenas de DNA se forman hendiduras a lo largo del exterior de la hélice donde residen los grupos fosfato de los nucleótidos que son conocidas según su amplitud. Así, se habla de surco mayor y de surco menor. Estos surcos, debido a su diferente estructura, muestran preferencia por determinados ligandos. El surco mayor es principalmente reconocido por proteínas y aunque el surco menor es considerado menos específico es el responsable del reconocimiento de moléculas orgánicas pequeñas (Bewley, Gronenborn, y Clore, 1998). Estas últimas adoptan, en su sitio de acción molecular, una conformación helicoidal (Zavala-Franco, González-Campos; Chacón-García, 2010). Dichas

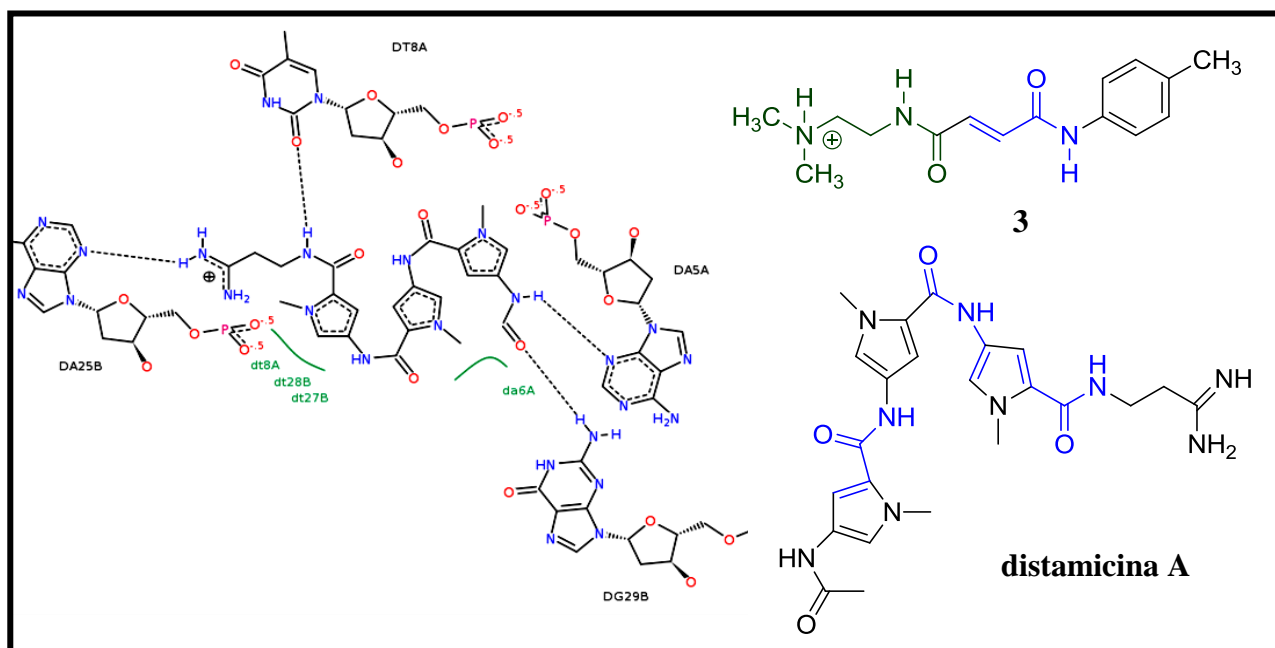
moléculas exhiben actividad antiparasitaria, antiviral y antibacteriana; y además muestran también actividad antitumoral (Wemmer y Dervan, 1997).

Un ejemplo interesante es la distamicina A que se caracteriza por la presencia de un marco de pirrolcarbamol de oligopéptido terminando con un resto amidino, el cual se une reversiblemente al surco menor del DNA mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas, con una fuerte preferencia por secuencias ricas en Adenina-Timina (A-T). Se observa que la saturación de los anillos de pirrol reducidos son en gran medida responsables de la afinidad de unión al DNA. Algunos análogos a la distamicina (**Figura 1**) presentan actividad citotóxica sobre la línea celular de leucemia, algunos estudios indican que al agregar anillos de pirrol aumentan la especificidad hacia la secuencia A-T (Woods *et al.*, 2002).



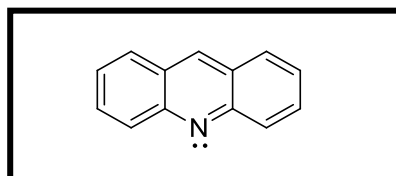
**Figura 1.** Estructura química de la distamicina A.

Este compuesto se une al surco menor del DNA de forma no covalente, con una preferencia de unión en secuencias ricas en A-T. Se determinó mediante rayos X su estructura cristalográfica del complejo entre la distamicina y una secuencia de (GGCCAATTGG) posee dos modos de unión en la orientación del compuesto sobre el surco menor. Dichos cristales difractan a 2.38 y 1.85 Å respectivamente. El átomo de nitrógeno de la amida forma puente de hidrógeno con el N3 de la adenina y el O2 de la citosina en el surco menor y el oxígeno de la amida terminal forma puente de hidrógeno con el N2 del grupo amino, el complejo está más estabilizado por interacciones de Van der Waals e interacciones electrostáticas (**Figura 2**) (Uytterhoeven *et al.*, 2002).



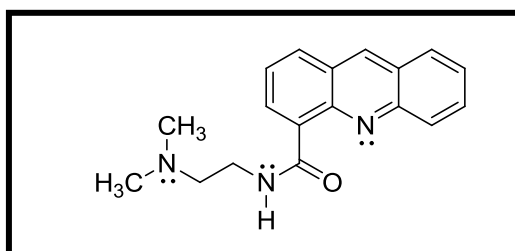
**Figura 2.** Interacciones de la distamicina en el DNA.

**Intercaladores:** Estos compuestos se insertan perpendicularmente en el DNA sin la formación de enlaces covalentes, las únicas fuerzas reconocidas que mantienen la estabilidad del complejo DNA-Intercalador son fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas de transferencia de carga, etc. Su actividad citotóxica se explica por un envenenamiento de la enzima Topoisomerasa desencadenando una serie de eventos que llevan a la apoptosis celular (Martínez y Chacón-García, 2005). Uno de los compuestos intercaladores del DNA más estudiados por su valor potencial como agente anticancerígeno son las acridinas (**Figura 3**), de los cuales se han descrito una amplia diversidad estructural (Denny *et al.*, 1982).



**Figura 3.** Estructura química de la acridina.

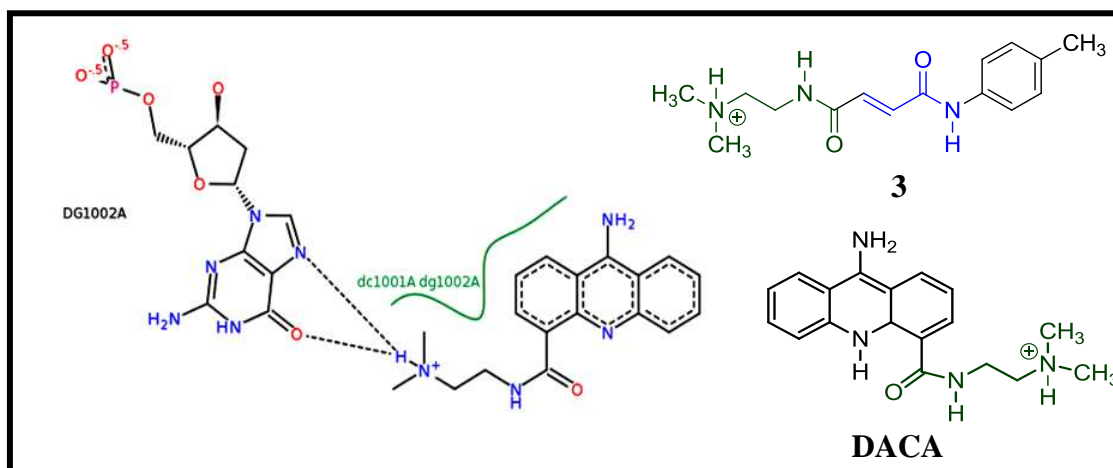
La N-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida (DACA) (**Figura 4**) ha sido estudiada intensamente, la cual intercala en el DNA dúplex con una interacción específica de hidrógeno unido al N7 de la guanina en el surco mayor. Actúa como agente antitumoral, y se sabe que es una envenenadora mixta de topo I / topo II (Todd *et al.*, 1999). La búsqueda de nuevas acridinas ha llevado a que se construya una nueva generación de intercaladores de DNA las cuales han sido probadas en tumores murinos y leucemias.



**Figura 4.** Estructura química de DACA.

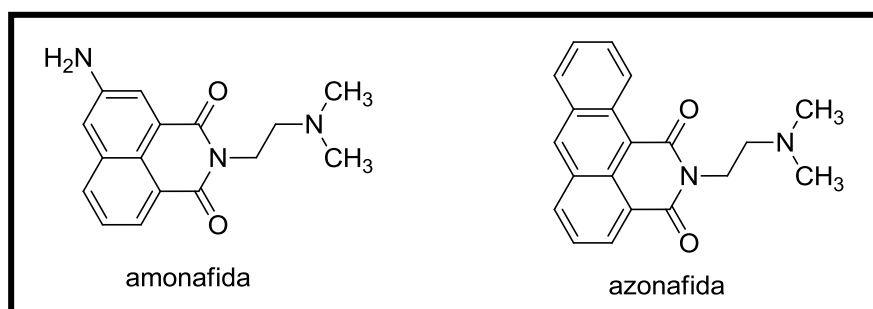
Otros estudios también muestran que tanto el núcleo acridina como la cadena dimetilamino forman parte en la interacción de la molécula con el DNA. Se ha reportado una serie de acridinas análogas de DACA que presentan una gran variedad de sustituyentes en el núcleo acridina de la molécula (Spicer *et al.*, 1997).

Un estudio de rayos X demostró que la estructura cristalográfica del 9-amino-(N-(2-dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida se intercala entre cada uno de los dinucleótidos, el grupo dimetilamino protonado parcialmente ocupa las posiciones cerca del N7 y O6 de la guanina en el surco mayor interaccionando mediante puentes de hidrogeno (**Figura 5**) (Adams *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Interacciones de la estructura cristalográfica de DACA.

La amonafida es un intercalador del DNA, inhibidor de la topoisomerasa II, es efectivo en enfermedades neoplásicas (Norton *et al.*, 2008). Otro ejemplo de intercalador es la azonafida, análogos han sido probados en células de tumores sólidos humanos y de células de leucemia L1210 murinas (Sami *et al.*, 2000). La amonafida posee anillos planos con al menos un grupo amino, la cadena interactúa en el surco mayor y esta interacción no covalente interfiere en la función normal de la topoisomerasa II (Braña *et al.*, 2001). Pruebas de actividad citotóxica demuestran que tienen una toxicidad moderada hacia ratones y ratas ( $LD_{50} > 6$  mg/kg) (Braña *et al.*, 1980) (**Figura 6**).



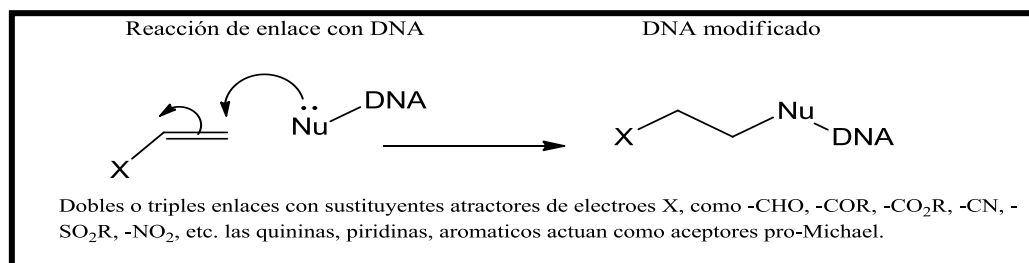
**Figura 6.** Estructura química de amonafida y azonafida.

Las interacciones irreversibles, son también conocidas como interacciones enlazantes.

**Agentes alquilantes:** Son fármacos que se unen al DNA formando enlaces covalentes creando puentes de unión entre las dos cadenas de DNA, de esta forma se producen daños estructurales impidiendo la duplicación, transcripción, síntesis de proteínas, mitosis, determinando de esta forma la muerte celular. Este tipo de interacciones son propias de los gases de guerra y algunos antitumorales como el Cisplatino (García y Pascual-Teresa, 2004). La alquilación de los diversos sitios nucleófilos en el DNA depende de la naturaleza del agente alquilante. La posición N7 de la guanina es el sitio preferido por la mayoría de los agentes alquilantes. Los agentes alquilantes con dos o más centros electrófilos (cross-linking agents) pueden generar enlaces cruzados entre dos o más centros nucleófilos del DNA (Rajski-Williams, 1998).

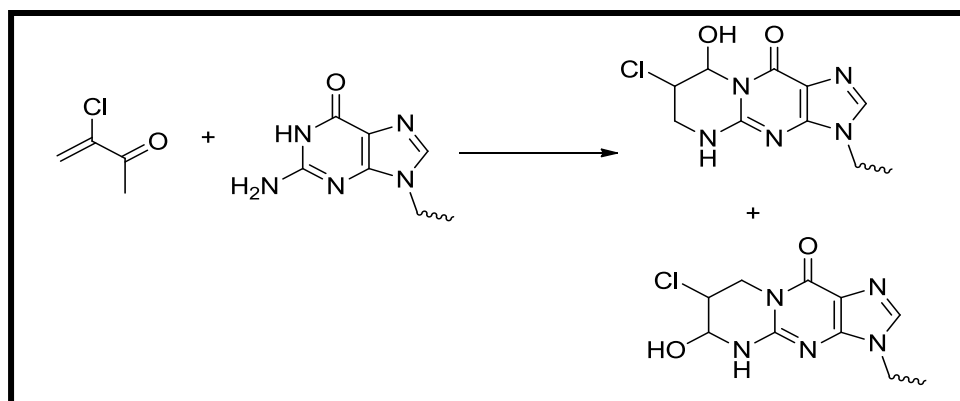
Entre estos agentes se encuentran los compuestos carbonílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados que tienen dos sitios reactivos: el grupo carbonilo y el doble enlace conjugado; el último presenta una deficiencia de carga que lo hace susceptible de reaccionar con grupos nucleófilos y de interactuar con macromoléculas biológicas mediante reacciones de adición de Michael (Van *et al.*, 1997, Chung *et al.*, 1988). Este hecho da como resultado una serie de efectos adversos, siendo uno de ellos la mutagenicidad.

El mecanismo de adición de Michael se ilustra en la **Figura 7** (Eder *et al.*, 1982), los sustituyentes en el carbono  $\alpha$  o  $\beta$  de la insaturación vecinal del carbonilo afectan significativamente la efectividad de la reacción. Aunque los receptores de Michael son electrófilos suaves esto no significa que no reaccionen con nucleófilos duros como el DNA (Aptula *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Reacción de Michael sobre carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado.

Además, la sustitución de un halógeno en el carbono  $\alpha$  aumenta la mutagenicidad (Van-Beerendonk *et al.*, 1992), debido al potencial de entrecruzamiento con otros centros nucleófilos del DNA o proteínas (**Figura 8**). Los compuestos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados son altamente reactivos, tanto con proteínas como con bases del DNA. Tal reactividad implica consecuencias para la salud de los seres vivos. No obstante, la falta de evidencia experimental sobre la formación de productos de reacción con proteínas o DNA no presupone ausencia de mutagenia.



**Figura 8.** Mecanismo de adición tipo Michael para los grupos carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados con cloro en posición 2.

### Maleimidias

Se ha encontrado que algunos de estos compuestos actúan como inhibidores de la enzima topoisomerasa II humana. Un análogo de las maleimidias, las succinimidias, tienden a no presentar actividad citotóxica y se les considera inactivos. Las maleimidias actúan como aceptores de Michael haciendo susceptible a la enzima topoisomerasa II formándose un enlace covalente con un grupo SH de la cisteína presente en la enzima y la maleimida mediante una reacción de Michael (Shen *et al.*, 2004). Dicho proceso inhibe la actividad de la topoisomerasa II. Se concluye que la topoisomerasa II es un diana biológica significativa para maleimida debido a que la citotoxicidad conferida por dos "envenenadores" (etopósido-daunorubicina) bien caracterizados que se dirigen a la topoisomerasa II puede ser antagonizado por estos fármacos (Jensen *et al.*, 2002).

Existen reportes acerca de que las N-aril maleimidas son inhibidores de la enzima pro-apoptótica Bfl-1, por ello los hacen candidatos potenciales para la terapéutica anti-cáncer. Los estudios de estructura-actividad (SAR) para la inhibición de Bfl-1 análogos por maleimida de N-arilo revelaron una preferencia por sustituyentes que retiran electrones en el anillo de N-arilo y amins hidrofílicas que acompañan al núcleo maleimida. Se indicó la importancia de la insaturación del anillo de maleimida sustituida por un grupo cloro así como su incorporación de un anillo de piperazina. Se demostró que al no tener la insaturación es decir un análogo de la succinimida se perdía la actividad (Cashman *et al.*, 2010).

### **Química computacional**

Es un área muy extensa y prácticamente se encuentra en constante interacción con otros campos de la ciencia; en este caso, el interés se centra en el papel que juega la computación en la Química. A principios de los años 70's apareció un nuevo campo de conocimiento dirigido al diseño de moléculas asistido por computadora: la química computacional, la cual implica el uso de modelos matemáticos para predecir las propiedades químicas, biológicas y físicas de los compuestos, permitiendo la investigación de átomos, moléculas y macromoléculas (Cuevas-Cortés, 2003).

La química computacional incluye aspectos como:

- El modelado molecular.
- Los métodos computacionales.
- El diseño molecular asistido por ordenador.
- Las bases de datos químicos.
- El diseño en síntesis orgánica.

En la química computacional podemos encontrar diversos métodos y niveles de cálculo, los cuales pueden dividirse en dos grandes categorías (Jensen 1999, Grand *et al.*, 1995):

#### La mecánica molecular:

- Acoplamiento molecular (“Docking”).

- Dinámica molecular.
- Folding (plegamiento de proteínas).

Estos métodos aplican las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente a los electrones.

#### La mecánica cuántica:

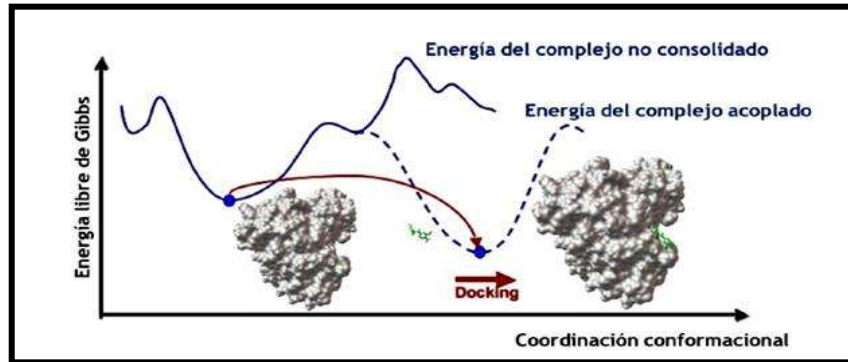
- Métodos semiempíricos.
- Métodos de Hartree-Fock.
- Métodos posHartree-Fock.
- Métodos de Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT).

Los cuales se basan en resolver la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica. Dichos métodos teóricos-computacionales han avanzado de manera exponencial tanto en la capacidad de cálculo como en la resolución de problemas de tipo químico-biológico. La metodología utilizada se lleva al cabo a partir de algoritmos basados en las propiedades fisicoquímicas de moléculas pequeñas y grandes para predecir, simular y estudiar sus interacciones con otras moléculas, que usan estrategias muy avanzadas en la búsqueda de soluciones para diversas situaciones, basándose en parámetros obtenidos de manera experimental.

#### **Acoplamiento molecular o “Docking”**

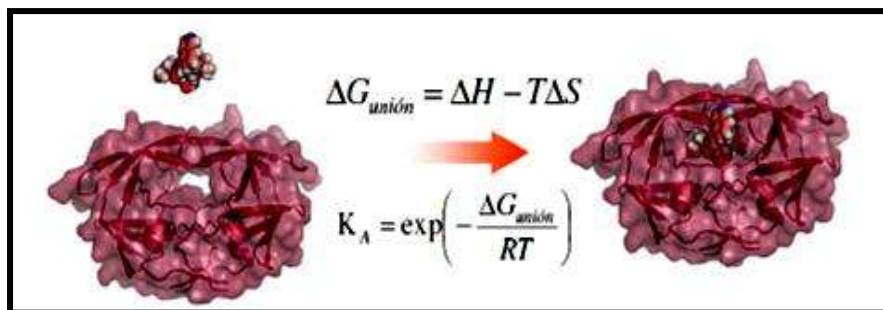
En la simulación del docking, la proteína y el ligando están separadas a una distancia física, de ahí el ligando encuentra su posición en el sitio afín de la proteína, esto después de un cierto número de movimientos en el espacio conformacional, estos movimientos se incorporan como transformaciones de cuerpo rígido tales como traslaciones y rotaciones, también con cambios internos en la estructura del ligando incluyendo torsiones. Cada uno de estos movimientos en el espacio conformacional del ligando induce un costo en la energía total del sistema.

Dos aproximaciones son las más populares dentro de la comunidad del docking. La primera usa la técnica de “matching” que describe a la proteína y al ligando como superficies complementarias. La segunda aproximación simula el proceso de docking como el par ligando-proteína y se calculan las energías de unión, las energías libres, o alguna cantidad numérica medible como función, para determinar cuál es el complejo más estable (**Figura 9**).



**Figura 9.** Cambios de energía en la formación del complejo acoplado.

Al calcular el cambio de energía total en el sistema ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) derivada de cada una de las interacciones en condiciones estándar, es posible conocer la constante de disociación, la cual corresponde a la constante de equilibrio de la disociación del complejo proteína-ligando (**Figura 10**). Cuanto menor sea la constante de disociación menor es la concentración de ligando necesaria para saturar la proteína y, en consecuencia, mayor es la afinidad ( $K_A$ ) de la proteína hacia el ligando, suponiendo que esta mayor afinidad corresponde a la afinidad del sitio activo.



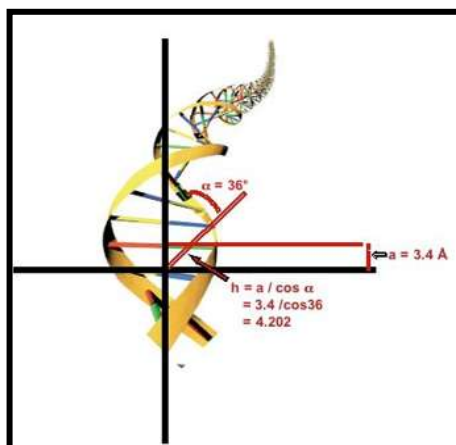
**Figura 10.** Modelo de acoplamiento molecular.

La ventaja de este método es que es mucho más manejable para incorporar la flexibilidad en el ligando, otra ventaja es que el proceso es físicamente mucho más cercano a lo que sucede en la realidad. Una desventaja de esta técnica es que necesita una gran cantidad de tiempo para evaluar las conformaciones óptimas para la unión de la molécula estable y se tiene que explorar una gran cantidad de posibilidades.

Muchos investigadores se han centrado en la unión de pequeñas moléculas al surco menor de DNA, esto implica generalmente una mayor afinidad de unión y una mayor especificidad de secuencia que el de unión intercaladores (Paul y Bhattacharya, 2012).

En un estudio previo, en el cual se describió el efecto de la isohelicoicidad, en función de sus interacciones por puentes de hidrógeno, de una serie de N,N'-diarilalcanodiamidas con longitud variable y con actividad citotóxica moderada, se propuso un descriptor molecular (descriptor  $D_{CL}$ ) relacionado con el reconocimiento topológico y la distancia entre grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con el DNA, obtenido a partir de la longitud de la molécula geoméricamente optimizada por métodos computacionales semiempíricos, teniendo en cuenta que se requiere una longitud específica para un reconocimiento geométrico óptimo con la doble hélice, considerando isohelicoicidad (Chacón-García y Martínez, 2001) (**Figura 11**).

Para medir la interacción del DNA con el reconocedor se utilizan varios métodos, uno de ellos es basado en la diferencia de la estabilidad entre el DNA solo y cuando se calienta. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) se toma como la temperatura a la que la mitad del DNA se ha desnaturalizado, es decir, la mitad de las bases de una sola hebra no interactúan con sus bases complementarias (Martínez y Chacón-García, 2005).



**Figura 11.** Esquema de las características del DNA que dan lugar al descriptor  $D_{CL}$ .

Otro método es por fluorescencia y absorbancia óptica, este se basa en el complejo entre un ligando de una molécula y un ácido nucleído, el cual conduce a cambios ópticos que pueden ser utilizados para controlar el proceso de reconocimiento. A medida que estas interacciones DNA-Reconocedor de surco, son un mecanismo reversible, una determinación de la constante de equilibrio de unión puede dar una idea de la naturaleza y la fuerza de los hechos subyacentes intermoleculares. El análisis de los efectos inducidos espectrales también puede revelar detalles considerables sobre la estequiometría del DNA-reconocedor, el tamaño del sitio de unión, y la termodinámica de la formación del complejo. La extensión de estas técnicas de secuencias de oligonucleótidos puede resaltar el posible sitio o secuencia específica de unión, un factor clave en el diseño racional de los medicamentos para su uso potencial en el gen específico de quimioterapia. Otra técnica descrita es la técnica calorimétrica, esta se puede utilizar para medir los efectos del calor que acompañan a una interacción fármaco-DNA; en principio se puede calcular a partir de estas mediciones tanto de cambio, la afinidad ( $\Delta G$ ) y entalpía ( $\Delta H$ ) para el proceso. Para este proyecto utilizamos estudios electroforéticos para observar la interacción entre los compuestos sintetizados y el DNA.

En este trabajo se describe la síntesis de una serie de arilmaleimidias que por sus características estructurales pueden representar compuestos que interactúan con el DNA

mediante reconocimiento supramolecular. La funcionalización de estas maleimidias con grupos reactivos como la aziridina permitirán también un comportamiento propio de agentes alquilantes. El estudio se apoya de estudios teóricos computacionales (QSAR y Docking) y ensayos biológicos para medir la actividad de los compuestos sobre el DNA.

## **V. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones. La Secretaría de Salud de México (SSA) reporta los casos de cáncer en el 2008, donde la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), seguida del cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%). La leucemia afecta principalmente a los hombres (15.1%), mientras que el cáncer de mama a las mujeres (8.4%) ("Programa de acción específico 2007-2012. Cáncer de mama," 2008). Aunque las tasas de mortalidad de estas enfermedades disminuyeron de 2005 a 2009, la tasa estandarizada de cáncer de mama pasó de 17.9 a 10.8% fallecimientos por cada 100 mil mujeres de 25 años o más y la correspondiente a la del cáncer cérvico-uterino bajó de 17.8 a 9.1% ("Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte," 2011). Por lo tanto, aun se trabaja con esfuerzo en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos que sean más selectivos y que no produzcan resistencia.

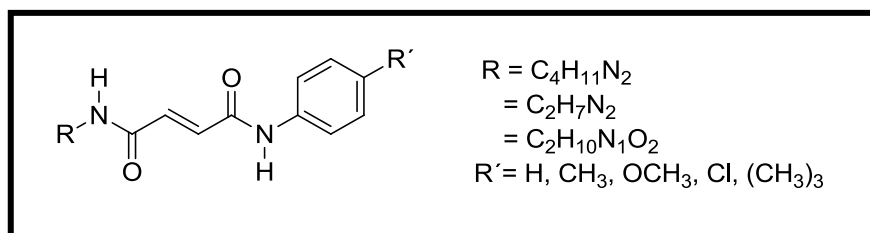
En la actualidad, los reconocedores de surco y los agentes alquilantes caben dentro de los fármacos para el tratamiento del cáncer.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar compuestos potencialmente reconocedores de surco de DNA aprovechando predicciones hechos por estudios QSAR y Docking molecular.

### Objetivos particulares:

1. Realizar un estudio QSAR de reconocedores de surco de una serie de compuestos descritos en la bibliografía con la estructura general (**Figura 12**).
2. Correlacionar la actividad de los compuestos **1-16** (**Figura 13**) descrita en el anterior objetivo, con estudios Docking.
3. Predecir la actividad utilizando los resultados de los objetivos anteriores, arrojados por el estudio QSAR y Docking.
4. Sintetizar los compuestos considerados con más posibilidades de presentar actividad citotóxica.
5. Evaluar la capacidad de reconocimiento de los compuestos sintetizados en el objetivo anterior por DNA mediante técnicas de electroforesis.



**Figura 12.** Estructura general de la Serie 1 (**1-16**).

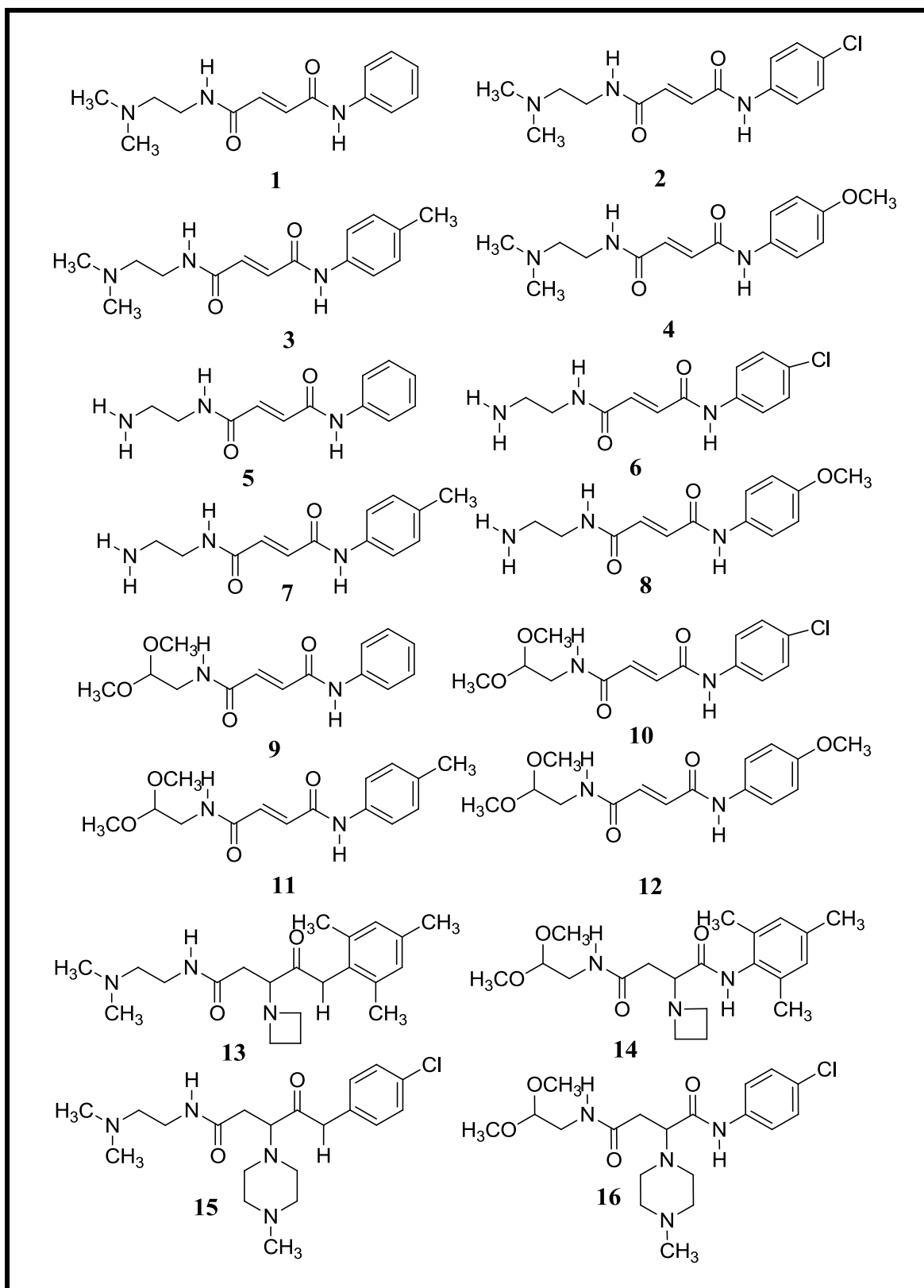
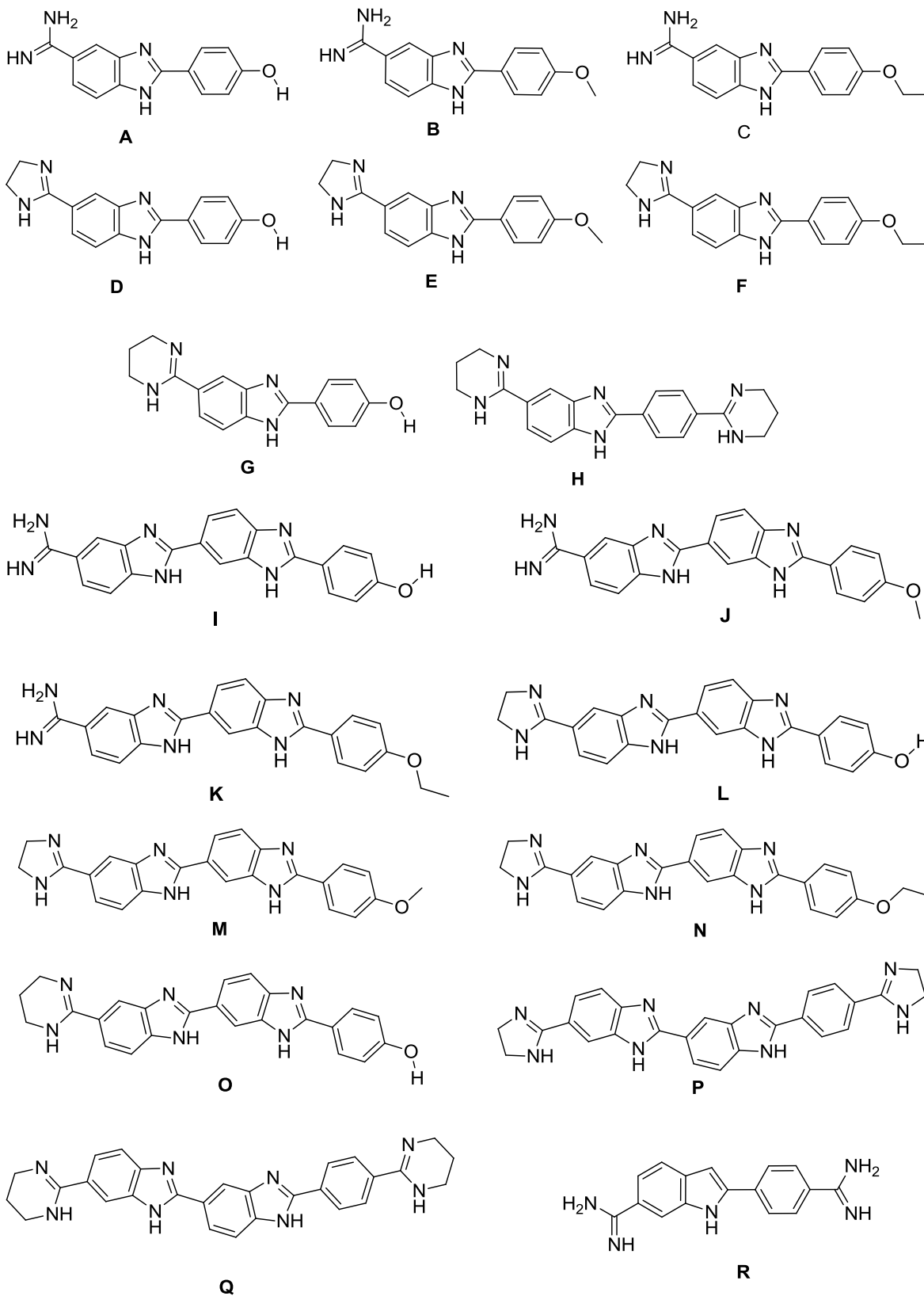


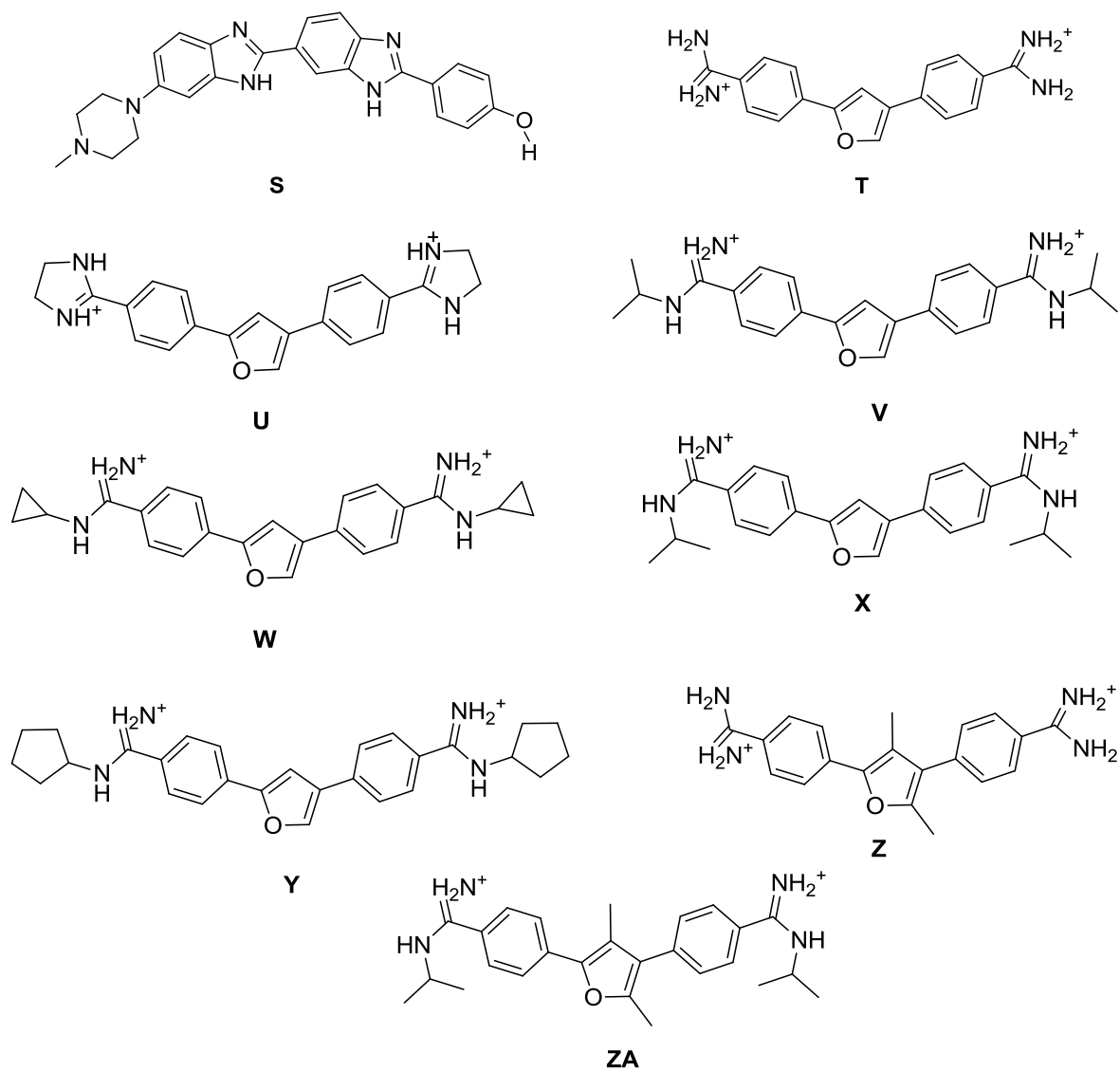
Figura 13. Serie 1 de compuestos propuestos.

## **VII. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 METODOLOGÍA QSAR:**

Se modeló la serie de exploración utilizando el software HYPERCHEM® (**Figura 14**) se optimizaron geoméricamente con mecánica molecular hasta convergencia de 0.01 y posteriormente con el método semiempírico AM1, utilizando como base el algoritmo Polak-Ribiere, con parámetros de condiciones de terminación de 0.1 kcal/(Å mol) o 465 ciclos como máximo. Se obtuvieron las combinaciones de los descriptores en el software DRAGON®, este programa utiliza 1664 descriptores agrupados en 20 familias. Se obtuvieron los 50 mejores modelos por algoritmos genéticos en el software MODYDIGS®. Se analizaron los resultados hasta obtener el mejor modelo matemático. Posteriormente, se modelaron y optimizaron los compuestos de la Serie 1 (**1-16**) (**Figura 13**) utilizando el software HYPERCHEM® se utilizó Mecánica molecular con el método MM<sup>+</sup> para su optimización geométrica. Utilizando el modelo descrito anteriormente, se calculó la actividad ( $\Delta T_m$ ) y se llevó a cabo un análisis de los resultados, para proponer a los mejores compuestos.





**Figura 14.** Serie de exploración de A-ZA.

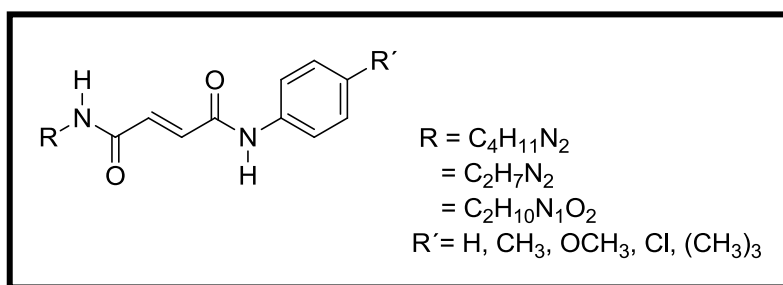
## **7.2 METODOLOGÍA DE ANCLAJE MOLECULAR:**

Se realizó un estudio de anclaje molecular o “Docking”, a los compuestos de la Serie 1 y 2, como primer paso se seleccionó el cristal de la secuencia de DNA, en el *Protein Data Bank* así como la secuencia sintética (C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G)<sub>2</sub> con código: **3U05**. Los ligandos (**1-16**), se modelaron en el programa SPARTAN®, como primer paso se realizó una búsqueda de conformeros, el estudio de conformeros arrojó cierto número de conformeros a los cuales se les determinó la energía en Kcal/mol, la energía libre en Kcal/mol y la distribución de Boltzmann, para el estudio se eligió el primer conformero, ya que posee la mínima energía y su distribución poblacional es la mayoritaria (>70%). Se optimizaron los compuestos (**1-16**) utilizando teoría de funcionales de la densidad (DFT) y el híbrido B3LYP 6-31 G\*\*. Utilizando el programa AUTODOCK TOOLS ® se prepararon los archivos PDBQT, se agregaron los enlaces rotables de los ligandos y utilizando el Grid box se calculó el tamaño de la rejilla o celda (44 x 54 x 124) del espacio del receptor en este caso el DNA (0.375 Å), el tamaño de la celda cubrió toda la secuencia, esto se realizó de esta forma, ya que no se conoce el sitio en donde reconocerá el ligando, a esto se le conoce como Docking ciego. Una vez que ya se tienen los archivos PDBQT del DNA y de los ligandos, se realizó un documento con formato TXT en donde se coloca el nombre del archivo de la macromolécula y del ligando, así como las coordenadas y los modos de unión para este estudio utilizamos 100, el programa emplea solo 10, pero se aumentaron con la finalidad de que se realice un cálculo más completo. El acoplamiento del receptor y los ligandos se llevo a cabo en el programa AUTODOCK VINA®, dicho programa utiliza un algoritmo heurístico y calcula internamente su propio mapa Grid, esto se lleva a cabo automáticamente. El cual arrojó un documento de texto con los resultados que incluyen la raíz cuadrada de la distancia media (RMSD) para la conformación del ligante, la energía libre de unión estimada ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) y un documento en formato PDBTQ con la estructura del compuesto en su conformación más estable en la unión con el DNA. Para documentar las estructuras en dos dimensiones (2D) se utilizó el programa POSEVIEW®, las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno y las líneas verdes las interacciones hidrófobas (**Figura 56, 58**).

## 7.3 METODOLOGÍA SÍNTESIS:

La espectroscopía RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se obtuvo con un equipo Varian Mercury Plus de 200 MHz y/o 400 MHz. Se utilizó como referencia interna TMS y como disolvente  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  y  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ . Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Hewlett Packard modelo 5989B, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie 2 plus. Todos los reactivos fueron de origen comercial de la empresa Aldrich.

### 7.3.1 Procedimiento general para la preparación de los compuestos de la Serie 1 (1-16):



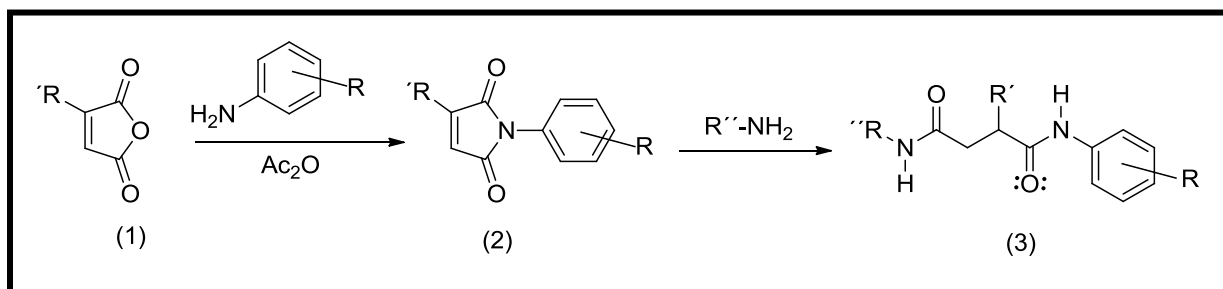
**Figura 12.** Estructura general de los compuestos de la Serie 1 (1-16).

La Síntesis de la Serie 1 de los compuestos **1-16** (**Figura 12**) consta de dos pasos fundamentales:

1.- En una matraz bola se colocó una solución de ácido acético caliente con 5.0 g de anhídrido maléico, se adicionó lentamente otra solución de ácido acético caliente conteniendo 6.5 g de la anilina correspondiente, inmediatamente precipitó el ácido maleámico, el cual se dejó enfriar, filtró y se lavó con agua. El sólido amarillo se recrystalizó con etanol. El ácido N-fenilmaleámico correspondiente fue suspendido en anhídrido acético, se colocó en agitación y calentó a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , se agregó una pequeña cantidad de acetato de sodio anhidro y se colocó en reflujo por 2 horas. Después de enfriar, se vertió en agua fría precipitando la maleimida, dichos cristales amarillos se filtraron y se lavaron con agua 3 veces por 5 mL. Se recrystalizó con metanol hasta obtener cristales

amarillos puros, el rendimiento dependió de los sustituyentes presentes en los compuestos varia del 40 al 50%.

2.- Posteriormente en un matraz bola se pusieron a reaccionar 200 mg de la maleimida en 6 mL de etanol grado reactivo, lentamente se adicionó 200  $\mu$ L de N-N-dimetiletildiamina, se colocó a reflujo por 1 hora, posteriormente se evapora el disolvente; para su purificación cromatografía en columna se empleó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla de diclorometano-metanol-hidróxido de amonio en proporción 2:3:0.1, se observó en las fracciones seleccionadas la formación de cristales en forma de aguja de color amarillo claro, con un rendimiento total de 25-36% dependiendo de los sustituyentes de los compuestos (**Figura 15**).



**Figura 15.** Esquema general de la síntesis de los compuestos (1-16).

La Tabla 1 muestra los diferentes sustituyentes R, R' y R''; ya que se los compuestos 1-16 poseen diferentes grupos funcionales en el anillo aromático, así como en el doble enlace y diferentes aminas.

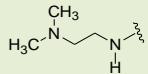
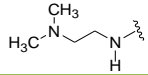
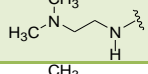
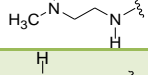
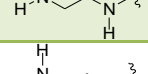
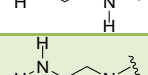
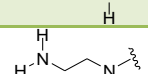
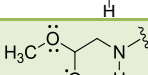
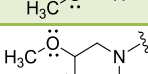
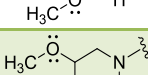
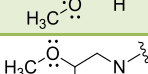
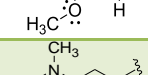

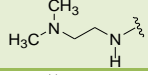

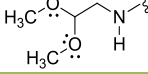
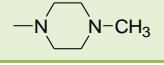
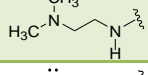
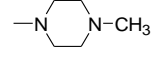
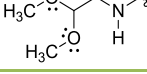
Compuesto Serie 1	Sustituyente (R)	Sustituyente (R')	Amina (R')
1	-H	-H	
2	-Cl	-H	
3	-CH <sub>3</sub>	-H	
4	-OCH <sub>3</sub>	-H	
5	-H	-H	
6	-Cl	-H	
7	-CH <sub>3</sub>	-H	
8	-OCH <sub>3</sub>	-H	
9	-H	-H	
10	-Cl	-H	
11	-CH <sub>3</sub>	-H	
12	-OCH <sub>3</sub>	-H	
13	-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		
14	-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		
15	-Cl		
16	-Cl		

Tabla 1. Sustituyentes de 1-16.

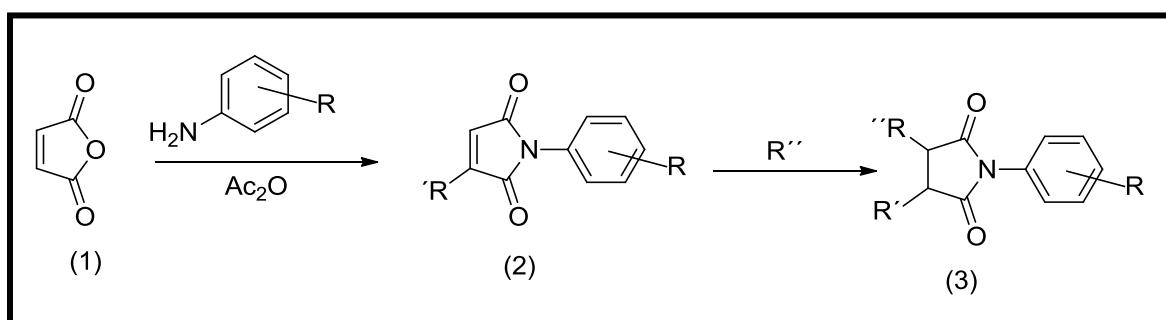
### 7.3.2 Procedimiento general para la preparación de los compuestos de la Serie 2 (17-31):

La síntesis de la Serie 2 está compuesta por 15 compuestos análogos a maleimididas y succinimididas. Los compuestos **17-31** (Tabla 2). Consta de dos pasos principalmente:

- 1.- La síntesis de las maleimididas se encuentra descrita en la metodología anterior.
- 2.- En un matraz bola se colocó una solución etérea conteniendo 500 mg de la maleimida correspondiente, se colocó en agitación y le fueron adicionados 200  $\mu$ L de azetidina/aziridina/piperazina diluida en éter, después de 1 hora, el disolvente fue evaporado al vacío (**Figura 16**). El residuo se pasó por una columna de cromatografía empacada con gel de sílice y eluída con cloroformo-acetato de etilo (1:1). El producto de reacción se disolvió en  $\text{CCl}_4$  caliente y después de enfriar se precipitó con hexano como sólido blanco; se obtuvo un rendimiento del 20-80 % dependiendo de los sustituyentes de los compuestos.


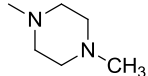




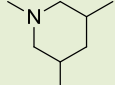
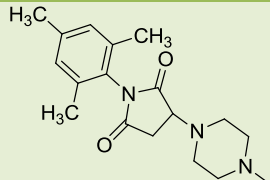
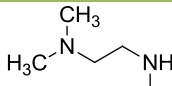
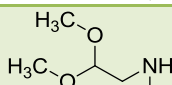
Para la síntesis de los compuestos **14,15**:

- 2.- En un matraz bola se adicionaron 200 mg de la maleimida correspondiente en 6 mL de etanol, en agitación, se adicionaron 100  $\mu$ L de la amina correspondiente, se colocó a reflujo por 1 hora, se evaporó el disolvente. Se observa un líquido viscoso de color naranja-café, el cual se purificó por columna cromatográfica con gel de sílice, el disolvente que se utilizó fue hexano-acetato de etilo en una proporción de 1:4, y diclorometano-metanol en una proporción 2:3, se evaporó el disolvente, se observó un líquido aceitoso transparente con un rendimiento del 20-40% dependiendo del sustituyente de los compuestos (**Figura 16**).



**Figura 16.** Esquema general de la síntesis de los compuestos (17-31).

La Tabla 2 muestra los diferentes sustituyentes R, R' y R''; ya que se utilizarán diferentes grupos funcionales en el anillo aromático, así como en el doble enlace y diferentes aminas.

Compuestos Serie 2	Sustituyente R	Sustituyente R'	Sustituyente R''
17	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	
18	Cl	H	
19	<i>m</i> -(CH <sub>3</sub> )	H	
20	Cl	H	
21	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	
22	Cl	Cl	
23	Cl	H	
24	NO <sub>2</sub>	H	Cl
25	OCH <sub>3</sub>	H	Cl
26	NO <sub>2</sub>	Cl	Cl
27	Cl	Cl	Cl
28	<i>m</i> -(Cl)	H	H
29	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	
30	Cl	H	
31	Cl	H	

**Tabla 2.** Sustituyentes de 17-31 de la Serie 2.

## **7.4 METODOLOGÍA ENSAYOS EN DNA:**

Se preparó el gel de agarosa al 1.8% pesando 0.5 g de agarosa de la marca INVITROGEN® y utilizando 30 mL de TBE 1X (Tris-Borax-EDTA) de la marca INVITROGEN® como buffer. La concentración de los compuestos se preparó de acuerdo al ensayo realizado. Se incubaron a 25 °C en agitación a 500 rpm utilizando el termomezclador de la marca EPPENDOR® variando el tiempo de incubación. Se utilizó una cámara de electroforesis de la marca OWL® el corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 v. utilizando una fuente de poder de la marca THERMO®, se utilizó como buffer TBE 1X. Una vez cumplido el tiempo de corrimiento electroforético, para revelar el gel se utilizó bromuro de etidio al 0.01%. Su visualización se llevó a cabo mediante luz ultravioleta utilizando un transiluminador UV de la marca THERMO®, se documentaron las fotografías con el equipo CHEM DOC de marca BIORAD®.

### **7.4.1 Ensayo. Efecto del metanol sobre los fragmentos de DNA.**

Se analizaron dos concentraciones de  $\lambda$  DNA 2  $\mu$ L y 4  $\mu$ L disuelto en 5  $\mu$ L de metanol.

#### **Metodología:**

Se realizó un gel de agarosa a una concentración 1.5%. Se prepararon las siguientes diluciones se agregaron 2  $\mu$ L de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu$ L de metanol; 4  $\mu$ L de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu$ L de metanol. Ambas concentraciones se incubaron a 25 °C en agitación (500 rpm) durante 1 hora. Se preparo el control agregando 7 $\mu$ L de  $\lambda$  DNA. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa agregando 2  $\mu$ L de buffer blue. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 100 v por 90 minutos; el gel de agarosa se reveló utilizando bromuro de etidio durante 10 minutos, posteriormente para visualizarlo se utilizó el transiluminador de la marca THERMO®.

#### **7.4.2 Ensayo. Determinación de la concentración de $\lambda$ DNA.**

Se analizaran dos concentraciones de  $\lambda$  DNA 0.125 y 0.5  $\mu$ L diluidos en metanol.

##### **Metodología:**

Se prepararon las siguientes diluciones 0.25  $\mu$ L de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu$ L de Metanol (1:10); 0.125  $\mu$ L de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu$ L de Metanol (1:20). Ambas concentraciones se incubaron a 25°C en agitación (500 rpm) durante 1 hora. Se preparó un gel de agarosa con una concentración de 1.8%. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa agregando 2  $\mu$ L de buffer orange. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 v por 90 minutos; el gel de agarosa se reveló utilizando bromuro de etidio durante 10 minutos, posteriormente para visualizarlo se utilizó el transiluminador THERMO®.

#### **7.4.3 Ensayo. Efecto de los compuestos sobre el DNA.**

Se analizó el efecto de los compuestos **1, 3, 4, 17, 18, 20, 21, 26 y 32** sobre los fragmentos de  $\lambda$  DNA, se incubaron por 1, 4, 6 y 8 horas.

##### **Metodología:**

Se prepararon las diluciones con **1, 3, 4, 17, 18, 20, 21, 26 y 32**, donde se agregó 5  $\mu$ L del compuesto (0.04  $\mu$ g/ $\mu$ L) en 10  $\mu$ L  $\lambda$  DNA (0.0125  $\mu$ g/ $\mu$ L), para el caso el compuesto **26** se agregaron 10  $\mu$ L Compuesto **26** (0.04  $\mu$ g/ $\mu$ L) + 10  $\mu$ L  $\lambda$  DNA (0.0125  $\mu$ g/ $\mu$ L). Para la preparación del Control se agregaron 10  $\mu$ L  $\lambda$  DNA (0.0125  $\mu$ g/ $\mu$ L). Se incubaron variando de 1, 4, 6, 8 horas a 25°C en agitación (500 rpm). Se preparó un gel de agarosa al 1.8%. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa agregando 5  $\mu$ L de buffer orange, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 100 v por 90 minutos; el gel de agarosa se reveló utilizando bromuro de etidio durante 10 minutos, posteriormente para visualizarlo se utilizó el transiluminador de la marca THERMO®.

#### **7.4.4 Ensayo con diferentes diluciones de los compuestos 20 y 21 sobre el DNA.**

Se van a analizar **20** y **21** que presentaron tener un efecto sobre el DNA en las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000.

##### **Metodología:**

Se prepararon las siguientes diluciones con **20** y **21** agregando 5  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA; 4.5  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.5  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:10); 4.75  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.25  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:100); 4.87  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.125  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:1000). Se repiten las mismas concentraciones para **21**. Para la preparación del control se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu\text{L}$  de metanol. Se dejaron incubar por 1 hora a 25 °C en agitación (500 rpm). Se preparó un gel de agarosa al 1.8%. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa agregando 5  $\mu\text{L}$  de buffer orange, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 100 v por 90 minutos; el gel de agarosa se reveló utilizando bromuro de etidio durante 10 minutos, posteriormente para visualizarlo se utilizó el transiluminador de la marca THERMO ®.

#### **7.4.5 Ensayo variando las diferentes diluciones y el tiempo de 20 sobre el DNA.**

Se analizó el compuesto **20**, ya que dicho compuesto presenta tener un efecto sobre el DNA, se prepararon las siguientes diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:100, 1:1000 incubándolos a 1 hora y las diluciones 1:1, 1:2, 1:4 incubándolos a 5 minutos.

##### **Metodología:**

Se prepararon las siguientes diluciones con **20**, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:1); 2.5  $\mu\text{L}$  de metanol + 2.5  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:2); 3.75  $\mu\text{L}$  de metanol + 1.25  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:4); 4.5  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.5  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:10); 4.75  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.25  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:100); 4.87  $\mu\text{L}$  de metanol + 0.125  $\mu\text{L}$  de **20** en 10  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA (1:1000). Para la preparación del Control se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de  $\lambda$  DNA en 5  $\mu\text{L}$  de metanol. Se dejaron incubar 5 minutos las diluciones 1:1, 1:2 y 1:4 y 1 hora las diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:100 y 1:1000 a 25 °C

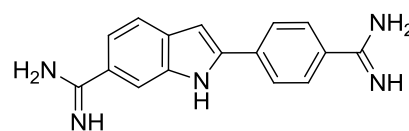
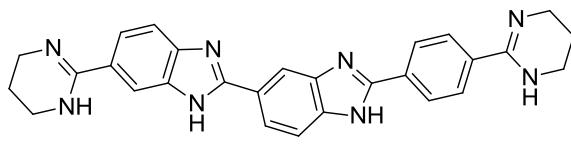
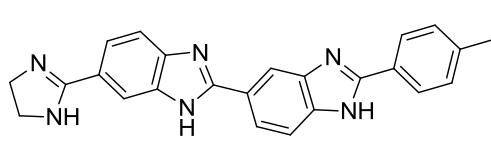
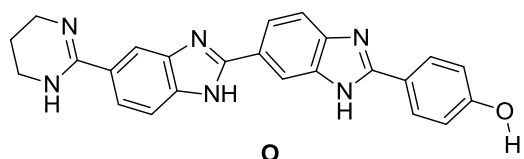
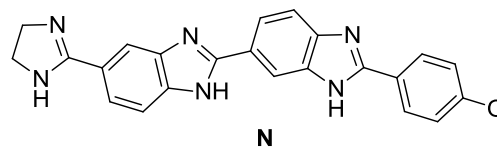
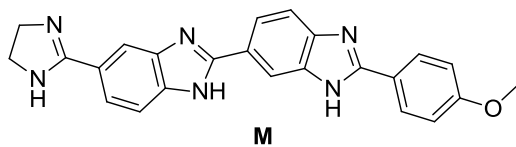
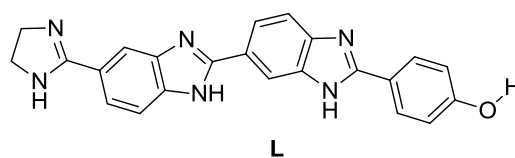
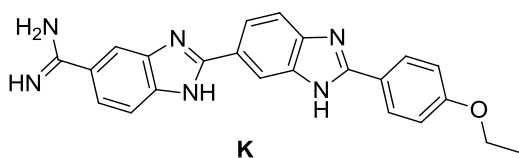
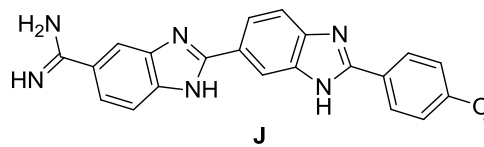
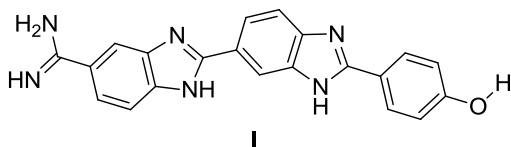
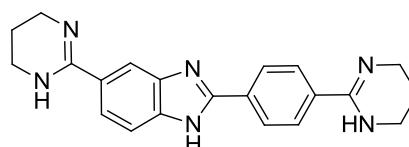
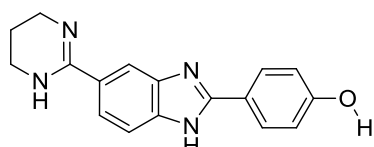
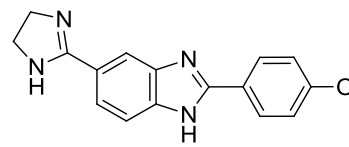
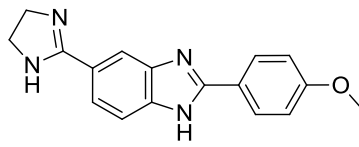
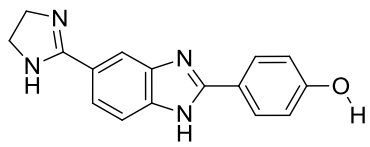
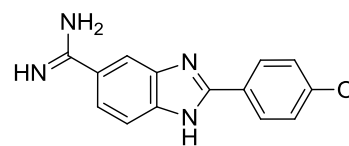
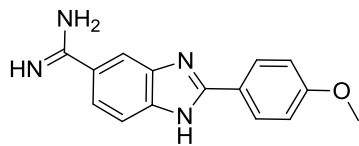
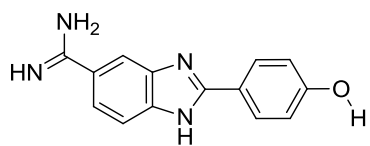
en agitación (500 rpm). Se preparo un gel de agarosa al 1.8%. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa agregando 5  $\mu$ L de buffer orange y se utilizó un marcador de peso molecular 100 pb. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 100 v por 90 minutos; el gel de agarosa se reveló utilizando bromuro de etidio durante 10 minutos, posteriormente para visualizarlo se utilizó el transiluminador de la marca THERMO®.

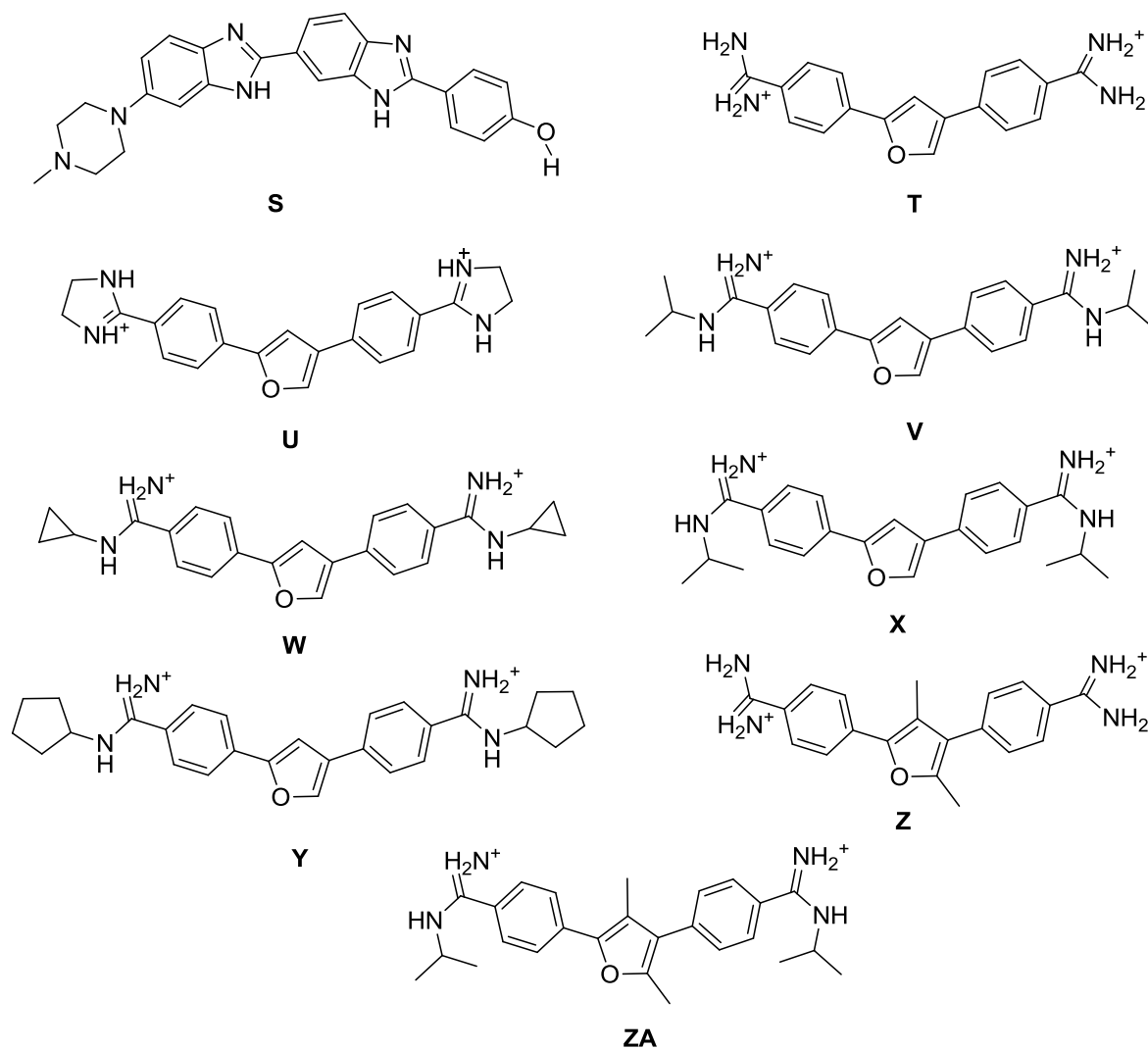
## **VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1 QSAR:**

La  $T_m$  es la temperatura a la cual el 50 % de un polímero se desnaturaliza. En el caso del DNA es la temperatura a la cual se separa el 50 % de ambas hebras. Esta propiedad física es un indicativo de la estabilidad del DNA surgida por el reconocimiento de los puentes de hidrógeno entre pares G-C y A-T, por lo que la  $T_m$  puede sufrir variaciones por efecto de composición de bases, efecto de disolventes, concentración de iones y moléculas que interactúan con la doble hélice estabilizándola (ó también desestabilizándola). Es entonces razonable que resulte posible extraer información de la relación entre la estructura de una serie de compuestos análogos que interactúan con el DNA y la  $T_m$  que presenta una determinada secuencia de DNA frente a dichos compuestos.

Así, el primer paso para el diseño de las estructuras propuestas en este estudio inició con un análisis QSAR de una serie de exploración (**Figura 14**) conformada por 27 compuestos (**A-ZA**) reconocedores de surco del DNA tomadas de una base de datos de 53 compuestos, descrita por De Oliveira, *et al.*, 2003. El criterio de selección fue considerar los que contaran con datos experimentales de su actividad ( $\Delta T_m$ ).





**Figura 14.** Serie de exploración.

Se obtuvieron 1664 descriptores moleculares, agrupados en 20 familias (**Tabla 3**), para cada compuesto de las estructuras optimizadas geoméricamente y se buscó correlacionarlos con la  $T_m$ , lo cual resultaría complicado si se llevara a cabo de forma manual por lo que el estudio se realizó mediante inteligencia artificial utilizando algoritmos genéticos. La variable independiente se tomo como  $-\log(1/Y)$  en donde "Y" es igual a  $\log(\Delta T_m)$ , y se consideraron los 50 mejores modelos se encuentren estables (**Tabla 4**). Todos los modelos fueron estadísticamente validados por  $Q^2$ ,  $R^2$ ,  $Q^2_{boot}$ , F, s y  $K_x$ .

FAMILIAS	
1. Constitutional descriptors.	2. Topological descriptors.
3. Walk and path counts.	4. Connectivity indices.
5. Information indices	6. 2D autocorrelations.
7. Edge adjacency indices.	8. Burden eigenvalues.
9. Topological charge indices.	10. Eigenvalue-based indices.
11. Randic molecular profiles	12. Geometrical descriptors.
13. RDF descriptors.	14. 3D-MoRSE descriptors.
15. WHIM descriptors.	16. GETAWAY descriptors.
17. Functional group counts.	18. Atom-centred fragments.
19. Charge descriptors.	20. Molecular properties.

**Tabla 3.** Familias de Descriptores.

MODELOS	DESCRIPTORES	R <sup>2</sup>	F	S
1	SP01 MATS7v MATS8e GATS1p	96.23	127.45	0.024
2	DP06 MATS8e GATS1p GATS5p	95.91	117.23	0.025
3	SP01 MATS8e GATS7v GATS1p	95.71	111.48	0.026
4	DP07 MATS8e GATS1p GATS5p	95.73	112.19	0.025
5	Mor30u Mor02v Mor07v C-034	95.69	110.95	0.026
6	IVDM MATS7v MATS8e GATS1p	95.65	110	0.026
7	Mor30u Mor02v Mor07p GATS1p	95.34	102.3	0.027
8	IVDM MATS8e GATS7v GATS1p	95.7	111.33	0.026
9	Ss MATS8e GATS1p ESpm15u	95.45	104.79	0.026
10	Mor30u Mor02v Mor07v Mor03e	95.5	106.23	0.026
11	Mor30u Mor02v Mor13e Mor07p	95.42	104.24	0.026
12	ATS1m MATS8e GATS7v GATS1p	95.53	106.78	0.026
13	Ss MATS8e GATS1p ESpm14u	95.34	102.23	0.027
14	IDDM MATS8e GATS1p GATS5p	95.28	100.9	0.027
15	DP06 MATS7v MATS8e GATS1p	95.35	102.56	0.027
16	Ss MATS8e GATS1p ESpm13u	95.22	99.64	0.027
17	IDDM MATS7v MATS8e GATS1p	95.54	107.14	0.026
18	ATS1v ATS2e MATS8e GATS5p	95.12	97.47	0.027
19	piPC06 piPC08 MATS8e GATS5p	94.44	84.99	0.029
20	ATS1m MATS7v MATS8e GATS1p	95.15	98.08	0.027
21	MATS8e GATS7v GATS1p ESpm01r	95.32	101.85	0.027
22	MATS7v MATS8e GATS1p ESpm01r	95.12	97.47	0.027
23	Mor30u Mor02v Mor07v ESpm14u	94.79	90.92	0.028

24	Mor30u Mor02v Mor07v ESpm15u	94.77	90.55	0.028
25	Mor30u Mor02v Mor07v ESpm13u	94.79	90.93	0.028
26	HDcpx MATS8e GATS1p GATS5p	95.22	99.59	0.027
27	Mor30u Mor02v Mor07v Mor13e	95.13	97.64	0.027
28	DP07 MATS7v MATS8e GATS1p	95	94.93	0.028
29	IDDM MATS8e GATS7v GATS1p	95.4	103.67	0.026
30	C-033 Ss ATS2e MATS8e	94.93	93.65	0.028
31	H-048 Ss ATS2e MATS8e	94.93	93.65	0.028
32	MWC02 MATS8e GATS7v GATS1p	95.09	96.93	0.027
33	Mor30u Mor02v Mor03e Mor07p	94.99	94.8	0.028
34	SP09 MATS7v MATS8e GATS1p	94.63	88.18	0.029
35	Ui piPC08 MATS8e GATS5p	94.72	89.69	0.028
36	ATS1v MATS8e GATS1p GATS5p	94.53	86.46	0.029
37	IAC MATS8e GATS1p GATS5p	94.86	92.26	0.028
38	TIC0 MATS8e GATS1p GATS5p	94.86	92.26	0.028
39	SP09 MATS8e GATS1p GATS5p	94.77	90.56	0.028
40	Mor30u Mor02v Mor07p PW2	94.78	90.77	0.028
41	SP10 MATS8e GATS1p GATS5p	94.67	88.74	0.028
42	SP01 MATS8e GATS1p GATS5p	94.36	83.72	0.029
43	SP10 MATS7v MATS8e GATS1p	94.32	82.97	0.029
44	IVDM MATS8e GATS1p GATS5p	94.23	81.61	0.03
45	Mor30u Mor02v Mor07v GATS1p	94.13	80.22	0.03
46	Mor30u Mor02v Mor07p ATS2e	94.2	81.24	0.03
47	Mor30u Mor02v Mor07v C-033	93.97	77.98	0.03
48	SP01 Mor30u Mor02v Mor07p	94.24	81.87	0.03
49	Mor30u Mor02v Mor07v PW2	93.98	78.1	0.03
50	DP07 MATS8e GATS7v GATS1p	94.22	81.44	0.03

**Tabla 4.** Valores de los mejores descriptores.

Con la finalidad de evitar ambigüedad entre descriptores, se calculó la correlación de Pearson, como ejemplo tomaremos el modelo **8** (**Tabla 5**); sin embargo, este cálculo se llevo a cabo para los 50 modelos; entre las combinaciones de 4 descriptores, se descartaron todos los modelos que pasaban de 0.5 de correlación.

	IVDM	MATS8e	GATS7v	GATS1p
IVDM	1	0.05068377	-0.4042929	0.30419574
MATS8e	0.05068377	1	0.07302916	0.06821435
GATS7v	-0.4042929	0.30419574	1	-0.35653673
GATS1p	0.30419574	0.06821435	-0.35653673	1

**Tabla 5.** Correlación de Pearson entre los descriptores del modelo **8**.

Las ecuaciones QSAR obtenidas se calcularon mediante estimación lineal y siguiendo la ecuación base se obtienen los valores que conforman los modelos completos de acuerdo a la ecuación general.

$$Y = m \cdot x + b \text{ ó bien } Y = m_1x_1 + m_2x_2 + \dots + b.$$

Tomando en cuenta las restricciones estadísticas (correlación de Pearson no fuera mayor a 0.5, así como un  $K_X$  mayor a 50 así como  $Q^2$ ,  $Q^2_{boot}$  y  $R^2$  mayor a 90) que permitan validar los modelos como producto de una correlación matemática entre descriptores y actividad, descartando correlaciones por casualidad, se eligieron como los mejores modelos a: 2, 3, 4, 8, 12, 14, 26, 39, 41 (Tabla 6).

MEJORES MODELOS		
Modelo	Q <sup>2</sup> BOOT	R <sup>2</sup>
2	92.51	0.9678
3	92.91	0.9573
4	92.33	0.9673
8	92.61	0.9598
12	92.16	0.9602
14	91.53	0.9644
26	91.23	0.9648
39	90.53	0.9626
41	90.56	0.9623

**Tabla 6.** Modelos seleccionados de acuerdo a las restricciones estadísticas establecidas.

Como validación interna se valoró la capacidad predictiva de los mejores modelos (Tabla 7), comparando la actividad experimental con la actividad calculada por cada modelo, con la finalidad de observar la capacidad predictiva.

MODELO 2							
Compuesto	DP06	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	10.801	-0.138	1.002	1.019	-0.01355207	0.96927704	1.233
T	9.996	-0.027	0.723	0.933	-0.06245008	0.86606387	0.959
MODELO 3							
Compuesto	SP01	MATS8e	GATS7v	GATS1p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	4.899	-0.138	0.949	1.002	-0.00649787	0.98514949	1.233
T	4.504	-0.027	1.185	0.723	-0.10297424	0.78890692	0.959
MODELO 4							
Compuesto	DP07	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	11.492	-0.138	1.002	1.019	-0.01271241	0.97115285	1.233
T	10.584	-0.027	0.723	0.933	-0.06295544	0.86505667	0.959
MODELO 8							
Compuesto	IVDM	MATS8e	GATS7v	GATS1p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	4.728	-0.138	0.949	1.002	-0.00062079	0.99857161	1.233
T	4.443	-0.027	1.185	0.723	-0.07590969	0.83963457	0.959
MODELO 14							
Compuesto	IDDM	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	4.723	-0.138	1.002	1.019	-0.01837071	0.95858205	1.233
T	4.49	-0.027	0.723	0.933	-0.03398637	0.9247272	0.959
MODELO 26							
Compuesto	HDcpx	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	1.695	-0.138	1.002	1.019	-0.01818453	0.95899307	1.233
T	1.651	-0.027	0.723	0.933	-0.02994466	0.93337323	0.959
MODELO 41							
Compuesto	SP10	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	13.162	-0.138	1.002	1.019	-0.01299239	0.97052698	1.233
T	11.595	-0.027	0.723	0.933	-0.05357639	0.88394167	0.959
MODELO 44							
Compuesto	IVDM	MATS8e	GATS1p	GATS5p	Log 1/C cal.	Act cal	Act Cal Arti
H	4.728	-0.138	1.002	1.019	-0.02209238	0.95040262	1.233
T	4.443	-0.027	0.723	0.933	-0.02912423	0.93513814	0.959

\*Act cal: Actividad calculada en este estudio; \*Act Cal Arti: Actividad reportada.

**Tabla 7.** Validación de los mejores modelos.

Para la validación se decidió sacar de la serie de exploración un par de compuestos **H** y **T**, elegidas al azar, y se utilizaron los dos mejores modelos **8** y **26** (**Tabla 8**) para predecir su actividad que, una vez calculada se comparó con la experimental, siendo el modelo **26** (Ecuación 1) el que contó con mayor capacidad predictiva pues solo hubo una diferencia de 0.026 entre el valor experimental con el calculado.

**MODELO 26:**

$$\text{Log}(\Delta T_m) = (-2.03) \text{HDcpx}(\pm 0.19) + (0.34) \text{MAT58e}(\pm 0.11) + \text{GATS1p}(0.40) (\pm 0.06) + \text{GATS5p}(0.32) (\pm 0.06) + (2.75) (\pm 0.19).$$

Modelo	Modelos	Actividad Calculada	Actividad observada
8	H	0.998	1.233
	T	0.839	0.959
26	H	0.959	1.233
	T	0.933	0.959

**Tabla 8.** Comparación de los dos mejores modelos para predecir la actividad.

La interpretación de los descriptores moleculares involucrados en los modelos encontrados no es tan simple, sin embargo se analizarán brevemente.

El modelo **26** está compuesto por cuatro descriptores:

- HDcpx
- MATS8e
- GATS1p
- GATS5p

Estos descriptores pertenecen a la familia:

- Índices de información (5)
- Autocorrelación en 2D (6)

## ÍNDICES DE INFORMACIÓN

Son descriptores moleculares se definen como el contenido total y la información que poseen las moléculas. Así como, la equivalencia de los átomos en una molécula como la identidad química, formas de unión a través del espacio, la topología molecular y la simetría.

### HDcpx (distancia gráfico de índice de complejidad)

Se deriva de la matriz de distancia, donde las distancias topológicas entre pares de átomos se recogen como sigue:

$$HDcpx = \sum_{i=1}^{nSK} \frac{\sigma_i}{2W} \cdot \left( - \sum_{j=1}^{nSK} \frac{d_{ij}}{\sigma_j} \cdot \log_2 \frac{d_{ij}}{\sigma_j} \right)$$

Donde  $\sigma_i$  es el i-ésimo grado distancia de vértice (es decir, la suma de las distancias topológicas del átomo),  $W$  es el índice Wiener,  $d_{ij}$  es la distancia topológica entre los átomos  $i$  y  $j$  y el número de  $nSK$  molécula de átomos distintos de hidrógeno.

### AUTOCORRELACIONES 2D

Son descriptores moleculares que describen cómo una propiedad considerada se distribuye a lo largo de una estructura molecular topológica.

#### MATSkw autocorrelación Moran:

- $W$  la propiedad atómica para ponderar el gráfico molecular
- $k$  se calcula aplicando el coeficiente de Moran a la gráfica molecular.

$$MATSkw = \frac{\frac{1}{D} \cdot \sum_{i=1}^{nSK} \sum_{j=1}^{nSK} \delta_{ij} \cdot (w_i - \bar{w}) \cdot (w_j - \bar{w})}{\frac{1}{nSK} \cdot \sum_{i=1}^{nSK} (w_i - \bar{w})^2}$$

Donde  $w_i$  es cualquier propiedad atómica,  $w$  es su valor promedio en la molécula,  $nSK$  es el número de átomos distintos de hidrógeno,  $\delta_{ij}$  es la delta de Kronecker ( $\delta_{ij} = 1$  si  $d_{ij} = k$ , cero en caso contrario,  $d_{ij}$  es la distancia topológica entre dos considerados átomos).  $D$  es la suma de los deltas de Kronecker, es decir, el número de pares de átomos a una distancia igual a  $k$ .

### El GATSkw autocorrelación de Geary:

- W la propiedad atómica para ponderar el gráfico molecular
- k se calcula aplicando el coeficiente de Geary a la gráfica molecular.

$$\text{GATSkw} = \frac{\frac{1}{2\Delta} \cdot \sum_{i=1}^{nSK} \sum_{j=1}^{nSK} \delta_{ij} \cdot (w_i - w_j)^2}{\frac{1}{(nSK - 1)} \cdot \sum_{i=1}^{nSK} (w_i - \bar{w})^2}$$

Donde  $w_i$  es cualquier propiedad atómica, es su valor promedio en la molécula,  $nSK$  es el número de átomos distintos de hidrógeno,  $d_{ij}$  es la delta de Kronecker ( $d_{ij} = 1$  si  $d_{ij} = k$ , cero en caso contrario,  $d_{ij}$  es la distancia topológica entre dos considerados átomos).  $D$  es la suma de los deltas de Kronecker, es decir, el número de pares de átomos a una distancia igual a  $k$ .

- Valores positivos de entre 0 y 1.
- Valores negativos menores que 1.

Dado que este estudio tiene como finalidad obtener modelos que permitan diseñar estructuras novedosas, una vez obtenido el modelo QSAR, se procedió a modelar y optimizar una serie de alquendiamidas y cuatro alcanodiamidas candidatas a interactuar con el DNA y así conocer su actividad predictiva y proceder a su síntesis. A los 16 compuestos propuestos que se ilustran en la **Figura 17**, se les obtuvieron los descriptores involucrados en el modelo matemático 26.

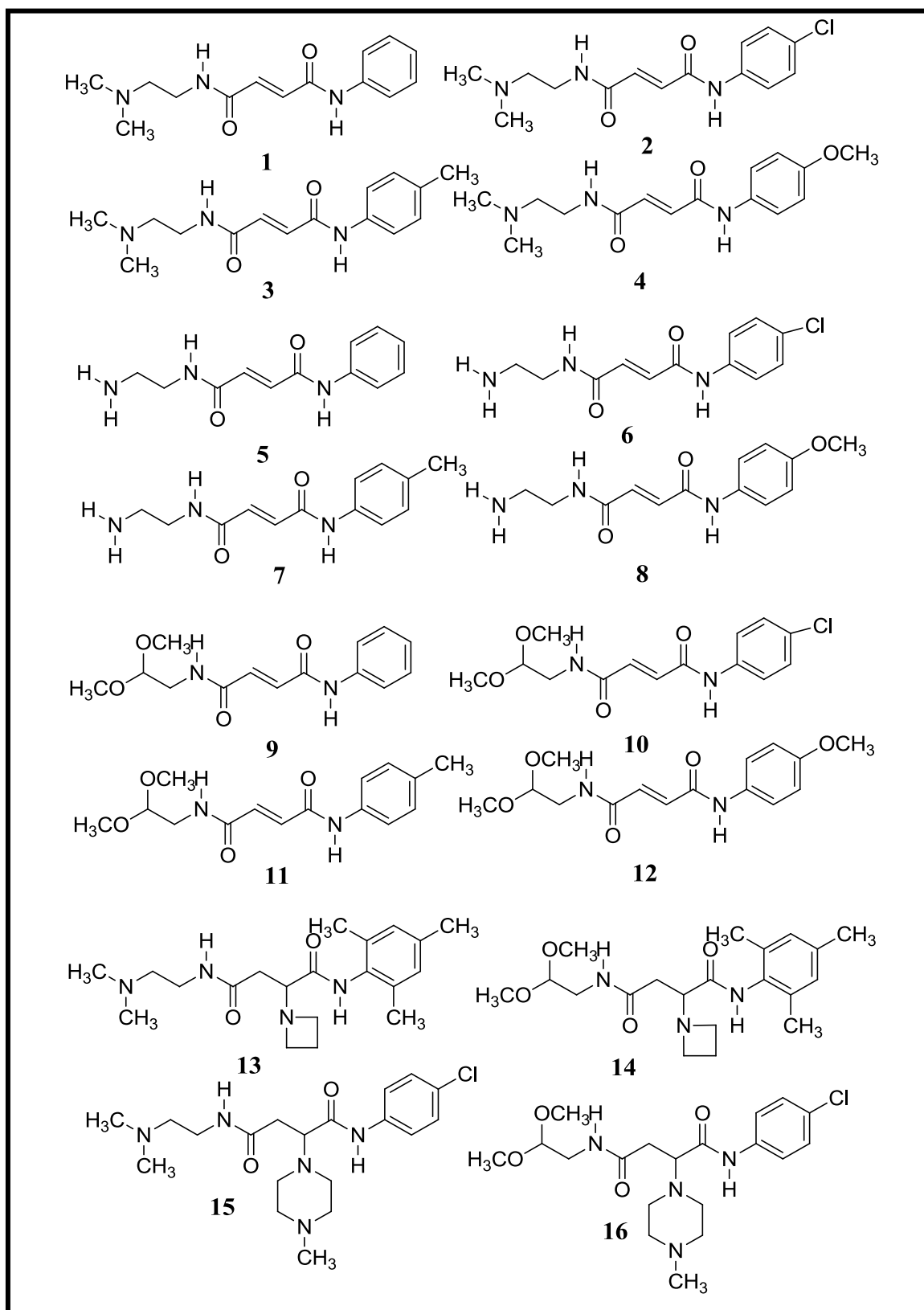


Figura 17. Serie 1 de compuestos para el estudio.

La predicción de la actividad ( $\Delta T_m$ ) de los 16 compuestos de la serie **1** se muestra en la **Tabla 9**.

**MODELO 26:**

$$\text{Log } \Delta T_m = (-2.03) \text{HDcpx} (\pm 0.19) + (0.34) \text{MAT58e} (\pm 0.11) + \text{GATS1p} (0.40) (\pm 0.06) + \text{GATS5p} (0.32) (\pm 0.06) + (2.75) (\pm 0.19).$$

COMPUESTO Serie 1	HDcpx	MAT58e	GATS1p	GATS5p	log 1/ $\Delta T_m$	$\Delta T_m$ cal
1	1.595	0.002	1.267	0.714	0.24280957	1.74907958
2	1.649	-0.047	0.952	1.012	0.08484453	1.2157507
3	1.611	0.373	1.326	0.843	0.4049099	2.5404456
4	1.625	0.289	1.169	0.795	0.26840155	1.85524619
5	1.638	0.268	1.411	0.915	0.37073366	2.34819229
6	1.683	0.327	1.158	0.921	0.19967522	1.5837084
7	1.61	-0.053	1.116	0.68	0.12130341	1.32221906
8	1.61	-0.115	1.282	0.723	0.18040038	1.51495727
9	1.672	0.001	1.115	0.844	0.06627782	1.16487096
10	1.562	-0.063	1.059	0.938	0.27572848	1.88681135
11	1.579	-0.142	0.907	0.886	0.13557887	1.36640321
12	1.579	-0.197	1.094	0.915	0.20106604	1.58878832
13	1.694	0.063	1.365	1.106	0.2281848	1.69116039
14	1.705	0.232	1.419	1.167	0.30611228	2.02354228
15	1.707	0.033	1.315	0.716	0.04547898	1.11039879
16	1.717	0.174	1.353	0.774	0.10826823	1.28312283

**Tabla 9.** Actividades predichas utilizando el modelo **26**.

De acuerdo a los resultados anteriores, se decidió iniciar la síntesis con los compuestos **3**, **5** y **14** ya que se espera mayor  $\Delta T_m$  y por lo tanto mejor reconocimiento al DNA.

## 8.2 ESTUDIO “DOCKING” O ANCLAJE MOLECULAR

El estudio Docking o anclaje molecular es un procedimiento de cálculo que tiene como fin predecir la unión no covalente de una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando). El objetivo es predecir las conformaciones de la envolvente y la afinidad de unión.

Un estudio Docking asume gran parte o todo el receptor rígido, las longitudes covalentes y los ángulos constantes, así como tiene en cuenta un conjunto seleccionado de enlaces covalentes rotables. La dinámica molecular trata directamente con energías de acoplamiento, ésta última se interesa en los potenciales químicos, que determinan la preferencia de conformación unida y la energía libre de vinculante.

En esta sección se muestran los resultados de energía de formación del complejo (afinidad) y el modo de unión de los compuestos (**1-16**) de la serie **1** propuesta, estimado mediante el método de Docking. Para este estudio se simuló la unión de dichos compuestos con el sitio activo (DNA), generándose un complejo Compuesto-DNA de mínima energía de unión.

Se llevó a cabo un análisis de varias estructuras cristalinas de DNA unidas a reconocedores de surco, obtenidas del Protein Data Bank (PDB). Se tomaron en cuenta varias propiedades para poder seleccionar la mejor estructura tridimensional de DNA para este estudio, ver la **Tabla 10**.

El cristal seleccionado tiene las siguientes características: la resolución es de 1.27 Å, la secuencia (C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G)<sub>2</sub> y el reconocedor de surco menor (6-(1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl)-2-[4'-(1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-2-yl) biphenyl-4-yl]-1H-indole), cuyo código **PDB: 3U05**. Dicho cristal consta de dos cadenas A y B, posee 12 fragmentos, la secuencia fue construida sintéticamente y los nucleótidos están secuenciales, dichos parámetros hacen adecuado el cristal para el estudio.

El archivo PDBQT del receptor (DNA) fue preparado utilizando el programa AUTODOCK TOOLS® para el estudio se eliminaron las moléculas de agua y el reconocedor de surco de referencia, se agregaron los hidrógenos polares, así como también se adicionaron las cargas Kollman.

CODIGO PDB	RESOLUCIÓN	LIGANDOS ADICIONALES	SECUENCIA
453D	1.8 Å	Benzimidazol	C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G
1D43	2.0 Å	Piperazinil-bi-benzimidazol Mg <sup>+2</sup>	C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G
443P	1.6 Å	Piperazinil-bi-benzimidazol Mg <sup>+2</sup>	C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G
1Z8V	1.7 Å	Netropsin	G-G-C-C-A-A-T-T-G-G
3U05	1.27 Å	Tetrahidropirimidin-2-bifenil- 4-1H-indol Mg <sup>+2</sup>	C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G
3U08	1.25 Å	Benzimidazol carboxamida Mg <sup>+2</sup>	C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G
366D	1.3 Å	DACA	C-G-BRU-A-C-G

**Tabla 10.** Características de las diferentes estructuras cristalográficas.

En la **Tabla 11**, se muestra la energía libre de unión del complejo de los 16 compuestos de la serie **1**. Aunque las energías son bajas (-6.6 a -8.6 kcal/mol), el resultado sugiere una unión reversible y puede ser indicativo de una baja toxicidad por parte del compuesto.

Compuesto Serie 1	Energía (Kcal/mol)
1	-7.1
2	-7.3
3	-7.1
4	-7.4
5	-6.6
6	-7.3
7	-7.0
8	-7.2
9	-7.4
10	-7.4
11	-7.0
12	-7.2
13	-7.1
14	-7.1
15	-8.0
16	-8.6

**Tabla 11.** Energía de formación del Complejo de los Compuestos **1-16**.

En la **Figura 18**, se aprecia la interacción de los compuestos (**1-16**) con el surco menor el DNA. Se aprecia además (**Figura 19**) que el oxígeno del carbonilo de todos los compuestos forma puente de hidrogeno con el grupo amino de la guanina, el amino forma puente de hidrógeno con el oxígeno de la citosina, así como también el oxígeno de la pentosa; el nitrógeno protonado forma puente de hidrógeno con el oxígeno de la citosina y con el oxígeno de la pentosa, así como también forma un puente de hidrógeno interno entre el grupo dimetilamino protonado y el oxígeno del carbonilo. En el caso de los compuestos que presentan grupos metoxilos estos interaccionan formando puentes de hidrógeno con el grupo amino de la guanina. Los resultados se resumen en la **Tabla 12**.

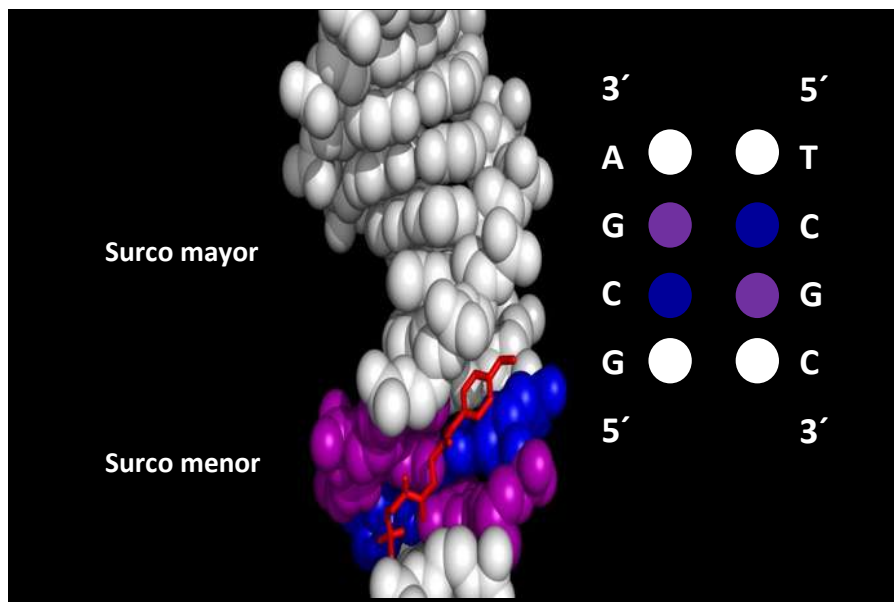


Figura 18. Reconocedor de surco sobre el DNA.

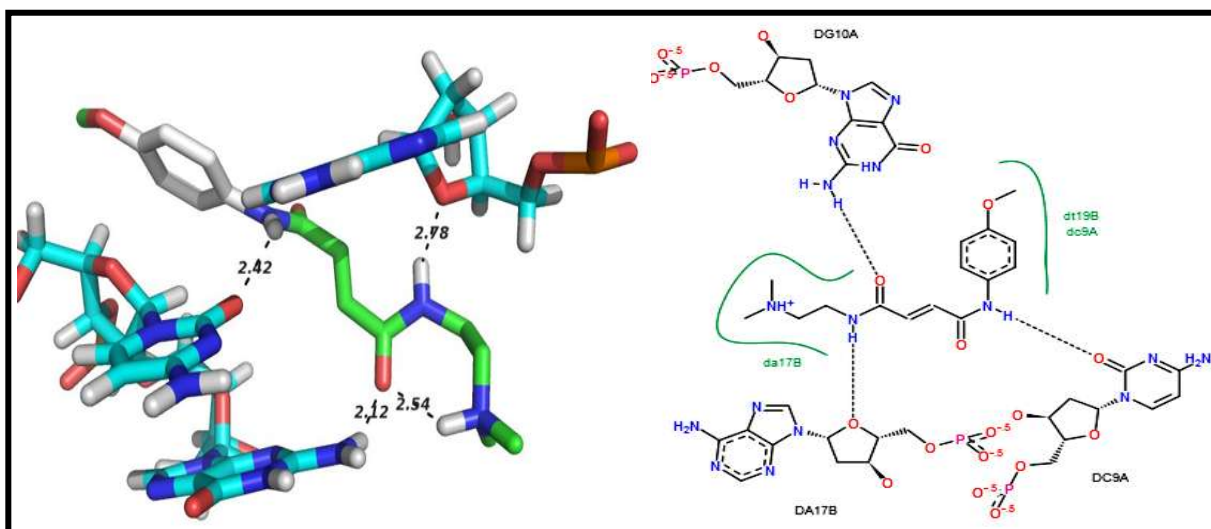


Figura 19. Interacciones que presenta el compuesto 4 con el DNA.

	CaO5--- Gua10- N2	CaO5--- Gua16- N2	CaN1--- Gua16- N3	CaN1--- Cit7- O2	CaN1- -Cit15- O2	CaN1- -Cit19- O2	CaN1- - CaO5 Intra	CaN4- - Cit9- O2	CaN4--- Cit21- O2	CaN4--- Cit22- O2	CaN8--- Cit8- O2	CaN9- - Cit9- O2	CaN1-- Pent16- O1	CaN4--- Pent8- O1	CaN4- - Pent11 O1	CaN4-- Pent17 O1
1	2.4 Å	2.4 Å					2.6 Å	2.6 Å								
2	2.4 Å	2.4 Å						2.6 Å							2.6 Å	
3									2.4 Å	2.5 Å						
4	2.1 Å						2.5 Å					2.4 Å				2.8 Å
5							2.4 Å					2.3 Å				2.1 Å
6			2.7 Å		2.2 Å							2.4 Å	2.0 Å			2.7 Å
7	2.1 Å	2.4 Å					2.3 Å					2.2 Å				
8				2.7 Å		2.3 Å						2.4 Å		2.3 Å		
9		2.8 Å									1.9 Å					

	CaN8--- Cit9- O2	CaO4--- Gua10- N2	CaO4--- Gua16- N2	CaN3--- Pent11- O1	CaN3--- Cit11- O2	CaN1--- Gua14- N2	CaO5--- Gua22- N2	CaO9--- Gua4- N2	CaO5--- Gua16- N2	CaO9--- Gua10- N2	CaO9--- Gua16- N2	CaO8--- Gua22- N2	CaO8--- Cit10- N4	CaO4--- CaN8 Intra	CaN3--- Pent11- O1	CaN8--- Pen18- O1
10															2.6 Å	2.7 Å
11	2.3 Å	2.3 Å	2.4 Å	2.8 Å												
12					2.0 Å	2.6 Å										
13							2.2 Å	2.5 Å								
14												1.9 Å		2.1 Å		
15									2.7 Å	2.4 Å	2.6 Å					
16													2.0 Å	2.1 Å		

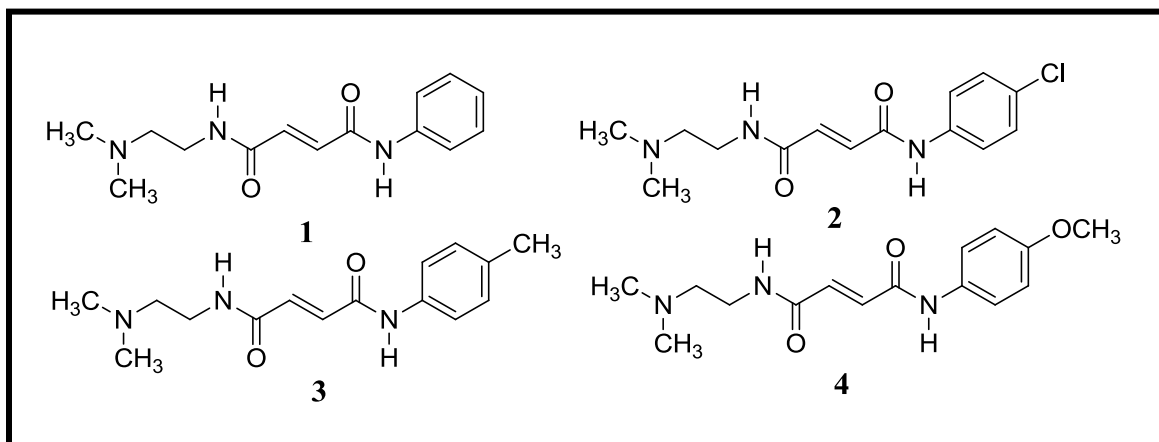
**Tabla 12.** Distancias de Puentes de hidrógeno, donador de H---aceptor (Å) de los Compuestos (1-16).

	QSAR		DOCKING
Compuesto Serie 1	Act Cal.	Compuesto	Afinidad (kcal/mol)
3	2.54	16	-8.6
5	2.34	15	-8
14	2.02	4	-7.4
10	1.88	9	-7.4
4	1.85	10	-7.4
1	1.74	2	-7.3
13	1.69	6	-7.3
12	1.588	8	-7.2
6	1.583	12	-7.2
8	1.51	3	-7.1
11	1.36	13	-7.1
7	1.32	14	-7.1
16	1.28	1	-7.1
2	1.21	7	-7
9	1.16	11	-7
15	1.11	5	-6.6

**Tabla 13.** Comparación de resultados de QSAR y Docking.

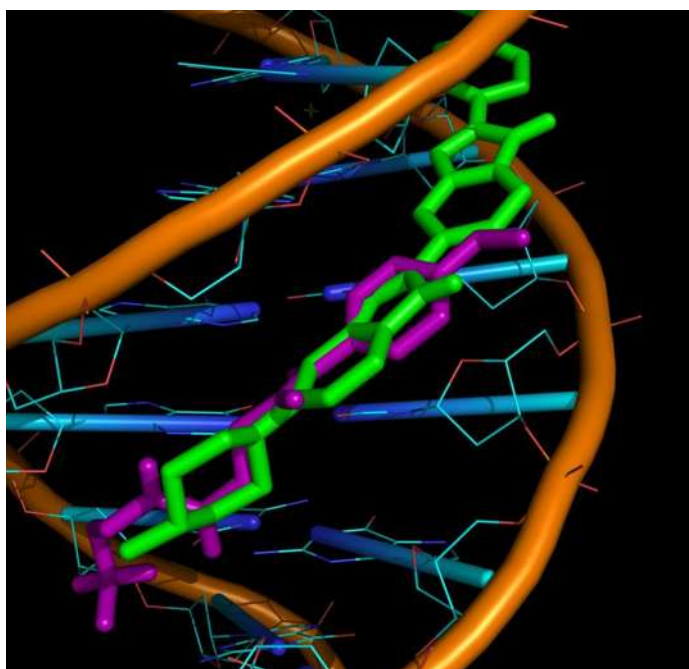
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de QSAR y de Docking, se puede comprender mejor el posible comportamiento en su sitio de acción. Ambos estudios representan métodos diferentes para explicar la actividad de un determinado compuesto pero suelen ser complementarios. Así, se realizó una comparación de los resultados de ambos estudios para seleccionar los compuestos con más posibilidades de éxito como reconocedores de surco del DNA (**Tabla 13**). Los compuestos **1-4 (Figura 20)**, presentan una buena afinidad y alta  $\Delta T_m$ . Resulta interesante encontrar en las estructuras más

relevantes la *N,N*-dimetiletildiamina pues estando presente en intercaladores del DNA incrementa la afinidad por el mismo (Adams *et al.*, 2002).



**Figura 20.** Compuestos propuestos para sintetizarlos.

En este tipo de estudios teóricos es importante comparar los resultados con compuestos a los cuales se le conozca su actividad experimental. De esta forma se decidió llevar a cabo la comparación con el 2′-(3-metil-4-dimetilaminofenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5′-bi-benzimidazol, que es un consabido reconocedor de surco ampliamente estudiado, y cuya estructura se tomó del **PDB: 1QV4**. Su interacción con el DNA (**PDB: 3U05**) mostró que tanto este compuesto de referencia como el compuesto **4** de la serie **1** reconocen el mismo sitio en el DNA (**Figura 21**).



**Figura 21.** Comparación de reconocimiento del mismo sitio entre **4** (morado) y 2′-(3-metil-4-dimetilaminofenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5′-bi-benzimidazol (verde).

Al encontrar que las diamidas podrían ser buenos candidatos a compuestos reconocedores de DNA, resultó interesante estudiar también una serie de maleimidas que continúan teniendo grupos carbonilos capaces de reconocer al DNA. De hecho, hay reportes de relación estructura-actividad predicen que las N-arilmaleimidas son inhibidoras de la Bfl-1 enzima anti-apoptótica los que los hace buenos candidatos para ser tratadas algunos tipos de leucemia (Cashman *et al.*, 2010).

Se realizó el estudio de anclaje molecular a la serie **2** (compuestos **17-31**) (**Figura 17**). Como receptor se utilizó la misma estructura cristalografía que en el caso del estudio del apartado anterior. Los valores de afinidad de los compuestos (**17-31**) se resumen en la Tabla 14. Se observa además que la interacción con el DNA es con el surco menor (**Figura 22**).

Al analizar las interacciones (**Tabla 15**) del complejo de los compuestos **17-31**, se observan principalmente los puentes de hidrógenos intermoleculares, la mayoría de estos entre el oxígeno de la maleimida y el hidrógeno del grupo amino de la guanina. En lo que respecta a los compuestos que poseen una amina se observa que el compuesto **30** forma puente de hidrógeno entre el NH con el oxígeno de la pentosa y el oxígeno de la maleimida forma puente de hidrógeno con uno de los hidrógenos de grupo amino de la guanina. Por su parte, el compuesto **31** forma puente de hidrógeno el grupo amino protonado con el oxígeno de la citosina, además de formar otro tipo de interacciones tales como de Van der Waals, electrostáticas, entre otros (**Figura 23**).

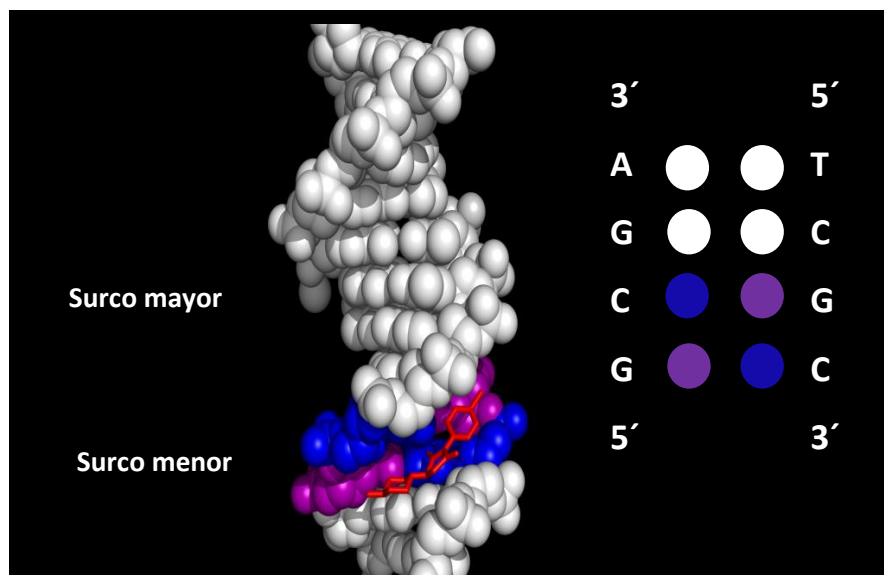


Figura 22. Reconocedor de surco sobre el DNA.

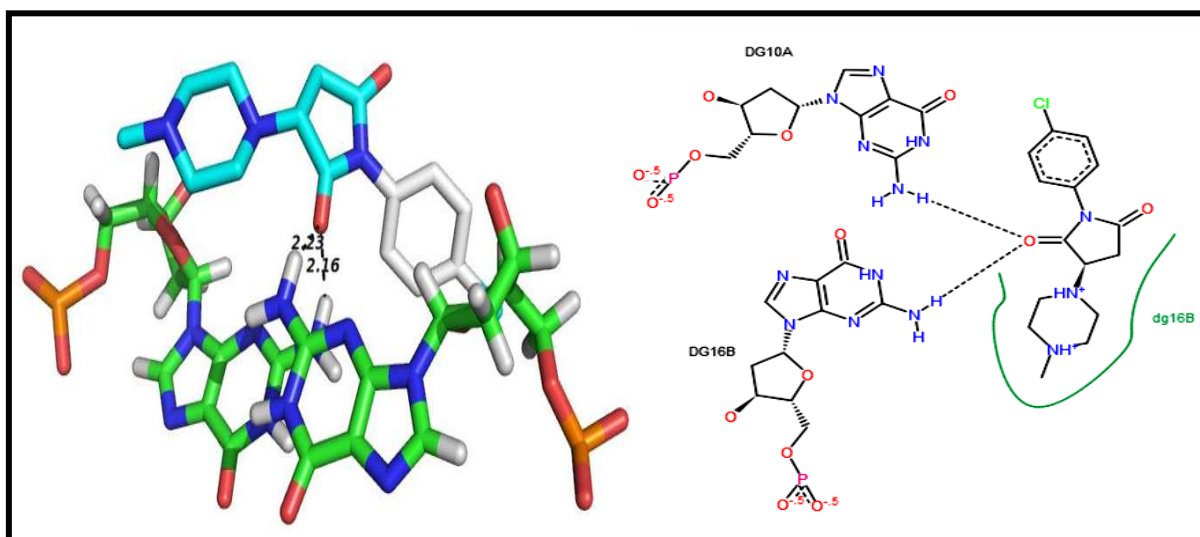


Figura 23. Interacciones que presenta el compuesto 18 sobre el DNA.

Compuestos Serie 2	Energía $\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)
17	-6.3
18	-8.7
19	-7.4
20	-7.4
21	-6.8
22	-7.6
23	-8.4
24	-7.2
25	-6.9
26	-8.2
27	-7.1
28	-6.7
29	-8.7
30	-7.6
31	-7.4

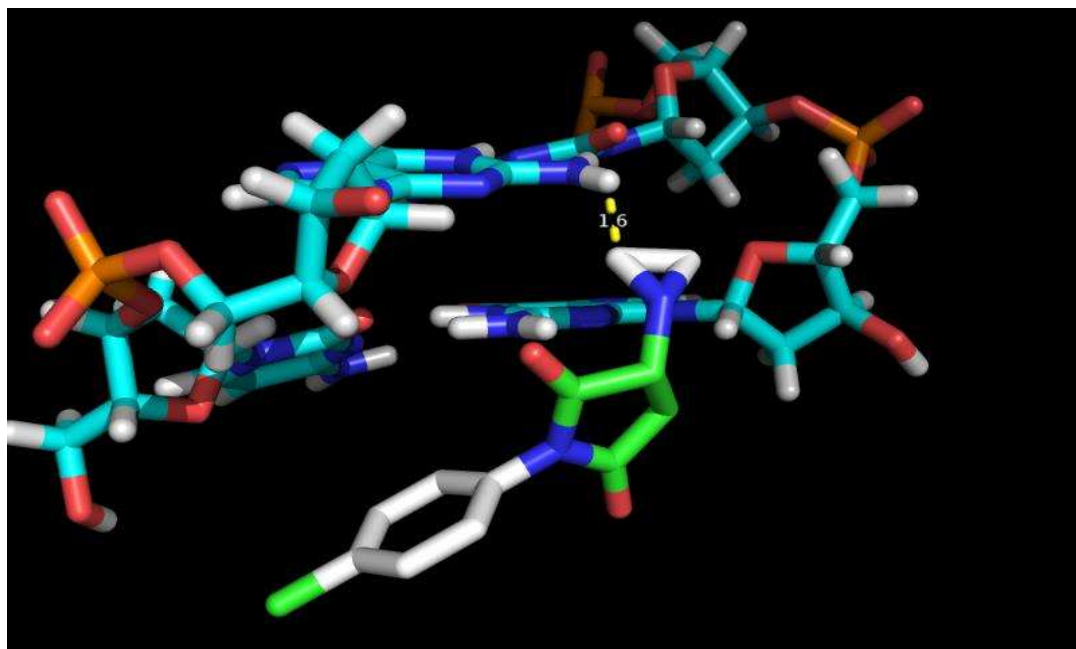
**Tabla 14.** Valores de afinidad de 17-31 de la serie 2.

	CmO1--- Gua2-N2	CmO1--- Gua4-N2	CmO1--- Gua10-N2	CmO1--- Gua16-N2	CmN8--- Cit9-O2	CmN6--- Pent11-O1
17		2.2 Å	2.2 Å			
18			2.2 Å	2.2 Å		
19			2.4 Å			
20			2.0 Å			
21				2.7 Å		
22			2.3 Å	2.2 Å		
23				2.6 Å		
24			2.3 Å	2.5 Å		
25			2.2 Å			
26				2.4 Å		
27			2.1 Å			
28				2.6 Å		
29	2.2 Å	2.6 Å				
30			2.0 Å		1.9 Å	
31			1.9 Å			2.4 Å

**Tabla 15.** Distancias de Puentes de hidrógeno, donador de H---aceptor (Å) de 17-31.

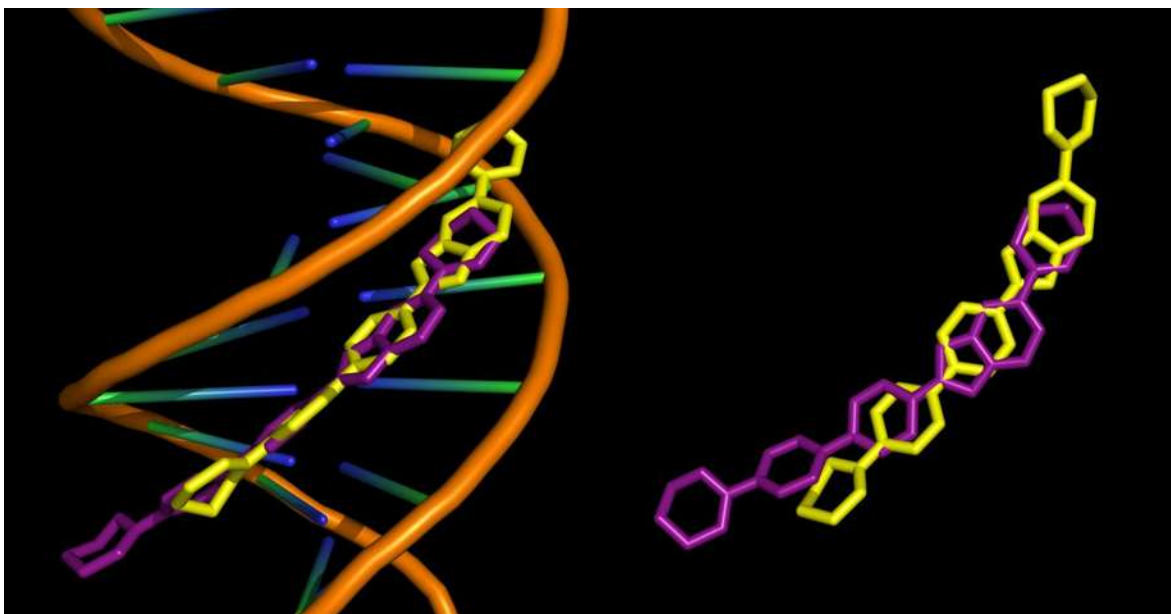
La decisión de incorporar aziridinas en las estructuras de la maleimida tiene como motivo principal el funcionalizar con grupos que conlleven a reacciones de alquilación del DNA como una consecuencia del reconocimiento supramolecular. Es sabido que las aziridinas tienen una gran tendencia a sufrir reacciones de apertura de anillo con nucleófilos presentes en el DNA, es por ello que se les considera tóxicas y mutagénicas (Helsby *et al.*, 2003).

En el estudio de anclaje molecular, del compuesto **20** sobre la misma secuencia de DNA usada en el apartado anterior, se observa que el anillo de aziridina se ubica cerca del grupo amino de la guanina, siendo esta la base nitrogenada más reactiva del DNA. La distancia entre uno de los carbonos de la aziridina y el grupo amino de la guanina es de 1.6 Å, con una geometría óptima para realizar un ataque nucleofílico indicando que este compuesto es buen candidato para alquilar el DNA tanto por la geometría que toma frente al DNA como por la reactividad de la aziridina (**Figura 24**).



**Figura 24.** Interacción del anillo de aziridina del compuesto **20** con el grupo amino de la guanina.

El proceso de anclaje molecular o “Docking” se validó con la estructura cristalográfica del reconocedor del surco menor tetrahidropirimidin-2-bifenil-4-1-indol, (código en PDB es **3U05**) y la estructura obtenida siguiendo la metodología empleada para este proyecto. Al visualizar ambas estructuras se aprecia la interacción en el mismo sitio, solo con algunas variantes (**Figura 25**). Analizando la raíz cuadrada de la distancia media (RSMD) entre la estructura del cristal y la estructura calculada, es del 0.421 (se compararon 33 de 33 átomos), esto es indicativo de la confiabilidad de los resultados encontrados.



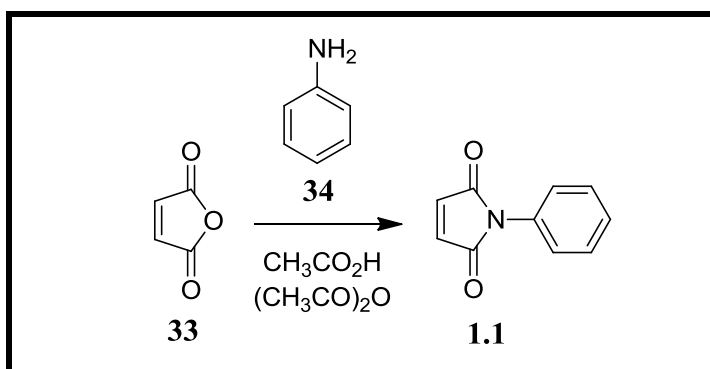
**Figura 25.** Comparación entre tetrahidropirimidin-2-bifenil-4-1-indol obtenido por el Docking (morado) y tetrahidropirimidin-2-bifenil-4-1-indol obtenido por PDB (amarillo).

## 8.3 SÍNTESIS:

### 8.3.1 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS ANÁLOGOS A ALQUENDIAMIDAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios QSAR y de anclaje molecular de la Serie **1** (compuestos **1-16**), se comenzó con la síntesis con las alquendiamidas que prometen tener una mejor actividad ( $\Delta T_m$ ) compuestos (**1-4**). Se llevó a cabo la síntesis de maleimididas, las cuales corresponden a diferentes análogos de la N-fenilmaleimida.

**8.3.1.1 Síntesis de las maleimididas.** Se sintetizaron 4 análogos de la N-fenilmaleimida con diferentes sustituyentes en el anillo aromático, de acuerdo a la metodología descrita por Chacón-García, 1993 (**Figura 26**).



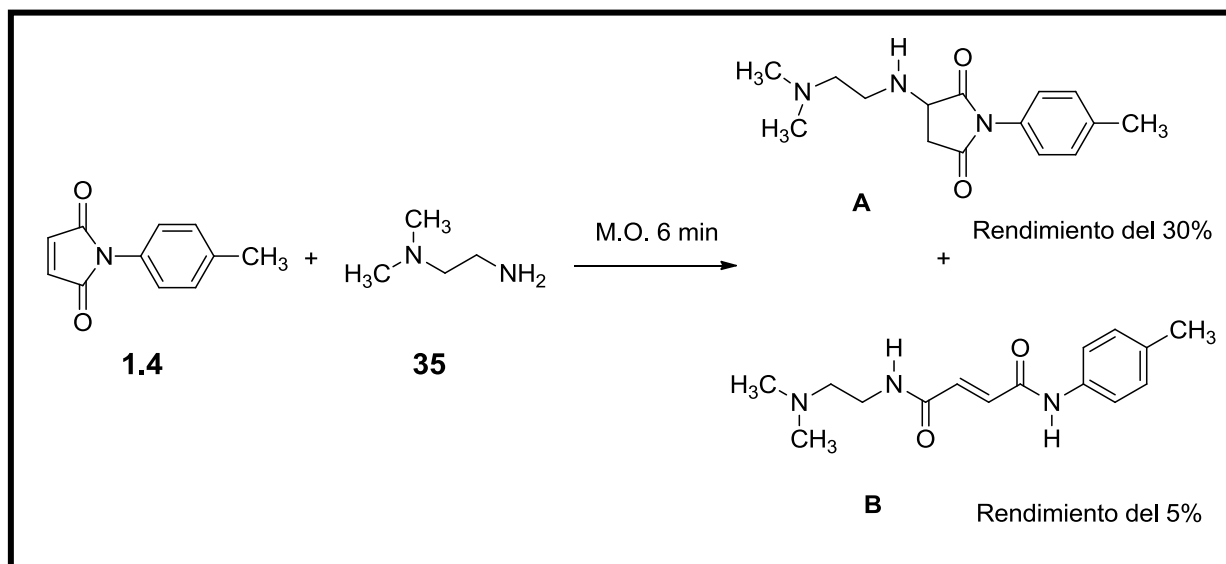
**Figura 26.** Síntesis de N-fenilmaleimida (**1.1**).

Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de las maleimididas sintetizadas indican que los productos obtenidos y analizados corresponden en estructura a las maleimididas propuestas. En la **Tabla 16** se presentan los desplazamientos de integración de las señales obtenidas de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H utilizando como disolvente CDCl<sub>3</sub>.

Nombre	Espectroscopia RMN de <sup>1</sup> H
<b>N-fenilmaleimida (1.1)</b>	RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 6.84 (s, 2H, H <sub>1</sub> ), 7.34 (aromáticos, 2H, H <sub>2</sub> ), 7.37 (aromáticos, 2H, H <sub>3</sub> ), 7.47 (aromáticos, 1H, H <sub>4</sub> ).
<b>p-clorofenilmaleimida (1.2)</b>	RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 6.87 (s, 2H, H <sub>1</sub> ), 7.31 (aromáticos, 2H, H <sub>2</sub> ), 7.44 (aromáticos, 2H, H <sub>3</sub> ).
<b>p-metoxifenilmaleimida (1.3)</b>	RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 3.83 (s, 3H, H <sub>1</sub> ), 6.83 (s, 2H, H <sub>2</sub> ), 6.98 (aromáticos, 2H, H <sub>3</sub> ), 7.23 (aromáticos, 2H, H <sub>4</sub> ).
<b>p-metilfenilmaleimida (1.4)</b>	RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 2.38 (s, 3H, H <sub>1</sub> ), 6.84 (s, 2H, H <sub>2</sub> ), 7.21 (aromáticos, 2H, H <sub>3</sub> ), 7.28 (aromáticos, 2H, H <sub>4</sub> ).

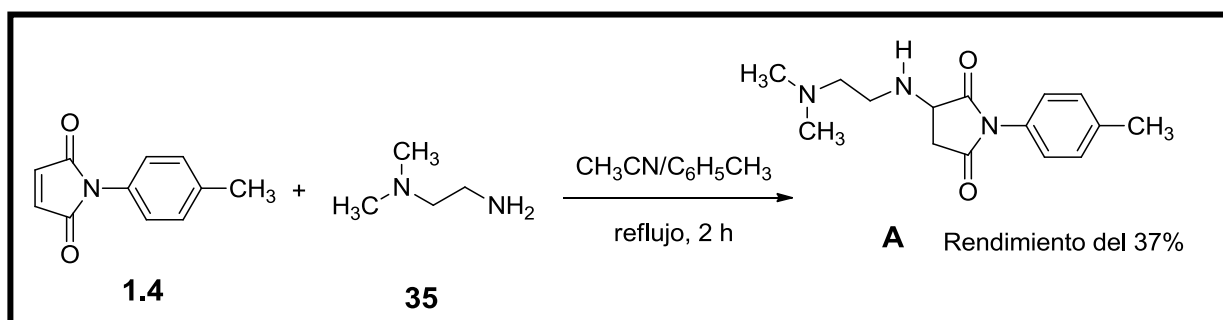
**Tabla 16.** Espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H de las Maleimidias **1.1-1.4**.

**8.3.1.2 Síntesis de los compuestos A y B.** Se inició con la reacción de la maleimida **1.4** ya que, de acuerdo con nuestros estudios computacionales, es la que promete tener una buena actividad ( $\Delta T_m$ ); la primera reacción que se llevó a cabo fue utilizando el método de microondas en donde solo colocábamos la maleimida y la amina en este caso la N-N-dimetiletildiamina sin disolvente por 6 minutos, el crudo de reacción se analizó por medio de RMN donde se observó la formación de varios productos, debido a la alta polaridad del producto la purificación resultó muy complicada, se realizaron varios métodos de purificación quedando la cromatografía en columna como mejor opción, utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil se probaron varios disolventes, encontrando que en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en proporción 2:3 era el más adecuado. Se lograron aislar 2 compuestos (**A** y **B**) con bajos rendimientos, ya que se recuperaba principalmente la materia prima y algunos otros subproductos (**Figura 27**).



**Figura 27.** Síntesis de los compuestos **A** y **B**.

**8.3.1.3 Síntesis del compuesto A.** Se decidió cambiar de método debido a que el anterior conducía a la formación del producto (**A**) de la adición 1,4 de forma mayoritaria. Por lo tanto, se decidió probar la reacción en reflujo, esperando con ello reducir la formación de subproductos, por lo tanto, se colocó **1.1** en tolueno y acetonitrilo, posteriormente se adicionó la amina (N-N-dimetiletildiamina). Por ésta metodología se observó la formación varios subproductos, para su purificación se utilizó la misma metodología de la prueba anterior, aislando principalmente solo un producto, el cual es el compuesto **A** (**Figura 28**) con un rendimiento del 37%.

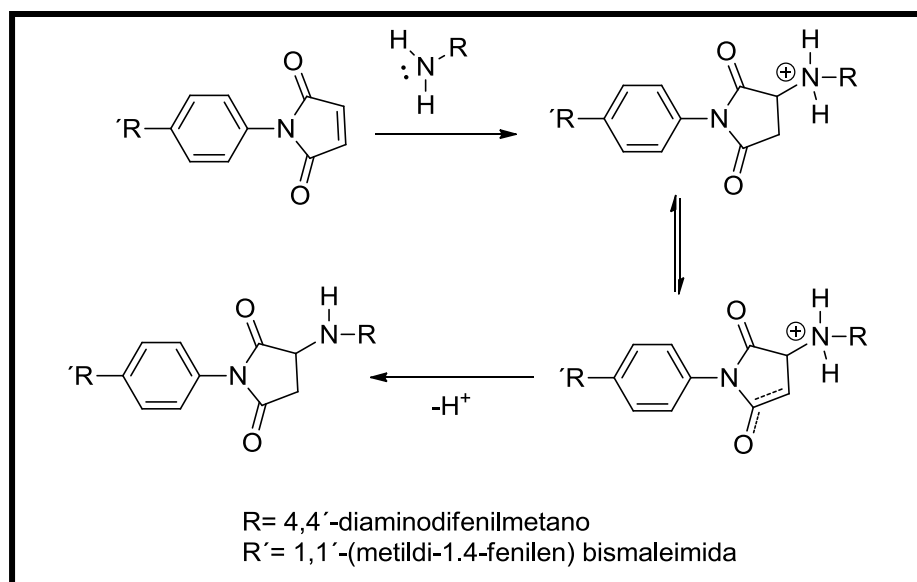


**Figura 28.** Síntesis del compuesto **A**.

Analizando el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **A**, se observa a 9.76 ppm una señal ancha que integra para un protón, este protón pertenece al NH unido a la cadena, este comportamiento lo atribuimos a que forma un puente de hidrógeno con el grupo dimetilamino y el oxígeno del carbonilo, este tipo de comportamiento se ha observado ya en otros trabajos de investigación realizados en nuestro grupo de trabajo, a 7.48-7.12 ppm se encuentran dos señales dobles que integran para 4H las cuales corresponden a los protones aromáticos; en 3.57- 2.36 ppm se encuentran un sistema ABX con varias señales doble de dobles de dobles pertenecientes a los dos metilenos, no han sido asignadas estas señales los dos metilenos de la cadena se ven afectados por este efecto, ya que adopta una conformación rígida y todos los protones tienen diferentes ambientes electrónicos. A 2.31 ppm se encuentra una señal simple que integra para 3 hidrógenos que pertenecen al metilo unido al anillo aromático; en 2.24 ppm se encuentra una señal simple que integra para 6 hidrógenos que pertenecen a los dos metilos del grupo dimetilamino (Ver Anexos).

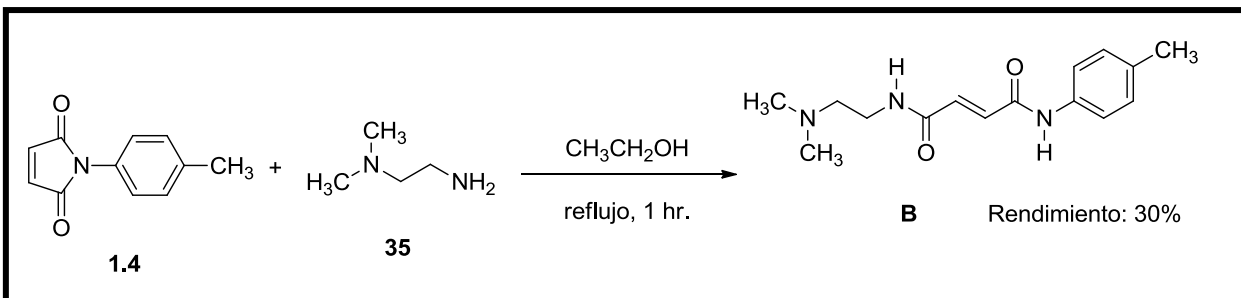
Hopewell, en 2000 reportó reacciones donde la maleimida sufre un ataque nucleofílico por parte de una amina primaria, el ataque ocurre en el doble enlace. Esta es una típica reacción de Michael. Crivello en 1973 realizó un estudio de la adición nucleofílica, la reacción se llevo a cabo utilizando N-fenilmaleimida y anilina en diferentes polaridades, encontraron que dicha reacción es de 2° grado y que la velocidad mejora al aumentar la polaridad del disolvente. Esto sugiere la presencia de un estado cargado mediante el cual se estabiliza la reacción (**Figura 29**). White *et al.*, 1984 llegó a un resultado similar donde la adición nucleofílica ocurre al doble enlace.

Debido a estos antecedentes se justifica los resultados de la reacción empleada, la cual es una adición 1,4.



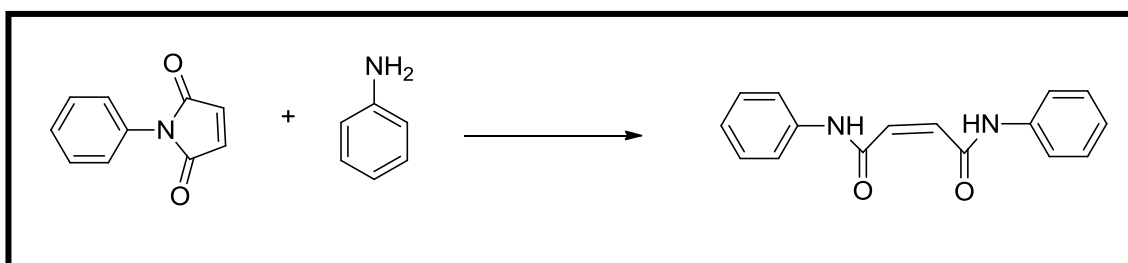
**Figura 29.** Mecanismo propuesto para la reacción de la maleimida con una amina aromática.

**8.3.1.4 Síntesis del compuesto B.** Debido a que no se obtuvo el compuesto **B** se optó por cambiar a disolvente prótico, realizando la reacción en etanol y metanol, dando mejores resultados con etanol, por lo tanto llevamos a cabo la reacción donde **1.3** en etanol grado reactivo, se adicionó la N-N-dimetiletildiamina, en reflujo. Se observó la formación mayoritaria del compuesto deseado **B** (**Figura 30**); para su purificación se empleo la misma metodología; la purificación resultó muy complicada debido a que el compuesto se descomponía en la columna, por lo tanto se obtenía muy poca cantidad de compuesto; al observar el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observaban aun algunas impurezas, por lo tanto nuevamente se realizaron modificaciones para la purificación donde se probaron diferentes disolventes, se cambio el tamaño de la columna; hasta la obtención el compuesto **B** puro en mayor cantidad, esto se logró utilizando como columna cromatográfica, utilizando una mezcla de tres disolventes, diclorometano-metanol-hidróxido de amonio en una proporción 2:3:0.1, a goteo lento, se logró aislar el compuesto **B**, se observó la formación de unos cristales en forma de aguja de color amarillo claro, con un rendimiento total de 30%.



**Figura 30.** Síntesis del compuesto **B**.

Hopewell *et al.*, en el 2000 reportaron una reacción secundaria de las maleimidias con aminas primarias, a la cual le llamaron reacción de “amidisation”, el resultado de dicha reacción es la apertura del anillo de maleimida y la formación de un grupo amida (**Figura 31**). Este producto se considera secundario ya que se produce en bajas cantidades.

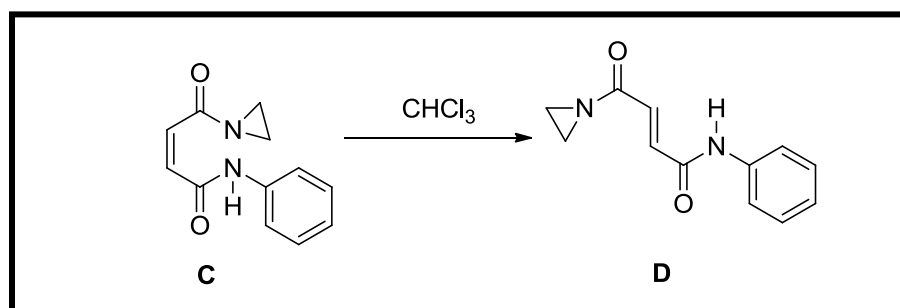


**Figura 31.** Reacción de apertura del anillo de maleimida en presencia de una amina.

Se obtuvo su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$ , donde se observan las señales características del compuesto deseado, a 7.71 ppm se encuentra una señal ancha que integra para 1 H, este pertenece al NH unido al anillo aromático; en 7.49-7.15 ppm se encuentran 2 señales dobles que integran para 4 H pertenecientes a los protones aromáticos; en 7.08-6.99 ppm se encuentran 2 señales dobles que integran para 2 H con  $J$  de acoplamiento en trans = 14.8 Hz pertenecientes a los protones vinílicos; en 3.44 ppm se encuentra una señal doble que integra para 2H estos protones pertenecen al metileno unido al grupo dimetilamino, a 2.47 ppm se encuentra una señal triple que integra para 2 H estos protones pertenecen al metileno de la cadena; en 2.33 ppm se encuentra una

señal simple que integra para 3 H perteneciente al metilo unido al anillo aromático; en 2.25 ppm se encuentra una señal simple que integra para 6 H pertenecientes a los dos metilos del grupo dimetilamino.

Se observó que después de recuperar la muestra del análisis de espectroscopía de resonancia se observaba un precipitado blanco, se realizó una cromatografía en capa fina y se observó descomposición y la aparición de materia prima; se lavó el precipitado con acetato de etilo, se dejó secar y los cristales que se formaron se analizaron por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$ , se observó que era el producto **B** puro en su forma *trans*, al analizar ambos espectros se observó que ocurrió una isomerización de *cis* a *trans* en la dilución de cloroformo. Nathan *et al.*, en 1973 reportó este fenómeno donde ocurre la isomerización del compuesto **C** después de haber pasado varias horas en  $\text{CHCl}_3$ , se aisló la mezcla de los productos **C**, **D** (Figura 32).



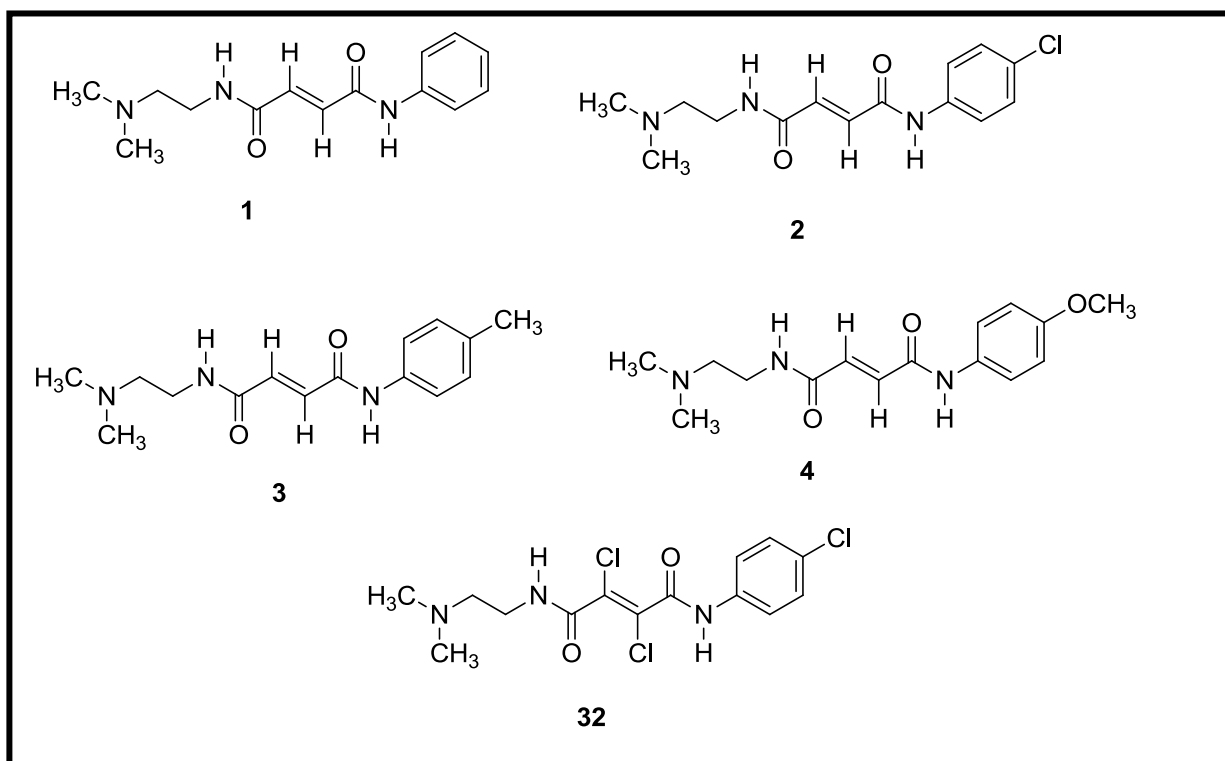
**Figura 32.** Isomerización del Compuesto **C** a **D**, propuesto por Nathan *et al.*, 1973.

Nuestros resultados corroboran las Teorías propuestas por Person en 1973 y Méndez *et al.*, en 1992, ya que las maleimidias tienen 2 sitios reactivos que pueden llevar a productos de adición 1,2 o 1,4. La reactividad de cada uno de los centros electrofílicos estará en función de diferentes factores como los sustituyentes del fenilo unido al nitrógeno, los sustituyentes del doble enlace, el disolvente y la temperatura.

Méndez y colaboradores (1992), describieron la reactividad local de los átomos de la maleimida, señalando que el carbono 2 es un centro duro y el carbono 4 un centro blando; de acuerdo a los conceptos de la teoría de los ácidos y bases duros y blandos, un

ácido duro reacciona con una base dura y un ácido blando con una base blanda (Person, 1963); en nuestro estudio se hizo reaccionar la maleimida con la amina (N,N-dimetiletildiamina), las aminas de acuerdo a la teoría de los ácidos-bases duros y blandas tienden a ser intermediarios, es por ello que al agregar un solvente suave como el tolueno y el acetonitrilo hace a la amina más blanda y por lo que se favorece una adición 1, 4. Por lo tanto, al realizar el cambio a un disolvente duro como el etanol, se le proporcionaba dureza a la amina favoreciendo la adición 1, 2.

Una vez que se establecieron las condiciones para llevar a cabo la reacción, así como su purificación, se logró la síntesis de 5 alquendiamidas (**1- 4, 32**) (**Figura 33**).



**Figura 33.** Serie de compuestos **1-4, 32**.

Para la identificación de los compuestos **1-4, 32** se analizó su espectroscopía de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C ver **Tabla 17** se muestran los rendimientos de obtención de dichos compuestos.

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE RMN <sup>1</sup> H Y RMN <sup>13</sup> C
<p><b>N1-(2-(dimetilamino)etil)-N4-fenilfumaramida (1).</b> C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (261.32 g/mol) cristales color amarillo claro, rendimiento: 30%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.66 – 7.63 (m, 2H), 7.34 (ddd, <i>J</i> = 8.5, 5.8, 1.9 Hz, 2H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 7.08 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 7.00 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 3.45 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.54 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.32 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 166.67, 164.52, 134.58, 134.44, 129.91, 125.76, 121.28, 58.91, 45.38, 38.20.</p>
<p><b>N1-(4-clorofenil)-N4-(2-(dimetilamino)etil)fumaramida (2).</b> C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (295.76 g/mol) cristales color amarillo claro, rendimiento: 25%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.68 – 7.63 (m, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 2H), 7.05 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 3.43 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.53 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 166.67, 164.56, 138.54, 134.87, 134.13, 129.90, 122.57, 58.91, 45.41, 38.26.</p>
<p><b>N1-(2-(dimetilamino)etil)-N4-(p-tolil)fumaramida (3).</b> C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (275.35 g/mol) cristales color amarillo claro, rendimiento: 30%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.53 – 7.49 (m, 2H), 7.14 (dd, <i>J</i> = 8.8, 0.6 Hz, 2H), 7.06 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 6.97 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 3.44 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.54 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.30 (s, 9H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 166.72, 164.50, 136.99, 135.72, 134.33, 130.37, 121.35, 58.80, 45.36, 38.22, 20.95.</p>
<p><b>N1-(2-(dimetilamino)etil)-N4-(4-metoxifenil)fumaramida (4).</b> C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (291.35 g/mol) cristales color amarillo claro, rendimiento: 36%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.58 – 7.52 (m, 2H), 7.05 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 6.96 (d, <i>J</i> = 15.1 Hz, 1H), 6.91 – 6.88 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.44 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.52 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.29 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 158.36, 134.45, 134.23, 132.59, 122.90, 115.04, 58.88, 55.88, 45.42, 38.38.</p>
<p><b>2.3-dicloro-N1-(4-clorofenil)-N4-(2-(dimetilamino)eti)fumaramida(32).</b> C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (364.65 g/mol) líquido color amarillo, rendimiento: 35%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.14 – 7.07 (m, 2H), 3.72 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.64 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H), 2.35 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.30, 166.07, 136.96, 134.29, 131.48, 128.91, 128.91, 124.76, 56.64, 44.87, 35.76, 29.68.</p>

**Tabla 17.** Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de los compuestos **1-4, 32**.

### 8.3.2 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS ANÁLOGOS A MALEIMIDAS Y SUCCINIMIDAS.

Se logró la síntesis de 15 compuestos análogos a maleimidias y succinimidias compuestos (17-31) (Figura 35) fueron sintetizados de acuerdo a la metodología reportada por Chacón-García (1993).

**8.3.2.1 Síntesis de 3-(1-azetidil)-1-(2,4,6-trimetilfenil) 2, 5 pirrolidindiona (17).** El compuesto **17** fue obtenido en una solución etérea conteniendo la mesidin maleimida en agitación con azetidina diluida en éter (Figura 34). El residuo se purificó por una columna de cromatografía empacada con gel de sílice y eluída con  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (1:1) y recristalizó en  $\text{CCl}_4$  caliente y Hex obteniendo un sólido blanco con un rendimiento del 50%.

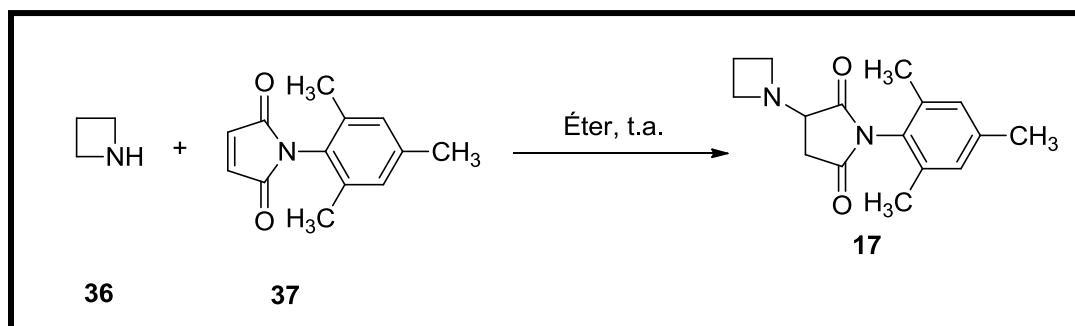


Figura 34. Síntesis de 17.

**8.3.2.2 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-(4-metilpiperazinil)pirrolidin-2,5-diona (18).** El compuesto **18** fue obtenido en una solución etérea conteniendo **39** puesta en agitación en un baño de hielo, con **38** dando lugar a un sólido blanco que precipitó instantáneamente y se lavó con hexano. Se recristalizó con etanol originando un sólido blanco con un rendimiento del 80% (Figura 36).

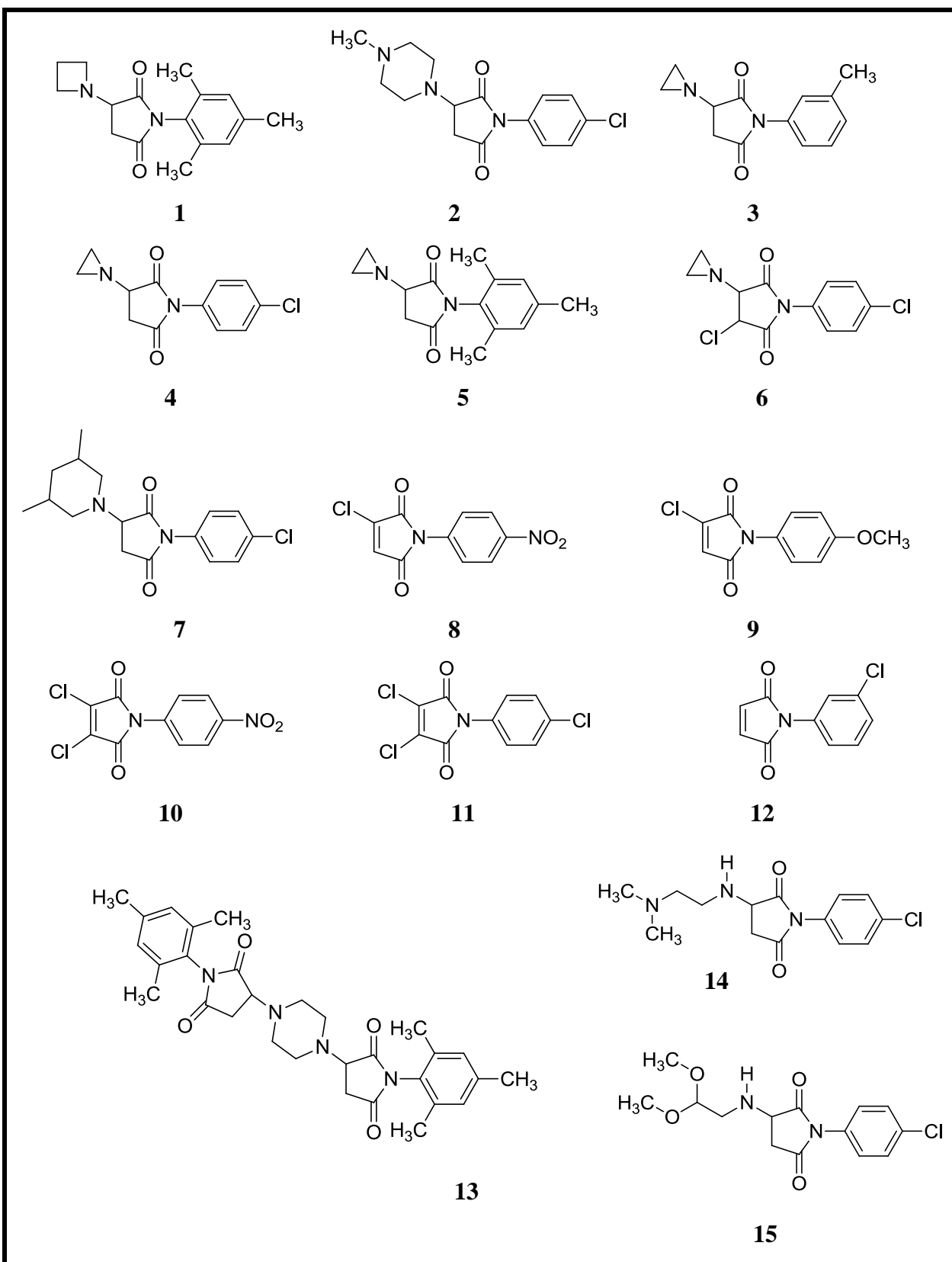


Figura 35. Serie 2 de compuestos 11-31.

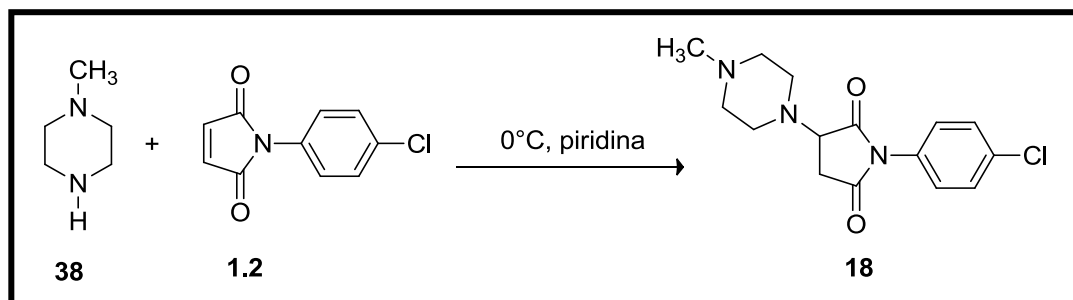
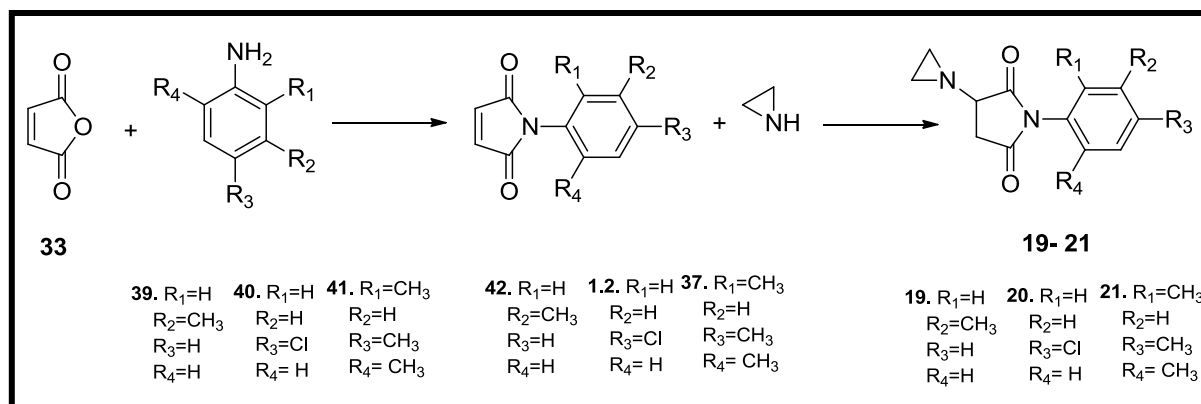


Figura 36. Síntesis de 18.

### 8.3.2.3 Síntesis de 3-(aziridinil)-1-(*m*-tolil)pirrolidin-2,5-diona (19), 3-(aziridinil)-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona (20), 3-(aziridinil)-1-mesitilpirrolidin-2,5-diona (21).

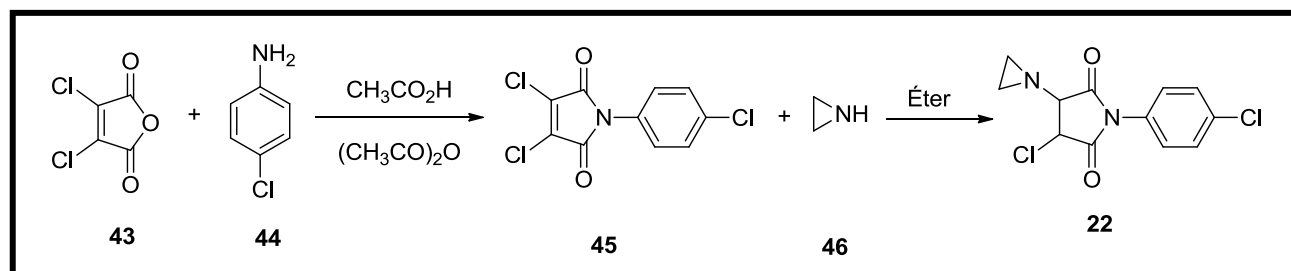
Los compuestos **19-21** fueron obtenidos en 2 etapas. En la primera etapa se lleva a cabo la formación de la maleimida para los compuestos (**19-21**) con una solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente con  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , se adicionó lentamente otra solución de caliente  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  conteniendo **1.2** o **42**. El sólido ligeramente amarillo se recristalizó con etanol. El ácido *p*-clorofenilmaleámico o *m*-metilfenilmaleámico obtenido fue suspendido en anhídrido acético, se colocó en reflujo por 2 horas; se agregó agua fría precipitando la maleimida en forma de cristales amarillos. El compuesto **21** se obtuvo al reaccionar  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  en tolueno con **37**. Posteriormente se purificó el crudo de reacción por columna cromatográfica utilizando como fase móvil  $\text{CHCl}_3$ , una vez que se obtiene el producto puro se observan cristales amarillos. La segunda etapa de la reacción para los compuestos (**19-21**) es la adición 1,4 con la aziridina, esta se obtiene en una solución etérea conteniendo la maleimida correspondiente con aziridina hasta la desaparición del color amarillo, los rendimientos de dichos compuestos varían dependiendo de los sustituyentes entre un 50 - 40% (Figura 37).



**Figura 37.** Síntesis de **19-21**.

**8.3.2.4 Síntesis de 3-(aziridinil)-4-cloro-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona (22).** El compuesto **22** se obtuvo en 2 etapas, en la primera etapa en una solución de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H caliente con **45**, se adicionó lentamente otra solución de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H caliente conteniendo **44**, inmediatamente precipitó el ácido maleámico. El ácido obtenido fue suspendido en (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, se colocó en reflujo por 2 horas. Después de enfriar, se vertió en agua fría precipitando la maleimida.

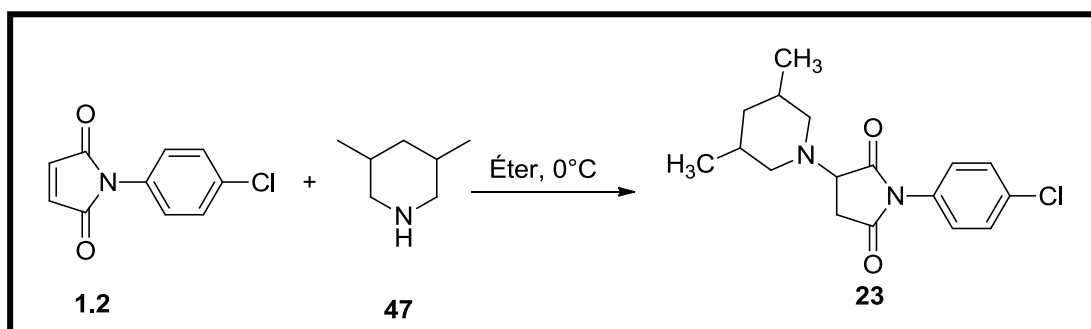
En la segunda etapa, se adicionó la maleimida diluida en éter en agitación, se adicionó gota a gota **46** hasta la desaparición del color amarillo, posteriormente se lavó y filtró el precipitado con un rendimiento del 30% (**Figura 38**).



**Figura 38.** Síntesis de **22**.

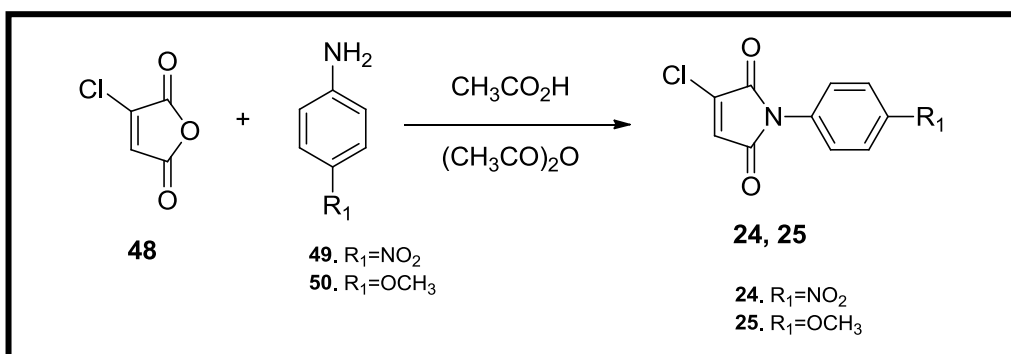
### 8.3.2.5 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-(3,5-dimetilpiperidinil)pirrolidin-2,5-diona (23).

El compuesto **23** se obtuvo al disolver **1.2** en éter, se colocó en agitación, se adiciono lentamente **47** en baño de hielo, hasta la aparición de un precipitado blanco, el cual fue lavado con éter con un rendimiento del 40% (**Figura 39**).



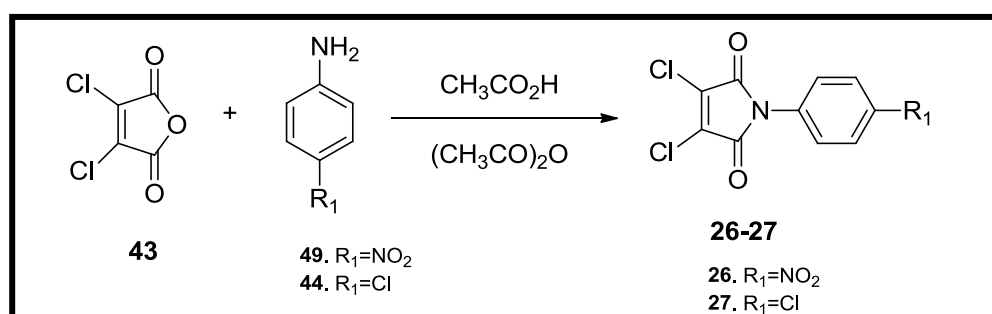
**Figura 39.** Síntesis de **23**.

**8.3.2.6 Síntesis de 3-cloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona (24), 3-cloro-1-(4-metoxifenil)-1-pirrol-2,5-diona (25).** Los compuestos **24**, **25** se obtuvieron en 2 etapas de reacción, en la primera etapa se adicionó  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente con **48**, se adicionó lentamente otra solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente conteniendo la anilina correspondiente (**49-50**), inmediatamente precipitó el ácido maleámico, el cual se dejó enfriar, se filtró y se lavó con agua. El ácido obtenido fue suspendido en  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , se colocó en reflujo por 2 horas. Después de enfriar, agregó en agua fría, precipitando la maleimida, con un rendimiento del 40% (**Figura 40**).



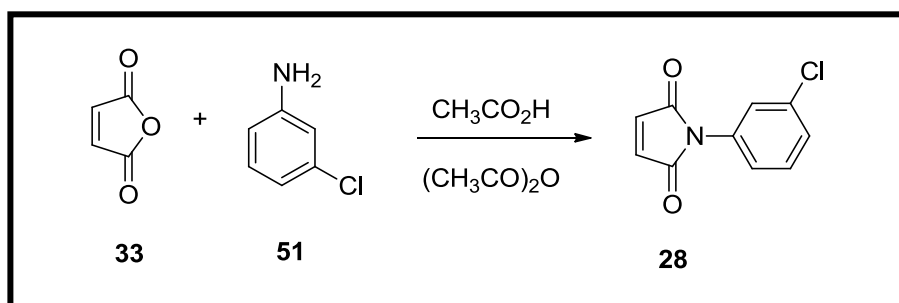
**Figura 40.** Síntesis de **24**, **25**.

**8.3.2.7 Síntesis de 3,4-dicloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona (26), 3,4-dicloro-1-(4-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona (27).** Los compuestos **26**, **27** se obtuvieron siguiendo la reacción: una solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente con **43**, se adicionó lentamente otra solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente conteniendo la anilina correspondiente (**44,49**), inmediatamente precipitó el ácido maleámico. El ácido maleámico obtenido fue suspendido en  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , se colocó en reflujo por 2 horas. Después de enfriar, se agregó agua fría precipitando la maleimida, con un rendimiento del 50% (**Figura 41**).



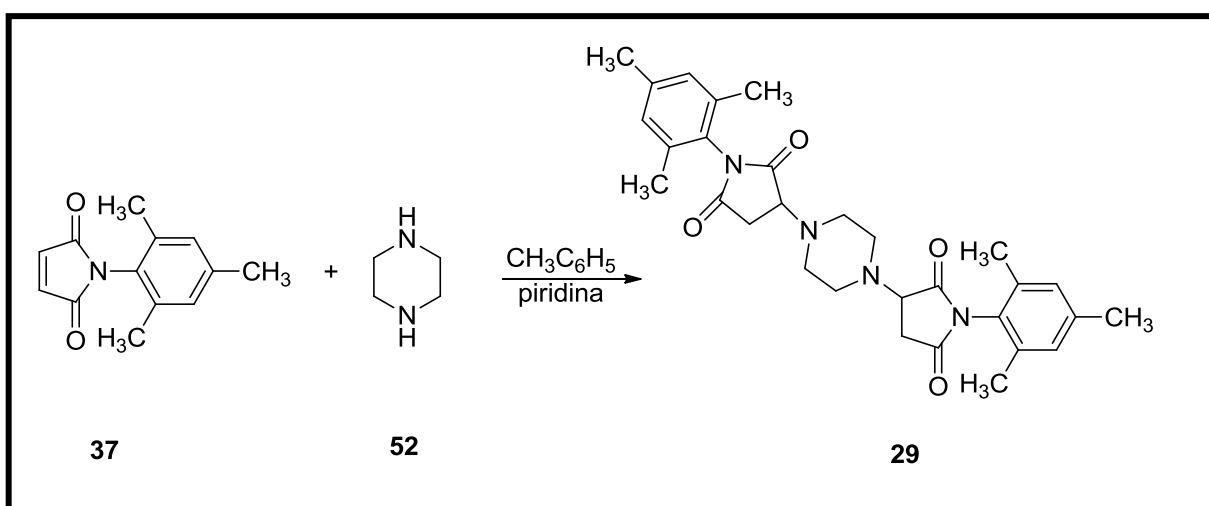
**Figura 41.** Síntesis de **26**, **27**.

**8.3.2.8 Síntesis de 1-(3-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona (28).** El compuesto **28** se obtuvo adicionando una solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente con **33**, se adicionó lentamente otra solución de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  caliente conteniendo **51**, inmediatamente precipitó el ácido maleámico correspondiente. El ácido obtenido fue suspendido en  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$  se colocó en reflujo. Después de enfriar, se agregó en agua fría precipitando la maleimida, con un rendimiento del 30% (**Figura 42**).



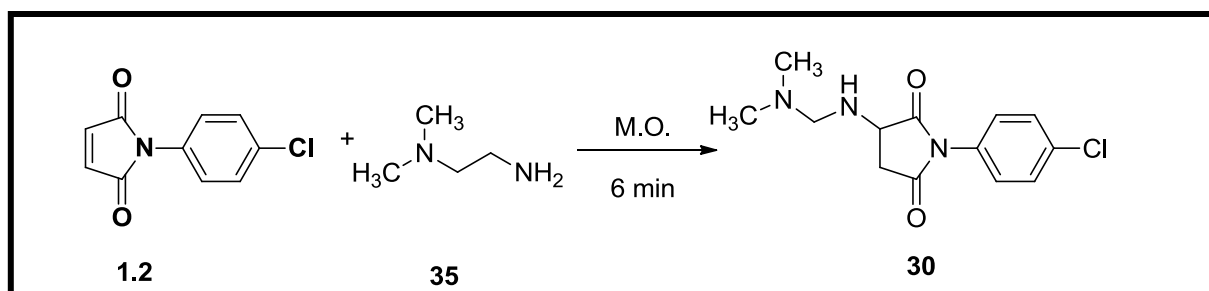
**Figura 42.** Síntesis de **28**.

**8.3.2.9 Síntesis de 3,3'-(piperazin-1,4-di)bis(1-mesitilpirrolidin-2,5-diona (29).** El compuesto **29** se obtuvo al adicionar **34** disuelta en tolueno, se colocó en agitación a temperatura ambiente y se adicionaron unas gotas de piridina, posteriormente se adicionó lentamente **52** hasta la formación de un precipitado blanco, se filtró y se realizaron varios lavados con hexano con un rendimiento del 30% (**Figura 43**).



**Figura 43.** Síntesis de **29**.

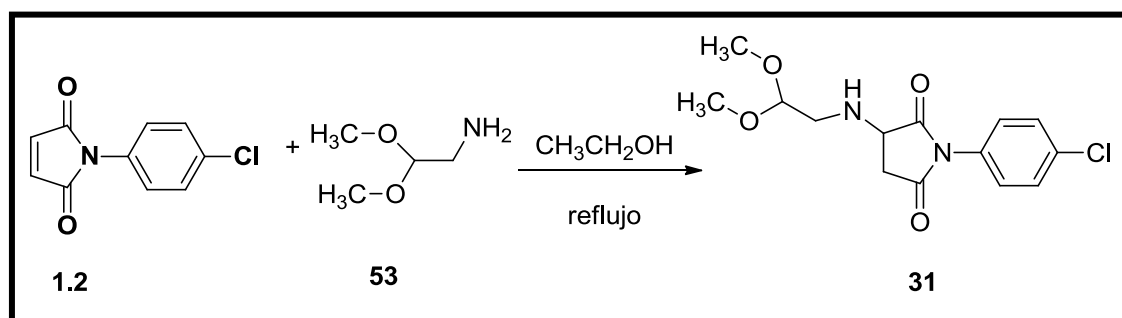
**8.3.2.10 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-((2-(dimetilamino)etil)amino)pirrolidin-2,5-diona (30).** El compuesto **30** se obtuvo utilizando el método de microondas donde se colocó **1.2** y **35** en exceso. Para la purificación del producto se utilizó una columna cromatográfica, utilizado como disolvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2:3), se evaporó el disolvente y se observó un líquido viscoso de color ámbar con un rendimiento del 40% (**Figura 44**).



**Figura 44.** Síntesis de **30**.

### 8.3.2.11 Síntesis de 1-(4-clorofenil)-3-((2,2-dimetoxietil)amino)pirrodin-2,5-diona (31).

El compuesto **31** fue obtenido al adicionar **1.2** en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , en agitación, se adicionó **52**, se colocó en reflujo por 1 hora. Se purificó por columna cromatográfica con gel de sílice, el disolvente que se utilizó fue  $\text{C}_6\text{H}_{14}-\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  (1:4), se dejó evaporar el disolvente, se observó un liquido aceitoso transparente con un rendimiento del 20% (**Figura 45**).



**Figura 45.** Síntesis de **31**.

Para la identificación de los compuestos (**17-31**) se analizó su espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopía de masas y análisis elemental (**Tabla 19**), la cual corresponde en estructura a los compuestos sintetizados.

#### ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

**3-(1-azetidínil)-1-(2,4,6-trimetilfenil) 2, 5 pirrolidindiona (17).**  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$  (272.34 g/mol), sólido color blanco, pf: 113-114°C, rendimiento del 50%;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.95 (s, 2H), 3.57 – 3.40 (m, 5H), 2.93 (dd,  $J = 18.0, 7.9$  Hz, 1H), 2.62 – 2.56 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.22 – 2.14 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.80, 174.34, 139.31, 135.49, 135.05, 129.32, 129.18, 127.06, 63.43, 54.20, 33.90, 21.03, 18.21, 17.63; m/z  $[\text{M}]^+$ : Calculado, 272.15, Encontrado 272.150; **Anal.** Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ : C, 70.40; H, 7.40; N, 10.29. Encontrado: C, 70.44; H, 7.08; N, 10.08.

**1-(4-clorofenil)-3-(4-metilpiperazinil)pirrolidin-2,5-diona (18).**  $C_{15}H_{18}ClN_3O_2$  (307.78 g/mol) sólido blanco, pf: 188-190 °C, rendimiento: 80%;  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.44 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.24 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 3.95 (dd,  $J = 9.0, 5.0$  Hz, 1H), 3.00 (dd,  $J = 18.5, 9.0$  Hz, 1H), 2.95 – 2.89 (m, 2H), 2.85 (dd,  $J = 18.5, 5.0$  Hz, 1H), 2.64- 2.50 (m, 6H), 2.30 (s, 3H).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  174.55, 173.72, 134.45, 129.84, 129.33, 127.57, 62.31, 54.80, 48.96, 45.90, 31.43;  $m/z$   $[M]^+$ : Calculado, 307.11, Encontrado 307.050; **Anal.** Calculado para  $C_{15}H_{18}ClN_3O_2$ : C, 58.54; H, 5.89; N, 13.65. Encontrado: C, 58.28; H, 5.65; N, 13.54.

**3-(aziridinil)-1-(*m*-tolil)pirrolidin-2,5-diona (19).**  $C_{13}H_{14}N_2O_2$  (230.26 g/mol) sólido color blanco, rendimiento del 40%;  $^1H$  RMN (400 MHz, Acetona)  $\delta$  7.34 (q,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.21 (dtd,  $J = 7.6, 1.5, 0.9$  Hz, 1H), 7.11 – 7.06 (m, 2H), 3.11 (dd,  $J = 18.3, 8.7$  Hz, 1H), 2.78 – 2.73 (m, 2H), 2.36 – 2.34 (m, 3H), 1.83 (dt,  $J = 10.2, 5.1$  Hz, 1H), 1.76 (dd,  $J = 7.1, 4.3$  Hz, 1H), 1.71 (dd,  $J = 5.7, 4.3$  Hz, 1H), 1.42 (dt,  $J = 7.3, 3.6$  Hz, 1H).  $^{13}C$  RMN (101 MHz, Acetone)  $\delta$  206.34, 205.92, 139.69, 129.64, 129.39, 128.24, 124.81, 67.17, 36.93, 27.87, 25.24, 21.16;  $m/z$   $[M]^+$ : Calculado, 230.11, Encontrado 230.050; **Anal.** Calculado para  $C_{13}H_{14}N_2O_2$ : C, 67.81; H, 6.13; N, 12.17. Encontrado: C, 67.95; H, 5.78; N, 11.86.

**3-(aziridinil)-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona (20).**  $C_{12}H_{11}ClN_2O_2$  (250.68 g/mol) cristales blancos, rendimiento 40%;  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 3.05 (dd,  $J = 18.2, 8.1$  Hz, 1H), 2.92 (dd,  $J = 18.2, 3.9$  Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J = 8.1, 3.9$  Hz, 1H), 2.05 – 2.01 (m, 1H), 1.89 (dd,  $J = 6.7, 3.9$  Hz, 2H), 1.38 – 1.35 (m, 1H).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  174.40, 173.77, 134.42, 129.96, 129.30, 127.57, 66.01, 36.14, 27.77, 25.72;  $m/z$   $[M]^+$ : Calculado, 205.05, Encontrado 205.05.

**3-(aziridinil)-1-mesitilpirrolidin-2,5-diona (21).**  $C_{15}H_{18}N_2O_2$  (258.32 g/mol), sólido color blanco, rendimiento del 45%;  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.98 – 6.95 (m, 2H), 3.08 (dd,  $J = 18.1, 8.0$  Hz, 1H), 2.97 – 2.92 (m, 1H), 2.65 (dd,  $J = 7.9, 3.7$  Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.06 – 2.02 (m, 4H), 1.90 – 1.85 (m, 2H), 1.37 – 1.32 (m, 1H).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  174.75, 174.26, 139.39, 135.58, 135.00, 129.35, 127.05, 66.46, 36.37, 27.65, 25.78, 21.05, 17.35;  $m/z$   $[M]^+$ : Calculado, 258.11, Encontrado 258.150; **Anal.** Calculado para  $C_{15}H_{18}N_2O_2$ : C, 69.74; H, 7.02; N, 10.84. Encontrado: C, 69.52; H, 6.93; N, 10.68.

<p><b>3-(aziridinil)-4-cloro-1-(4-clorofenil)pirrolidin-2,5-diona (22)</b> <math>C_{12}H_{10}Cl_2N_2O_2</math> (285.13 g/mol) sólido blanco, rendimiento: 30%; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, Acetona) <math>\delta</math> 7.78 – 7.73 (m, 2H), 7.37 – 7.35 (m, 2H), 6.04 (d, <math>J = 8.7</math> Hz, 1H), 5.91 (d, <math>J = 10.3</math> Hz, 1H), 2.46 – 2.39 (m, 4H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, Acetona) <math>\delta</math> 164.96, 161.23, 137.50, 129.37, 129.06, 122.37, 81.69, 81.62, 27.13; <b>Anal.</b> Calculado para <math>C_{12}H_{10}Cl_2N_2O_2</math>: C, 50.55; H, 3.54; N, 9.82. Encontrado: C, 50.89; H, 3.33; N, 9.38.</p>
<p><b>1-(4-clorofenil)-3-(3,5-dimetilpiperidinil)pirrolidin-2,5-diona (23)</b> <math>C_{17}H_{21}ClN_2O_2</math> (320.81 g/mol), cristales blancos, rendimiento del 40%; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 7.46 – 7.42 (m, 2H), 7.28 – 7.23 (m, 2H), 3.97 (dd, <math>J = 9.2, 4.8</math> Hz, 1H), 3.01 (dd, <math>J = 18.7, 9.2</math> Hz, 1H), 2.86 – 2.75 (m, 3H), 2.31 (t, <math>J = 10.8</math> Hz, 1H), 1.82 – 1.66 (m, 4H), 0.88 (d, <math>J = 6.2</math> Hz, 3H), 0.64 – 0.54 (m, 1H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 175.09, 174.10, 134.39, 129.94, 129.30, 127.61, 62.69, 58.58, 55.44, 41.69, 31.78, 31.44, 31.21, 19.44, 19.38; <b>Anal.</b> Calculado para <math>C_{17}H_{21}ClN_2O_2</math>: C, 63.64; H, 6.60; N, 8.73. Encontrado: C, 69.52; H, 6.93; N, 10.68.</p>
<p><b>3-cloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona (24)</b> <math>C_{10}H_5ClN_2O_4</math> (252.61 g/mol) sólido amarillo, rendimiento: 45%; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 8.37 – 8.33 (m, 2H), 7.70 – 7.65 (m, 2H), 6.88 (s, 1H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 165.64, 163.04, 146.39, 141.66, 136.56, 127.09, 125.51, 124.54; <b>m/z [M]<sup>+</sup></b>: Calculado, 251.99, Encontrado 252.05; <b>Anal.</b> Calculado para <math>C_{10}H_5ClN_2O_4</math>: C, 47.55; H, 2.0; N, 11.09. Encontrado: C, 47.94; H, 1.90; N, 10.95.</p>
<p><b>3-cloro-1-(4-metoxifenil)-1-pirrol-2,5-diona (25)</b> <math>C_{11}H_8ClNO_3</math> (273.64 g/mol), sólido amarillo, rendimiento: 40%; <math>^1H</math> NMR (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 7.25 – 7.20 (m, 2H), 7.01 – 6.95 (m, 2H), 6.76 (s, 1H), 3.82 (s, 3H). <math>^{13}C</math> NMR (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 166.92, 164.05, 159.34, 141.05, 134.07, 127.53, 123.32, 114.46, 55.44; <b>m/z [M]<sup>+</sup></b>: Calculado, 237.02, Encontrado 237.050; <b>Anal.</b> Calculado para <math>C_{11}H_8ClNO_3</math>: C, 55.60; H, 3.39; N, 5.89. Encontrado: C, 57.86; H, 4.13; N, 6.57.</p>
<p><b>3,4-dicloro-1-(4-nitrofenil)-1-pirrol-2,5-diona (26)</b> <math>C_{10}H_4Cl_2N_2O_4</math> (287.06 g/mol), sólido amarillo, %R= 50; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 8.39 – 8.32 (m, 2H), 7.70 – 7.65 (m, 2H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 161.20, 146.42, 136.14, 134.10, 125.61, 124.67; <b>m/z [M]<sup>+</sup></b>: Calculado, 285.95, Encontrado, 285.85.</p>

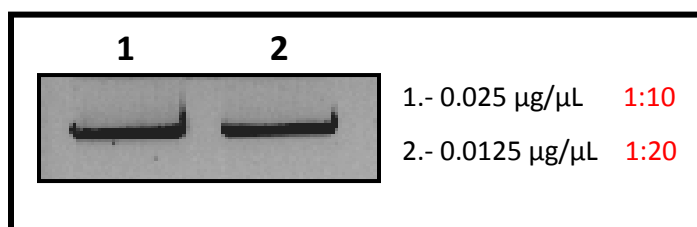
<p><b>3,4-dicloro-1-(4-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona (27)</b> <math>C_{10}H_4Cl_3NO_2</math> (276.50 g/mol), sólido amarillo, %R= 54; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.34 – 7.26 (m, 2H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 161.68, 134.44, 133.68, 129.55, 129.00, 127.05; <math>m/z</math> [M]<sup>+</sup>: Calculado, 274.93, Encontrado, 276.9.</p>
<p><b>1-(3-clorofenil)-1-pirrol-2,5-diona (28)</b> <math>C_{10}H_6ClNO_2</math> (207.61 g/mol), sólido blanco, %R= 45; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.34 (ddd, <math>J = 8.1, 1.9, 1.3</math> Hz, 1H), 7.28 (ddd, <math>J = 7.8, 2.0, 1.3</math> Hz, 1H), 6.87 (s, 2H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 168.93, 134.55, 134.22, 132.25, 130.00, 127.96, 125.98, 123.90; <math>m/z</math> [M]<sup>+</sup>: Calculado, 207.01, Encontrado, 207.00.</p>
<p><b>3,3'-(piperazin-1,4-di)bis(1-mesitilpirrolidin-2,5-diona (29)</b> <math>C_{30}H_{36}N_4O_4</math> (516.63 g/mol), sólido blanco, %R= 30; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 6.96 (d, <math>J = 1.8</math> Hz, 4H), 4.04 (ddd, <math>J = 9.1, 5.5, 1.5</math> Hz, 2H), 3.10 – 2.99 (m, 6H), 2.88 (ddd, <math>J = 18.6, 5.5, 2.5</math> Hz, 2H), 2.80 – 2.72 (m, 4H), 2.29 (s, 6H), 2.08 (s, 6H), 2.04 (s, 6H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 174.90, 173.83, 139.46, 134.99, 129.34, 127.20, 62.55, 49.05, 31.57, 21.02, 18.09, 17.67.</p>
<p><b>1-(4-clorofenil)-3-((2-(dimetilamino)etil)amino)pirrolidin-2,5-diona (30)</b> <math>C_{14}H_{18}ClN_3O_2</math> (295.76 g/mol), liquid color marron, %R= 40; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 10.02 (s, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 2H), 7.30 – 7.25 (m, 2H), 3.57 (dd, <math>J = 8.7, 3.9</math> Hz, 1H), 2.97 (dd, <math>J = 16.6, 3.9</math> Hz, 1H), 2.85 (ddd, <math>J = 12.4, 8.1, 4.4</math> Hz, 1H), 2.73 – 2.64 (m, 2H), 2.49 (ddd, <math>J = 12.5, 8.1, 4.5</math> Hz, 1H), 2.34 (ddd, <math>J = 12.5, 5.8, 4.4</math> Hz, 1H), 2.23 (s, 6H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 172.19, 171.38, 136.545, 128.86, 128.81, 120.546, 59.33, 59.04, 51.96, 45.33, 36.15.</p>
<p><b>1-(4-clorofenil)-3-((2,2-dimetoxietil)amino)pirrodin-2,5-diona (31)</b> <math>C_{14}H_{17}ClN_2O_4</math> (312.75 g/mol), liquido incoloro, %R= 20; <math>^1H</math> RMN (400 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 9.64 (s, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 2H), 7.29 – 7.25 (m, 2H), 4.43 (t, <math>J = 4.7</math> Hz, 1H), 3.61 – 3.55 (m, 1H), 3.43 – 3.37 (m, 6H), 2.98 – 2.89 (m, 2H), 2.76 – 2.66 (m, 2H). <math>^{13}C</math> RMN (101 MHz, <math>CDCl_3</math>) <math>\delta</math> 171.58, 170.83, 136.36, 128.93, 120.55, 103.68, 60.99, 59.34, 54.57, 54.03, 49.34.</p>

**Tabla 19.** Espectroscopía de RMN  $^1H$  y RMN  $^{13}C$  de los compuestos **17-31**.

## 8.4 ENSAYOS EN DNA:

La interacción de moléculas pequeñas con DNA puede ser evaluada por diversos métodos, entre los que se encuentran los ensayos por electroforesis. El principio básico es que la interacción del DNA con el compuesto orgánico conlleva a un retardo electroforético al retrasar la migración del material genético que es sensible tanto a las cargas como al tamaño del oligonucleótido, ambos pudiendo ser cambiados por la interacción supramolecular con un determinado compuesto activo. El comportamiento del DNA en un gel de electroforesis se vuelve más evidente cuando hay interacciones covalentes con el compuesto activo pues puede llevar a una degradación del oligonucleótido.

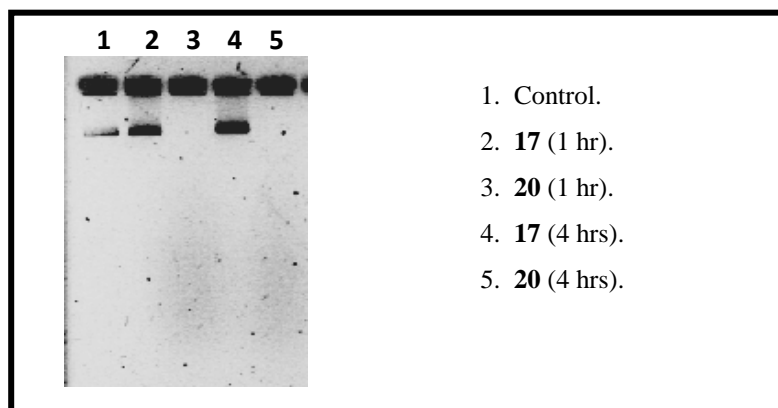
Se eligió, por disponibilidad, el plásmido  $\lambda$  ADN Nb-libre de metiladenina (500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Como ensayo de referencia se evaluó que el metanol, disolvente en el que es factible trabajar los compuestos, no afectase el DNA. Así el plásmido, a diferentes concentraciones de 2  $\mu\text{L}$  y 4  $\mu\text{L}$ , se sometió a electroforesis disuelto en metanol sin apreciar, después del corrimiento, cambios significativos con respecto al control. Así mismo, se encontró que la mejor concentración (**Figura 46**) para los ensayos fue de 0.0125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .



**Figura 46.** Efecto de la concentración de los compuestos sobre el DNA.

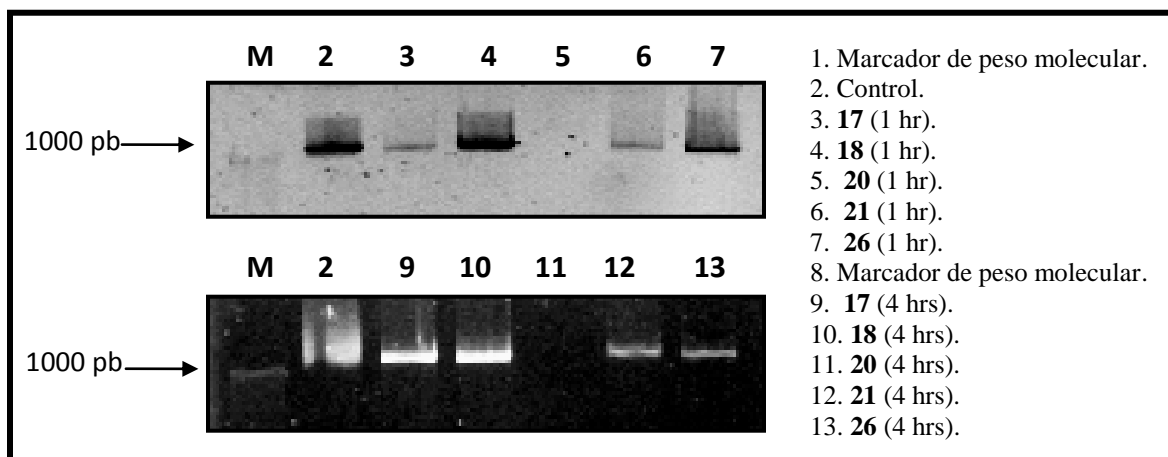
Los primeros ensayos fueron realizados con los compuestos **17** y **20**. En la **Figura 47** se observa que en el primer carril, la banda perteneciente al control no presento ningún cambio, en el segundo y cuarto carril que corresponden al compuesto **17** incubado a 1 y 4 horas, no se observó ningún efecto importante sobre el DNA, esto indica que no ocurrió una unión aparente entre el compuesto **17** y el DNA; sin embargo, el compuesto **20**

presentó cambios interesantes ya que al observar los carriles tres y cinco se observó la ausencia de ambas bandas y se aprecia un notorio barrido a un peso molecular más alto, tanto a 1 hora de incubación como a 4 horas, indicando que el compuesto no solo se unió al DNA sino que además presentó un efecto alquilante ya que fragmentó al DNA.



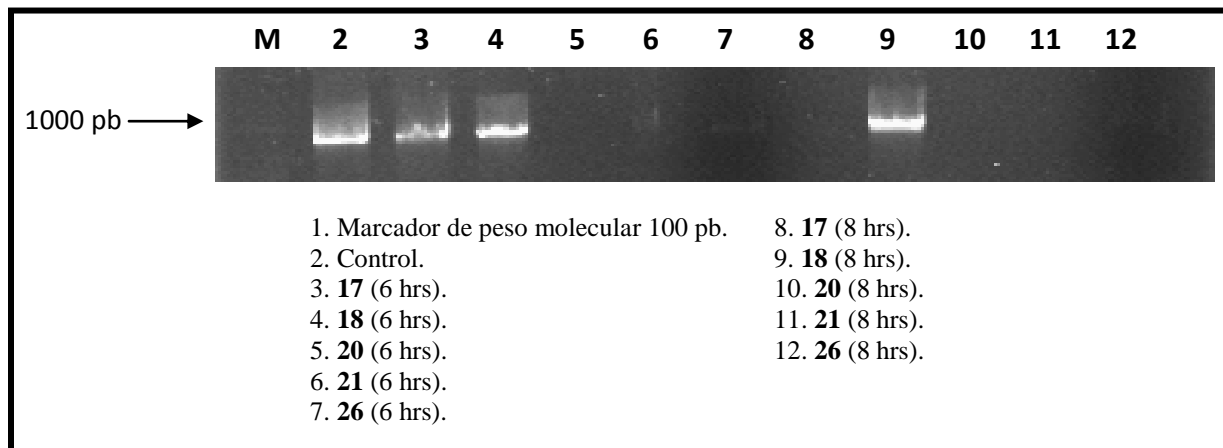
**Figura 47.** Efecto de **17** y **20** sobre el DNA.

Se realizó un ensayo donde se probaron los compuestos **17**, **18**, **20**, **21**, **26**, todos ellos funcionalizados de manera distinta. Los resultados se aprecian en la **Figura 48** se observa que los compuestos **17**, **18**, **26** incubados a 1 y 4 horas no se observa ningún efecto importante sobre el DNA, esto indica que no ocurrió una unión aparente entre los compuestos y el DNA. En los carriles 5 y 11 correspondientes al compuesto **20** se observa la ausencia de las bandas indicando que el compuesto no solo se unió al DNA sino que presenta un efecto alquilante sobre él desde la primera hora que se incubó. En el carril 6 correspondiente al compuesto **21** a 1 hora de incubación no se observa ningún cambio en la banda con respecto al control, sin embargo al observar el carril 12 correspondiente al compuesto **21** incubado por 4 horas respecto al control, se observa un notable retraso de la banda, esto indica una unión del compuesto **21** al DNA y dependiendo del retraso se considera de una intercalación o un reconocimiento del surco.



**Figura 48.** Electroforesis en gel de agarosa, efecto de **17, 18, 20, 21, 26** sobre el DNA, a distintos tiempos.

Al analizar la **Figura 49** se observa que los compuestos **17, 18, 26** incubados a 6 horas no ocurrió ningún efecto sobre el DNA, esto indica que no se observa una unión entre los compuestos y el DNA. Con respecto al compuesto **26** se observa levemente la banda y una sombra en el corrimiento, esto nos indica que el compuesto esta interaccionando de alguna forma con el bromuro de etidio y esto no permite que se revele normalmente. En el carril 5 correspondiente al compuesto **20** se observa la ausencia de la banda lo que demuestra que el compuesto no solo se unió sino que presenta un efecto alquilante sobre el DNA. En el carril 6 correspondiente al compuesto **21** se observa la ausencia de la banda respecto al control esto nos habla de que se ha degradado el DNA. A 8 horas de incubación los compuestos **17, 20, 21, 26** respecto al control se observa la ausencia de la banda, nuevamente en el compuesto **26** se observa una sombra lo que nos habla de una posible interacción con el bromuro de etidio. El compuesto **18** respecto al control no se observa que presente interacción con el DNA.



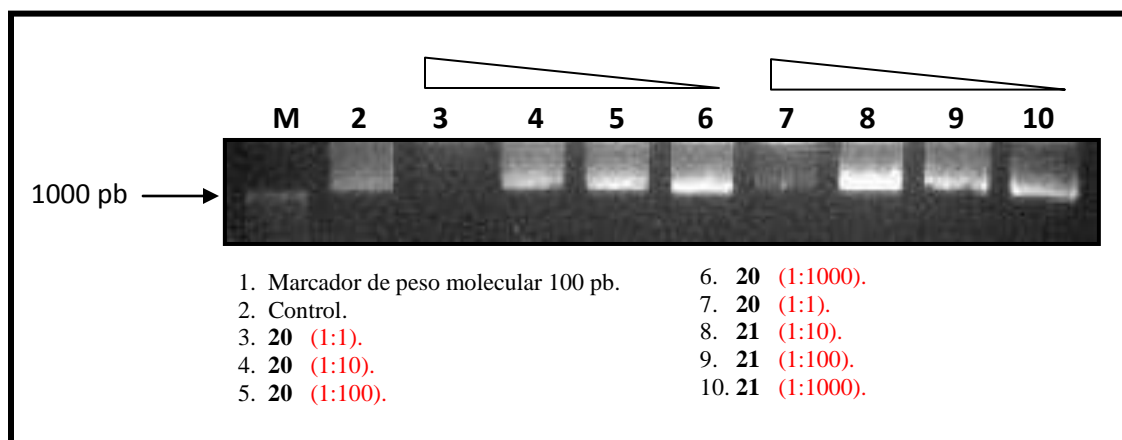
**Figura 49.** Electroforesis en gel de agarosa, efecto de **17, 18, 20, 21, 26** sobre el DNA, a distintos tiempos.

Los compuestos que presentaron tener un efecto más evidente sobre el DNA son el compuesto **20** y **21** ambos compuestos tienen la similitud de poseer una aziridina unida al anillo de cinco, se sabe que las aziridinas actúan como agentes alquilantes debido a que tienen una gran tendencia a sufrir reacciones de apertura de anillo con nucleófilos presentes en el DNA, es por ello que se les considera tóxicas y mutagénicas (Helsby *et al.*, 2003).

Debido a que los compuestos **20** y **21** son los compuestos que presentan un efecto sobre el DNA, determinamos la concentración ideal a la cual ocurre el efecto, así como su efecto a diferentes concentraciones del compuesto.

En un segundo ensayo (**Figura 50**) se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular y en el carril 2 el control. En el carril 3 se observa claramente como el compuesto **20** a la concentración (1:1) presenta efecto alquilante sobre el DNA ya que se observa una ausencia de la banda. En los carriles 4, 5 y 6 no se observa ningún cambio (con respecto al Control) esto nos indica que la cantidad de compuesto es muy pequeña y no permite la interacción con el DNA, por lo tanto dichas concentraciones no serán útiles para dicho estudio. En cuanto al compuesto **21** no se observó ningún efecto a estas concentraciones como se muestra en los carriles 7, 8, 9 y 10, al no haber efecto sobre la

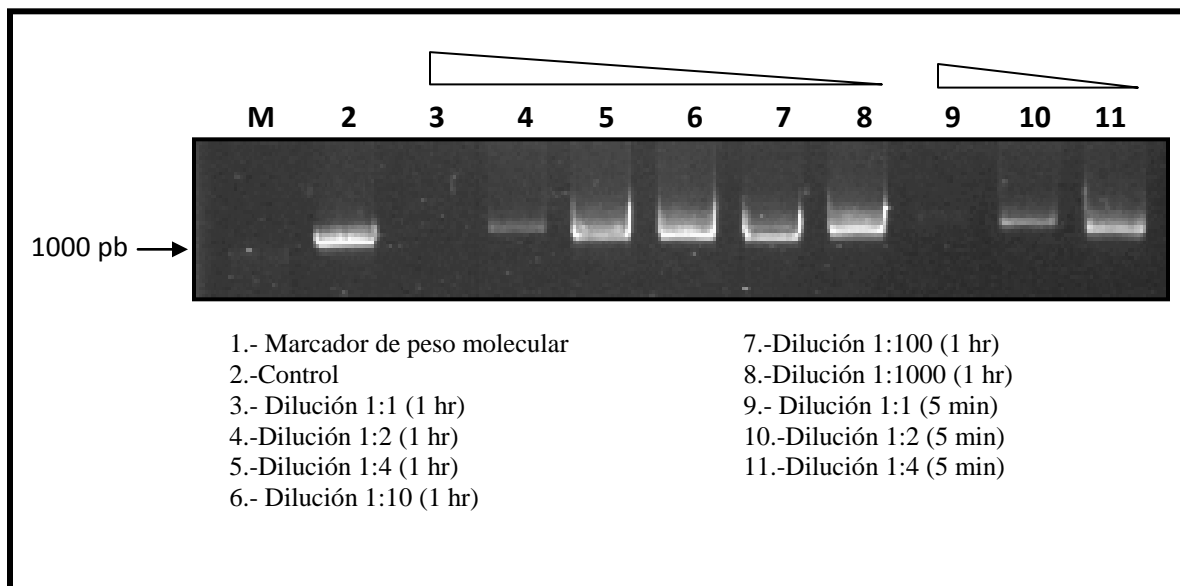
banda con respecto al control, esto se debe a que este compuesto presento su efecto a 4 horas de incubación y esta prueba se llevo a 1 hora de incubación.



**Figura 50.** Electroforesis en gel de agarosa, efecto de **20**, **21** sobre el DNA, a distintas concentraciones.

Al no observar el efecto buscado, el cual es, encontrar la concentración ideal a la cual el compuesto **20** degrada el DNA, se repitió el mismo ensayo las concentraciones fueron 1:1, 1:2, 1:4, así como también, se modificó el tiempo de incubación a una 1 hora y 5 minutos para observar si el efecto del compuesto **20** es inmediato.

En un sexto ensayo (**Figura 51**) se puede observar en los carriles 9, 10 y 11 perteneciente a las diferentes diluciones del compuesto incubadas por 5 minutos, donde se aprecia las bandas con un pequeño retraso con respecto al control, es decir en 5 minutos el compuesto aun no interactúa por completo con el DNA, sin embargo, si hay rastro de fragmentación del DNA; en el carril 3 que corresponde a la dilución (1:1) se observa la ausencia de la banda; en el carril 4 se observa un pequeño retraso de la banda, lo que nos indica que a la dilución de (1:2) si existe cierta interacción del compuesto con el DNA pero no es muy notoria, en el carril 5, 6, 7 y 8 no se observa un cambio aparente frente al control lo que indica que no ocurre interacción de las diluciones (1:4), (1:10), (1:100), (1:1000) del compuesto con el DNA.

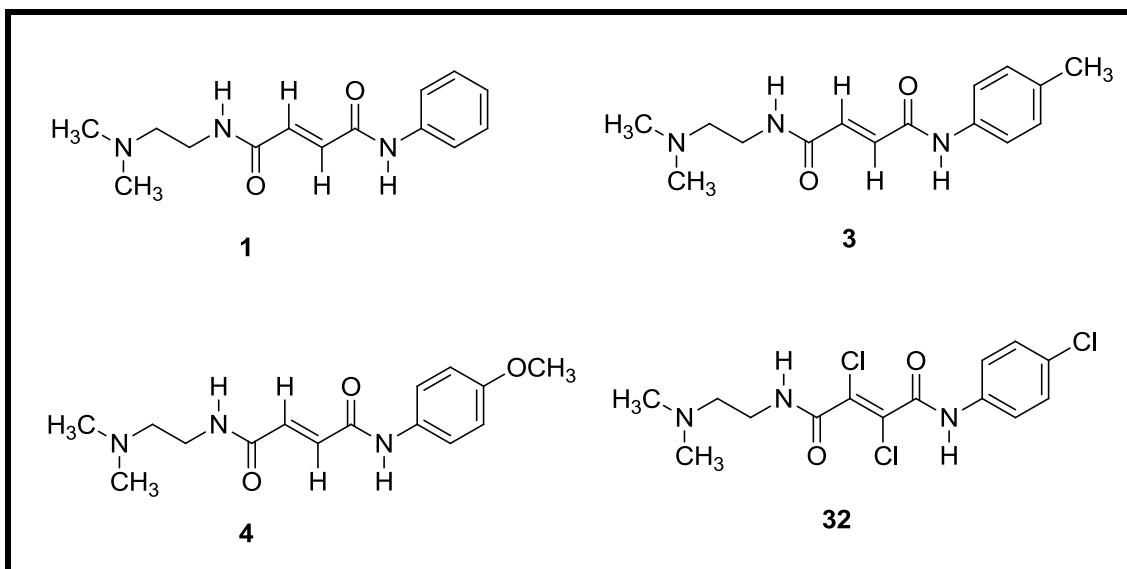


**Figura 51.** Efecto de la concentración de **20**.

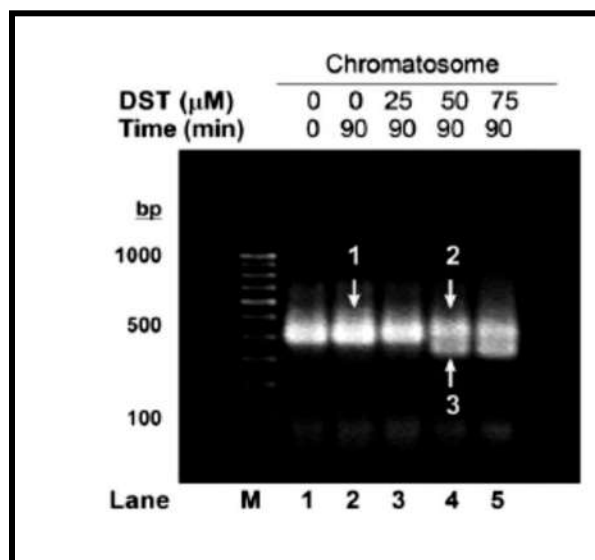
Podemos concluir que los resultados de los ensayos electroforeticos fueron satisfactorios ya que de cinco compuestos análogos a succinimidas y maleimidas **4** presentaron interacción con el DNA, el compuesto más reactivo fue el compuesto **20** este compuesto presenta como sustituyente un anillo de aziridina este anillo al estar tensionado es mucho mas reactivo y actua alquilando el DNA. Desde los 5 minutos de incubación se observa cierta interacción se requiere de concentración  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  del compuesto **20** diluido en  $\text{CH}_3\text{OH}$  para que se observe la interacción con el DNA. Se observa como dicho compuesto degrada el  $\lambda$  DNA en pequeños fragmentos. El compuesto **21** es un análogo de la succinimida y posee como sustituyente un anillo de aziridina, dicho compuesto es menos reactivo que el compuesto **20** ya que requiere 4 horas de incubación con una concentración de  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para que se presente el efecto sobre el DNA, se observa un retraso de la banda lo que nos indica que el compuesto esta interaccionando con el DNA de una forma no covalente, es decir, el compuesto está actuando como un reconocedor de surco o como intercalador dadas las características del compuesto podemos decir que actuaría como un reconocedor de surco, a las 6 horas de incubación se observa la ausencia de la banda por lo tanto estaría actuando como un agente alquilante. El compuesto **26** es un análogo de maleimida este compuesto posee 2 grupos cloros como sustituyentes en el anillo de 5

miembros de maleimida, dichos grupos le proporcionan cierta reactividad al compuesto para que se observe la interacción con el DNA requiere de 6 horas de incubación, a dicha hora se observa la desaparición de la banda, a las 4 horas de incubación se observa un ligero retraso de la banda lo que nos habla de otro tipo de interacción de tipo no alquilante, este compuesto requiere una concentración de  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para que se observe la interacción de tipo alquilante con el DNA. El compuesto **17** es un análogo de la succinimida y posee como sustituyente un anillo de azetidina este anillo es de 4 miembros lo que lo hace menos reactivo que el anillo de aziridina, este compuesto requiere 8 horas de incubación para que se pueda presentar la interacción con el DNA requiere la concentración de  $0.004 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de compuesto. El compuesto **18** es un análogo de la succinimida que posee como sustituyente un anillo de piperazina, dicho compuesto al no poseer un anillo reactivo o grupos que le confieran dicha reactividad lo hace inactivo frente al DNA.

Ya que los compuestos análogos a maleimidias y succinimidias presentaron tener un efecto alquilante frente al DNA se decidió probar el efecto de los compuestos **1, 3, 4 y 32 (Figura 52)**, dichos compuestos son alquendiamidas que presentan una carboxamida en su estructura, el carbonilo  $\alpha, \beta$ -insaturado podría actuar como agente alquilante ya que existen reportes en la literatura donde se ha comprobado su interacción con el DNA. Majumder *et al.*, 2013, estudiaron la interacción de la distamicina dicho compuesto presenta un carbonilo  $\alpha, \beta$ -insaturado, el cual se considera como un reconocedor del surco menor del DNA, en la **Figura 53** se aprecia un retraso en las bandas, este mismo efecto lo apreciamos anteriormente.

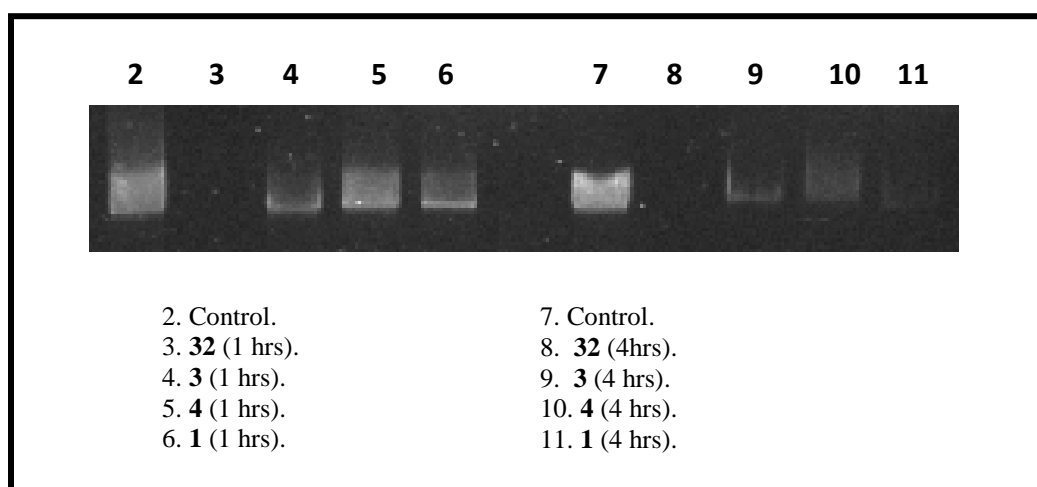


**Figura 52.** Estructuras químicas de los Compuestos 1, 3, 4 y 32.

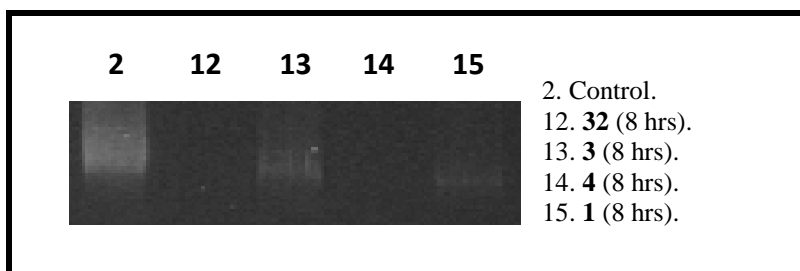


**Figura 53.** Electroforesis en gel de agarosa para estudiar el efecto de la distamicina. Las muestras se incubaron con distamicina a temperatura ambiente durante 90 minutos a las concentraciones de fármaco indicadas y se analizaron en 1,5% de gel de agarosa. Se incubaron con tampón (carriles 1 y 2) sirvieron como controles negativos (Majumder, *et al.*, 2013).

Se realizó un séptimo ensayo (**Figura 54, 55**) donde se observa como el compuesto **32** es el más reactivo ya que desde la primera hora de incubación se presenta la interacción con el DNA esto se observa en los carriles 3, 8 y 12 donde se aprecia la ausencia de la banda respecto al control. Recordando que el compuesto **26** análogo de la maleimida que presenta en su estructura un carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado con 2 grupos cloros presenta cierta reactividad por dichos grupos es lógico que el compuesto con el grupo carboxamida con 2 grupos cloros presentes en la insaturación sea el compuesto que presente mayor reactividad. Los compuestos **1** y **3** no presentan interacción con el DNA, el compuesto **4** a 1 y 4 horas de incubación no se observa interacción con el DNA ya que no se presenta un cambio respecto al control; sin embargo, incubado a 8 horas se observa la ausencia de la banda, por lo que el compuesto estaría alquilando al DNA.

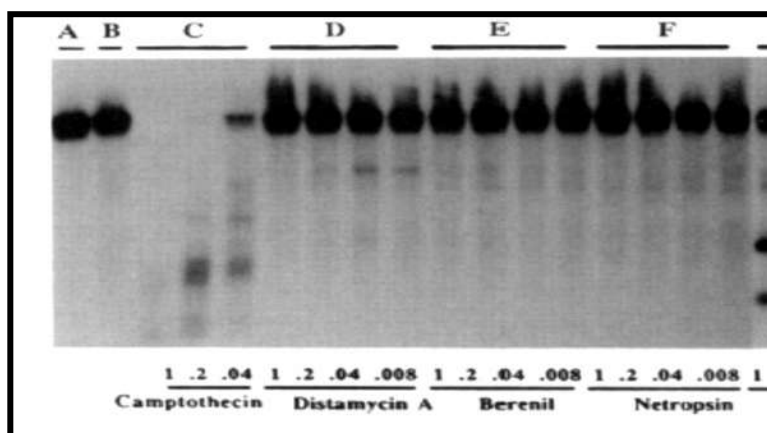


**Figura 54.** Electroforesis en gel de agarosa, efecto de los compuestos **1, 3, 4, 32** sobre el DNA, a distintos tiempos.



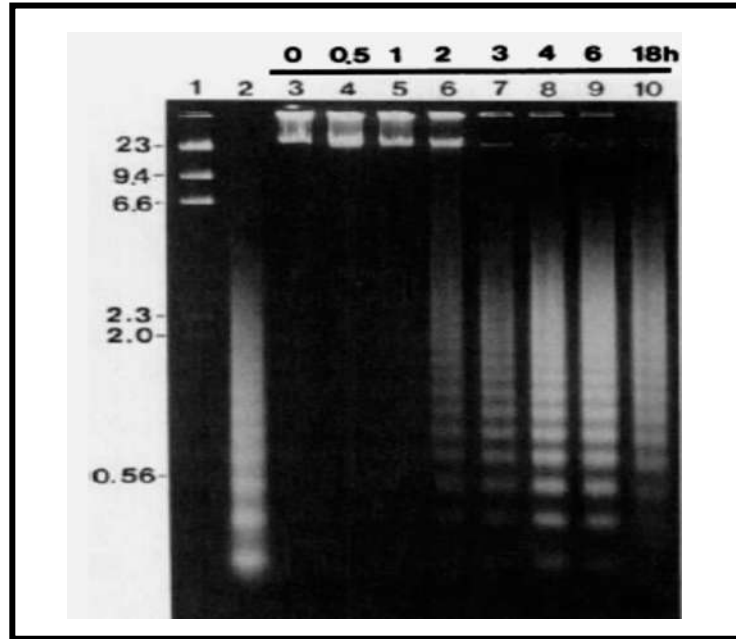
**Figura 55.** Electroforesis en gel de agarosa, efecto de los compuestos **1, 3, 4, 32** sobre el DNA, a distintos tiempos.

Revisando la literatura, Chen *et al.*, 1993, realizaron una serie de estudios sobre varios fármacos reconocedores de surco sobre su posible inhibición de la topoisomerasa, entre los fármacos analizados esta la distamicina, camptotecina, berenil y netropsin, utilizaron electroforesis en gel de agarosa, se puede apreciar como la camptotecina tiene un efecto alquilante ya que destruye el DNA se observa solo un barrido y la ausencia de la banda, en cuanto a los otros fármacos se observa la aparición de otras bandas a distintos pesos moleculares lo que indica distintos tipos de interacción sobre el DNA. Esto nos comprueba que los compuestos **20** y **21** poseen un efecto bastante bueno sobre al DNA al compararlo con otros estudios (**Figura 56**).



**Figura 56.** Estudio de varios Reconocedores el surco menor sobre el DNA y su posible efecto inhibitorio de la topoisomera (Chen *et al.*, 1993).

Scott H. Kaufman reporta la fragmentación del DNA como consecuencia del tratamiento de epipodofilotoxina. El DNA se somete a una fragmentación inducida por etoposidación en células HL-60. En la **Figura 57** se puede apreciar que al aumentar el tiempo la fragmentación es más notoria.



**Figura 57.** Electroforesis en gel de agarosa de la fragmentación del etopósido sobre el DNA. Las células HL-60 fueron tratadas con 40  $\mu\text{g/mL}$  (68  $\mu\text{M}$ ) de etopósido durante 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, ó 18 h (carril 3-10, respectivamente). Se aisló el DNA y se sometió a electroforesis en gel de agarosa en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 se muestra el DNA después de ser incubado con células HL-60 (Scott H. Kauffman, 1989).

## **IX. CONCLUSIONES**

- ✓ Se predijo la actividad ( $\Delta T_m$ ) de la serie **1** de los compuestos **1-16**, mediante un estudio QSAR, de acuerdo a los resultados elegimos los compuestos **3, 5, 14** ya que son los que pretenden tener una mayor estabilidad en el DNA .
  
- ✓ Se realizó un estudio de anclaje molecular a los Series 1 y 2, dichos compuestos son capaces de interactuar en el surco menor de DNA, analizando la energía de formación del complejo nos podemos dar una idea de la estabilidad del complejo ya que puede presentar cierta reversibilidad, por lo tanto los compuestos actuarían potencialmente como compuestos citotóxicos.
  
- ✓ Se logró la síntesis de 15 compuestos análogos a maleimidias y succinimidias (**1-15**); se logró la síntesis de 5 compuestos **1, 2, 3, 4** y **32**, así como se describió una nueva metodología para obtenerlos.
  
- ✓ Se evaluó la capacidad de interacción de nueve compuestos con el DNA, 6 de ellos **3, 17, 20, 21, 26** y **32** interactúan con el DNA, actuando como agentes alquilantes, ya que destruyen en fragmentos el DNA.

## **X. BIBLIOGRAFIA:**

Ambati B., Ambati, J., y Mokhtar, M. (1991). Heuristic combinatorial optimization by simulated Darwinian evolution: a polynomial time algorithm for the Traveling Salesman. *Problem. Biological Cybernetics*, 65(1), 31-35.

Aptula AO, Roberts DW. (2006). Mechanistic applicability domains for non-animalbased toxicological end points: General principles and application to reactive toxicity. *Chem Res Toxicol*; 19, 1097–1105.

Beerendonk GJM, Nivard MJM, Vogel EW, Nelson SD, Meerman JHN. (1992). Formation of thymidine adducts and cross-linking potencial of 2-bromoacrolein, a reactive metabolite of tris(2,3-dibromopropyl)phosphate. *Mutagenesis*, 7, 19–24.

Bewley CA., Gronenborn, AM., and Clore, GM. (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27, 105-131.

Braña MF. Castellano JM. Roldan CM. Santos A. Vazquez D. Timenez A. (1980). Synthesis and mode(s) of action of a new series of inaide derivatives of 3-nitro-1,8 naphthalic acid. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. 4(1), 61-6.

Braña, M.F.; Cacho, M.; Gradillas, A.; Pascual-Teresa, B.; Ramos, A. (2001). Intercalators as Anticancer Drugs. Source: *Current Pharmaceutical Design*, Volume 7, Number 17, 1, pp. 1745-1780(36).

Burger A., and Wolff, ME. (1995). Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and practice (5th ed. Vol. 1). New York: Wiley.

Cashman John R., MacDonald Mary, Ghirmai Senait, Okolotowicz Karl J., Sergienko Eduard, Brown Brock, Garcia Xochella, Zhai Dayong, Dahl Russell, Reed John C. (2010). Inhibition of Bfl-1 with N-aryl maleimidias. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 6560–6564.

Cuevas G., Cortés F. (2003). Introducción a la química computacional. *Fondo de cultura económica*. México, DF. pp. 15-20.

Chacón-García L., y Martínez, R. (2001). Cytotoxic activity and QSAR of N,N'-diarylalkanediamides. *Eur J Med Chem*, 36(9), 731-736.

Chen Allan Y., Chiang Yu, Gatto Barbara, and Liu Leroy F. (1993). DNA minor groove-binding ligands: A different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp. 8131-8135.

Chung, FL.; Roy, KR.; Hecht, SS. (1988). A study of reactions of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds with deoxyguanosine. *J. Org. Chem.* 53, 14-17.

Denny WA., Cain, BF., Atwell, GJ., Hansch, C., Panthananickal, A., y Leo, A. (1982). Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents. *J Med Chem*, 25(3), 276-315.

De Oliveira, A. M.; Custodio, F. B.; Donnici, C. L.; Montanari, C. A. (2003). *European Journal of Medical Chemistry* 38, 141-155.

Eder E, Henschler D, Neudecker T. (1982). Mutagenic properties of allylic and  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated compounds: consideration of alkylating mechanism. *Xenobiotica*, 12, 831-848.

Free S. M., Jr., y Wilson, J. W. (1964). A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J Med Chem*, 7, 395-399.

García M. A., y Pascual-Teresa, B. d. (2004). Técnicas empleadas para el estudio de la interacción entre agentes antitumorales y el DNA. *Oncología (Barcelona)*, 27, 33-43.

Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte (Comunicación Social). (2011). (Comunicado no. 267/11). Retrieved 13 de Julio de 2011, from Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).

<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Boletines/Boletin/Comunicados/Especiales/2011/Julio/comunica>.

Grand GH., Richards WG. (1995). Computational chemistry. *Oxford science publications. Universidad de Oxford*. pp. 1-3, 32-45.

Hansch C., Leo A.; Hoekman D. (1995). Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants. *ACS, Washington DC*.

Helsby Nuala A., Wheeler S. James, Pruijn Frederik B., Palmer Brian D., Yang Shangjin, Denny William A., and Wilson William R. (2003). Effect of Nitroreduction on the Alkylating Reactivity and Cytotoxicity of the 2,4-Dinitrobenzamide-5-aziridine CB 1954 and the Corresponding Nitrogen Mustard SN 23862: Distinct Mechanisms of Bioreductive. *Chem. Res. Toxicol.*, 16 (4), pp 469-478.

Hernández-Gallegos Z., y Lehmann, PA. (1990). A Free-Wilson/Fujita-Ban analysis and prediction of the analgesic potency of some 3-hydroxy- and 3-methoxy-N-alkylmorphinan-6-one opioids. *J Med Chem*, 33(10), 2813-2817.

Hopewell JL., George GA., Hill DJ. (2000). Analysis of the kinetics and mechanism of the cure of a bismaleimide-diamine thermoset. *Polymer* 41, 8231-8239

Jensen Lars H., Renodon-Corniere Axelle, Wessel Irene, Seppo W. Langer, Søkilde Birgitte, Carstensen Elisabeth V., Sehested Maxwell, and Jensen Peter B. (2002). Maleimide Is a Potent Inhibitor of Topoisomerase II in Vitro and in Vivo: A New Mode of Catalytic Inhibition. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 1353/981199, *Mol Pharmacol* 61:1235–1243.

Johnson SW., Perez, RP., Godwin, AK., Yeung, AT., Handel, LM., Ozols, RF., y Hamilton, TC. (1994). Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*, 47(4), 689-697.

Kaufmann Scott H. (1989). Induction of Endonucleolytic DNA Cleavage in Human Acute Myelogenous Leukemia Cells by Etoposide, Camptothecin, and Other Cytotoxic Anticancer Drugs: A Cautionary Note1. *CANCER RESEARCH* 49, 5870-5878.

Kirschner LS., Greenberger, LM., Hsu, SI., Yang, CP., Cohen, D., Piekarz, RL., Horwitz, SB. (1992). Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells. *Biochem Pharmacol*, 43(1), 77-87.

Lazcano-Ponce EC., Nájera-Aguilar, P., Alonso de Ruiz, P., Buiatti, E., y Hernández-Ávila, M. (1996). Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. I. Diagnóstico situacional. *Rev Inst Nal Cancerol Méx*, 42(3), 123-140.

Majumder P, Banerjee A, Shandilya J, Senapati P, Chatterjee S. (2013). Minor Groove Binder Distamycin Remodels Chromatin but Inhibits Transcription. *PLoS ONE* 8(2): e57693.

Martínez R., y Chacon-García L. (2005). The search of DNA-Intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Current Medicinal Chemistry*, 12(2), 127-151.

Méndez Francisco, Galván Marcelo, Garritz Andoni, Vela Alberto, Gàzquez José. (1992). Local softness and chemical reactivity of maleimide: nucleophilic addition. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 277, 10, Pages 81–86.

Nathan P. Joseph, Mendoza V., García G. Esther. (1973). Aziridine Induced Isomerization of Isomaleimides to Maleimides. *Can. J. Chem.*, 52, 129.

Norton JT, Witschi MA, Luong L, Kawamura A, Ghosh S, Stack MS, Sim E, Avram MJ, Appella DH, Huang S. (2008). Synthesis and anticancer activities of 6-amino amonafide derivatives. *Anticancer Drugs*.19(1):23-36.

Paul A., y Bhattacharya, S. (2012). Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. *Current Science*, 102(2), 212-231.

Pearson, R. G. (1963). *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3533.

Programa de acción específico 2007-2012. Cáncer de mama. (2008). Retrieved 7 de enero de 2011, from Secretaria de Salud (SSA) <http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos/cancer-de-mama.html>.

Sami SM, Dorr RT, Alberts DS, Sólyom AM, Remers WA. (2000). Analogues of amonafide and azonafide with novel ring systems. *J Med Chem.* 10;43(16):3067-73.

Shen Gang, Horgan Adrian, Levicky Rastislav. (2004). Reaction of *N*-phenyl maleimide with aminosilane monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35, 59–65.

Spicer J. A., Gamage, S. A., Atwell, G. J., Finlay, G. J., Baguley, B. C., y Denny, W. A. (1997). Structure-activity relationships for acridine-substituted analogues of the mixed topoisomerase I/II inhibitor N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide. *J Med Chem*, 40(12), 1919-1929.

Rajski SR, Williams RM. (1998). DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chem Rev*, 98, 2723–2795.

Todd A. K., Adams, A., Thorpe, J. H., Denny, W. A., Wakelin, L. P., y Cardin, C. J. (1999). Major groove binding and 'DNA-induced' fit in the intercalation of a derivative of the mixed topoisomerase I/II poison N-(2-(dimethylamino)ethyl)acridine-4-carboxamide (DACA) into DNA: X-ray structure complexed to d(CG(5-BrU)ACG)2 at 1.3-Å resolution. *J Med Chem*, 42(4), 536-540.

Uytterhoeven Koen, Sponer Jiri and Meervelt Luc Van. (2002). Two 1:1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG). *Eur. J. Biochem.* 269, 2868–2877.

Van Iersel, M. L. P.; Jan-Peter, H. T.; Ploemen, M.; Federici, G.; Van Bladeren, P. J. (1997). Interactions of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem.-Biol. Interact.* 108, 67-78.

Vogelstein B., Kinzler K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10: 789-799.

Wemmer D. E., y Dervan, P. B. (1997). Targeting the minor groove of DNA. *Curr Opin Struct Biol*, 7(3), 355-361.

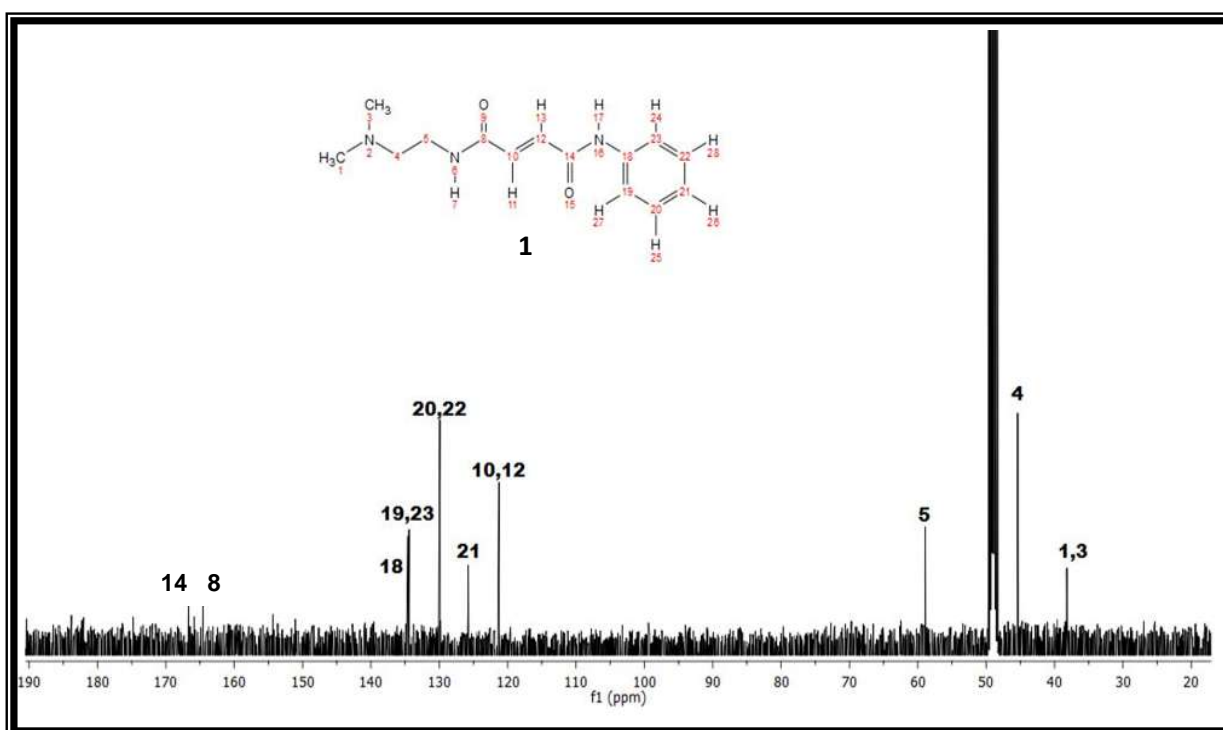
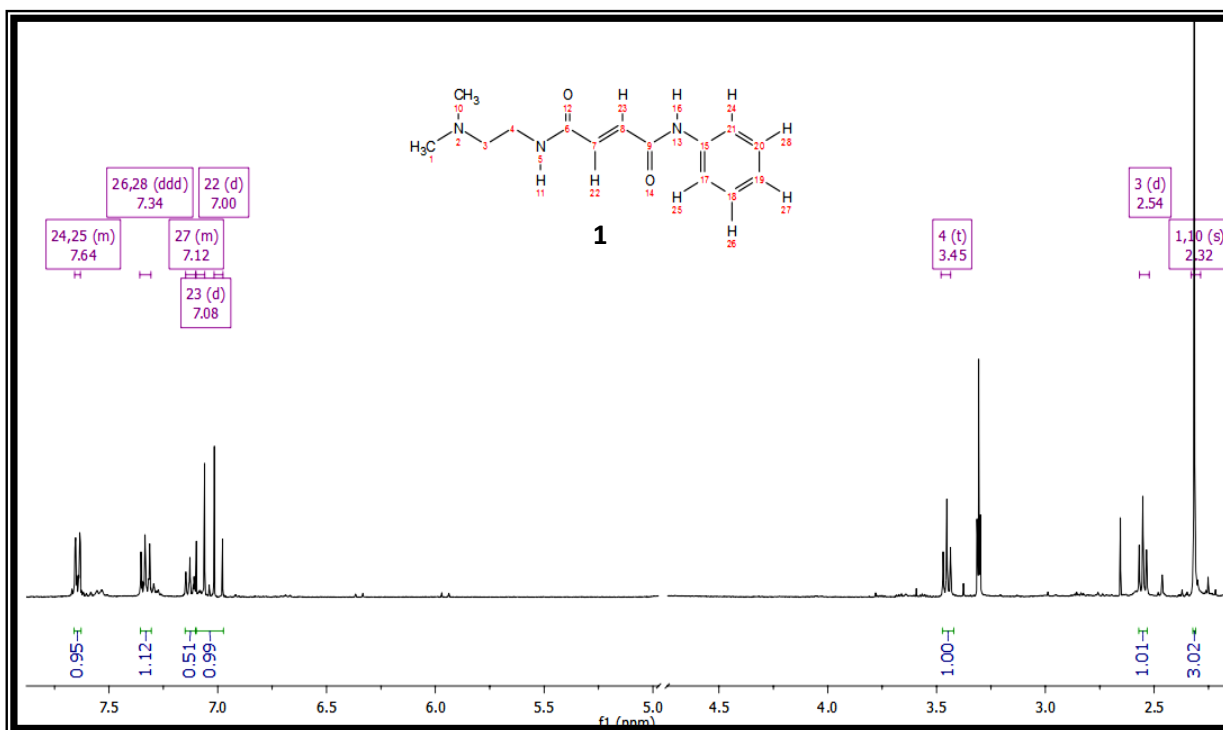
White JE, Snider DA. (1984). *J Appl Polym Sci*, 29, 891.

Woods CR, Faucher N, Eeschgfaller B, Bair KW, Boger D. (2002). Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogues. *Bioorg Med Chem Lett*;12, 2647–2650.

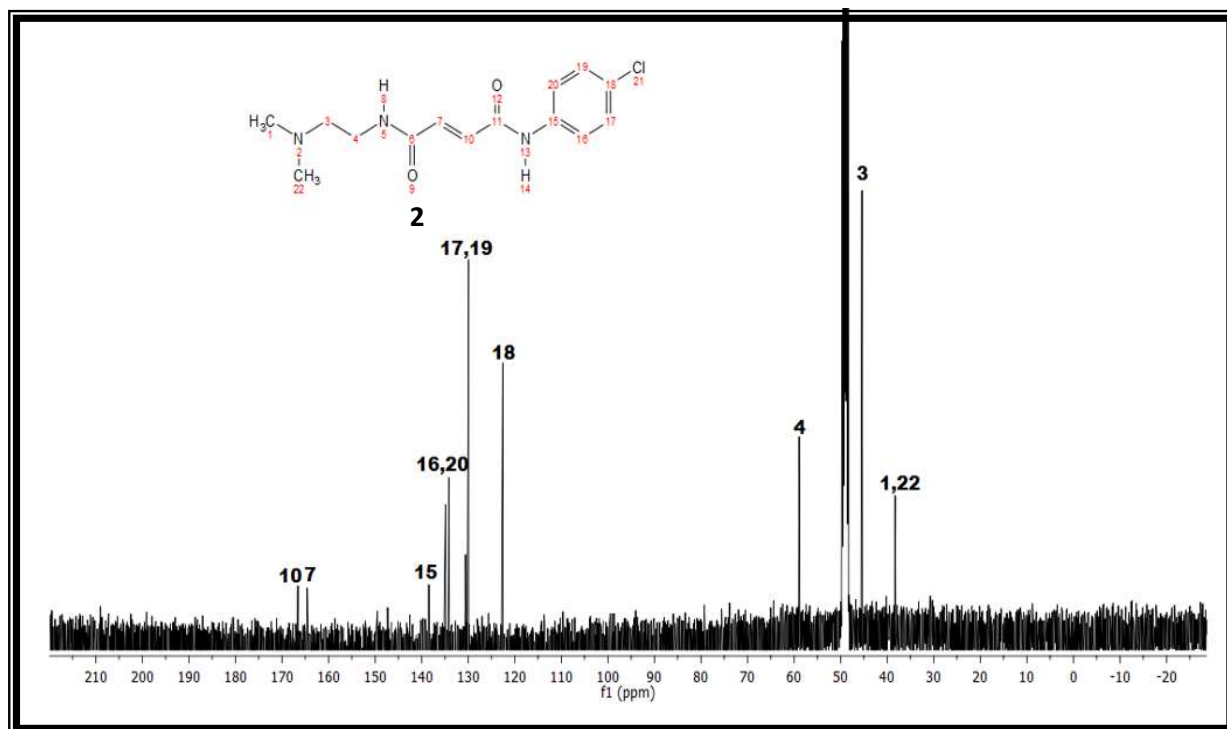
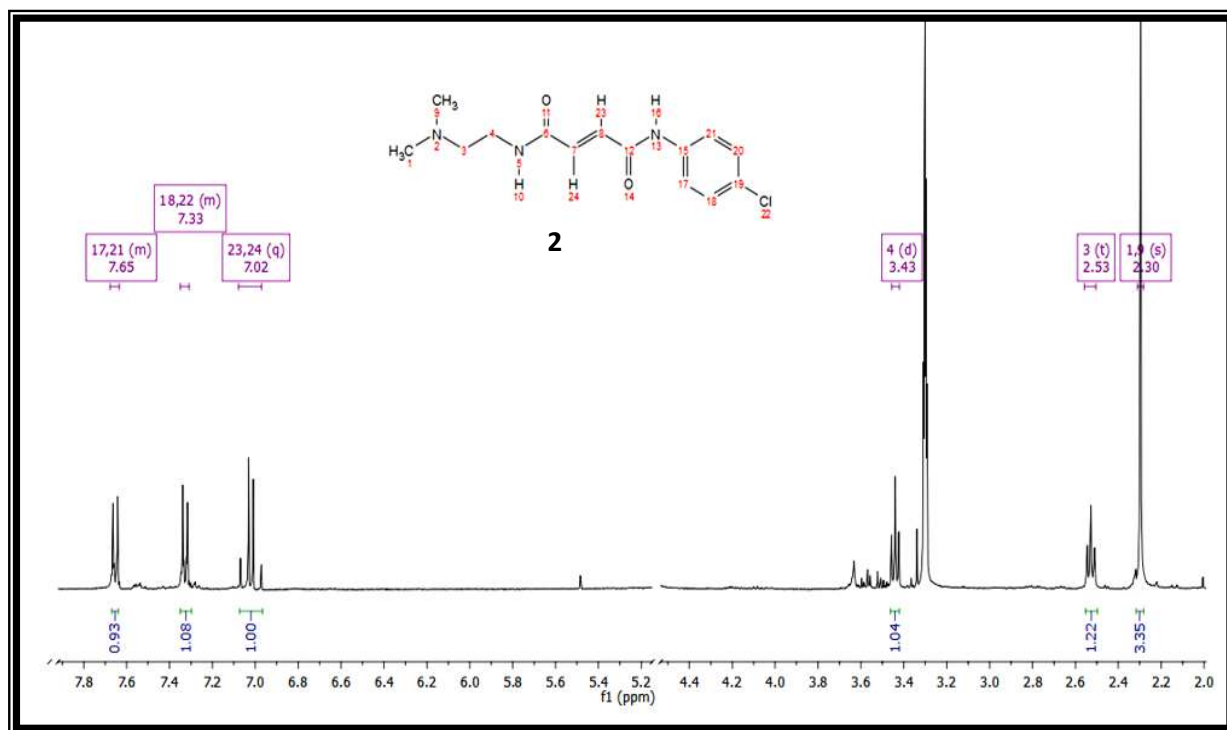
Zavala-Franco A., González-Campos, J. B., y Chacón-García, L. (2010). Estudio QSAR por algoritmos genéticos de reconocedores de surco DNA. *Biológicas*, 12(2), 108-115.

# **ANEXOS**

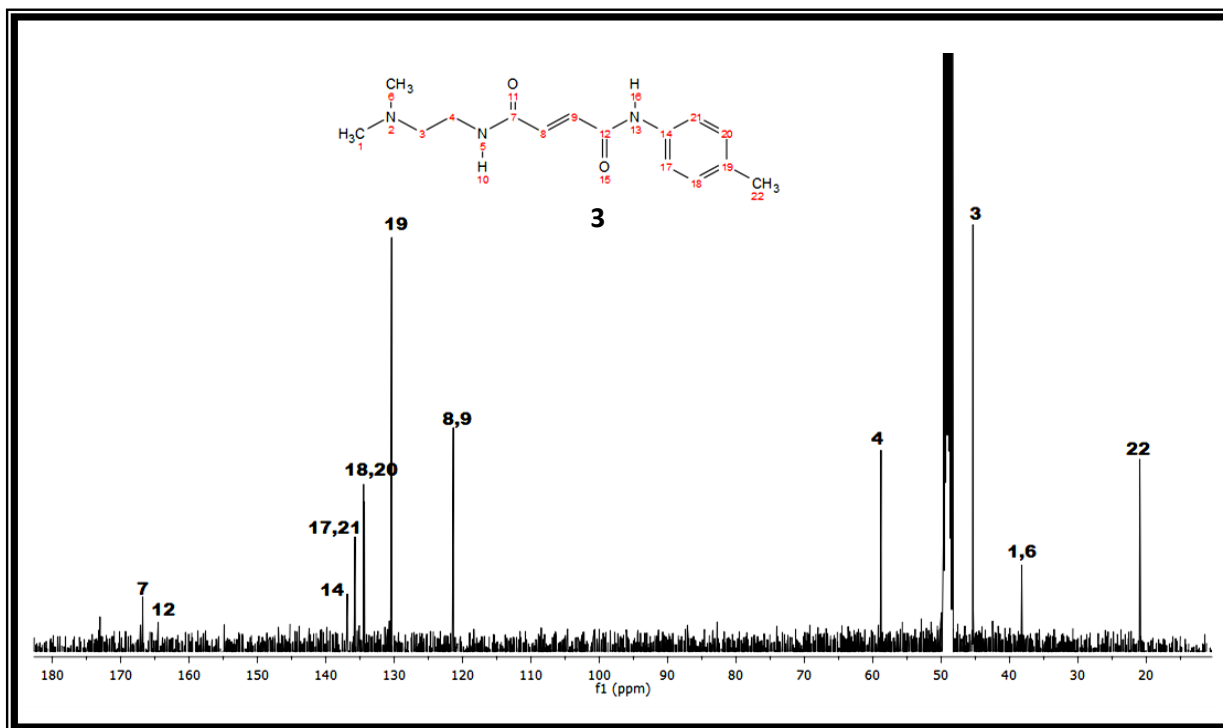
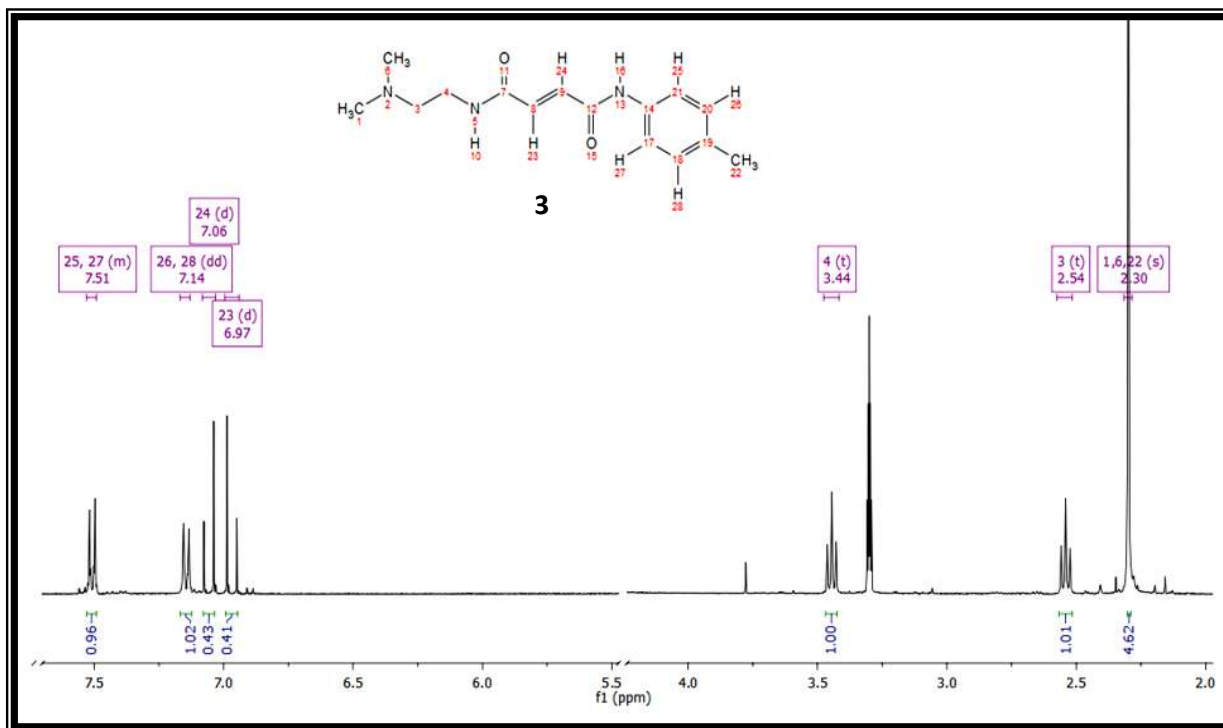
## **ESPECTROS DE RMN de $^1\text{H}$ , RMN de $^{13}\text{C}$**



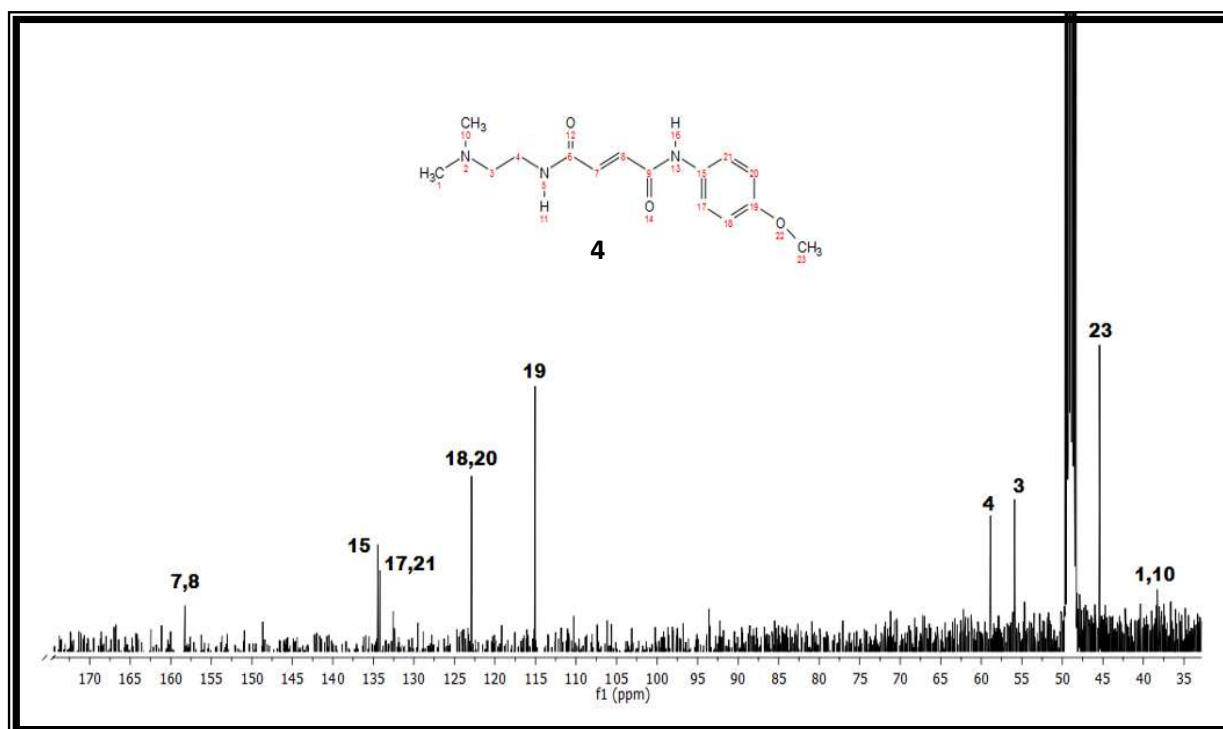
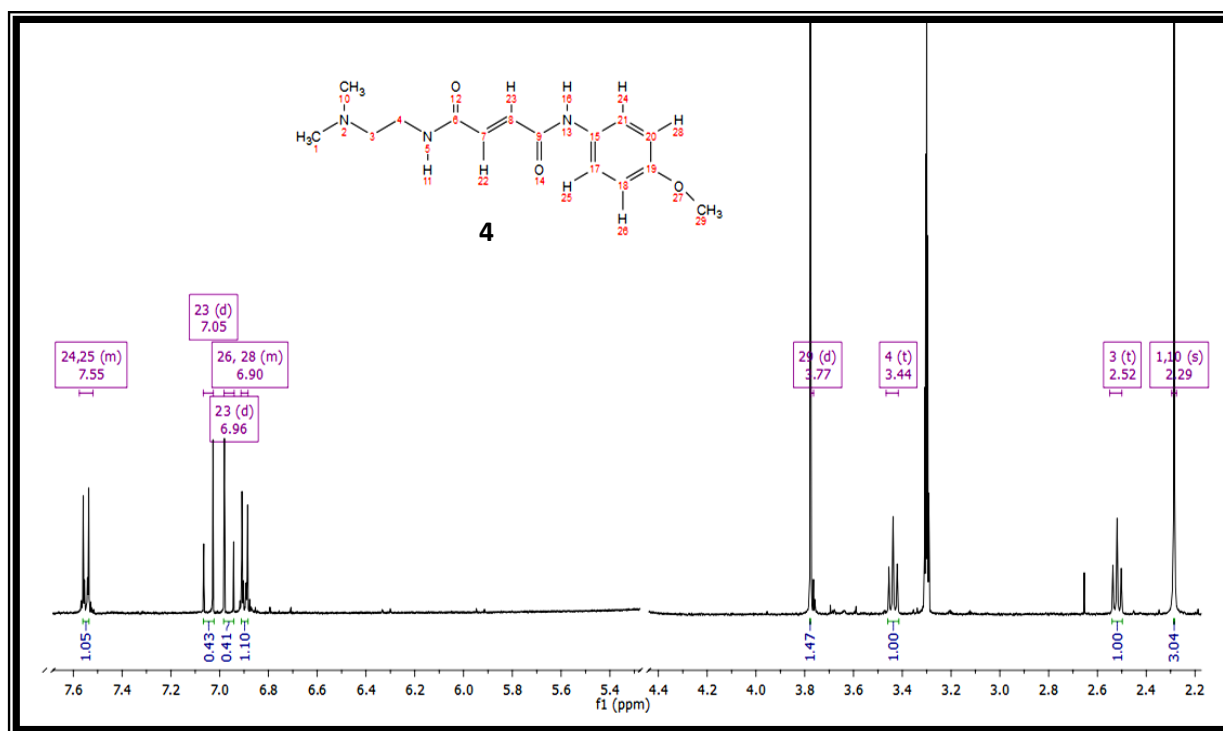
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 1.



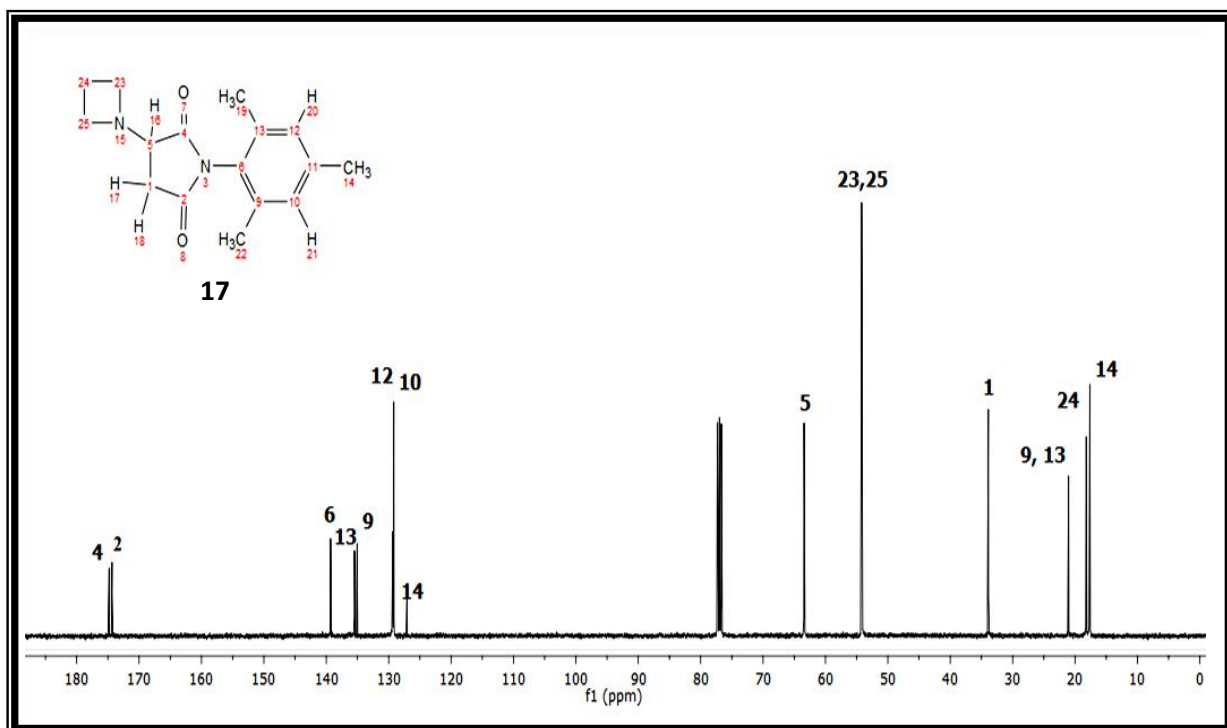
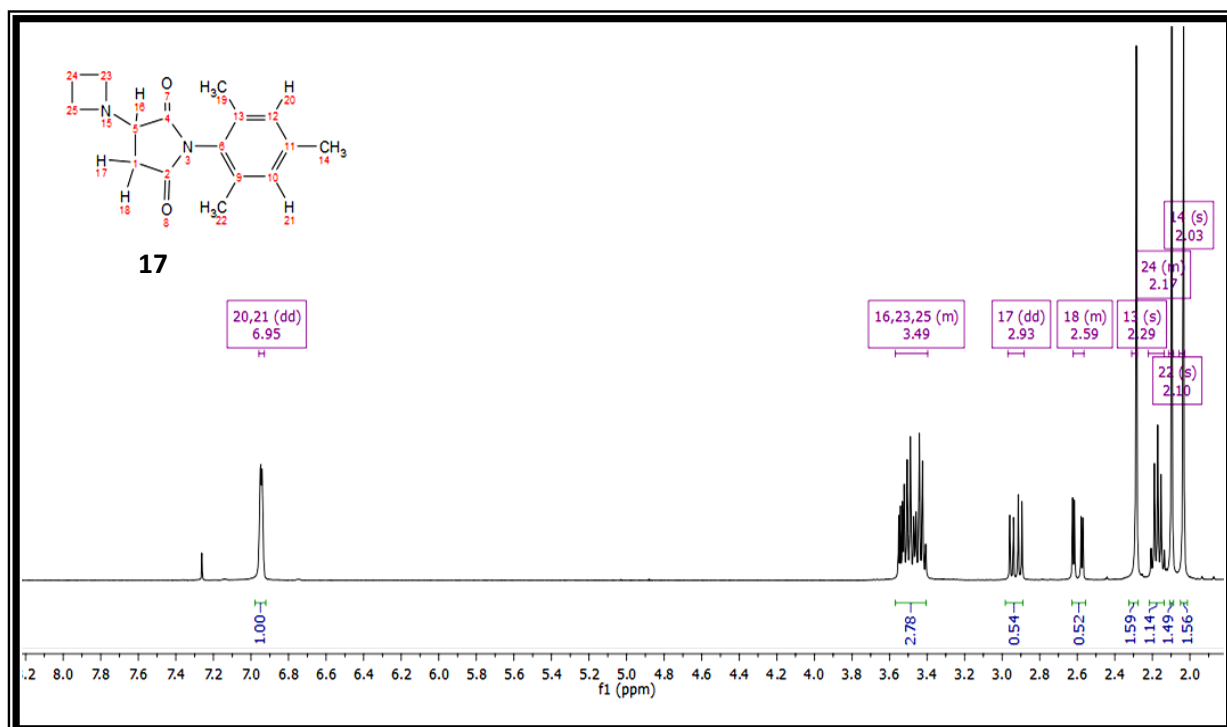
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 2.



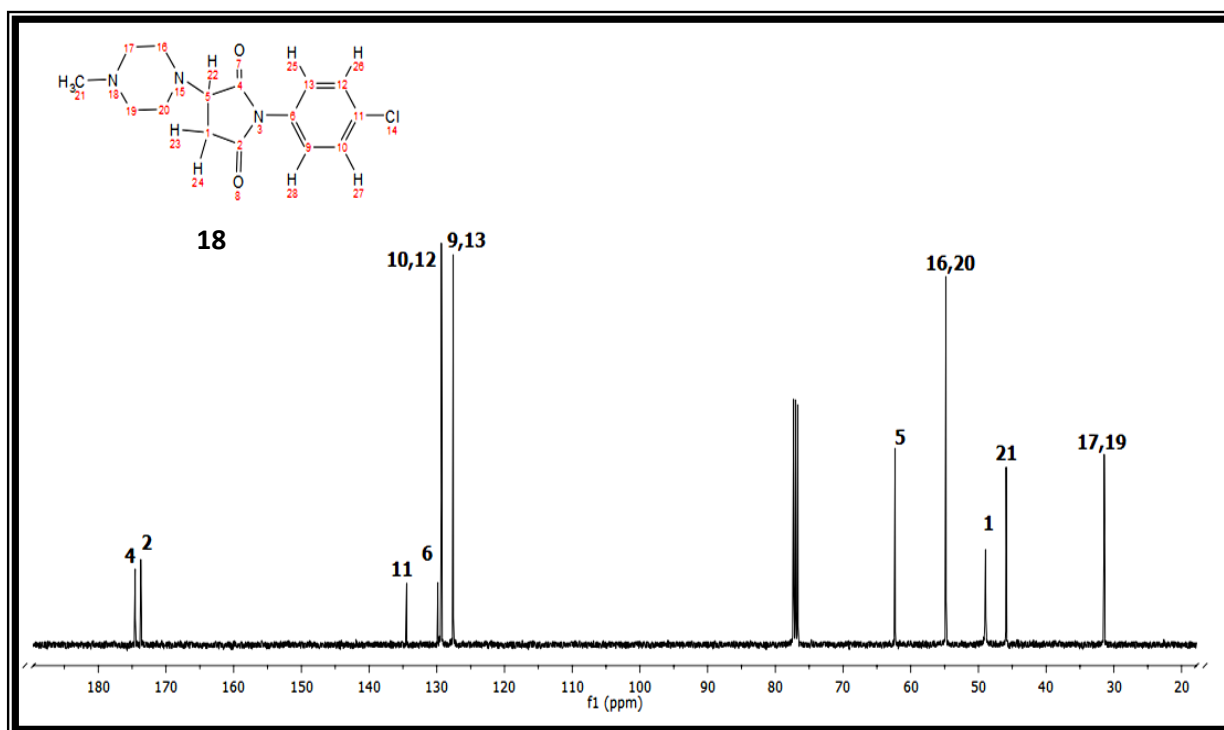
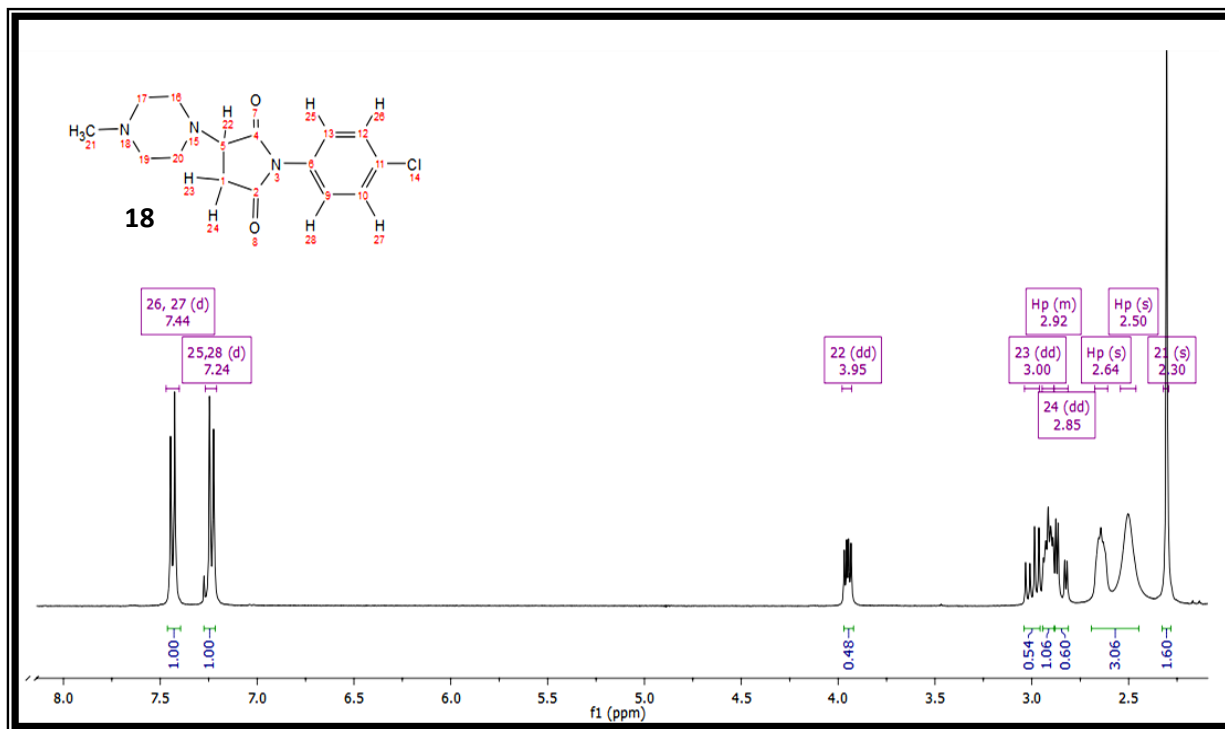
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 3.



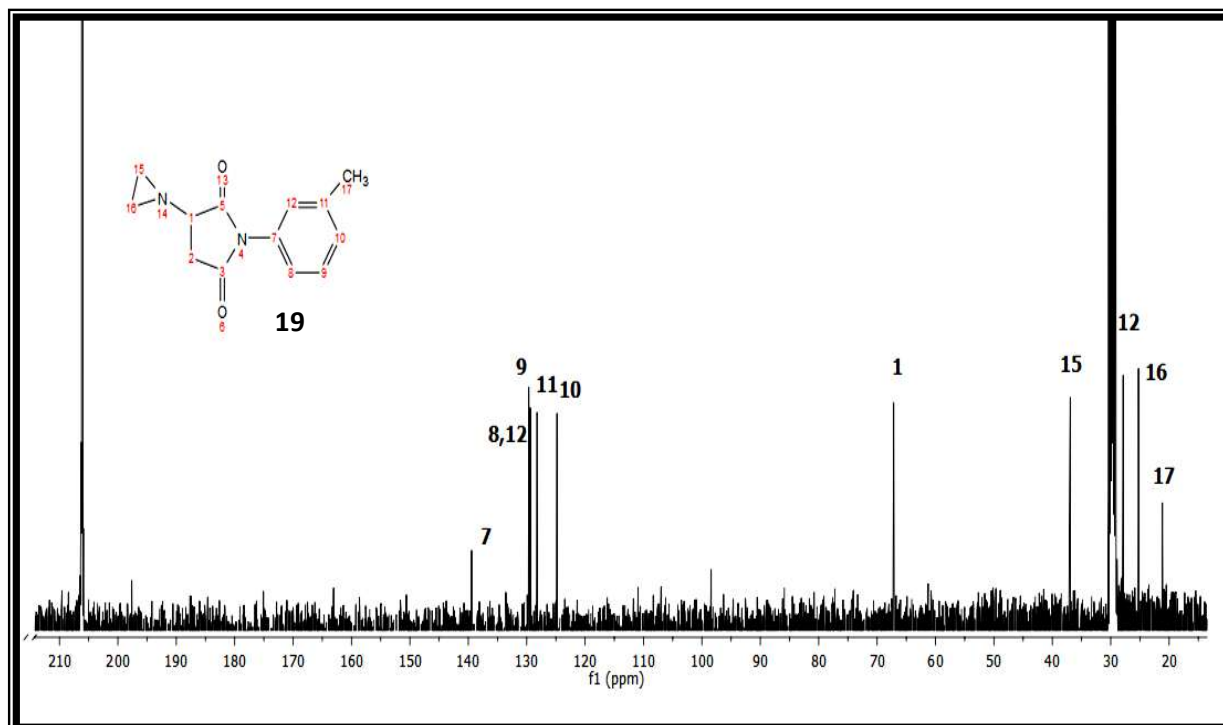
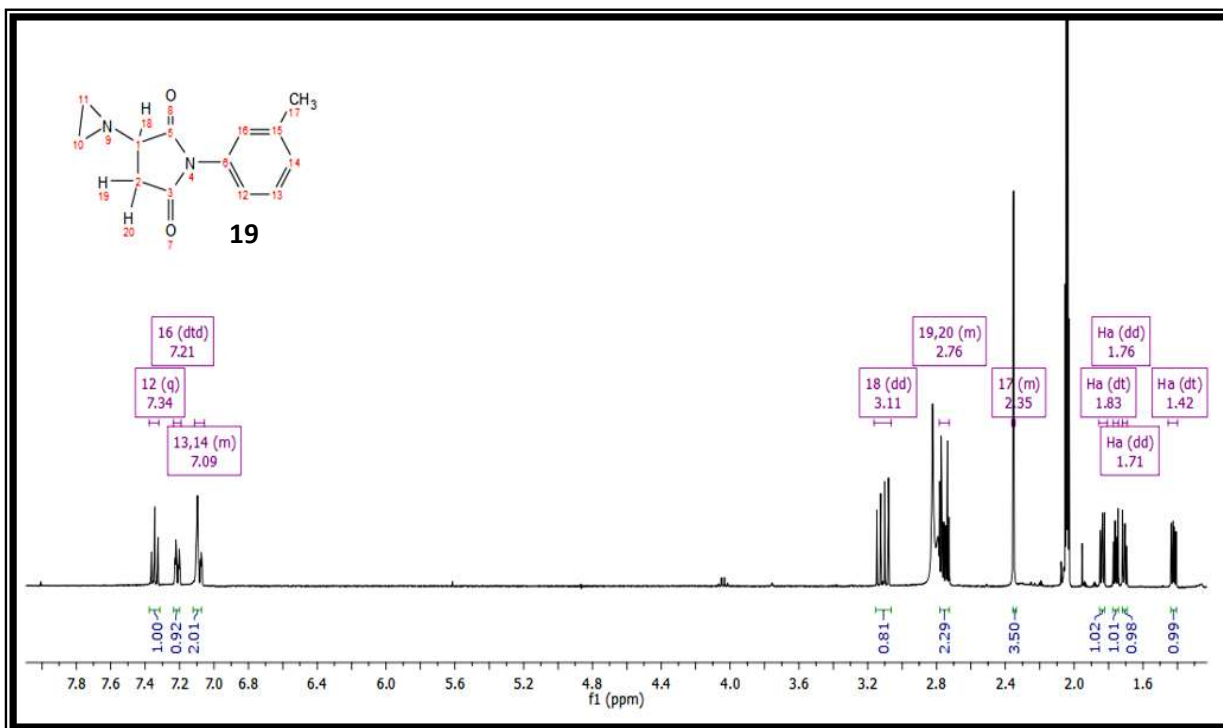
Spectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 4.



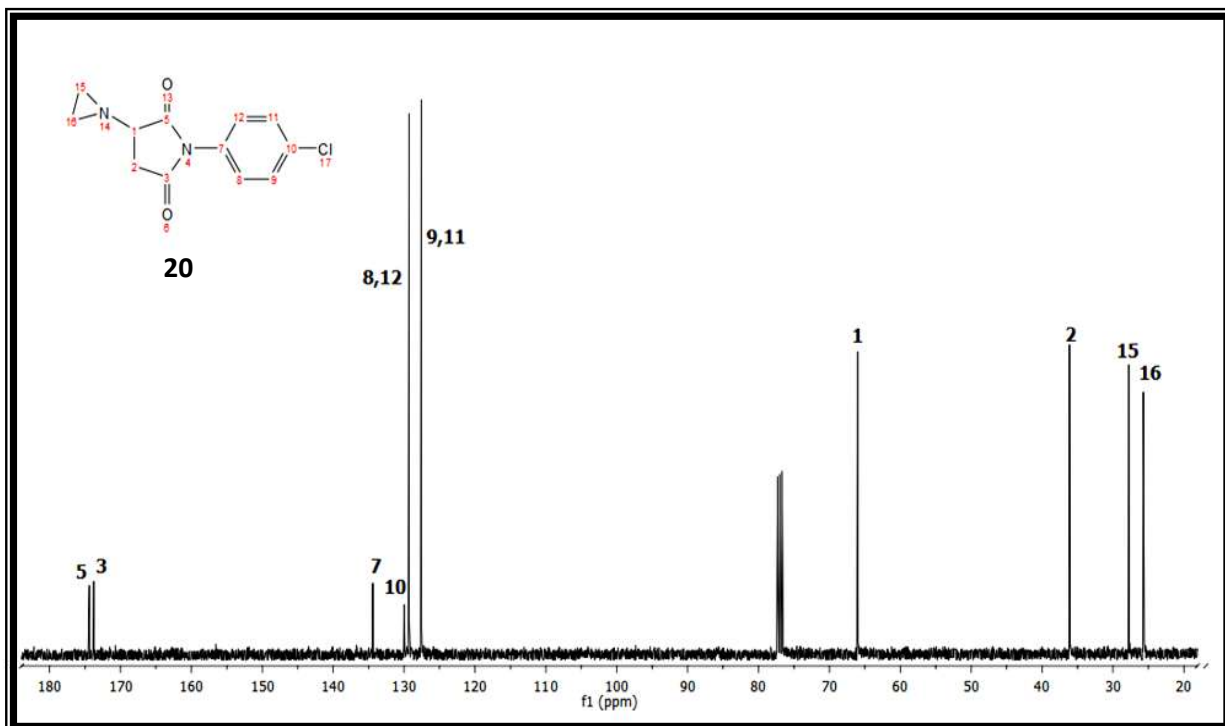
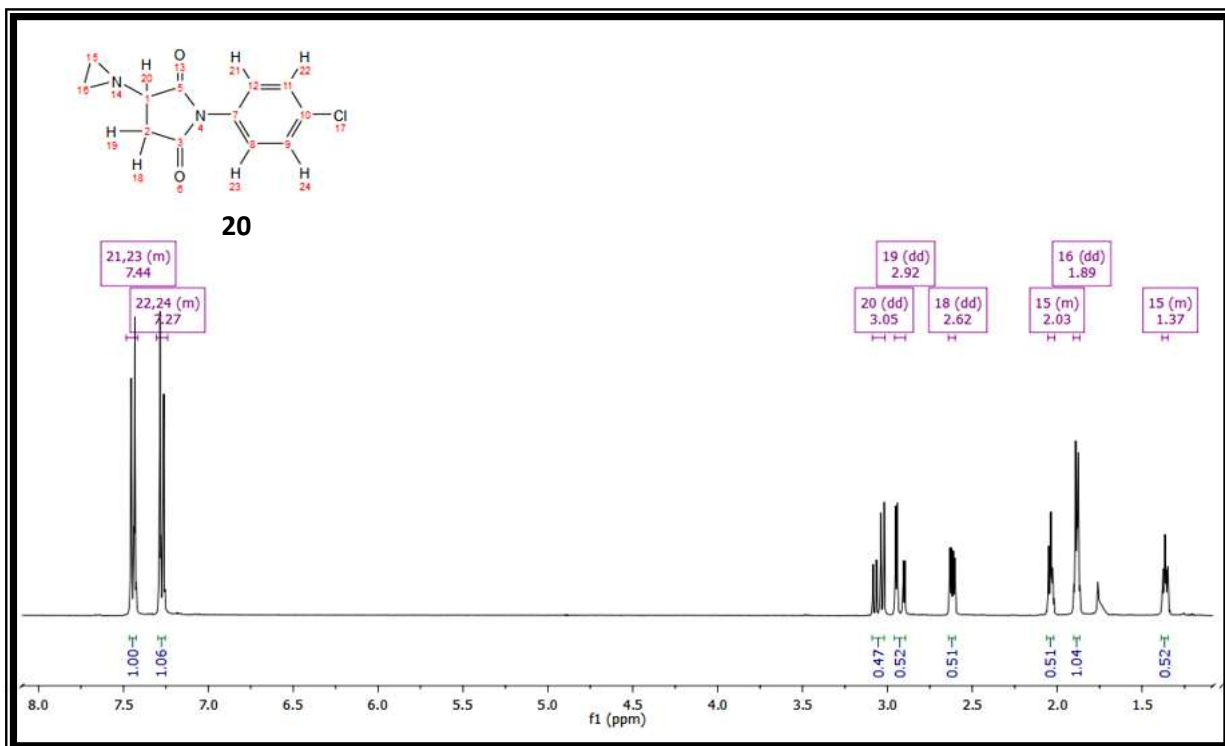
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 16.



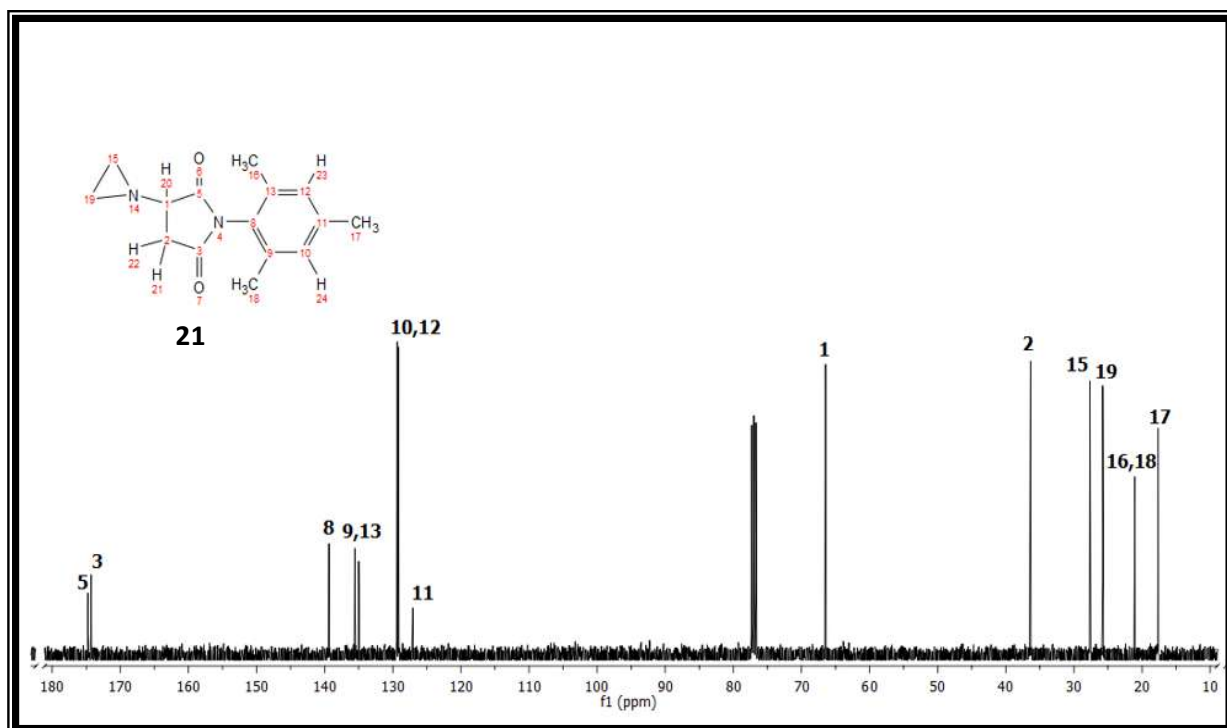
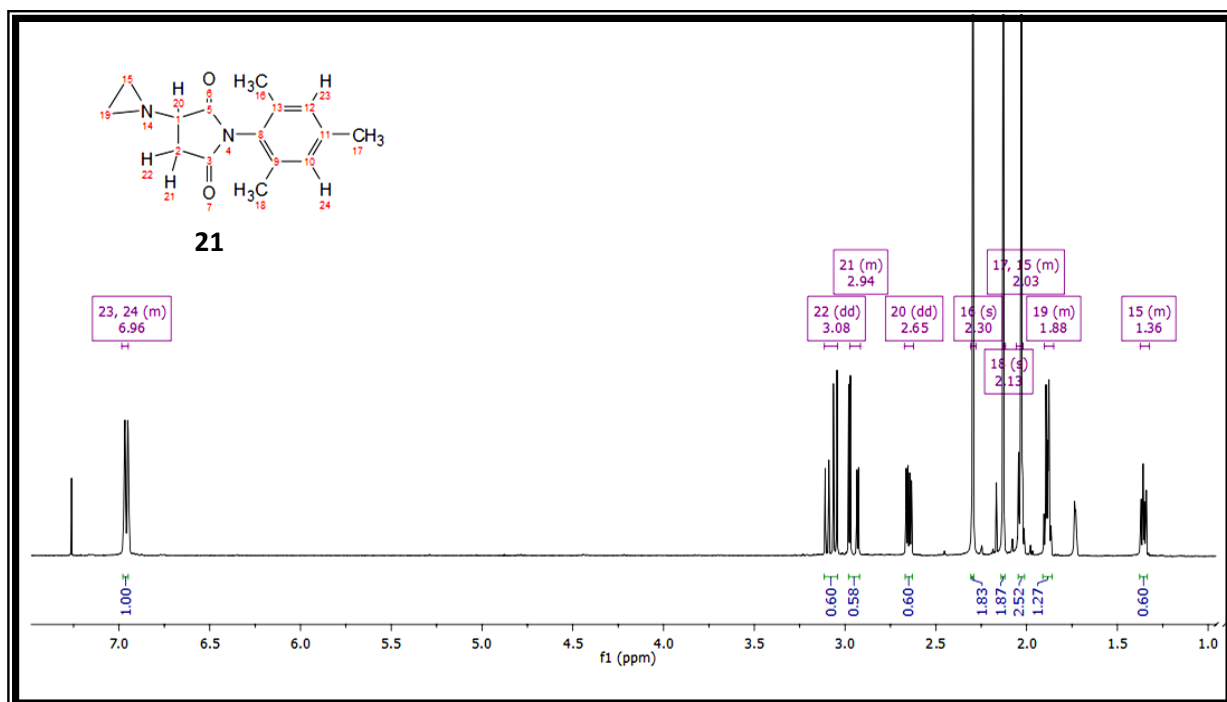
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 18.



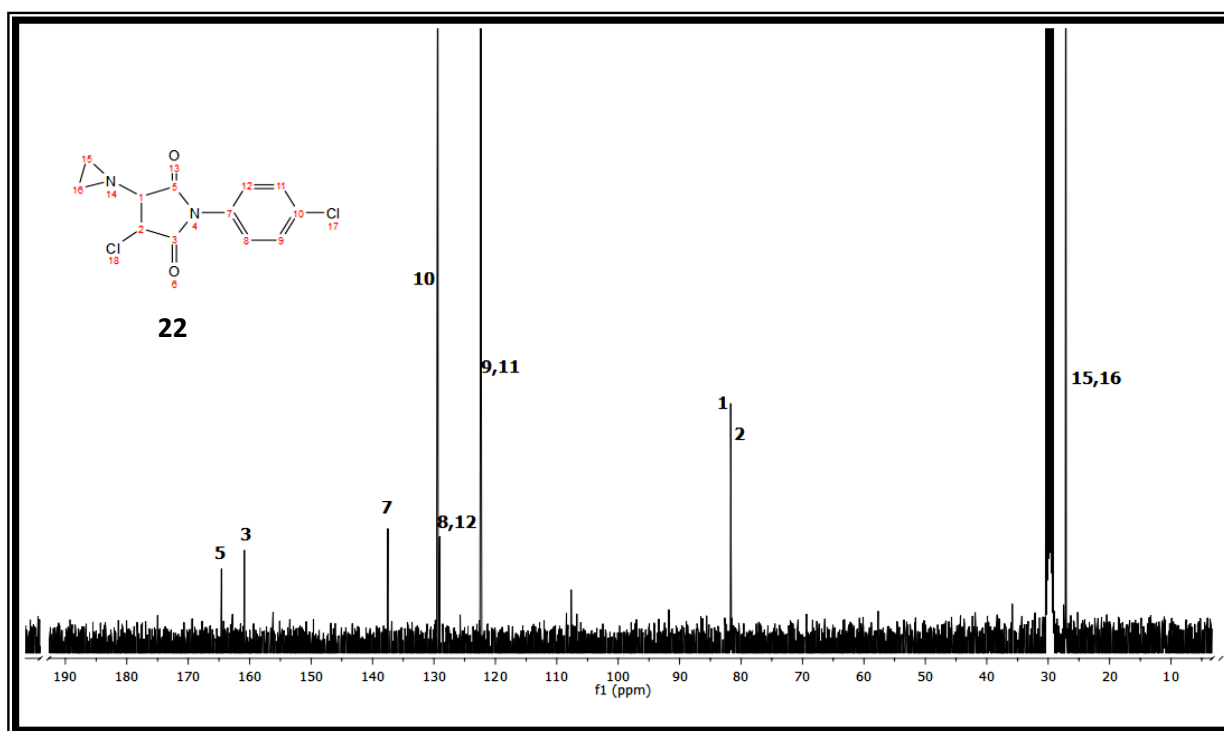
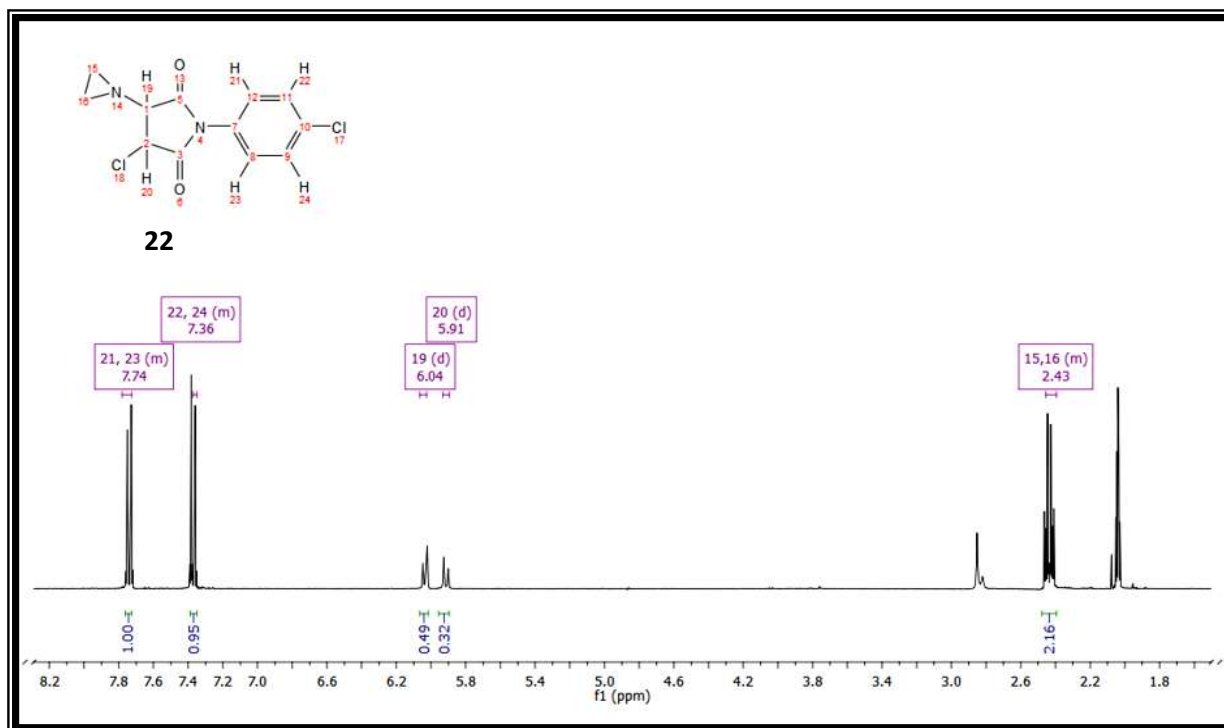
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 19.



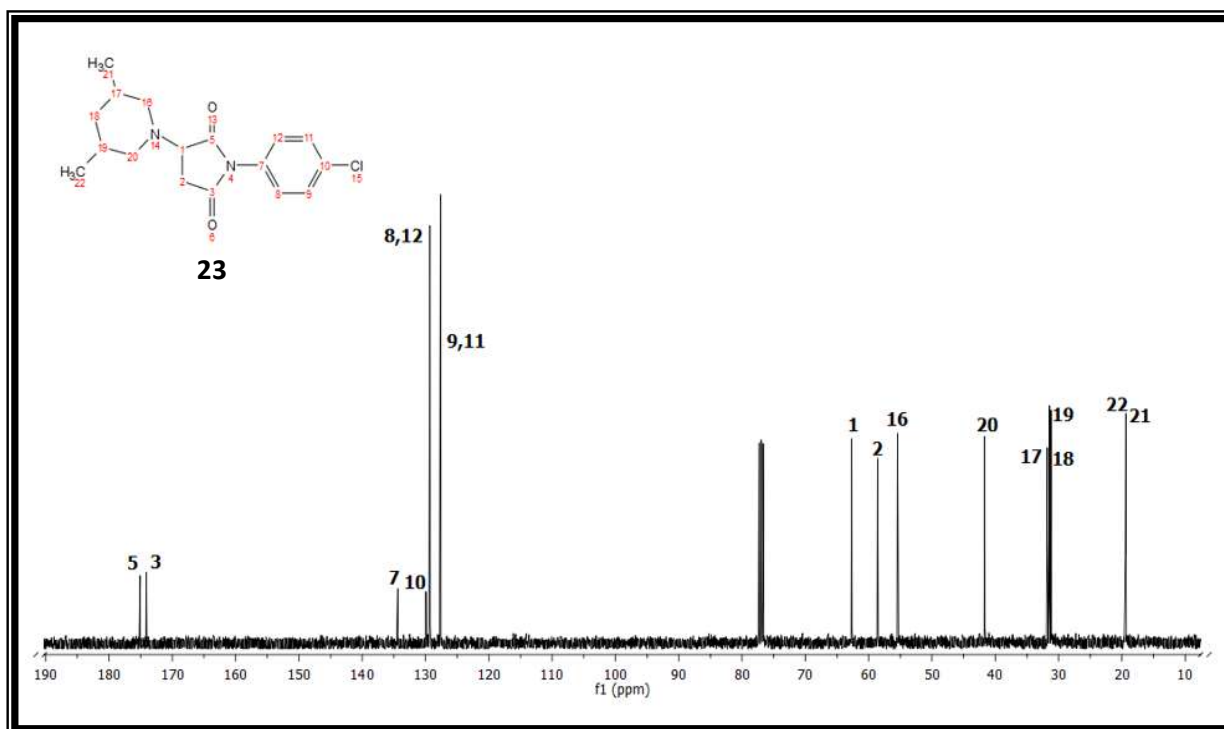
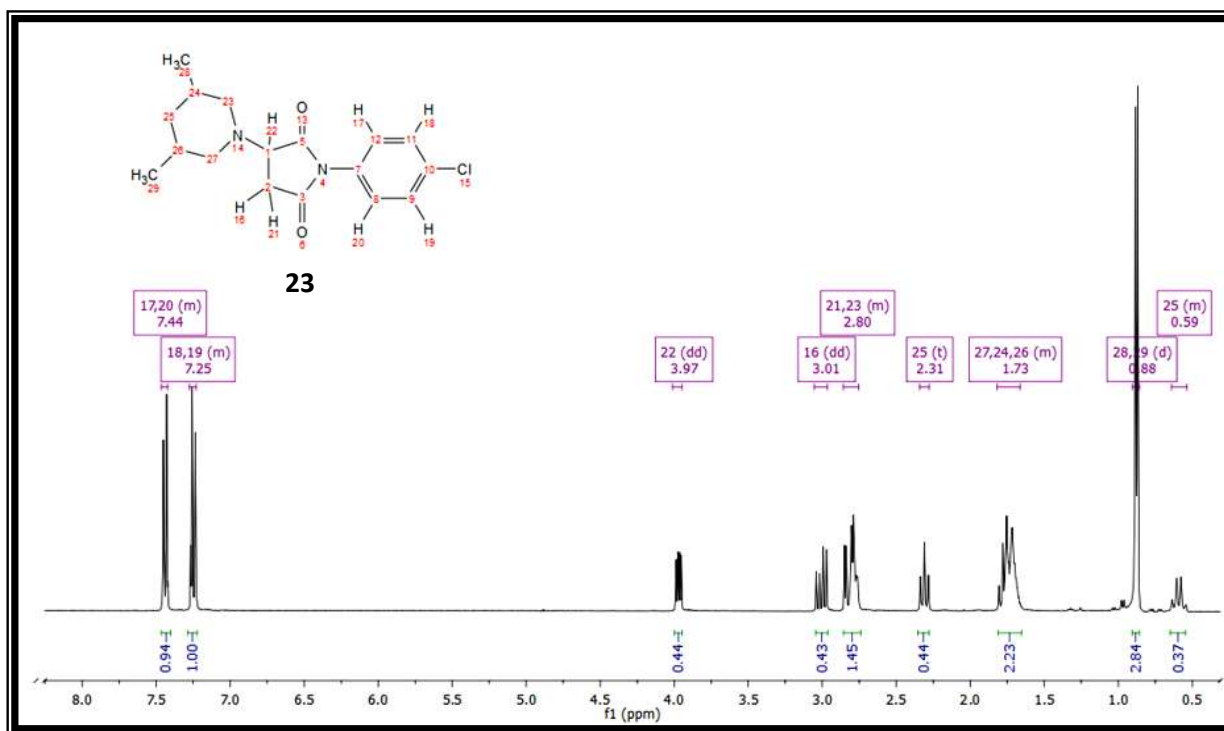
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 20.



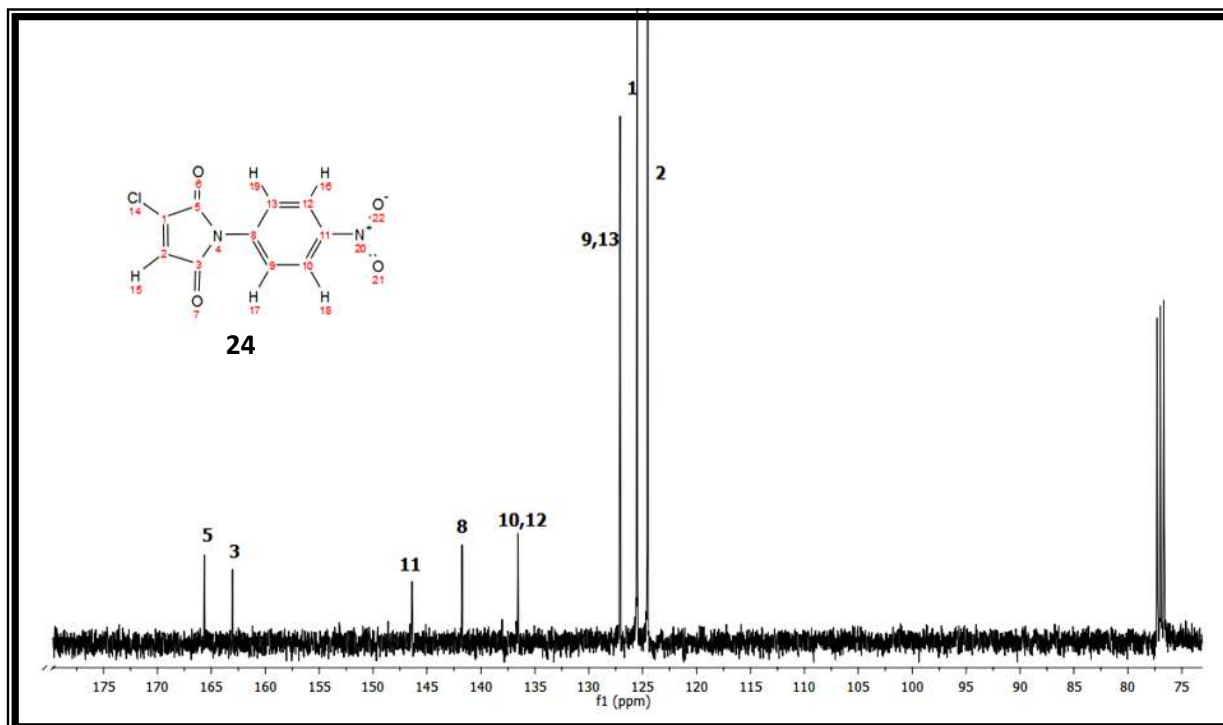
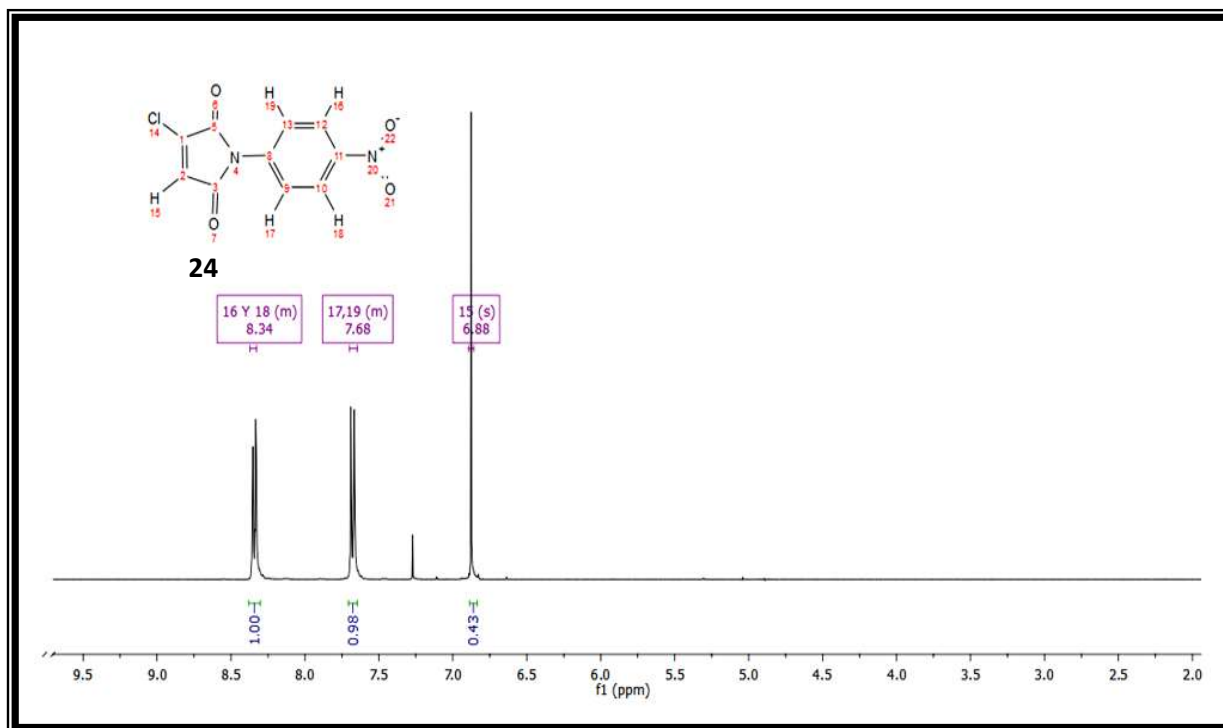
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 21.



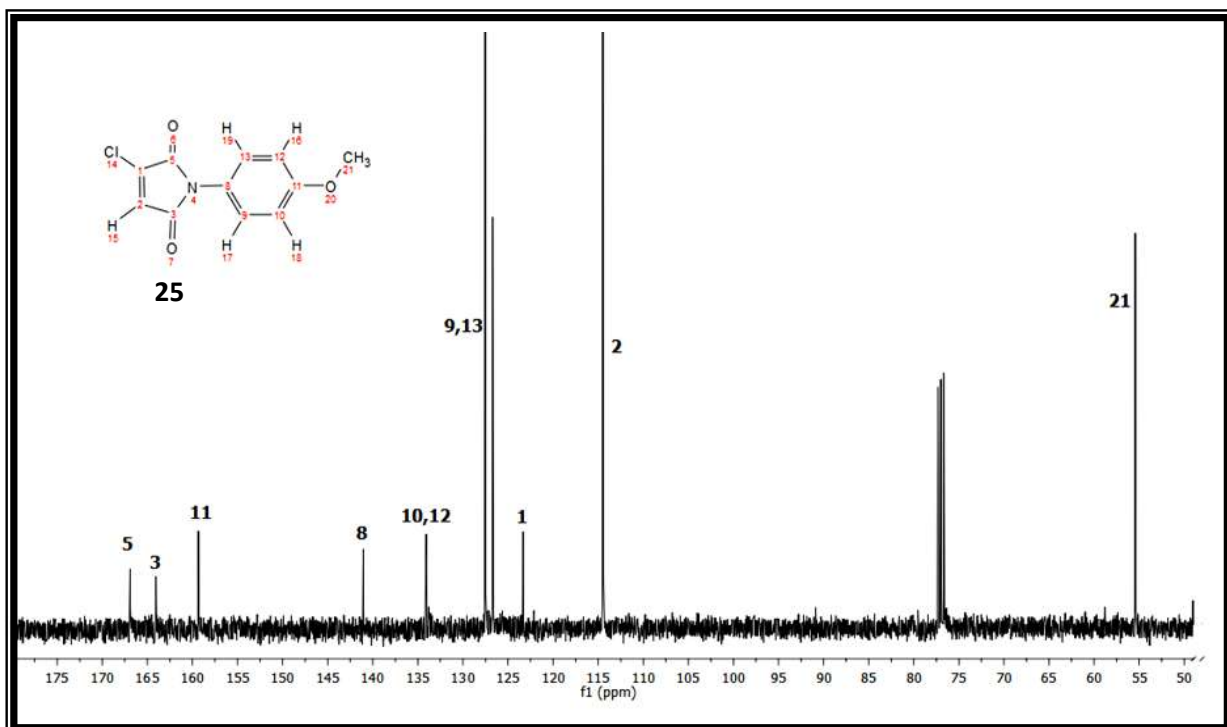
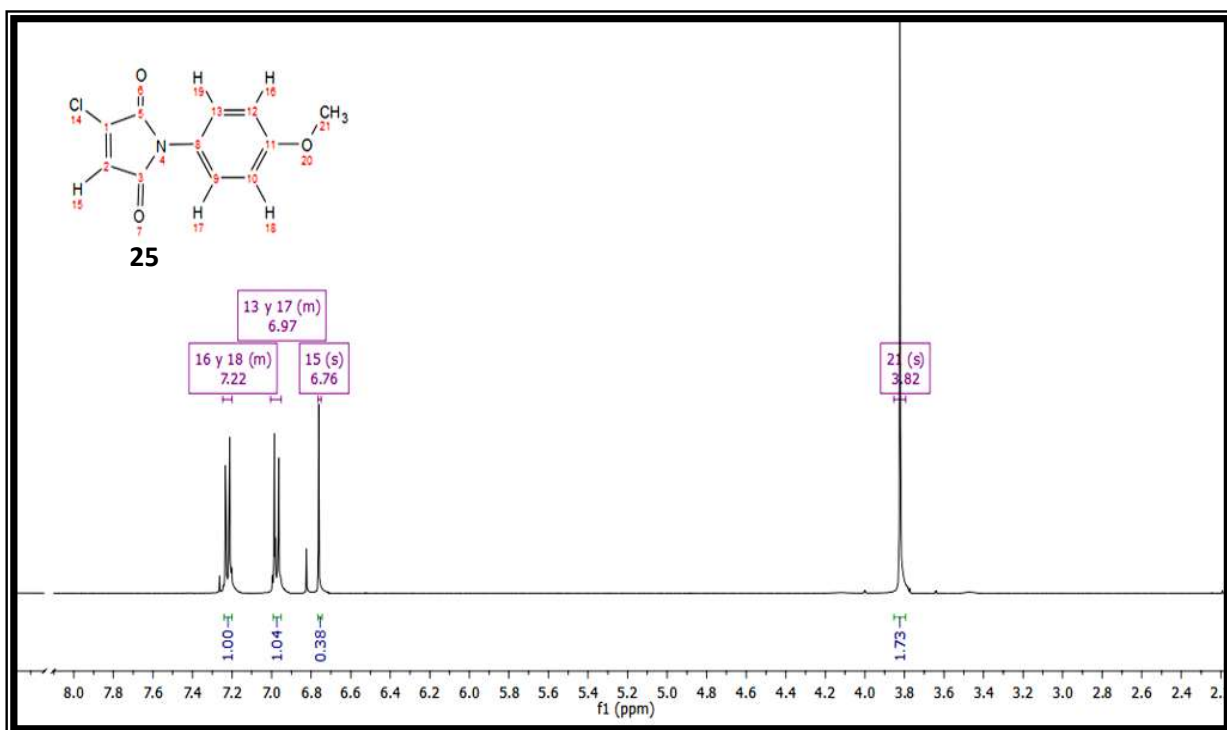
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 22.



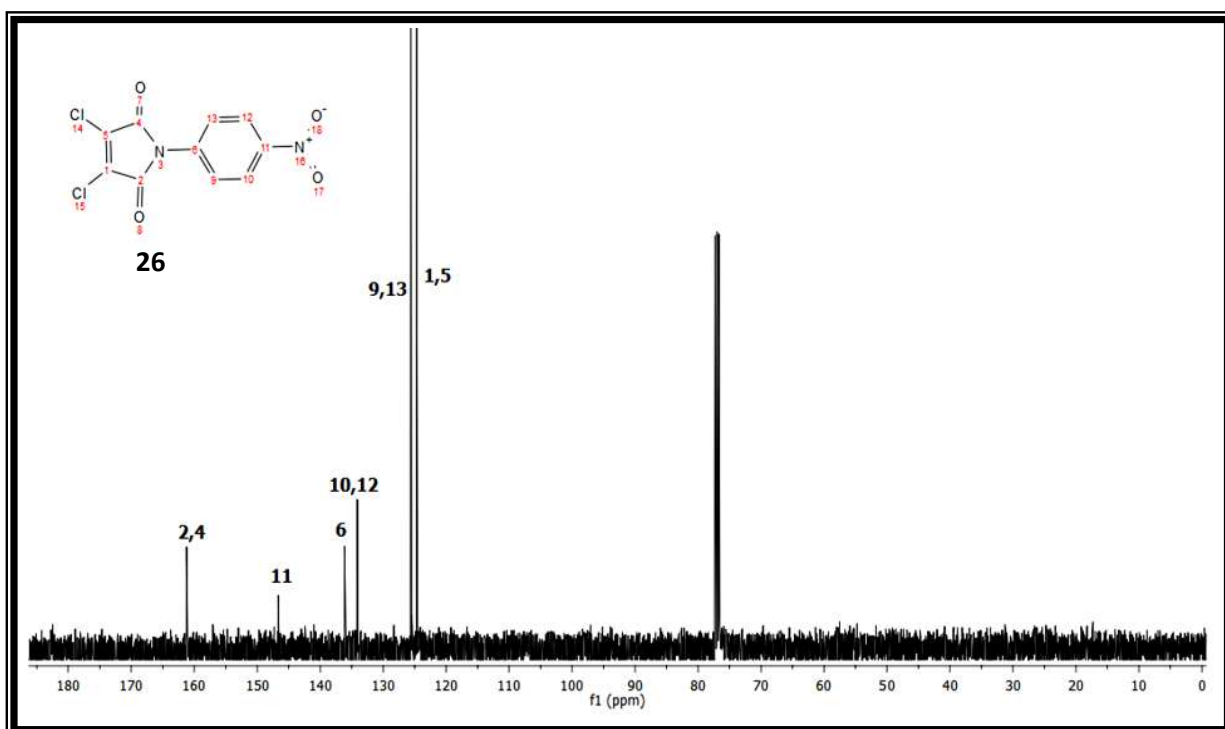
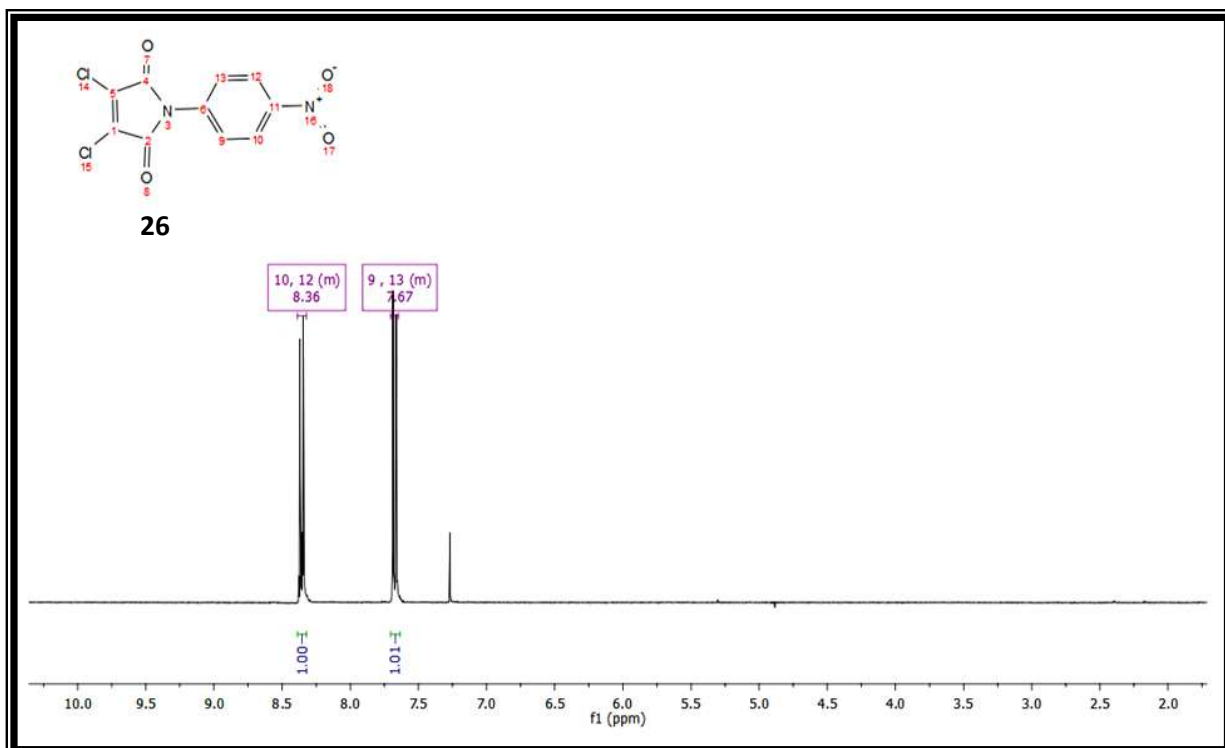
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 23.



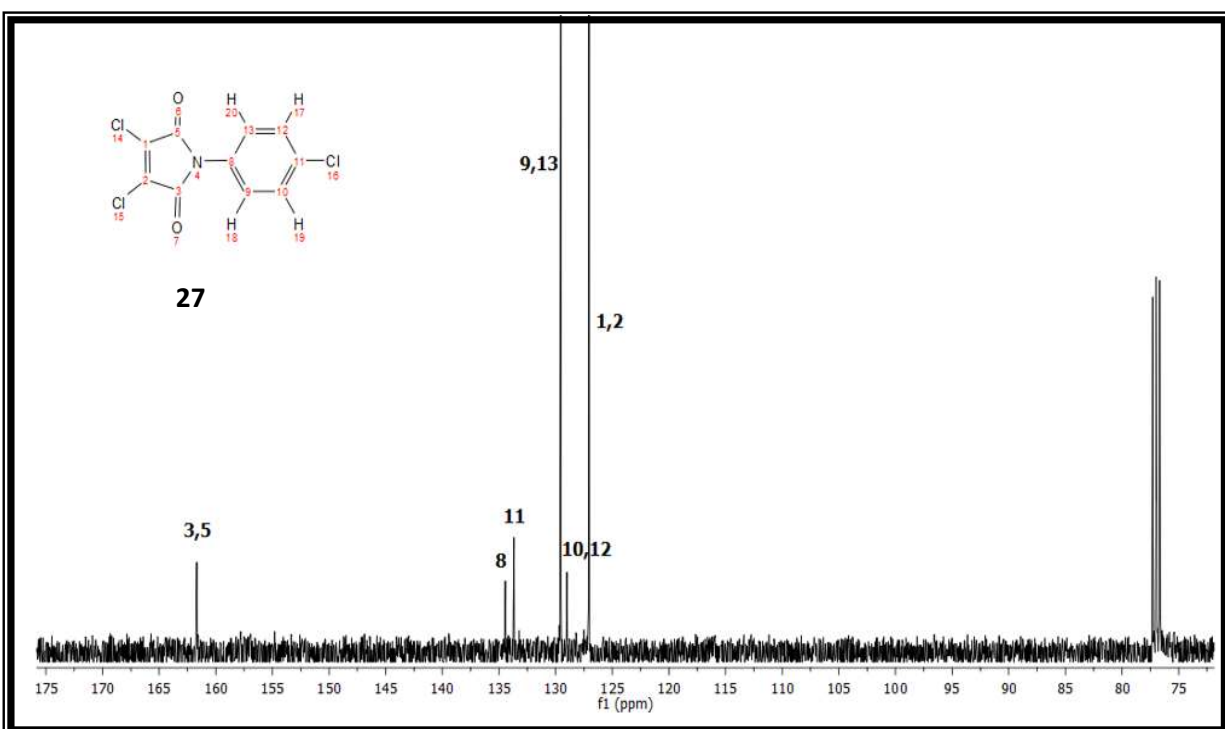
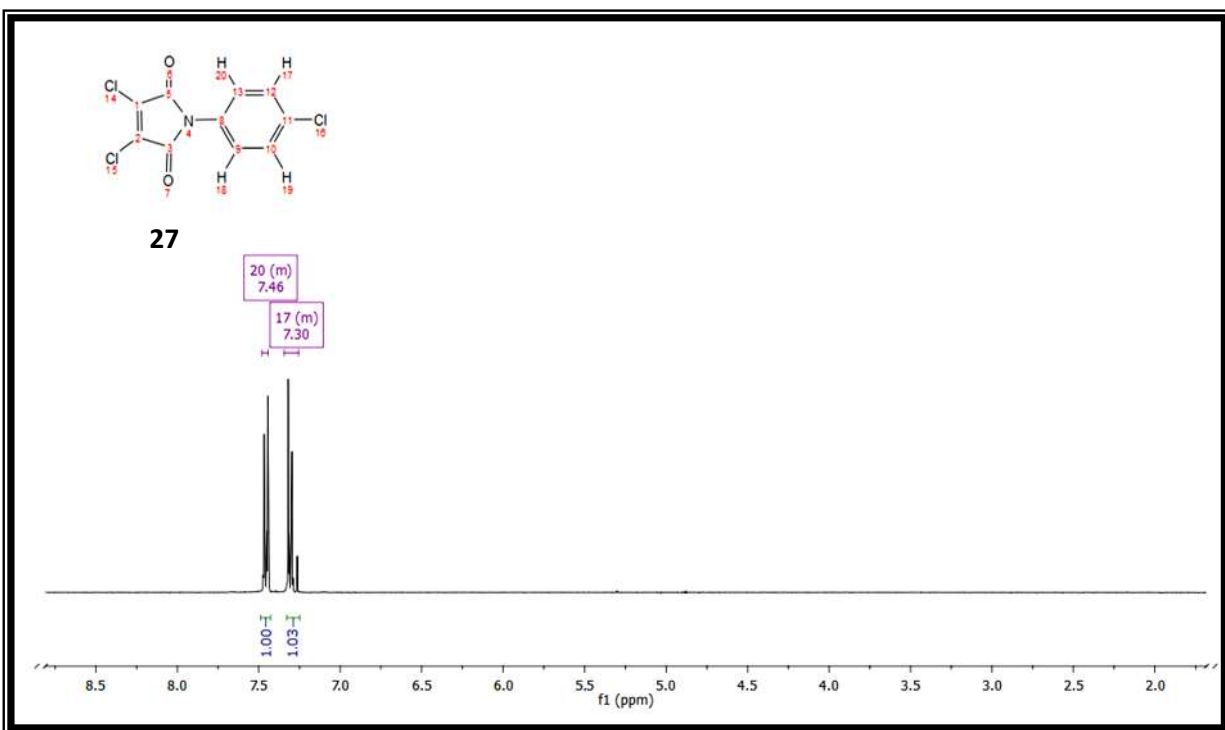
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 24.



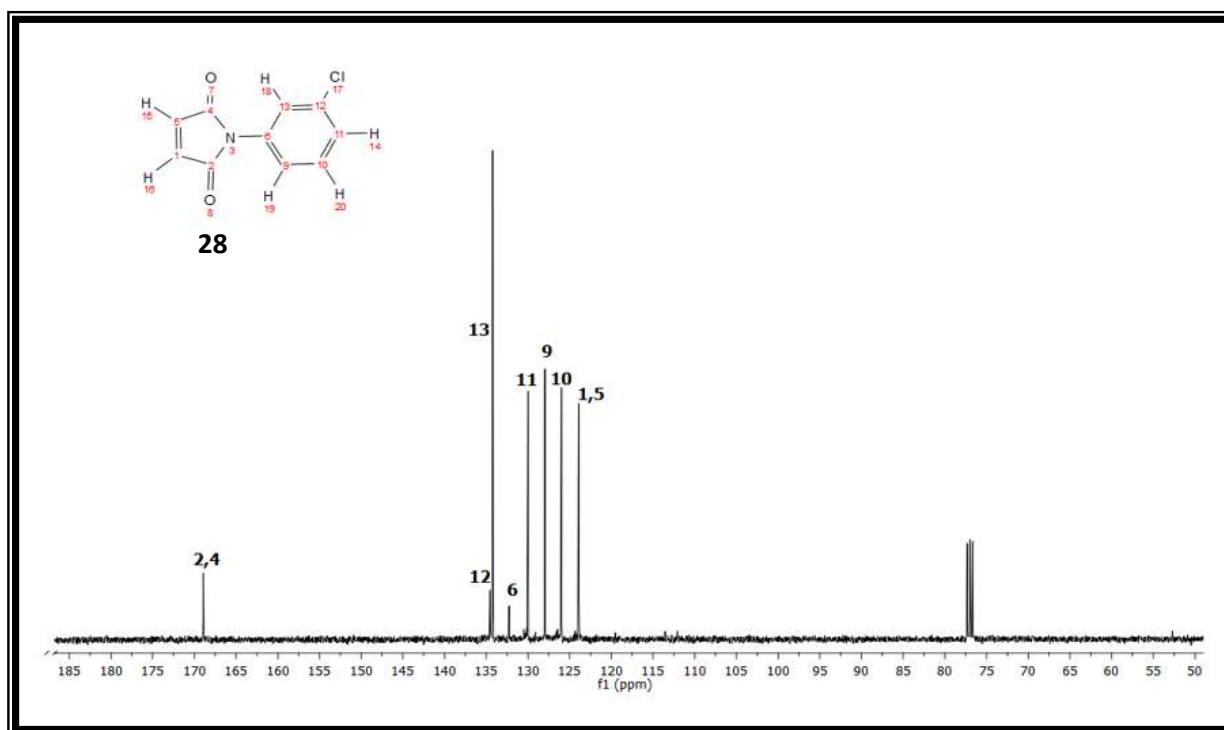
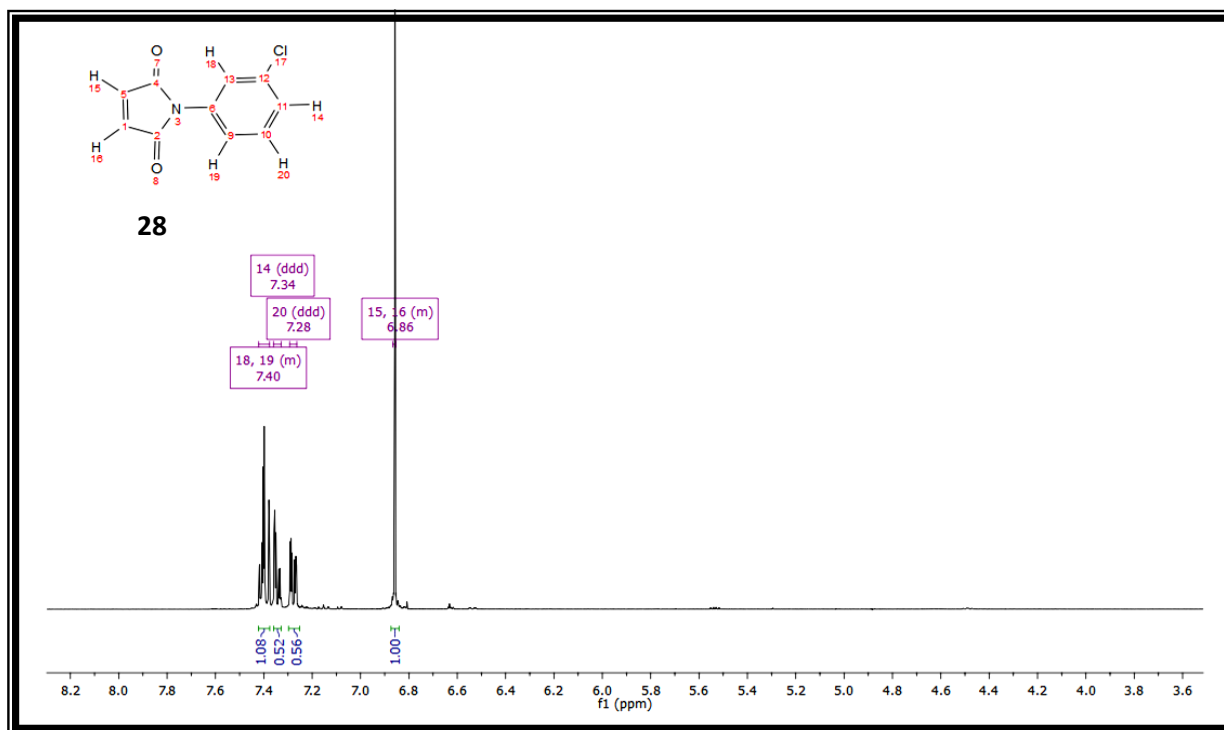
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 25.



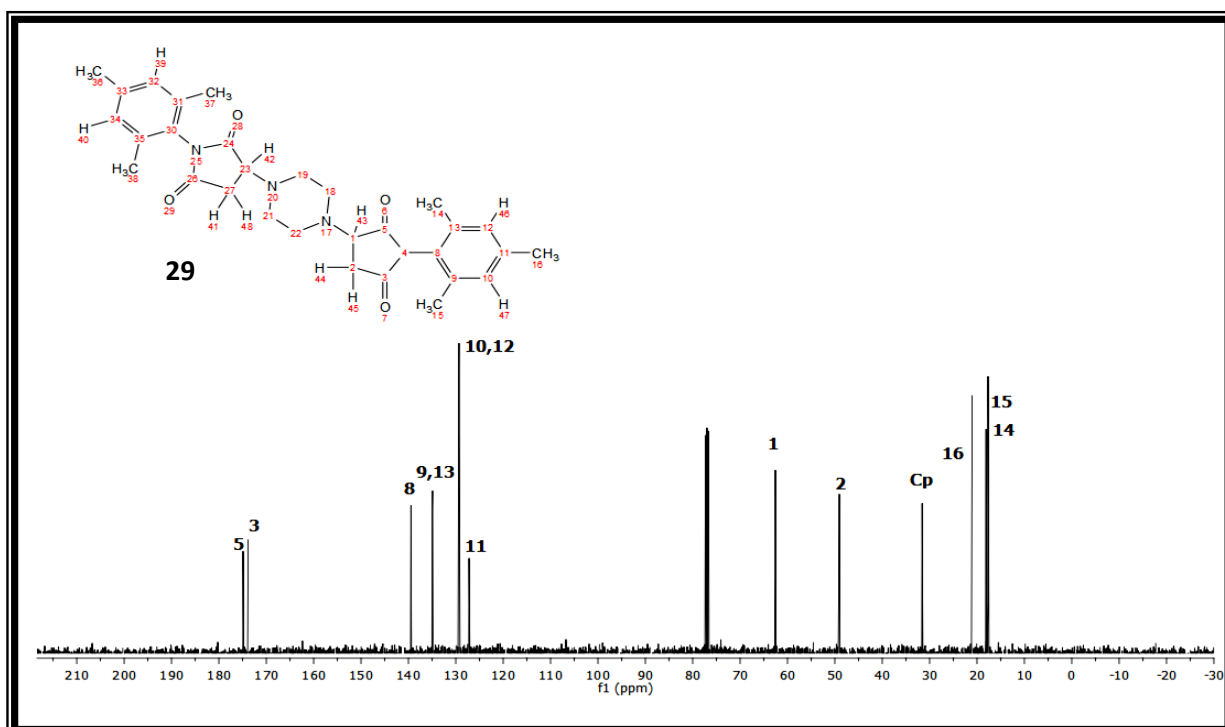
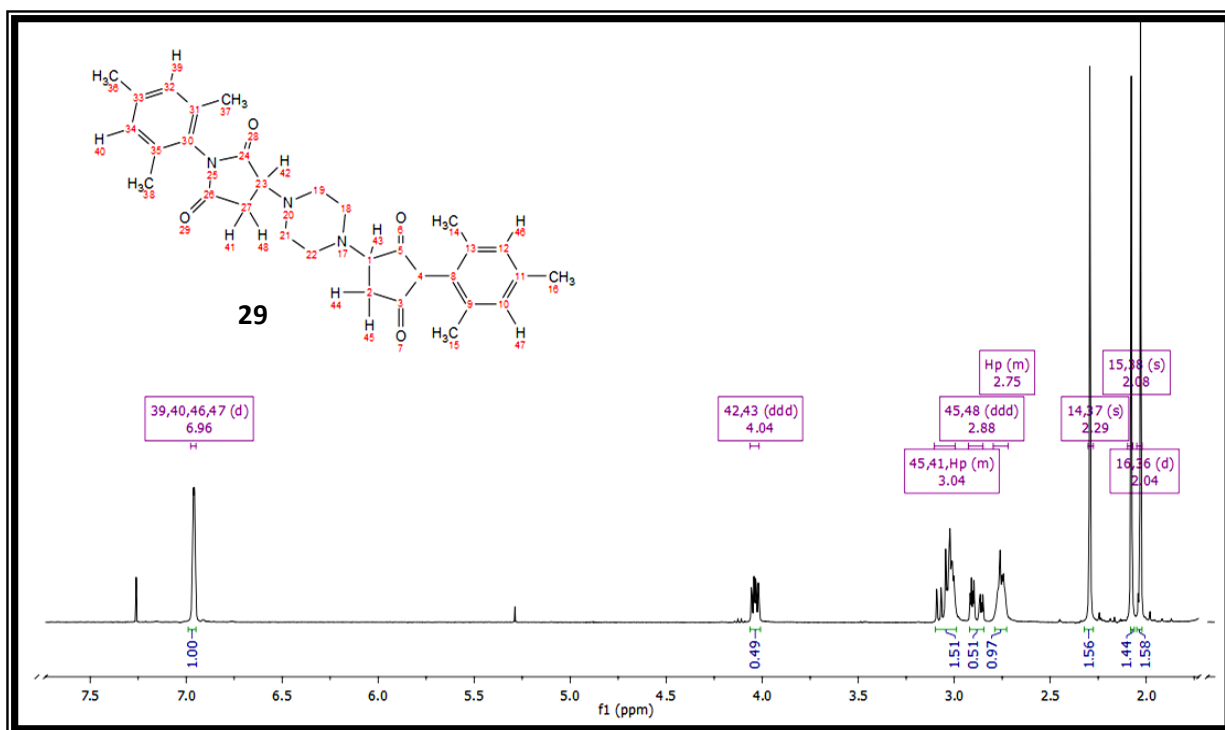
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 26.



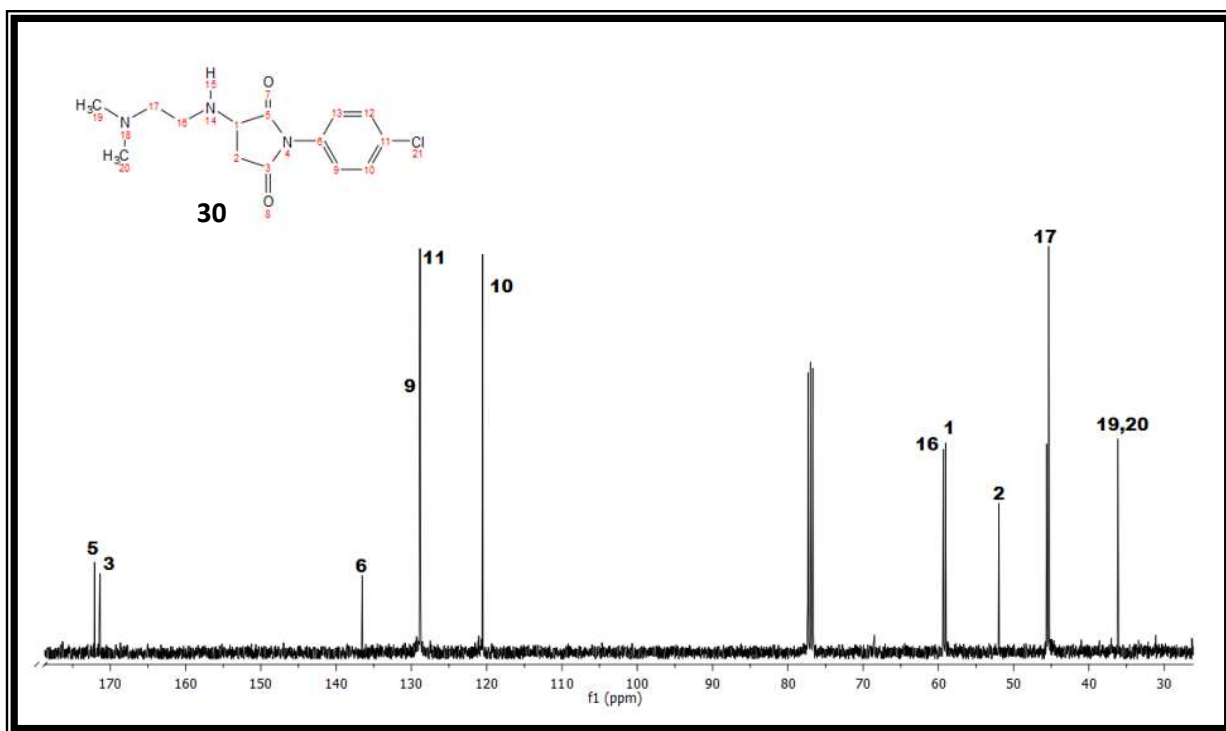
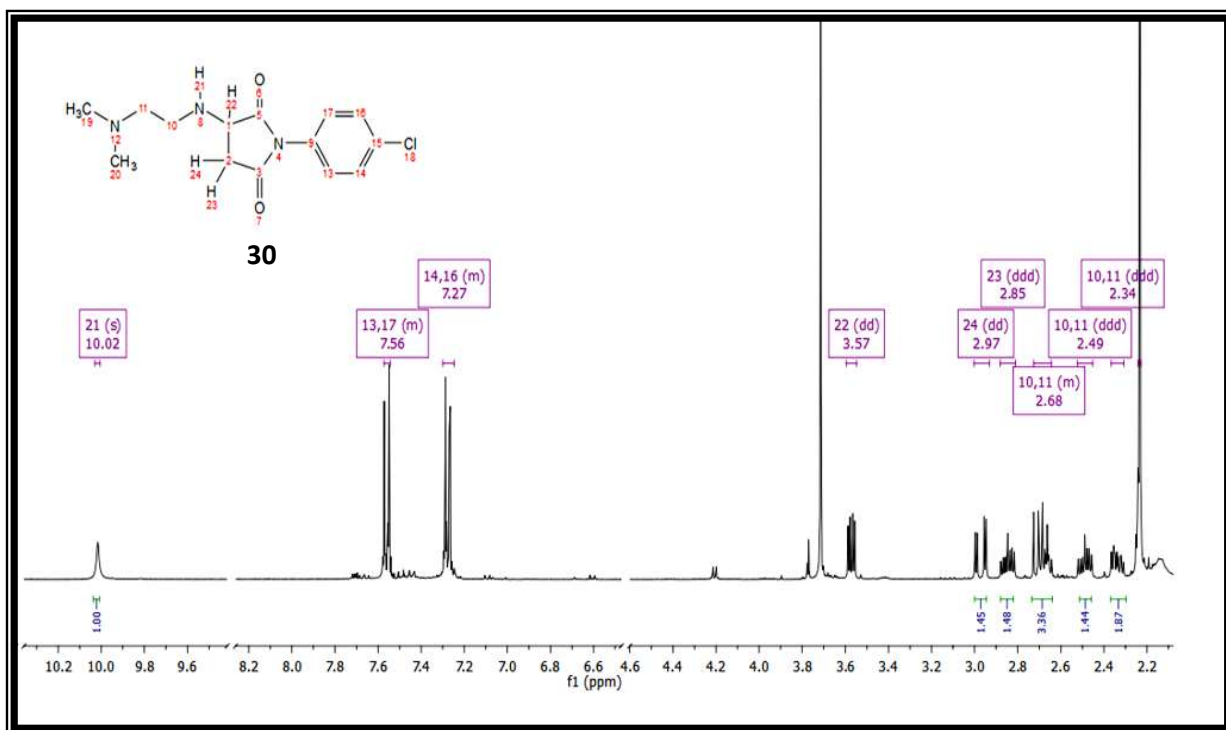
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C de 27.



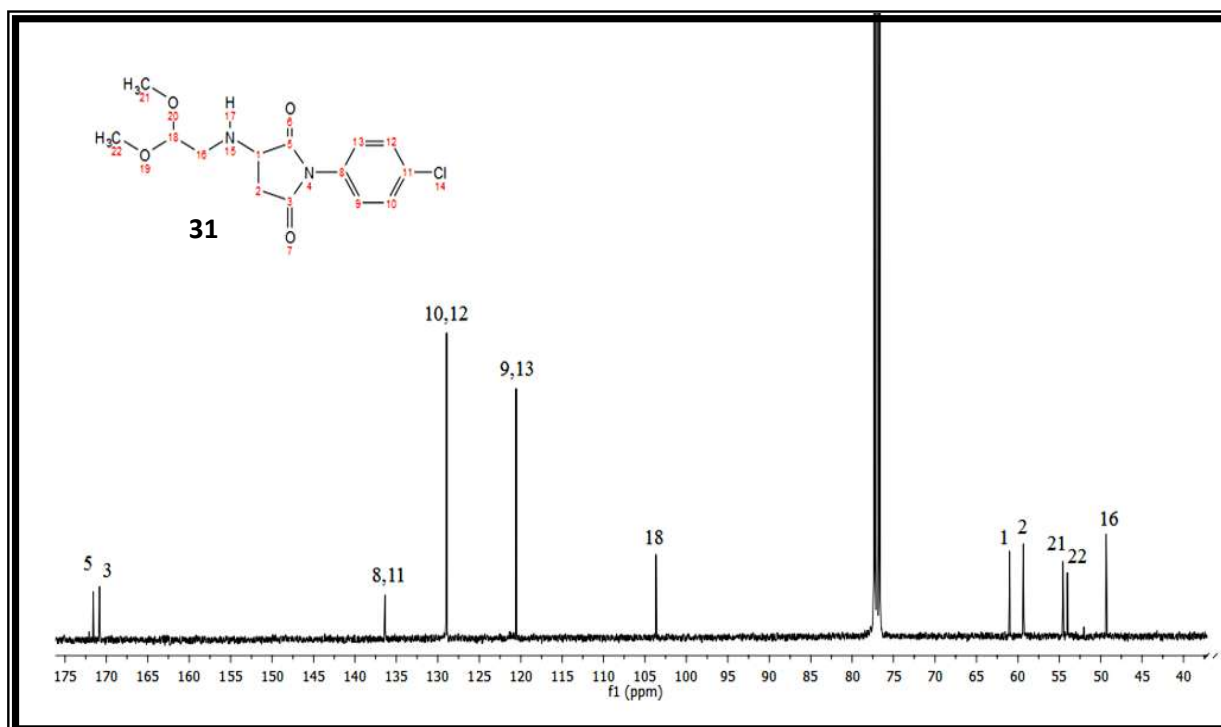
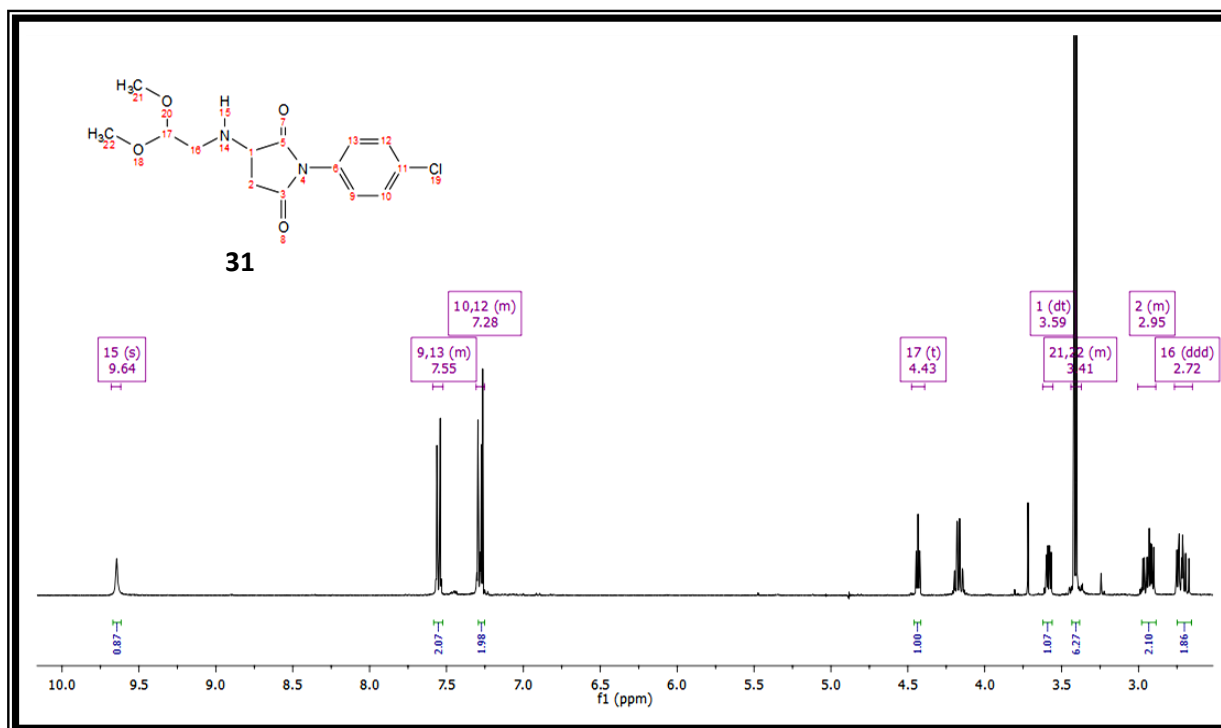
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 28.



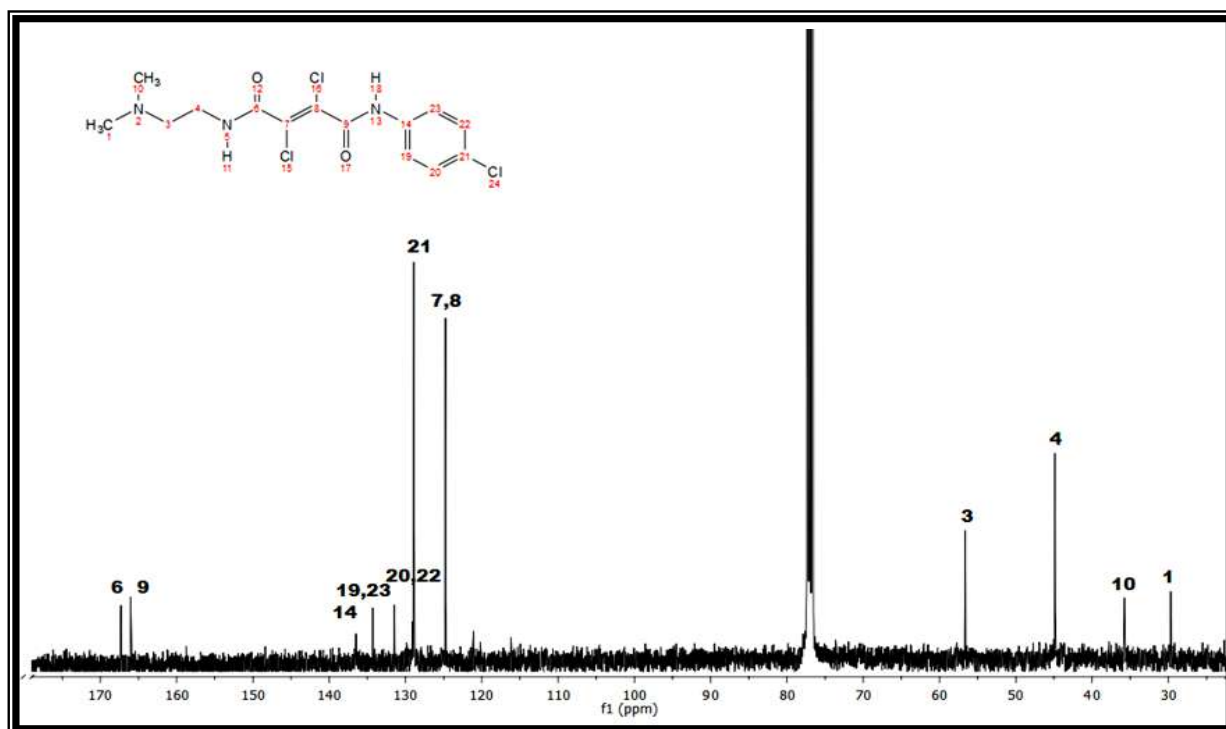
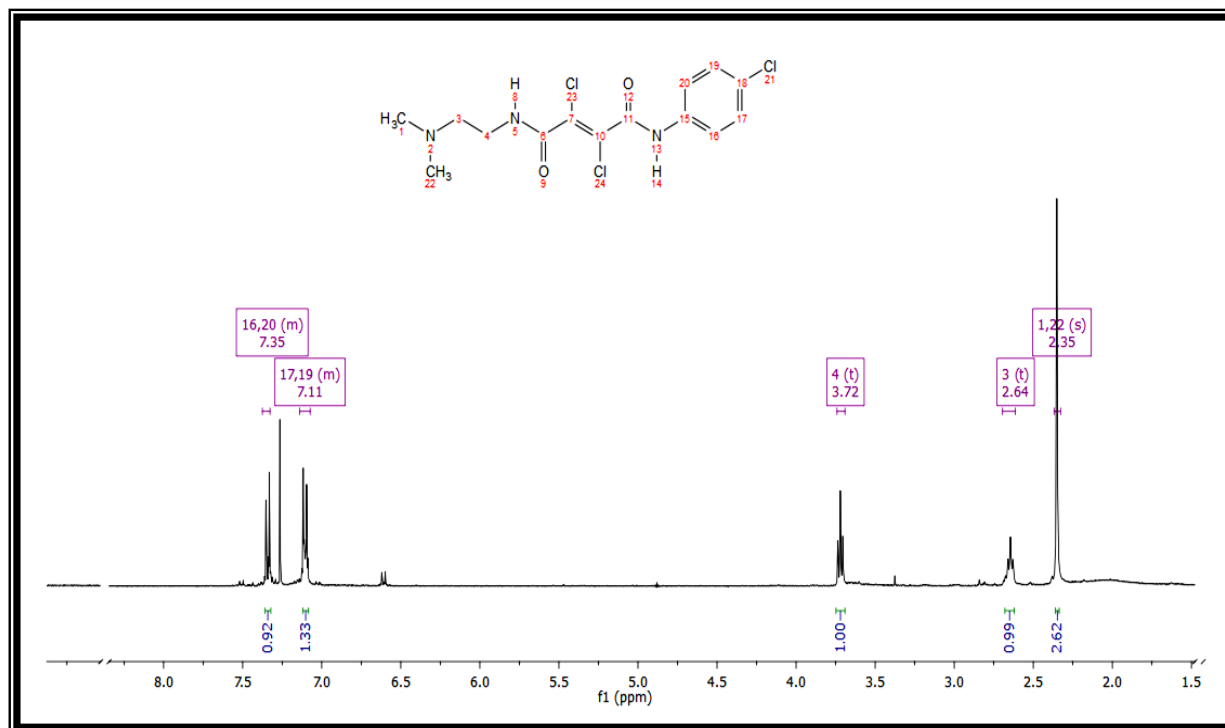
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 29.



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 30.



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 31.



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$  de 32.