

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE
TETRANDRINA: RECONOCIMIENTO
SUPRAMOLECULAR DE ADN Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

**Que para obtener el título de
DOCTORA EN CIENCIA DE MATERIALES**

Presenta

M.C. VIVIANA ISABEL CALVILLO PÁEZ

HERMOSILLO, SONORA

Octubre 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



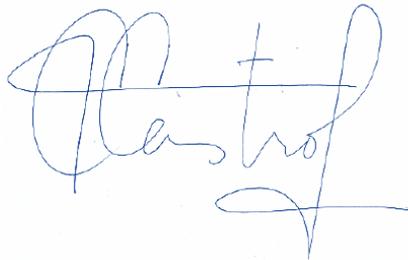
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. Karen Lillian Ochoa Lara. Parte del financiamiento fue a través del proyecto CB-239581 y de la Red Temática de Química Supramolecular.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

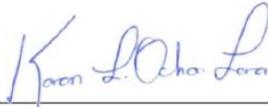
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Teresa del Castillo Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro
Jefe del Departamento

FORMA DE APROBACIÓN

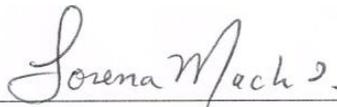
Los miembros del jurado para revisar la Tesis Profesional de **Viviana Isabel Calvillo Páez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Doctora en Ciencia de Materiales.



Dra. Karen Lillian Ochoa Lara
Presidente



Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
Secretario



Dra. Lorena Machi Lara

Sinodal



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Sinodal



Dra. María Elisa Martínez Barbosa
Sinodal



Dr. Rogério Sotelo Mundo
Sinodal externo

AGRADECIMIENTOS

Gracias a CONACyT por el apoyo económico brindado y la beca otorgada para mis estudios de Doctorado, al proyecto CB-239581 y de la Red Temática de Química Supramolecular por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A la Universidad de Sonora, mi alma mater, la cual fue mi casa durante la mayor parte de mi vida como adulta, donde realice mis estudios de licenciatura y maestría.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales por ser mi hogar todos estos años, por sus laboratorios, aulas y sus excelentes profesores que me brindaron el apoyo necesario para concluir este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. Karen Lillian Ochoa Lara, por su guía constante, paciencia, comprensión y amistad. Además le estaré eternamente agradecida por acogerme bajo su ala todos estos años que lo necesite.

A los miembros de mi comité y jurado para la obtención del grado la Dra. Lorena Machi, la Dra. Elisa Martínez, el Dr. Rogelio Sotelo, el Dr. Juan Carlos Gálvez y el Dr. Ramón Robles por sus comentarios, ayuda y su participación en este trabajo.

Al Dr. Ramón Moreno, técnico especializado por tutoría y apoyo en todos los sentidos.

Al Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz y Dr. Mario Alberto Leyva Peralta por su ayuda con los experimentos de evaluación antiproliferativa, que gracias a esos primeros resultados se abrió camino para continuar con este trabajo. Gracias infinitas.

A la Dra. Maribel Plascencia Jatomea por su paciencia y por brindarme su apoyo en cuanto a los estudios de evaluación antibacteriana, por la confianza brindada en el uso completo de su laboratorio y gracias especiales a los miembros de su equipo de trabajo.

A la Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez por la confianza de usar su laboratorio, su lector de placas de Elisa y su asesoría en la parte de evaluación antioxidante. También gracias a su alumno y orgullosamente mi gran amigo el M.C. Ricardo Iván González Vega, que me brindo todo su conocimiento en el mundo de los antioxidantes, además de su amistad.

A la Dra. María A. Islas Osuna por el apoyo brindada en CIAD con los experimentos de electroforesis y un agradecimiento especial a todo su equipo de trabajo.

Al Dr. José Octavio Juárez Sánchez, por el apoyo con los modelados moleculares.

Al Dr. Herbert Höpfl, por su apoyo para la recolección y refinamiento de los datos de Rayos X de monocristal.

Un agradecimiento especial al “**racita team**”: Andya★, Horacio, Raymundo y Martin que sin ellos nada hubiera sido igual, su amistad y las vivencias es lo mejor que me llevo del doctorado a mi vida personal.

A mis amigos Adilene, Tomasa, Flor, Fátima, Marcos, Itzel, Jancarlo, Brianda, Héctor, Grecia, Dulce, Lucia, Rogelio, Moisés, Karla, etc, tantos y tan poco espacio gracias por acompañarme en este viaje.

Finalmente a mi familia, mi mamá y papá, hermanos: Julio, Víctor, Judith, Daniel y Luis, y mis sobrinas Andrea y Sofía, en general a toda la familia Calvillo Páez que me ha permitido ser quien soy y apoyado en este camino.

Por último y no menos importante, A la Dra. Heidi Burrola por su ayuda desde el día número **1** que la conocí en la Universidad de Sonora, gracias por el apoyo en estos aproximadamente **4600** días.

DEDICATORIA

En este viaje llamado doctorado hay alguien que siempre estuvo ahí.

Heidy, esto es para ti ♥

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
RMN de ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN de ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
IR	Espectroscopia de infrarrojo
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
MAcT	Derivado de la tetrandrina mono-alquilado con acridina
MAnT	Derivado de la tetrandrina mono-alquilado con antraceno
IC₅₀	Concentración mínima que inhibe el 50 % del total de la muestra estudiada
IC₉₉	Concentración mínima que inhibe el 99 % del total de la muestra estudiada

ÍNDICE

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	II
FORMA DE APROBACIÓN	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE FIGURAS APÉNDICES	XVI
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Ácido desoxirribonucleico (ADN)	5
3.2. Interacciones de moléculas pequeñas con ADN.....	7
3.2.1. Moléculas que se unen de manera electrostática	8
3.2.2. Moléculas que se unen a surcos del ADN	10
3.2.2.1. Moléculas que se unen al surco menor del ADN	11
3.2.2.2. Moléculas que se unen al surco mayor del ADN	12
3.2.3. Intercaladores de ADN	14
3.2.3.1. Técnicas usuales para el estudio de moléculas capaces de intercalar ADN	20
3.3. El ADN como objetivo en la terapia contra el cáncer	21
3.4. Los alcaloides	22
3.4.1. Tetrandrina: Propiedades y derivados.....	23
3.4.2.1. Derivados de tetrandrina reportadas por nuestro grupo de investigación	25
3.4.2.2. Derivados de tetrandrina reportados por otros grupos de investigación.....	28
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. General	36
4.2. Particulares	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1. Reactivos	37
5.2. Solución amortiguadora	37

5.3. Equipos.....	38
5.3.1. Lámpara ultravioleta	38
5.3.2. Punto de fusión	38
5.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y de ¹³C	38
5.3.4. Espectrofotómetro de absorción electrónica (UV/Vis).....	38
5.3.5. Espectrofotómetro de emisión electrónica (fluorescencia)	38
5.3.6. Espectrómetro de masas	39
5.3.7. Potenciómetro	39
5.3.8. Lectores de microplacas.....	39
5.3.9. Baño de calentamiento	39
5.3.10. Microcentrífuga	39
5.3.11. Foto-documentador	39
5.3.12. Equipo de difracción de Rayos X.....	39
5.3.13. Microscopio invertido de fluorescencia.....	40
5.4. Programas computacionales.....	40
5.4.1. Ajuste de datos experimentales	40
5.4.2. Gráficas y figuras	40
5.4.3. Estudios de potenciometría.....	40
5.4.4. Difracción de rayos X de monocristal.....	40
5.4.5. Microscopia de fluorescencia	41
5.4.6. Modelado molecular.....	41
5.4.7. Análisis estadístico.....	41
5.5. Síntesis de los derivados.....	41
5.5.1. Derivado con acridina (MAcT)	42
5.5.2. Derivado con acridina (MAnt).....	42
5.6. Análisis por difracción de Rayos X de monocristal.....	42
5.7. Estudios en solución	43
5.7.1. Titulaciones espectrofotométricas con nucleótidos	43
5.7.1.1. Método de las variaciones continuas (Job).....	44
5.7.2. Estudios potenciométricos	45
5.8. Estudios con ADN	46
5.8.1. Titulaciones espectrofotométricas con ADN.....	46
5.8.2. Ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio	47
5.8.3. Movilidad electroforética con ADN plasmídico.....	47

5.9. Estudios de evaluación biológica.....	47
5.9.1. Estudios antiproliferativos	47
5.9.1.1. Cultivo celular	48
5.9.1.2. Ensayo de evaluación antiproliferativa	48
5.9.2. Evaluación antioxidante por radicales libres.....	49
5.9.2.1. Radical ABTS⁺	49
5.9.2.2. Radical DPPH[·]	49
5.9.3. Actividad antibacteriana	50
5.9.3.1. Análisis de componentes celulares por microscopía de fluorescencia	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1. Síntesis y caracterización de los derivados.....	52
6.1.1. Derivado MAcT	52
6.1.1.1. RMN de ¹H de MAcT.....	52
6.1.1.2. Análisis elemental de MAcT.....	53
6.1.1.3. Espectroscopia de masas de MAcT (ESI-MS⁺).....	54
6.1.1.4. Análisis de la estructura cristalina por Difracción de rayos X de monocristal para MAcT.....	54
6.1.2. Derivado MAnT.....	55
6.1.2.1. RMN de ¹H de MAnT	56
6.1.2.2. Análisis elemental de MAnT	56
6.1.2.3. Espectroscopia de masas de MAnT (ESI-MS⁺)	57
6.1.2.4. Espectroscopia de fluorescencia para MAnT	57
6.2. Estudios en solución	57
6.2.1. Caracterización por espectroscopia de absorción electrónica (UV/Vis).....	57
6.2.1.1. Derivado MAcT	57
6.2.1.2. Derivado MAnT.....	58
6.2.2. Estudios potenciométricos	59
6.2.3. Titulaciones espectrofotométricas con nucleótidos	59
6.2.3.1. Método de las variaciones continuas (Método de Job).....	62
6.2.4. Titulaciones espectrofotométricas con ADN.....	63
6.2.4.1. Experimentos por espectroscopia de absorción (UV/Vis) con ADN	63
6.2.4.2. Ensayo del desplazamiento del bromuro de etidio	65
6.3. Estudio con un ADN plasmídico por electroforesis.....	69
6.4. Modelado Molecular	71

6.5. Evaluación biológica	72
6.5.1. Ensayo de evaluación antiproliferativa	72
6.5.2. Capacidad antioxidante	76
6.5.2. Actividad antibacteriana	78
7. CONCLUSIONES.....	87
8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	88
9. BIBLIOGRAFÍA.....	89
10. APÉNDICES.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras químicas de los derivados de la tetrandrina y de la tetrandrina (TET) sin modificar.	4
Figura 2.	(A) Estructura química de las nucleobases; (B) Representación esquemática de los enlaces de hidrógeno entre A-T y C-G; (C) ADN-B destacando las unidades repetitivas (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	6
Figura 3.	Vistas de las estructuras cristalinas de rayos X de tres topologías diferentes del ADN de doble cadena: A-, B- y Z-ADN (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	7
Figura 4.	Diagrama esquemático de diferentes modos de unión no covalente al ADN: 1 es un ligante al surco mayor, 2 es un ligante al surco menor, 3 representa un ligante que se une de manera electrostática y 4 es un intercalador (Fuente: Almaqwashi <i>et al.</i> , 2016).	9
Figura 5.	Ejemplos de moléculas que se unen a ADN de tipo electrostático (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	9
Figura 6.	Complejo [Co(bpy) ₃] ²⁺ que se une a ADN mediante interacciones electrostáticas. Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	10
Figura 7.	Estructura de complejos de Pt (II) (Fuente: Lorente y Fernández, 2008).	10
Figura 8.	Estructura química de importantes ligantes al surco menor (Fuente: Baraldi <i>et al.</i> , 2004).	12
Figura 9.	Estructura química del verde de metilo (Fuente: Kim y Nordén, 1993).	13
Figura 10.	Estructura química de dos compuestos que se unen inicialmente al surco mayor (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	13
Figura 11.	Estructura química de un compuesto que se une en el surco mayor (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).	14
Figura 12.	Representación gráfica de los tipos de intercaladores (Fuente: Rescifina <i>et al.</i> , 2014).	15
Figura 13.	Ilustración esquemática de los cambios que se dan cuando una molécula intercala el ADN, a la izquierda el alargamiento de la hélice y a la derecha el desenrollamiento (Fuente: Almaqwashi <i>et al.</i> , 2016).	16
Figura 14.	Estructura química de algunos intercaladores de ADN (Fuente: Paul y Bhattacharya, 2012).	16
Figura 15.	Estructura química de proflavina (Fuente: Rescifina <i>et al.</i> , 2014).	17
Figura 16.	Estructura química de fármacos intercaladores (Fuente: Rescifina <i>et al.</i> , 2014).	17
Figura 17.	Estructura química de m-AMSA (Fuente: Gonzalez-Garcia J. y Vilar R., 2016).	18
Figura 18.	A) Representación esquemática de la unión a ADN de las porfirinas (representadas como estructuras negras sólidas) reportadas por Lebedeva <i>et al.</i> , en 2018 a) ADN rico en CG, b) ADN rico en AT. B) Estructuras optimizadas de las porfirinas utilizadas en este reporte.	18
Figura 19.	Estructura química de los derivados reportados por Farooqi <i>et al.</i> , 2018.	19
Figura 20.	Estructura química de los macrociclos reportados por Bharathi-Dileepan <i>et al.</i> , 2018.	19
Figura 21.	Formas de atacar el ADN para detener el cáncer (Fuente: Ali y Bhattacharya, 2014).	22
Figura 22.	Estructura química del derivado bisbencilado de la tetrandrina (Fuente: Ochoa-Lara <i>et al.</i> , 2001).	26
Figura 23.	Estructuras químicas de los derivados de la tetrandrina reportados por Moreno-Corral y Ochoa-Lara (2008).	27

Figura 24.	Estructura química de H1 (Fuente: Wei <i>et al.</i> , 2011).	28
Figura 25.	Derivados de a) tetrandrina y b) fangchinolina reportados por He <i>et al.</i> (2012).	29
Figura 26.	Estructura química-base de los 20 derivados reportados por Wu <i>et al.</i> , 2013.	30
Figura 27.	Estructura química de los derivados de tetrandrina y fangchinolina (Liu <i>et al.</i> , 2014).	30
Figura 28.	Estructura de los derivados en la patente de Liu <i>et al.</i> , 2014.	31
Figura 29.	Estructura química de W6 (Sun <i>et al.</i> , 2015).	31
Figura 30.	Estructura química de S1 (Fuente: Lei <i>et al.</i> , 2016).	32
Figura 31.	Estructura base química de los 35 derivados reportados por Lan <i>et al.</i> , 2017.	33
Figura 32.	Estructura-base química de los derivados reportados por Li <i>et al.</i> , 2017.	33
Figura 33.	Estructura-base química de los derivados reportados por Song <i>et al.</i> , 2018.	34
Figura 34.	Estructura-base química de los derivados reportados por Yang <i>et al.</i> , 2018.	34
Figura 35.	Esquema de reacción general para la obtención de los derivados de la tetrandrina mono-alkilados.	42
Figura 36.	Espectro de RMN de ¹ H de MAcT en DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz).	53
Figura 37.	a) Vista en perspectiva de la estructura molecular de MAcT (sin el contraión Br ⁻) extraída de la estructura cristalina de MAcT ·6H ₂ O·MeOH. b) Vista en perspectiva mostrando los contactos intermoleculares C-H···Br y O-H···Br con el ion bromuro. Los elipsoides de desplazamiento se dibujan en el nivel de probabilidad del 50%.	55
Figura 38.	Espectro de RMN de ¹ H de MAnt en DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz).	56
Figura 39.	Espectros de absorción de MAcT a diferentes concentraciones en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C.	58
Figura 40.	Espectros de absorción de MAnt a diferentes concentraciones en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C.	59
Figura 41.	a) Espectros de absorción del derivado MAcT (6x10 ⁻⁵ M) tras la adición de GTP (1x10 ⁻³ -0.01 M), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C. b) Gráfica de la absorbancia de MAcT (6x10 ⁻⁵ M) a 367 nm vs [GTP], (M). La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con la Ecuación 1.	60
Figura 42.	a) Titulación fluorométrica de MAnt (6.0x10 ⁻⁶ M) con ATP (1x10 ⁻³ -0.01 M), λ _{exc} = 350 nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 °C. b) Representación gráfica de la intensidad de emisión a 413 nm de MAnt (6.0x10 ⁻⁶ M) vs la concentración de ATP. La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con la Ecuación 2.	62
Figura 43.	Grafica de JOB para el complejo formado por ATP y MAcT .	63
Figura 44.	Espectros de absorción para MAcT (6.0x10 ⁻⁵ M) tras la adición de ADN de doble cadena (1x10 ⁻⁶ -1x10 ⁻⁵ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, con 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v): a) ADN-2 y b) ADN-5. Gráfica de Scatchard para los complejos de c) ADN-2 (datos de λ _{max} = 397 nm) y d) ADN-5 (datos de λ _{max} = 367 nm).	64
Figura 45.	Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN en presencia de MAcT , λ _{exc} = 510 nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v). [EtBr] = 5 μM, [ds-DNA] = 10 μM, [MAcT] = 0-25 μM: a) ADN-4; b) ADN-5.	66
Figura 46.	Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN en presencia de MAnt , λ _{exc} = 510 nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO	67

	(v/v). [EtBr] = 5 μ M, [ds-DNA] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M: a) ADN-4; b) ADN-5.	
Figura 47.	Gráfico de Stern-Volmer de la titulación de fluorescencia de a) MAcT y b) MAnT con BrEt-ADN.	68
Figura 48.	A) Primer carril marcador de peso molecular, a) plásmido 100 ng, b) plásmido 100 ng + DMSO, c) plásmido 100 ng + tetrandrina 100 μ M, d) plásmido 100 ng + MAcT 100 μ M, e) plásmido 100 ng + MAnT 100 μ M. B) Observación a simple vista del gel de agarosa (1%), MAcT y MAnT provocan la retención de los colorantes en los pozos del gel de agarosa.	70
Figura 49.	Estructura molecular para complejo entre ADN-1 y MAcT (Obtenido usando método semiempírico PM3 usando Gaussian y el modelado con ADN usando el programa HyperChem).	71
Figura 50.	Actividad antiproliferativa de MAnT (6.25 μ g/ml) en la línea celular HeLa. Observación a las 48 h en un microscopio invertido: a) 10X y b) 40X. Cambios morfológicos: cuerpos apoptóticos (AB), célula pequeña (SC), citoplasma condensado (CC). Las imágenes que se muestran son representativas de al menos cuatro campos de vista por muestra y tres ensayos independientes.	74
Figura 51.	Gráficas de la concentración de cada tratamiento utilizado TET, MAnT y MAcT (mg/mL) vs crecimiento bacteriano en UFC/mL x 10 ⁸ para cepas de: a) S. aureus, b) E. coli, c) K. pneumoniae y d) P. aeruginosa.	81
Figura 52.	Cultivos en microplaca de las diferentes cepas bacterianas, teñidas con resazurina: a) S. aureus, b) E. coli, c) K. pneumoniae, d) P. aeruginosa. En todos los casos: pozos A1-A3: Medio BHI, A4-A6: BHI + inóculo respectivo, A7-A9: BHI + DMSO, A10-A12: BHI+ inóculo respectivo + DMSO, B1-C6: Tetrandrina (TET) a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL, D1-E6: MAcT a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL, F1-G6: MAnT a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL.	83
Figura 53.	Fotografías tomadas con microscopio invertido (40x) de la tinción con yoduro de propidio: a) Campo claro de S. aureus a) S. aureus expuesto a MAnT 200 μ g/mL, c) Control.	84
Figura 54.	Fotografías tomadas con microscopio invertido 40x de la tinción con DCFH2-DA: a) Campo claro de S. aureus a) S. aureus expuesto a MAnT (200 μ g/mL), c) Control.	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Mecanismos de acción en diferentes tipos de cáncer utilizando tetrandrina, derivados de tetrandrina o de la tetrandrina en sinergia con medicamentos utilizados como quimioterapia (Fuente: Bhagya y Chandrashekar, 2018).	24
Tabla 2.	Concentraciones utilizadas para el método de las variaciones continuas del derivado MAcT con ATP y la fracción molar (X) que representa.	45
Tabla 3.	Constantes de unión (K) para los complejos de los derivados y diferentes nucleótidos, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 ° C.	61
Tabla 4.	Constantes de afinidad (K) para complejos de MAcT con ADN de doble cadena, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl de 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 ° C.	65
Tabla 5.	Constantes de apagamiento (K_{sv}) para complejos MAcT y MAnt con ADN, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 ° C.	68
Tabla 6.	Constantes obtenidas para el bromuro de etidio y las cinco secuencias estudiadas por fluorescencia.	69
Tabla 7.	Actividad antiproliferativa (valores de IC_{50}) de los nuevos derivados en varias líneas celulares.	75
Tabla 8.	Efecto de los derivados sobre los radicales $ABTS^{+}$ y $DPPH^{\cdot}$ en % de inhibición y en concentración inhibitoria mínima (IC_{50}).	78
Tabla 9.	Concentración requerida para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas en un 50 y 99% (IC_{50} e IC_{99} , respectivamente).	80

LISTA DE FIGURAS APÉNDICES

APÉNDICE 1. Estudios de reconocimiento molecular de nucleótidos

- Figura 1.1.** Gráfica de la absorbancia de **MAcT** (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [ATP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la **Ecuación 1**. 98
- Figura 1.2.** Gráfica de la absorbancia de **MAcT** (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [TTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la **Ecuación 1**. 98
- Figura 1.3.** Gráfica de la absorbancia de **MAcT** (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [CTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la **Ecuación 1**. 99
- Figura 1.4.** Gráfica de la absorbancia de **MAcT** (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [UTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la **Ecuación 1**. 99
- Figura 1.5.** a) Titulación fluorométrica de **MAnt** (6×10^{-6} M) con GTP (0.001-0.01 M), $\lambda_{exc} = 350$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v), a 25 °. b) Gráfica de la intensidad de emisión a 413 nm de **MAnt** (6×10^{-6} M) vs la concentración de GTP. La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con una ecuación modificada. 100

APÉNDICE 2. Estudios de reconocimiento molecular de ADN por UV/Vis

- Figura 2.1.** Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-1. 100
- Figura 2.2.** Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-3. 101
- Figura 2.3.** Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-4. 101

APÉNDICE 3. Estudios del desplazamiento del bromuro de etidio

- Figura 3.1.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M. 102
- Figura 3.2.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-2 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-2] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M. 102
- Figura 3.3.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-3 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-3] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M. 103
- Figura 3.4.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **MAnt**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [MAnt] = 0-25 μ M. 103
- Figura 3.5.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-2 en presencia de **MAnt**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-2] = 10 μ M, [MAnt] = 0-25 μ M. 104

- Figura 3.6.** Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-3 en presencia de **MAntT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-3] = 10 μ M, [**MAntT**] = 0-25 μ M. **104**
- Figura 3.7.** a) Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **TET**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [**TET**] = 0-25 μ M. **105**
 b) Grafica de concentración de ADN vs I_0/I ajustada mediante la ecuación de Stern-Volmer.

APÉNDICE 4. Modelado molecular

- Figura 4.1.** Estructura molecular para complejo **MAcT**: a) ADN-1 y b) ADN-4. **105**
- Figura 4.2.** Energía total para diez poses diferentes (estructuras de energía mínima) del complejo entre ADN-1 y **MAcT**. **106**

APÉNDICE 5. Fotografías de microscopio invertido con filtros de fluorescencia

- Figura 5.1.** Fotografías tomadas con microscopio invertido 40x de las cepas bacterianas 1) *S. aureus*, 2) *E. coli*, 3) *K. pneumoniae*, 4) *P. aeruginosa* incubadas 24 horas en medio BHI con a) tetrandrina, b) **MAcT**, c) **MAntT**, d) Control, todas teñidas con yoduro de propidio. **106**
- Figura 5.2.** Fotografías tomadas con microscopio invertido de las cepas bacterianas 1) *S. aureus* 2) *E. coli*, 3) *K. pneumoniae*, 4) *P. aeruginosa* incubadas 24 horas en medio BHI con a) tetrandrina, b) **MAcT**, c) **MAntT**, d) Control, todas teñidas con dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH₂-DA). **107**

RESUMEN

En esta tesis se presenta la síntesis y caracterización estructural de dos nuevos derivados mono-alkilados de la tetrandrina con una unidad acridina (**MAcT**) y una unidad antraceno (**MAnt**), respectivamente. Ambos fueron caracterizados por técnicas convencionales y para el derivado **MAcT** se obtuvo un cristal apto para difracción de rayos X de mono-cristal. A estos derivados se les realizaron estudios de reconocimiento molecular con una serie de nucleótidos tipo tri-fosfato y cinco diferentes oligonucleótidos de ADN de doble cadena por las técnicas de UV/Vis y fluorescencia en solución amortiguadora de fosfatos a un pH=7.2, usando para el control de la fuerza iónica 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v). Mediante estos estudios, se observó que los derivados pueden unirse con alta afinidad al ADN de doble cadena vía intercalación, mostrando constantes del orden de $K \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. Además, se realizó modelado molecular de tres complejos de **MAcT** con tres secuencias de ADN estudiadas experimentalmente mostrando que los derivados se unen con aportación de interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y del efecto hidrofóbico. Por otra parte, se realizó la evaluación biológica de los compuestos mediante estudios celulares antiproliferativos, de capacidad antioxidante y de actividad antibacteriana. Respecto a la actividad antiproliferativa los derivados se evaluaron en diversas líneas celulares: HeLa (cáncer cervicouterino), A-549 (cáncer de pulmón), LS-180 (cáncer colorrectal), PC-3 (cáncer de próstata), ARPE-19 (células del epitelio de la retina pigmentaria humana). Dentro de los resultados, destacó el derivado **MAnt** el cual mostró una IC_{50} de 2.74 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular HeLa, mucho menor que el presentado por la tetrandrina. Los resultados de capacidad antioxidante contra radicales libres demostraron que los derivados poseen capacidad antioxidante, resaltando el resultado de **MAnt** contra el radical libre ABTS^{++} con una IC_{50} de 4.59 $\mu\text{g/mL}$; por lo cual este derivado puede ser considerado un buen antioxidante de acuerdo a la literatura. Por otro lado, la actividad antibacteriana mostrada por los derivados es superior a la tetrandrina natural. Al respecto, **MAnt** mostró efecto inhibitorio contra *S. aureus* (IC_{50} de 1.51 $\mu\text{g/mL}$) y moderado contra *E. coli* (IC_{50} de 61.51 $\mu\text{g/mL}$) y *K. pneumoniae* (IC_{50} de 30.19 $\mu\text{g/mL}$). El derivado **MAnt** es el derivado con mayor actividad biológica. En general, los resultados del presente trabajo demuestran que el diseño molecular de los derivados de la tetrandrina modifica las propiedades físicas, químicas y biológicas de la tetrandrina natural.

ABSTRACT

This thesis presents the synthesis and structural characterization of two new mono-alkylated derivatives of tetrandrine with an acridine unit (**MAcT**) and an anthracene unit (**MAnt**), respectively. Both were characterized by conventional techniques and for the MAcT derivative, a crystal suitable for single-crystal X-ray diffraction was obtained. Molecular recognition studies were carried out on these derivatives with a series of triphosphate nucleotides and five different double-stranded DNA oligonucleotides using UV / Vis and fluorescence in phosphate buffer solution at pH = 7.2, using for control of ionic strength 0.01 M NaCl and 10% DMSO (v / v). Through these studies, it was observed that the derivatives can bind with high affinity to the double-stranded DNA via intercalation, showing constants of the order of $K \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. In addition, molecular modeling of three MAcT complexes with three experimentally studied DNA sequences was performed, showing that the derivatives bind with the contribution of electrostatic interactions, van der Waals forces and the hydrophobic effect. On the other hand, the biological evaluation of the compounds was carried out by means of antiproliferative cellular studies, of antioxidant capacity and of antibacterial activity. Regarding antiproliferative activity, the derivatives were evaluated in diverse mammalian cell lines: HeLa (cervical cancer), A-549 (lung cancer), LS-180 (colorectal cancer), PC-3 (prostate cancer), ARPE-19 (epithelial cells of the human pigmented retina). Among the results, the **MAnt** derivative stood out, which showed an IC_{50} of 2.74 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in the HeLa cell line, much lower than that presented by tetrandrine. The results of antioxidant capacity against free radicals showed that the derivatives possess antioxidant capacity, highlighting the result of **MAnt** against free radical ABTS^{•+} with an IC_{50} of 4.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$; therefore, this derivative can be considered a good antioxidant according to the literature. On the other hand, the antibacterial activity shown by the derivatives is superior to natural tetrandrine. In this regard, **MAnt** showed an inhibitory effect against *S. aureus* (IC_{50} of 1.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and moderate against *E. coli* (IC_{50} of 61.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *K. pneumoniae* (IC_{50} of 30.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The **MAnt** derivative is the derivative with the highest biological activity. In general, the results of the present work demonstrate that the molecular design of tetrandrine derivatives modifies the physical, chemical, and biological properties of natural tetrandrine.

1. INTRODUCCIÓN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la biomolécula en la que están codificados los datos genéticos de todos los organismos celulares. La secuencia específica de cada ADN define muchas características como los rasgos físicos de cada individuo o incluso la susceptibilidad a una enfermedad. El ADN de doble cadena consiste en dos cadenas complementarias, anti-paralelas que están asociadas con enlaces de hidrógeno específicos entre las bases de los nucleótidos. Los nucleótidos se componen de una base que contiene nitrógeno, un azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato. (Hannon, 2007; Paul y Bhattacharya, 2012).

Muchas enfermedades se originan a nivel de ADN y de proteínas las cuales son codificadas por el ADN, por esta razón es un blanco selectivo para los fármacos, puesto que una molécula que se una al ADN de manera selectiva puede modificar la expresión de un gen, por tanto, producir mutaciones o producir la muerte celular (Hannon, 2007; Lorente y Fernández, 2008; Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

En este contexto, la técnica de fluorescencia ha revolucionado la investigación biomédica. Se utilizan sondas fluorescentes construidas a partir de compuestos aromáticos diseñados para unirse a una macro-biomolécula (por ejemplo, a una proteína o un ácido nucleico) o localizar una región específica estructural de la célula, como el citoesqueleto, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático o el núcleo. (Sánchez *et al.*, 2009). Estas sondas con grupos fluoróforos pueden ser usadas para aplicaciones analíticas en biología molecular, medicina, entre otras (Lorente y Fernández, 2008; Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

La química supramolecular es una herramienta poderosa para diseñar nuevas moléculas que puedan interaccionar de manera selectiva con biomoléculas, haciendo uso de las interacciones no covalentes que se pueden dar entre ellas. Una molécula se puede unir al ADN de doble cadena de diversas maneras: interaccionando por los surcos, mediante intercalación entre las pares de bases o a través de interacciones electrostáticas inespecíficas con los grupos fosfatos, por tanto, se necesitan combinar varias características estructurales para que una molécula se una selectivamente al ADN y al unirse proporcione una señal

analítica que pueda ser cuantificada de alguna manera (Hannon, 2007; Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

Por otro lado, según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Cada año fallecen 8.2 millones de personas y hoy viven en el mundo más de 32 millones de pacientes con cáncer. Esta enfermedad en 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, fallecen por esta enfermedad 14 de cada 100 mexicanos y la expectativa de vida de quienes la padecen es de alrededor de 63 años y en México los tumores malignos más frecuentes son: el cáncer de mama, con 20 mil casos nuevos por año, 14 mil de próstata y cervicouterino, y más de 8 mil casos de colon y pulmón (OMS, 2018; Secretaría de Salud, 2017).

El cáncer se define como un proceso descontrolado de crecimiento y diseminación de células y es un claro ejemplo de las enfermedades que se originan a nivel de proteínas y ADN, por tanto es necesario diseñar y sintetizar moléculas pequeñas que sean capaces de reconocer predeterminadas secuencias de ADN. Estas moléculas pueden finalmente demostrar su importancia como nuevos y mejores agentes terapéuticos (Paul y Bhattacharya, 2012). El uso de la quimioterapia contra el cáncer se inició en la década de 1940 empleando mostazas nitrogenadas (tipo de fármaco antineoplásico alquilante basado en el gas mostaza usado en la primera guerra mundial) y antifolatos (tipo de medicamento que impide a las células utilizar ácido fólico para elaborar ADN). Hoy en día, hay unos 200 medicamentos aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos) para tratar diferentes tipos de cáncer y más del 75 % de los medicamentos son de fuentes naturales, utilizados de forma pura o con modificaciones estructurales mínimas (Bhagya y Chandrashekar, 2018).

Los alcaloides son compuestos que generalmente contienen una estructura heterocíclica con un átomo de nitrógeno, muchas veces teniendo a algún aminoácido como precursores. Tienen funciones de defensa en las plantas, y desde tiempos ancestrales han sido utilizados como medicamentos. Actualmente son importantes puesto que sirven como un depósito rico para el descubrimiento de nuevos fármacos. Varios alcaloides aislados de

plantas exhiben efectos antiproliferativos y anti-neoplásicos en varios tipos de cánceres tanto *in vitro* como *in vivo* (Lu *et al.*, 2012).

Entre ellos destaca la tetrandrina (**Figura 1**) que cuenta con múltiples propiedades farmacológicas como inmunosupresor, bloqueador no selectivo de los canales de Ca^{2+} , capacidad antioxidante y actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer por ejemplo de mama, de pulmón, de colon, nasofaríngeo, neuroblastoma, entre otros. Además, durante años se ha utilizado en la medicina tradicional china para tratar a pacientes con artritis, arritmia, hipertensión, inflamación y silicosis, entre otras (Bhagya N. y Chandrashekar, 2016; Bhagya y Chandrashekar, 2018).

La modificación estructural de este alcaloide puede mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (Ochoa-Lara *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2011). Nuestro grupo de investigación es pionero en la síntesis y estudios fisicoquímicos con derivados de la tetrandrina utilizando como estrategia la cuaternización de los nitrógenos para la obtención de derivados alquilados con diversos grupos para el reconocimiento de carboxilatos, nucleótidos y ADN (Ochoa-Lara *et al.*, 2001; 2004; 2005; Moreno-Corral y Ochoa-Lara 2008; Wong-Molina *et al.*, 2008; Escobar-Picos *et al.*, 2019). En fechas más recientes existen reportes de otros grupos de investigación de derivados de tetrandrina que incorporan átomos de halógeno u otros sustituyentes en los anillos aromáticos, en todos estos estudios se realizaron pruebas antiproliferativas en líneas celulares cancerosas con resultados muy prometedores (Wei *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018).

Debido a todo lo anterior, en este trabajo se presenta la síntesis y caracterización estructural de dos derivados mono-alquilados de tetrandrina con un grupo acridina (**MAcT**) y un grupo antraceno (**MAnt**) (ver **Figura 1**), los cuales pueden formar complejos estables con aniones de importancia biológica tales como nucleótidos y ADN de doble cadena en medio acuoso. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los derivados de tetrandrina poseen amplia actividad biológica, por tanto, en este trabajo se realizaron estudios de actividad antiproliferativa en diversas líneas celulares, así como de la capacidad antioxidante con radicales libres y de actividad antibacteriana con varias cepas de interés clínico. Al respecto, destaca un incremento de la actividad biológica de los derivados, debido a la modificación química realizada a la tetrandrina.

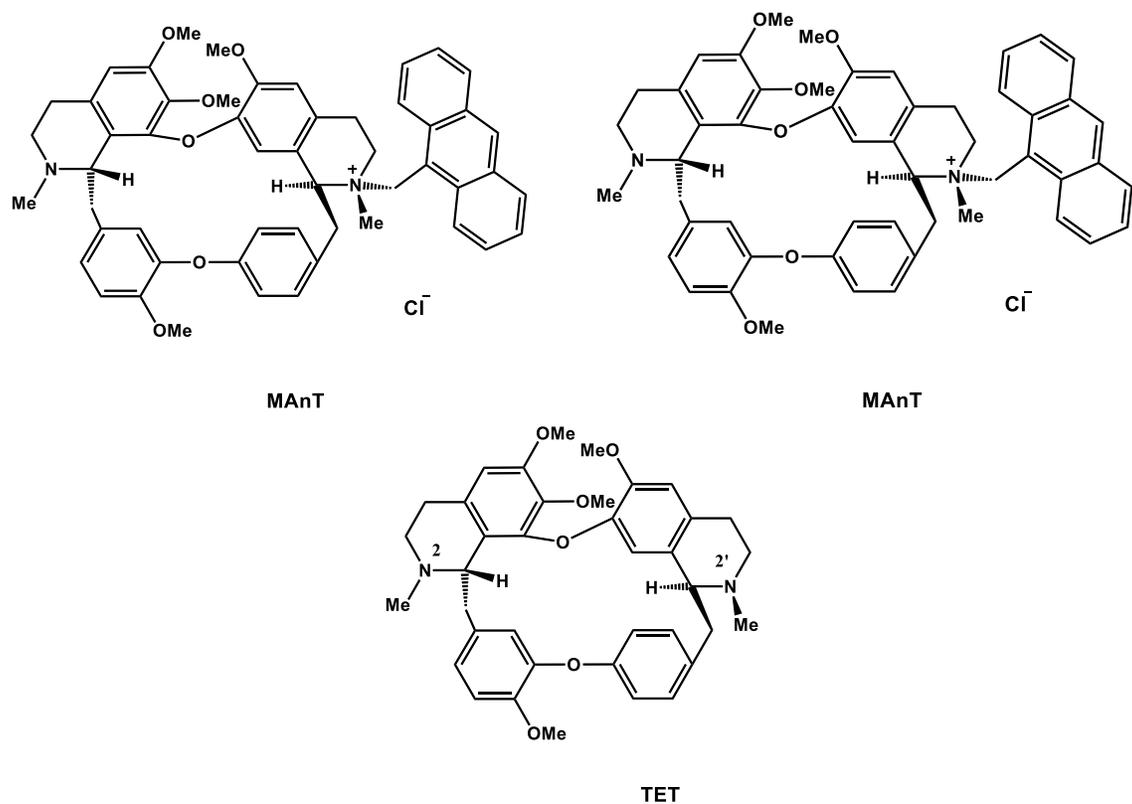


Figura 1. Estructuras químicas de los derivados de la tetrandrina y de la tetrandrina (**TET**) sin modificar.

2. HIPÓTESIS

La modificación química de la tetrandrina mediante la alquilación del nitrógeno más reactivo con una unidad metil(acridina) o metil(antraceno) modificará las propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas del alcaloide, ya que la incorporación de las nuevas unidades generará un nuevo centro quiral con una carga formal y un aumento de la superficie hidrofóbica, que producirá derivados quirales con propiedades anfifílicas con una mayor capacidad de unirse al ADN de doble cadena. Tales modificaciones influirán en las propiedades biológicas de los derivados y por lo tanto serán candidatos potenciales para ser utilizados como fármacos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es el almacén principal de la información genética. En 1953, Watson y Crick dedujeron que la estructura secundaria del ADN era una doble hélice, basados en datos cristalográficos de rayos x obtenidos por Rosalind Franklin. En dicho modelo, se tienen dos hebras antiparalelas formando una doble hélice. El ADN consiste en un biopolímero de unidades repetitivas llamadas nucleótidos, que están compuestos por una base nitrogenada, un azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato (Hannon, 2007; Paul y Bhattacharya, 2012; Rescifina *et al.*, 2014).

Las bases nitrogenadas son heterociclos aromáticos y se dividen en dos grupos: pirimidinas (citosina, C, timina, T) y purinas (adenina, A, guanina, G). En la doble cadena del ADN, las nucleobases se ubican en cadenas opuestas y se unen mediante enlaces de hidrógeno: entre A y T hay dos enlaces de hidrógeno; y entre C y G hay tres enlaces de hidrógeno. En una sola cadena de ADN, los nucleótidos se unen covalentemente a través de los grupos fosfato que están unidos a las posiciones 3' y 5' de la desoxirribosa. Por lo tanto, la cadena principal de azúcar-fosfato consiste en enlaces fosfodiéster en la posición 5' a 3' con las bases que sobresalen de la cadena principal, **Figura 2** (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016; Hannon, 2007).

Las cadenas están enrolladas entre ellas formando una estructura helicoidal diestra. Una serie de estudios estructurales y bioquímicos han establecido que el ADN de doble cadena puede estar presente en diferentes topologías dependiendo de las condiciones (pH, fuerza iónica del medio, disolvente, etc.), pero la más relevante en condiciones fisiológicas es la del ADN-B, **Figura 3** (Hannon, 2007; Rescifina *et al.*, 2014; Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

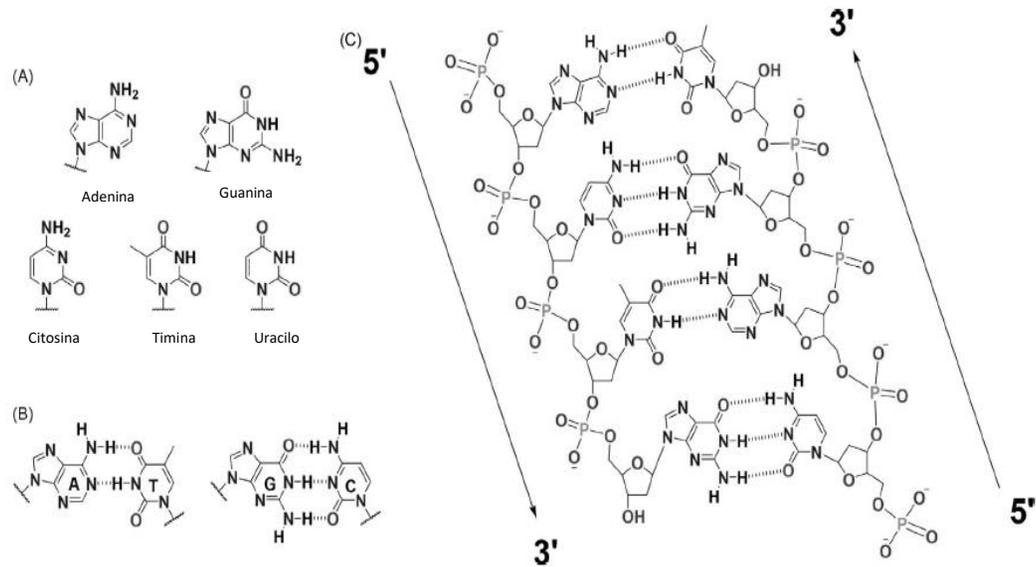


Figura 2. (A) Estructura química de las nucleobases; (B) Representación esquemática de los enlaces de hidrógeno entre A-T y C-G; (C) ADN-B destacando las unidades repetitivas (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

El ADN-B se presenta en condiciones de alta humedad. En esta conformación las pares de bases se apilan una encima de la otra en una estructura helicoidal y el espacio entre los anillos de desoxirribosa genera en la superficie espacios denominados surcos. El surco mayor es ancho, y relativamente poco profundo, mientras que el surco menor es más estrecho, con una anchura muy variable dependiente de la composición de las pares de bases. En promedio hay 10.5 pares de bases por surco y el diámetro de la hélice es de aproximadamente 2.0 nm y la distancia promedio entre los pares de bases es 3.4 nm (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

Por otro lado, existen otras conformaciones conocidas como el ADN-A (**Figura 3**), la cual se presenta en condiciones de baja humedad (75%), en esta conformación, las nucleobases están retorcidas una respecto de la otra y se encuentran fuera del eje de la hélice. Además, existe el ADN-Z (**Figura 3**) cuya conformación es característica de las moléculas de ADN que tienen secuencias de GC alternas y su formación se ve favorecida bajo altas concentraciones de sal (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016). El ADN-B es la forma más frecuente de ADN en sistemas biológicos mientras que las otras conformaciones son relevantes, pero más limitadas (Hannon, 2007). Por este motivo este trabajo se enfocara al ADN-B.

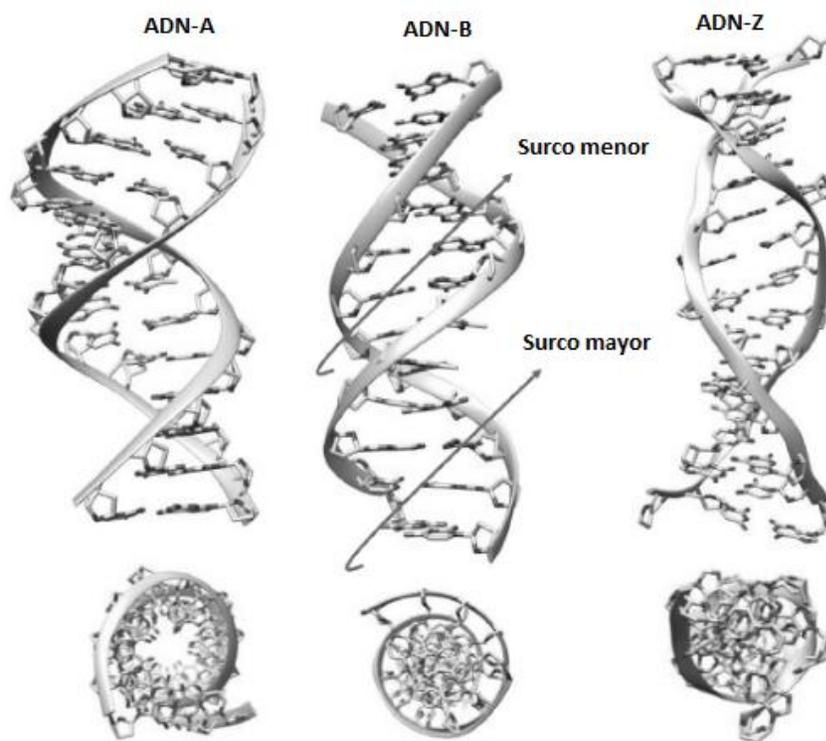


Figura 3. Vistas de las estructuras cristalinas de rayos X de tres topologías diferentes del ADN de doble cadena: A-, B- y Z-ADN (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

3.2. Interacciones de moléculas pequeñas con ADN

En los últimos años se han diseñado un gran número de moléculas pequeñas como agentes que se unen al ADN, dado que muchas enfermedades como el cáncer se expresan a través de la acción de proteínas, pero se originan a nivel de ADN. El ADN es un objetivo importante, ya que, en principio, una única molécula de un fármaco por célula podría cambiar la expresión de un gen (Hannon, 2007).

El ADN juega un papel muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos puesto que la interacción entre moléculas pequeñas usadas como fármacos y esta biomolécula puede causar un cambio en la conformación del mismo e inhibir la transcripción o la replicación provocando que las células inhiban su crecimiento y ocurra la muerte o apoptosis (Wang *et al.*, 2010; Rescifina *et al.*, 2014).

Por otro lado, la química supramolecular es un área multidisciplinaria que se centra en las interacciones no covalentes entre ellas destaca las interacciones de tipo electrostático, los puentes de hidrógeno, las interacciones π - π y catión- π y las fuerzas de Van der Waals. Estas interacciones están involucradas en múltiples procesos biológicos esenciales (Steed *et al.*, 2007). Por lo anterior, el uso de la química supramolecular es clave en los estudios de reconocimiento de ADN, el tamaño, las dimensiones de la superficie y la naturaleza de la biomolécula introduce nuevas posibilidades y desafíos. La química supramolecular nos proporciona herramientas para diseñar nuevas moléculas que puedan interactuar de manera selectiva con el ADN (Hannon, 2007).

Las moléculas pequeñas tienen dos maneras de interactuar con el ADN: pueden interactuar con el ADN de una manera inespecífica (es decir, cuando la molécula no se une selectivamente a una determinada secuencia o motivo estructural) o específicamente, cuando la molécula tiene cierta selectividad para una secuencia específica o motivo estructural (Wang *et al.*, 2010; Rescifina *et al.*, 2014).

Como ha sido mencionado, una molécula pequeña puede interactuar con ADN de manera no covalente, por lo que este trabajo se enfoca en el diseño molecular de nuevos compuestos que incluyan características tales que puedan proveer interacciones no covalentes que permitan la unión supramolecular con alta afinidad y, de ser posible, selectiva al ADN de doble cadena: Las tres formas de unión supramolecular principales son mediante interacciones electrostáticas, unión a surco menor o mayor vía interacciones de Van der Waals y unión mediante intercalación de unidades aromáticas entre los pares de bases (Rehman *et al.*, 2015), mediante interacciones π - π . En la **Figura 4**, se observa una representación gráfica de las mencionadas formas de unión “no covalente” (Almaqwashy *et al.*, 2016). En el siguiente apartado se describe cada una de ellas, con un especial énfasis en la unión por intercalación.

3.2.1. Moléculas que se unen de manera electrostática

Las interacciones electrostáticas de moléculas catiónicas con el ADN producen una estabilización del ADN liberando contraiones favoreciendo la entropía en la energía libre (Lorente y Fernández, 2008).

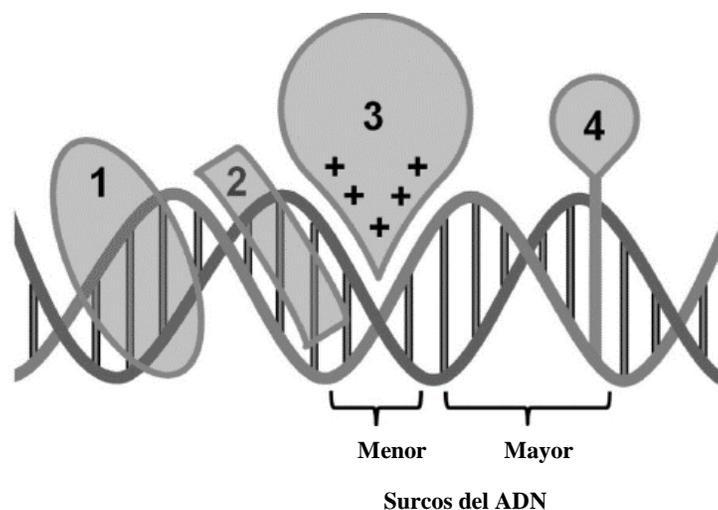


Figura 4. Diagrama esquemático de diferentes modos de unión no covalente al ADN: 1 es un ligante al surco mayor, 2 es un ligante al surco menor, 3 representa un ligante que se une de manera electrostática y 4 es un intercalador (Fuente: Almaqwashy *et al.*, 2016).

La carga negativa de los grupos fosfatos del ADN permite que moléculas con carga positiva se unan mediante interacciones electrostáticas. Por esta razón, algunas moléculas utilizadas para unirse a ADN incluyen en su estructura grupos tales como aminas, imidazoles, guanidinas o metales (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016; Lorente y Fernández, 2008).

Ejemplos interesantes de este tipo de moléculas son la espermina y la espermidina y algunos que se pueden observar en la **Figura 5**, estas pequeñas moléculas a pH fisiológico se encuentran protonadas y son capaces de interactuar con los grupos fosfato del ADN.

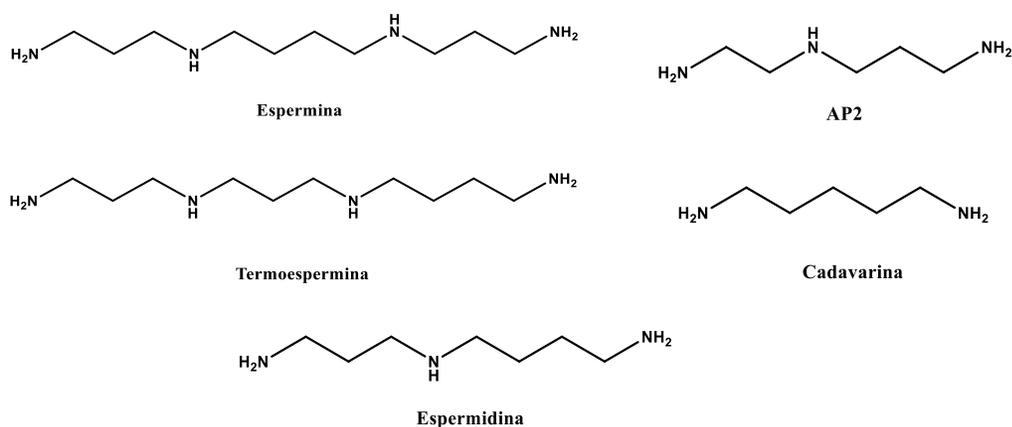


Figura 5. Ejemplos de moléculas que se unen a ADN de tipo electrostático (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

Otro tipo de compuestos que se unen principalmente mediante interacciones electrostáticas son los complejos metálicos. Por ejemplo, complejos octaédricos como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ y $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{2+}$ se unen al surco menor del ADN mediante interacciones electrostáticas (**Figura 6**) (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

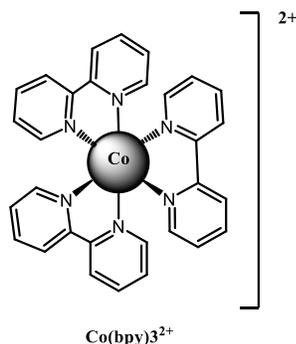


Figura 6. Complejo $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{2+}$ que se une a ADN mediante interacciones electrostáticas. Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

En el caso de complejos metálicos otro caso interesante es la estructura de la **Figura 7**, un compuesto trinuclear con Pt (II) en el que se observan interacciones de tipo electrostático y puentes de hidrógeno (Lorente y Fernández, 2008).

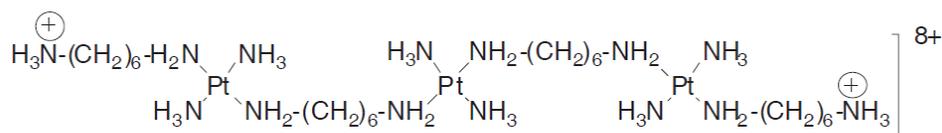


Figura 7. Estructura de complejos de Pt (II) (Fuente: Lorente y Fernández, 2008).

3.2.2. Moléculas que se unen a surcos del ADN

Existen diferencias entre el surco mayor y menor tanto en el potencial electrostático, como en el nivel de hidratación y la capacidad de formar puentes de hidrógeno, además de tener diferentes tamaños, por tanto, presentan efectos estéricos diferentes. Además, los surcos dependen de la composición de la secuencia. Usualmente las moléculas que se unen al surco son muy específicas en la preferencia por una secuencia específica (Gonzalez-Garcia y Vilar,

2016). A continuación, se resumen el tipo de moléculas con ejemplos que se unen a cada uno de los surcos.

3.2.2.1. Moléculas que se unen al surco menor del ADN

Las moléculas que se unen eficientemente a este sitio son muy específicas y son selectivas para algunas secuencias, en general se ha observado que se tiene predilección por secuencias ricas en A-T (adenina y timina) (Wang *et al.*, 2010). Usualmente los ligantes a surco menor contienen varios grupos heteroaromáticos como el furano, el pirrol o el imidazol conectados mediante enlaces con ciertos grados de libertad (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016). Este tipo de moléculas causan inhibición de las funciones dependientes del ADN. Ejemplos incluye a las diarilamidinas (como el DAPI, berenil y pentamidina) distamicina A y bis-benzimidazoles como el Hoechst 33258 (Wang *et al.*, 2010), **Figura 8**. Entre las diarilamidinas destaca el DAPI puesto que se une e inhibe la ADN polimerasa, mediante la interacción con las regiones ricas en AT. Además, el DAPI se usa como tinción diferencial entre los cromosomas y para la identificación de anomalías cromosómicas en neoplasias. El DAPI se une al surco menor mediante los anillos de fenilo e indol paralelos a las paredes del surco. Además, hay contribución por enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas (Baraldi *et al.*, 2004).

Por otro lado, el berenil posee actividad biológica como bactericida y tripanocida, éste también se une a secuencias ricas en AT donde el sitio de unión es una secuencia de tres pares de bases (ATT). Además, la pentamidina es una diamidina aromática activa contra una variedad de protozoos, este compuesto inhibe el ADN, el ARN y la síntesis de proteínas y al igual que los otros dos compuestos mencionados, existe una preferencia para la región rica en AT del ADN que contiene al menos cinco pares de bases AT consecutivas (Baraldi *et al.*, 2004). La distamicina A también se une a secuencias ricas en AT, uniéndose al surco menor en una estequiometría 1:1 o 1:2 y aparentemente su actividad biológica se da por inhibición de la topoisomerasa I y II, e inhibe la ARN polimerasa II provocando sitios frágiles. Mientras que el Hoechst 33258 también se unen en el surco menor del ADN y muestra selectividad por la secuencia AT, este es utilizado como tinte fluorescente y además ha sido sometido a una evaluación clínica como agente anticancerígeno y se sabe que inhibe la enzima topoisomerasa (Nelson *et al.*, 2007).

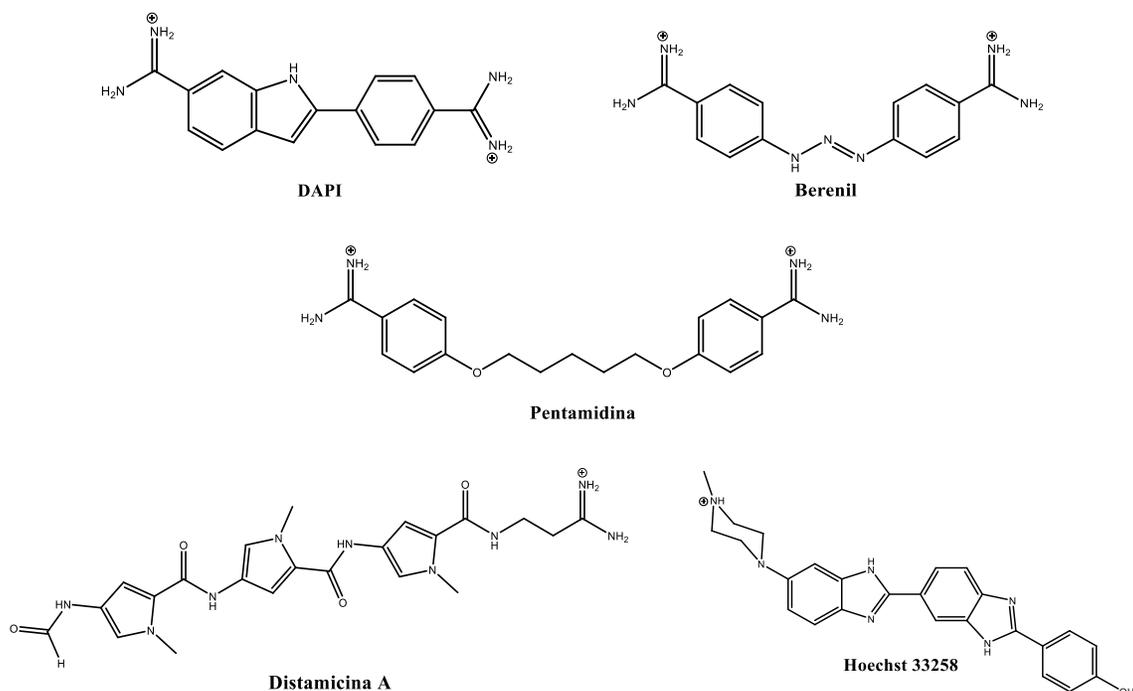


Figura 8. Estructura química de importantes ligandos al surco menor (Fuente: Baraldi *et al.*, 2004).

3.2.2.2. Moléculas que se unen al surco mayor del ADN

El surco mayor es el surco más ancho, como su nombre lo indica, este surco tiene valores aproximados de 11.6 Å en una secuencia promedio. Grandes biomoléculas como las proteínas se unen en este surco, pero hay pocos reportes de moléculas pequeñas que se unen en este surco, sin embargo, éste posee los grupos funcionales más libres para interactuar (Paul y Bhattacharya, 2012).

Un ejemplo de un compuesto que se une al surco mayor es el verde de metilo (**Figura 9**), el cual es utilizado como colorante de núcleos celulares, este posee carga positiva, se une a ADN y posee fluorescencia y se usa como tinción en geles de agarosa, la interacción se da mediante interacciones electrostáticas en el surco mayor (Kim y Nordén, 1993).

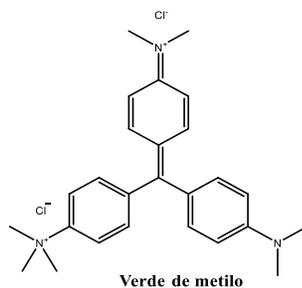


Figura 9. Estructura química del verde de metilo (Fuente: Kim y Nordén, 1993).

Otros dos ejemplos de moléculas pequeñas que se unen al surco mayor son la altromicina B y hedamicina, **Figura 10**, ambos antibióticos con actividad anticancerígena que actúan como agentes alquilantes. A pesar de que su modo de unión es covalente se acercan al ADN mediante interacciones no covalentes, tales como formación de puentes de hidrógeno en el surco menor (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

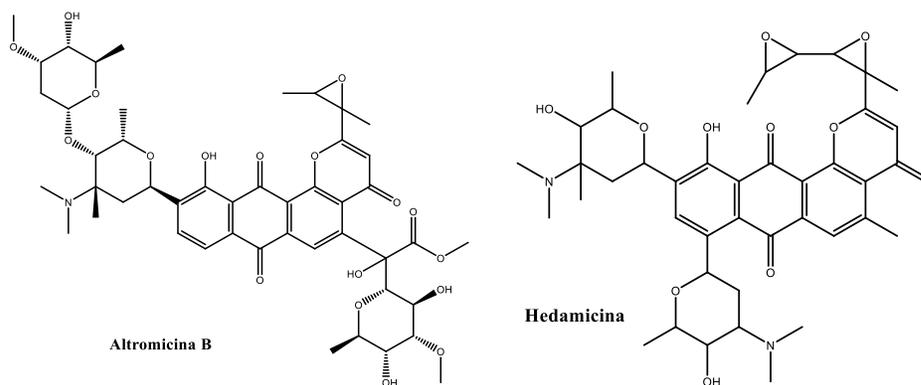


Figura 10. Estructura química de dos compuestos que se unen inicialmente al surco mayor (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

Otro ejemplo interesante es el ditercalinio, un fármaco anticancerígeno el cual se une en el surco mayor, pero además intercala el ADN de doble cadena; en la **Figura 11** se presenta la estructura química de dicho compuesto.

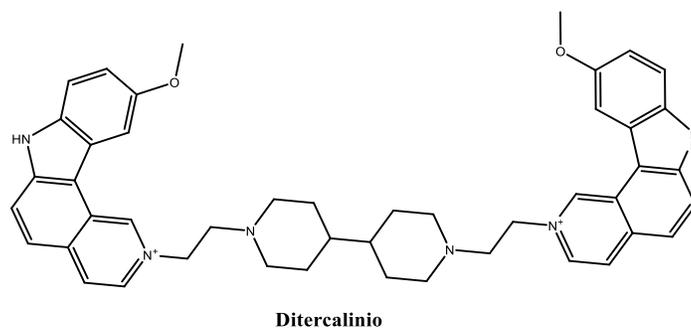


Figura 11. Estructura química de un compuesto que se une en el surco mayor (Fuente: Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

3.2.3. Intercaladores de ADN

Los intercaladores orgánicos son una clase de compuestos poliaromáticos que se pueden insertar o intercalar entre dos pares de bases adyacentes del ADN de doble cadena e inhibir la síntesis de ácidos nucleicos *in vivo* (Rescifina *et al.*, 2014).

Un intercalador posee una superficie óptima aproximada de 39 \AA^2 que se puede insertar entre las pares de bases de un ácido nucleico. La superficie mínima corresponde a la de una molécula de naftaleno. Usualmente los intercaladores de ADN contienen sistemas aromáticos policíclicos, planos y deficientes en electrones con la forma correcta para que coincida con las bases de ADN; además algunos presentan carga positiva, estos intercaladores catiónicos interaccionan con el ADN en un proceso en dos etapas: primeramente hay una interacción electrostática con los centros de carga negativa y luego el intercalador se desliza a lo largo de la hélice hasta que encuentra un lugar abierto, provocado por el movimiento térmico de los pares de bases (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016; Lorente y Fernández, 2008).

Por otro lado, los dos principales tipos de intercalación se describen a continuación y se representan gráficamente en la **Figura 12**:

1) Intercalación clásica: En este el intercalador se une al ADN con esencialmente todo su sistema aromático, entre los clásicos se encuentra el bromuro de etidio y la proflavina.

2) Intercalación en hebra (tipo “threading”) o no clásica: el intercalador muestra interacciones con surcos mayores y menores del ADN (Paul y Bhattacharya, 2012):

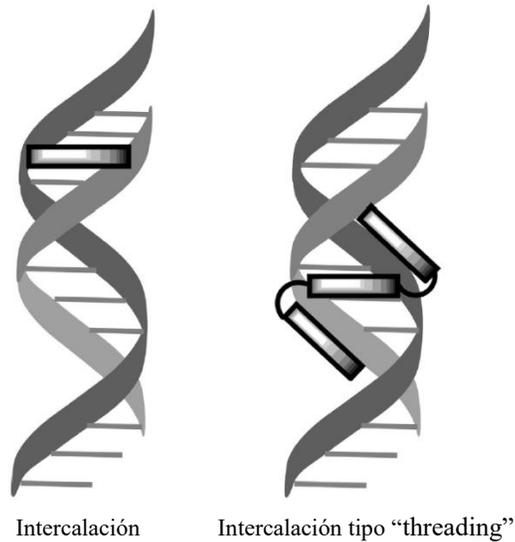


Figura 12. Representación gráfica de los tipos de intercaladores (Fuente: Rescifina *et al.*, 2014).

Además, los intercaladores pueden unirse al ADN de doble cadena través de dos mecanismos: En el primero, el intercalador desenrolla el ADN y coloca su sistema aromático y plano entre dos bases adyacentes, dejando las pares de bases intactas. En el segundo, la interacción es a través de la inserción, en este la molécula plana expulsa una de las bases que ocupa su posición en la estructura de dos cadenas. Este tipo de interacción es particularmente favorable en el ADN no coincidente o abásico (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2016).

Existen diferentes cambios característicos que se producen cuando una molécula pequeña se intercala en el ADN. Primeramente, las bases se separan aproximadamente 3.4 Å para acomodar a la molécula, lo que se corresponde con el espesor de un anillo aromático. Esta separación produce un desenrollamiento alrededor del eje de la hélice. Esta modificación estructural interfiere con la acción de las topoisomerasas (alterando el grado de superenrollamiento) y de las polimerasas (inhibiendo la replicación del ADN e impidiendo la corrección de errores). Además, la intercalación en múltiples lugares de la hélice produce un alargamiento de la misma que origina, a su vez, variaciones en la viscosidad y en el coeficiente de sedimentación del ADN. En la **Figura 13** se esquematiza dos de los cambios más importantes la elongación y el desenrollamiento que se da para compensar la elongación (Lorente y Fernández, 2008; Almaqwashi *et al.*, 2016).

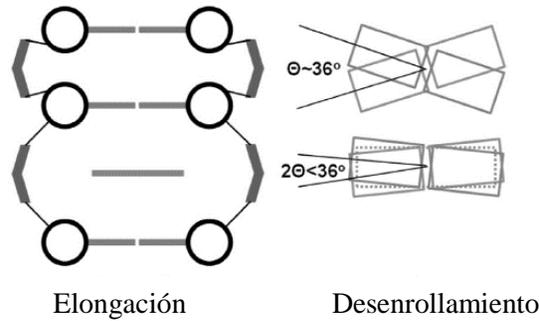


Figura 13. Ilustración esquemática de los cambios que se dan cuando una molécula intercala el ADN, a la izquierda el alargamiento de la hélice y a la derecha el desenrollamiento (Fuente: Almqwashi *et al.*, 2016).

Ejemplos importantes de intercaladores, **Figura 14**, conocidos son el bromuro de etidio, utilizado como colorante en laboratorios de biología molecular; la quinacrina, utilizada como fármaco antimalaria y antibiótico, y la daunomicina, usada como medicamento anticancerígeno, en especial en leucemias agudas. La unión de estas moléculas al ADN se caracteriza por la inserción de anillos aromáticos planos entre los pares de bases de ADN. La estabilidad de los complejos de intercalación se rige por fuerzas de van der Waals, fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas (Paul y Bhattacharya, 2012).

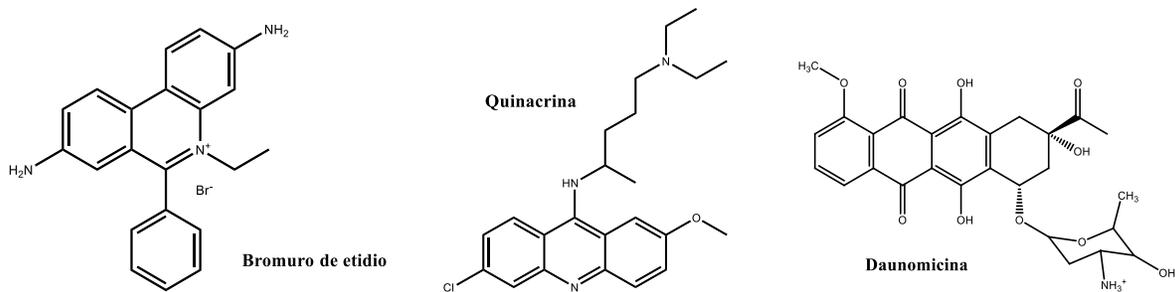


Figura 14. Estructura química de algunos intercaladores de ADN (Fuente: Paul y Bhattacharya, 2012).

Un ejemplo de intercalador clásico el cual puede presumiblemente intercalarse sin tener ningún efecto significativo en el surco mayor o menor es la proflavina (**Figura 15**), un derivado de la acridina, utilizado como un antiséptico y bactericida, además es conocido por sus propiedades mutagénicas en el ADN (Rescifina *et al.*, 2014).

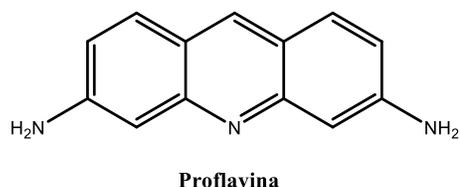


Figura 15. Estructura química de proflavina (Fuente: Rescifina *et al.*, 2014).

Otros fármacos importantes (**Figura 16**) que se intercalan son la camptotecina, que posee propiedades antiproliferativas contra tumores malignos, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de colon y de mama, y la doxorubicina, otro medicamento ampliamente utilizado como tratamiento contra el cáncer y además un antibiótico; ambos compuestos son voluminosos, por tanto, no solo intercalan sino que interaccionan en uno de los surcos, en especial el menor (Rescifina *et al.*, 2014).

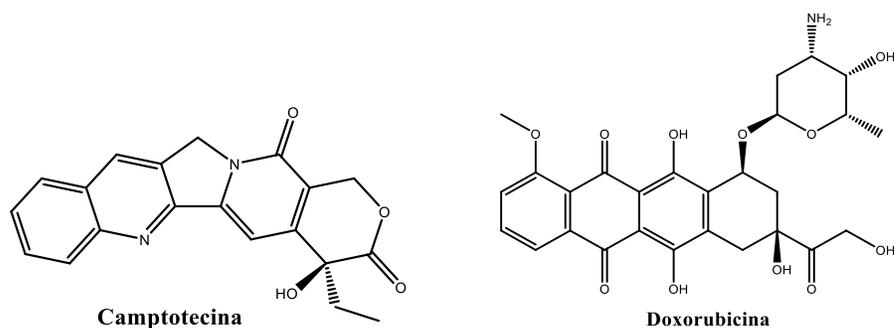


Figura 16. Estructura química de fármacos intercaladores (Fuente: Rescifina *et al.*, 2014).

Un ejemplo de intercalador no clásico interesante es el m-AMSA (**Figura 17**), el cual inhibe la actividad de la enzima topoisomerasa. El grupo acridina se intercala entre las pares de bases mientras que el resto interacciona con el resto del ADN (Gonzalez-Garcia J. y Vilar R., 2016).

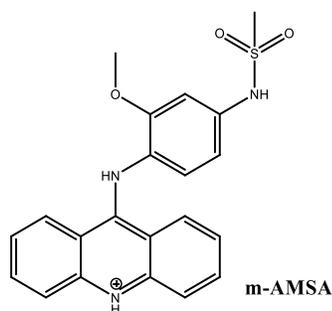


Figura 17. Estructura química de m-AMSA (Fuente: Gonzalez-Garcia J. y Vilar R., 2016).

A continuación, se describen brevemente algunos ejemplos más recientes dentro de la literatura de moléculas que se unen mediante intercalación pero aún no son aprobados como fármacos, pero presentan actividad biológica prometedora. En 2018, Lebedeva *et al.*, estudiaron porfirinas catiónicas demostrando que la posición del sustituyente catiónico en las porfirinas influye en la afinidad presentada por el ADN, además se observó que las porfirinas son capaces de romper el ADN. En la **Figura 18**, se observa una imagen esquematizando a estas porfirinas interactuando con el ADN y se observan las estructuras mínimas optimizadas de las dos porfirinas utilizadas en este estudio (Lebedeva *et al.*, en 2018).

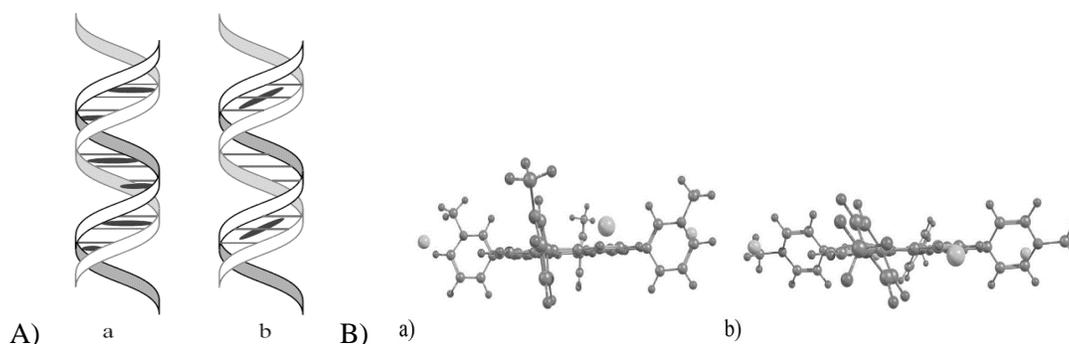


Figura 18. A) Representación esquemática de la unión a ADN de las porfirinas (representadas como estructuras negras sólidas) reportadas por Lebedeva *et al.*, en 2018 a) ADN rico en CG, b) ADN rico en AT. B) Estructuras optimizadas de las porfirinas utilizadas en este reporte.

Otro ejemplo de 2018, es el reportado por Farooqi *et al.*, donde se sintetizaron dos derivados de ibuprofeno y ciprofloxacina (**Figura 19**). Los estudios *in vitro* de unión a ADN fueron llevados a cabo por espectroscopia de UV/Vis, fluorescencia, voltametría cíclica y viscosimetría utilizando un pH de 7.4 (simulando el pH de la sangre) y de 4.7 (simulando en

pH del estómago), dando como resultado que los compuestos se unían mediante intercalación. Además, para ambos compuestos se llevaron a cabo estudios de evaluación antiproliferativa en una línea de adenocarcinoma hepatocelular revelando que tienen potencial, pero de acuerdo a los autores de este trabajo faltan más estudios para revelar su modo de acción (Farooqi *et al.*, 2018).

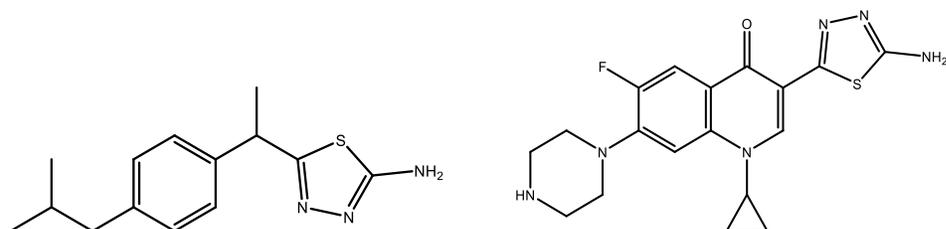


Figura 19. Estructura química de los derivados reportados por Farooqi *et al.*, 2018.

También durante 2018, Bharathi-Dileepan *et al.*, reportaron la síntesis de cuatro compuestos macrocíclicos (**Figura 20**) con la capacidad de unirse a ADN de doble cadena, estos fueron estudiados mediante espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular (CD), espectroscopia de UV/Vis y viscosimetría. Los resultados indicaron que los compuestos se unían a ADN mediante intercalación. Además, se estudió su capacidad antioxidante en radicales libres DPPH, NO y OH y también se realizaron estudios antibacterianos mostrando que estos compuestos tienen el potencial para detener el crecimiento de bacterias (Bharathi-Dileepan *et al.*, 2018).

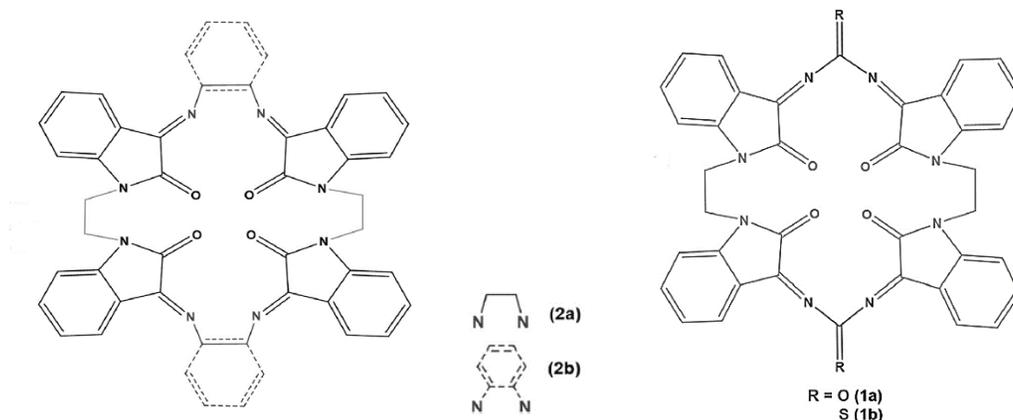


Figura 20. Estructura química de los macrociclos reportados por Bharathi-Dileepan *et al.*, 2018.

En la mayoría de los ejemplos encontrados de moléculas que funcionan como intercaladores, existe contribución de otros tipos de modos de unión ya sea con interacción con uno de los surcos, interacciones electrostáticas, de puente de hidrógeno o incluso efecto hidrofóbico. Por lo que para hacer la unión más fuerte y específica es necesario diseñar moléculas que combinen varios modos de unión. Esto anterior, es lo que se busca en este trabajo. A continuación, se mencionan las técnicas que se pueden utilizar para estudiar moléculas capaces de intercalar.

3.2.3.1. Técnicas usuales para el estudio de moléculas capaces de intercalar ADN

Existen diferentes técnicas que son utilizadas para el estudio de moléculas intercaladoras entre ellas destaca la espectroscopia de absorción (UV/Vis), la cual es ampliamente utilizada puesto que la formación del nuevo complejo ocasiona cambios en los espectros de absorción de la molécula evaluada. Al respecto, usualmente se observa hipocromismo, debido a la estabilización de la estructura secundaria del ADN, ya sea por efectos electrostáticos o por la intercalación, y desplazamiento hacia el rojo. Por otro lado, otra técnica muy utilizada es la espectroscopia de fluorescencia, esto dado que las moléculas que poseen grupos aromáticos funcionales muestran gran intensidad de fluorescencia, mientras que el ADN posee una intensidad despreciable, por eso se utilizan comúnmente estudios de competencia; como el ensayo del desplazamiento del bromuro de etidio, donde se estudia la capacidad de una molécula de desplazar al bromuro de etidio y determinar indirectamente, la posibilidad de intercalación del mismo (Rehman *et al.*, 2015; Long y Barton, 1990; Efthimiadou *et al.*, 2010).

Por otro lado, la medición de viscosidad es un método hidrodinámico de determinación del modo de unión de una molécula pequeña con el ADN. Es altamente sensible y se considera una técnica fiable. Cuando una molécula es capaz de intercalar, las pares de bases del ADN se separan para acomodar la molécula lo cual conduce a un aumento en la longitud total del ADN y por lo tanto un aumento de la viscosidad (Hannon, 2007; Paul y Bhattacharya, 2012).

Otra de las técnicas muy utilizadas son la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), esta nos da diferentes parámetros termodinámicos de la interacción entre el intercalante y el ADN, en ella se calculan varios parámetros como: sitios de unión (n), constantes de asociación (K), cambios en la entalpía (ΔH) y en la entropía (ΔS). Una gran entalpía negativa y una entropía positiva son típicos de la unión por intercalación (Rehman *et al.*, 2015).

También se estudian por resonancia magnética nuclear, los cambios provocados por la interacción entre la molécula y el ADN, el más utilizado es el RMN de ^1H ; aunque para estudiar los cambios que se dan los grupos fosfatos del ADN se utiliza RMN de ^{31}P . En el caso de la intercalación, este fenómeno da como resultado el ensanchamiento total de las señales en RMN de ^1H y cuando una molécula se observa parcialmente intercalada, se observa ensanchamiento de picos y desplazamientos a campo alto. Por otro lado, otra técnica que se puede utilizar es el dicroísmo circular para detectar cualquier cambio que ocurra en la estructura secundaria del ADN, en el caso de la intercalación se observan cambios importantes en las bandas conocidas del ADN, se producen cambios en la intensidad de los picos observados (Rehman *et al.*, 2015).

Existen además otras técnicas complementarias que se pueden emplear como la voltametría cíclica, la cual se utiliza comúnmente con moléculas que poseen metales de transición; por esta técnica, se pueden determinar la constante de unión y el tamaño de los sitios de unión. Otra técnica complementaria es la electroforesis en gel de agarosa, como las pruebas de movilidad electroforética o de rompimiento “cleavage”, la cual da un indicio cualitativo de la capacidad de unión a ADN, o la capacidad de rompimiento del mismo por medio de una molécula pequeña (Rescifina *et al.*, 2014).

3.3. El ADN como objetivo en la terapia contra el cáncer

En la terapia contra el cáncer, el principal objetivo es detener el ciclo celular desregulado de la célula cancerígena para llevarla hasta la apoptosis. Por esta razón se buscan fármacos que se puedan unir específicamente al ADN y alterar el proceso normal de replicación. La acción de estos se centra en la especificidad de reconocimiento (Ali y Bhattacharya, 2014).

Se han investigado diferentes blancos en la lucha contra el cáncer, actualmente existen objetivos como vías de señalización, tales como proteínas, o los microtúbulos del citoesqueleto. Sin embargo, a pesar de esas investigaciones, el ADN es todavía uno de los blancos más estudiados. Los medicamentos contra el cáncer que se unen al ADN pueden interactuar con él a través de los siguientes seis modos: 1) mediante una modificación covalente, 2) inhibición o bloqueo de la enzima topoisomerasa, 3) inhibición de las ADN polimerasas y/o ARN, 4) simulando precursores de ácidos nucleicos, 5) disminuyendo la concentración del precursor o 6) bloqueando el huso mitótico (Wang *et al.*, 2010).

A lo largo de los años se han investigados los mecanismos biológicos, para establecer una cura contra el cáncer y por lo tanto se han sintetizado un gran número de moléculas pequeñas diseñadas para dirigirse al ADN. Las moléculas pequeñas pueden actuar para detener el cáncer de diversas maneras, aun cuando después deben probar ser inocuos toxicológicamente y tener una adecuada absorción y eliminación, como se esquematiza en la **Figura 21** (Ali y Bhattacharya, 2014).

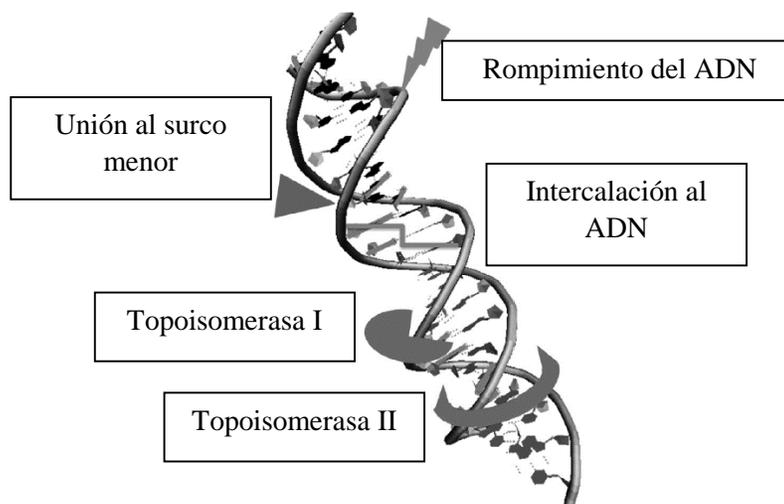


Figura 21. Formas de atacar el ADN para detener el cáncer (Fuente: Ali y Bhattacharya, 2014).

3.4. Los alcaloides

Los alcaloides son un grupo muy diverso de compuestos que contienen una estructura de un anillo y un átomo de nitrógeno. En la mayoría de los casos, el átomo de nitrógeno se

encuentra dentro de un anillo heterocíclico. Además, varios alcaloides poseen actividad biológica importante, tales como la acción de alivio de la efedrina para el asma, la acción analgésica de la morfina, y los efectos anticancerígenos de la vinblastina. De hecho, los alcaloides están entre los componentes activos de muchos medicamentos y se han desarrollado con éxito fármacos quimioterapéuticos, utilizándolos como unidad base, realizando modificaciones para hacerlos más selectivos (Lu *et al.*, 2012). Entre ellos destaca la tetrandrina por sus diversas propiedades que se enlistan a continuación.

3.4.1. Tetrandrina: Propiedades y derivados

La tetrandrina es un alcaloide bisbencilisoquinolínico (**Figura 1**) extraído de plantas de la familia de las Menispermaceae (e.g. *Stephania tetrandra* S. Moore), para el cual se ha reportado que tiene diversas propiedades farmacológicas tales como inmunosupresor, bloqueador no selectivo de los canales de Ca^{2+} , capacidad antioxidante, antifibrosis, antiproliferativa en cánceres de mama, de pulmón, de colón, nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma de Burkitt, carcinoma hepatocelular y leucemia (Bhagya y Chandrashekar, 2016). Además, durante años se ha utilizado en la medicina tradicional china para tratar a pacientes con artritis, arritmia, hipertensión, inflamación, silicosis, asma, tuberculosis, disentería, hiperglucemia y malaria, entre otras (Liu *et al.* 2016; Bhagya y Chandrashekar, 2016).

Se ha demostrado que la tetrandrina tiene actividad anticancerígena que se le puede atribuir a diferentes procesos: se activan diferentes rutas de señalización para producir antiproliferación y efectos antitumorales en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque a la fecha aún no se conocen completamente los mecanismos por los cuales la tetrandrina es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerígenas (Bhagya y Chandrashekar, 2018), se sabe que es posible gracias a diferentes vías como generación de especies reactivas de oxígeno, un mayor flujo de autofagia, vía caspasas, detención del ciclo celular y por modificación de los canales de calcio. En la **Tabla 1** se resumen diferentes mecanismos encontrados y los blancos que tienen en diferentes tipos de células cancerígenas (Bhagya y Chandrashekar, 2018).

Tabla 1. Mecanismos de acción en diferentes tipos de cáncer utilizando tetrandrina, derivados de tetrandrina o de la tetrandrina en sinergia con medicamentos utilizados como quimioterapia (Fuente: Bhagya y Chandrashekar, 2018).

Compuesto	Tipo de estudio	Tipo de cáncer	Objetivo celular y mecanismo
Tetrandrina		Renal	Detención G_1 –sobreexpresión de p21 ^{Cip} y p27 ^{Kip}
Tetrandrina		Pulmón	Apoptosis- sobreexpresión de caspasa-8, -9, -3 Detención del ciclo celular –sobreexpresión de P 21, inhibición de CycD1 Antiproliferación –inactivación de AKT Apoptosis – inhibición de ERK
Tetrandrina		Hígado	Apoptosis – activación de caspasa 3 Detención G_1 –sobreexpresión de p53, p21/WAF1 Apoptosis- Aumento de expresión FasL, Fas/APO- 1 Detención G_1 –sobreexpresión de p21, PCNA Apoptosis- sobreexpresión de BAX, BID. Apoptosis – activación de caspasas Apoptosis –activación ROS y supresión de AKT.
Tetrandrina		Colon	Detención de G_1 y apoptosis – activación de GSK3 β e inactivación de AKT Fosforilación de CycD1 a Thr 286 y ubiquitinilación Apoptosis – activación de la vía p38. Antiproliferación – bajaregulación de IGF1R y modulación de β –catenina.
Derivado de tetrandrina H1*		Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Apoptosis: regulación a la baja de c-FLIP para inducir apoptosis extrínseca a través de DR5 Autofagia – sobreexpresión de ATG 5, ATG 7
Tetrandrina	<i>In vitro</i>	Células estrelladas hepáticas	Apoptosis – activación de caspasas, rompimiento de PARP
Tetrandrina		Próstata, Cervical, Pecho, Glioma	Apoptosis – activación de caspasas vía ROS
Tetrandrina		Vegija	Apoptosis – Caspasas -3, -8, -9, Cyt C
Tetrandrina		Gástrico	Apoptosis – ROS
Tetrandrina		Leucemia	Apoptosis – vía caspasa intracelular, activación de PKC- δ
Tetrandrina		Próstata	Apoptosis – activación caspasas y supresión de AKT
Tetrandrina		Glioma	Antiproliferación –inhibición de ADAM17 y baja regulación de p-EGFR, PI3K-AKT
Tetrandrina		Pecho	Antiangiogenesis- inhibición de VEGF, HIF-1 α , ESM-1, Integrina β 5 y sobreexpresión de ICAM Reversión del MDR
Tetrandrina		Hígado, Colon	Apoptosis – ROS/Akt mediada apoptosis intrínseca
Tetrandrina		Vena umbilical endotelial	Proliferación de células inhibitoras de anti-angiogénesis, migración, formación de tubo Detención del ciclo celular
Tetrandrina		Oral	Autofagia – ATG5, Beclin-1 Apoptosis – via caspasa intracelular
Tetrandrina		Leucemia	Autofagia – activación de ROS y señal de NOTCH 1 Expresión reducida e inhibición de las funciones de P-gp
Tetrandrina + doxorubicina		Colon, Leucemia	Regulación de la actividad del transportador ABC y la inversión de la expresión de P-gp
Tetrandrina		Ovario, Colon	Modulación de P-gp

Tetrandrina + Vincristina		Epidermis	Unión e inhibición de P-gp
Tetrandrina	<i>In vitro, xenoinjerto de ratones desnudos</i>	Colon	Antiproliferación –modulando β -catenina
Tetrandrina		Tejido vascular	Detención de G ₁ y antiangiogénesis – activación de ROS e inhibición de AKT – fosforilación
Tetrandrina		Hepático	Apoptosis – activación de caspasas vía ROS
Tetrandrina		Glioma	Anti angiogénesis –supresión de VEGF
Tetrandrina	<i>In vitro, In vivo</i>	Hígado	Autofagia – activación de ROS, ERK e inhibición de ATG7
Tetrandrina		Leucemia	Antiproliferación – inhibición de p210 ^{Bcr-Abl} mRNA y β -catenina
Tetrandrina		Ovario	Antiproliferación – Detención G ₁ –S y supresión de señalización de catenina WNT- β
Tetrandrina		Epidermis	Inversión de la actividad de P-gp
Tetrandrina + daunorrubicina	Clínico	Leucemia	Reversión del MDR
Tetrandrina		Pulmón	-

*Ver estructura química de **H1** en la **Figura 24**.

La tetrandrina es una molécula muy atractiva no sólo por sus propiedades farmacológicas, sino también desde el punto de vista estructural, puesto que es un macrociclo que posee anillos aromáticos, dos centros quirales y dos nitrógenos terciarios que pueden cargarse positivamente por protonación o al ser cuaternizados, y por esta razón en nuestro grupo de investigación se ha empleado como base estructural para la obtención de nuevos anfitriones dicatiónicos para el reconocimiento de aniones de importancia biológica, así como para la hidrólisis de ésteres (Ochoa-Lara *et al.*, 2001; 2004; 2005 y Moreno-Corral y Ochoa-Lara, 2008). Además resulta de importancia señalar que en estudios previos del grupo se estudiaron los pKa de los nitrógenos de la tetrandrina sin modificar, demostrando que ambos poseen dos Pka distintos (pKa1 = 6.33 y pKa2 = 9.6), lo cual hace que el nitrógeno etiquetado con N2' sea más básico y por tanto, más reactivo como nucleófilo (Ochoa-Lara *et al.*; 2001). Con respecto a estos trabajos, a continuación se presentan los aspectos que se consideran más relevantes.

3.4.2.1. Derivados de tetrandrina reportadas por nuestro grupo de investigación

El derivado bisbencilado reportado por Ochoa-Lara *et al.*, en 2001 (**Figura 22**), fue caracterizado y estudiado en solución acuosa por RMN de ¹H, con lo cual se demostró que sufre dimerización a altas concentraciones. También se realizaron titulaciones por RMN de ¹H con una serie de mono- y di-carboxilatos de estructura variable, así como con los nucleótidos AMP, ADP y ATP. Los estudios revelaron que el anfitrón tiene alta selectividad por succinato. Además, se observó que este derivado semisintético presenta una mayor

afinidad por carboxilatos aromáticos en comparación con sus análogos alifáticos. También se observaron contribuciones significativas de interacciones π - π e hidrofóbicas en la formación de complejos con nucleótidos (Ochoa-Lara *et al.*, 2001).

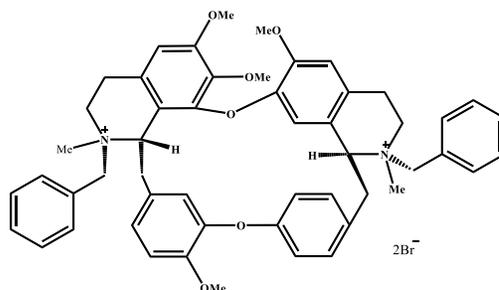


Figura 22. Estructura química del derivado bisbencilado de la tetrandrina (Fuente: Ochoa-Lara *et al.*, 2001).

Dado que el receptor bisbencilado también posee cuatro centros quirales, en 2004 el grupo de investigación de Ochoa-Lara *et al.*, realizaron estudios de reconocimiento quiral con este anfitrión y diversos pares L- y D- de aminoácidos libres y *N*-acetilados y pares de enantiómeros de estructuras análogas, en medio acuoso, por la técnica de RMN de ^1H . De los resultados destacó que el receptor muestra enantioselectividad por la *N*-acetil L-alanina, mientras que con otros derivados más grandes, se une más débilmente y de forma no enantioselectiva (Ochoa-Lara *et al.*, 2004).

Por otro lado, Moreno-Corral y Ochoa-Lara reportaron en 2008 dos derivados de la tetrandrina que poseen dos unidades metilantraqinona (1) o metilacridina (2) (**Figura 23**), análogos al anfitrión reportado por Ochoa-Lara *et al.*, en 2001. Cabe mencionar que dichos receptores fueron diseñados para formar complejos estables en medio acuoso con nucleótidos (en las formas de mono, di- y tri- fosfato), ya que los receptores poseen cargas positivas que pueden interactuar con los fosfatos y además, la incorporación de las unidades de acridina y antraqinona le confiere a los receptores una cavidad extendida capaz de establecer interacciones π - π con unidades aromáticas e interacciones hidrofóbicas en medio acuoso. Por tal razón, se realizaron los estudios de complejación con los nucleótidos por las técnicas de UV/Vis y fluorescencia. Las constantes de asociación de ambos anfitriones mostraron un incremento al aumentar la carga de los huéspedes (por ejemplo: $\text{AMP}^{2-} < \text{ADP}^{3-} < \text{ATP}^{4-}$). Además, se demostró que el derivado **1** presenta selectividad hacia ciertos nucleótidos

dependiendo de la base presente; A, (adenina), G (guanina), C (citosina) o T (timina). De acuerdo a los autores, las fuerzas principales que permitieron la estabilización de los complejos son las interacciones electrostáticas e interacciones de tipo π - π e hidrofóbicas. Es destacable que el derivado **1** también mostró propiedades de reconocimiento quiral en presencia de fenilalanina, con predilección por el enantiómero L (Moreno-Corral y Ochoa-Lara, 2008).

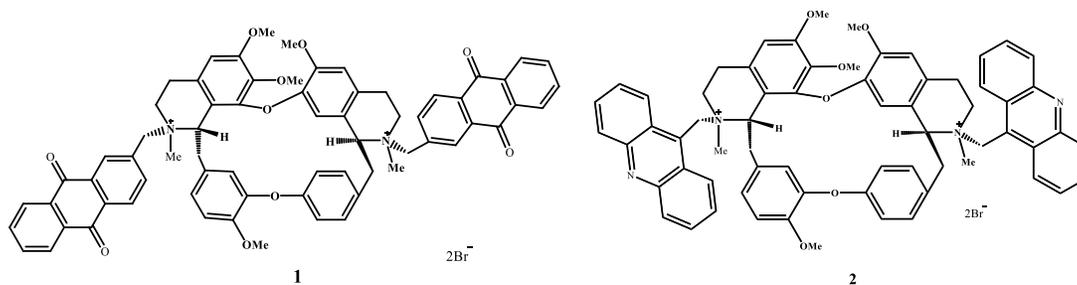


Figura 23. Estructuras químicas de los derivados de la tetrandrina reportados por Moreno-Corral y Ochoa-Lara (2008).

Considerando la buena afinidad reportada para los complejos del derivado **2** con nucleótidos y que la unidad de acridina es intercaladora de pares de bases en ácidos nucleicos, Wong-Molina *et al.*, estudiaron la interacción del receptor **2** con ADN de doble cadena de timo de ternera en la interfase aire-agua. En general de este estudio se concluyó la adhesión del ADN al macrociclo **2** en la interfase, lo que lo convierte en un candidato atractivo para la detección directa de ácidos nucleicos (Wong-Molina *et al.*, 2008).

Recientemente nuestro grupo de investigación reportó el derivado bis-naftilado, el cual se estudió por difracción de rayos X de monocristal y mostró un macroensamblaje de 48 moléculas unidas por interacciones no covalentes débiles (Escobar-Picos *et al.* 2019).

Todos estos trabajos fueron clave en la presente tesis debido a que el grupo tenía experiencia en el reporte de derivados de tetrandrina con la cuaternización de sus nitrógenos.

3.4.1.2. Derivados de tetrandrina reportados por otros grupos de investigación

Además de los trabajos de nuestro grupo de investigación se han obtenido otros derivados mediante diferentes métodos sintéticos. A continuación, se enlistan los derivados y los resultados más relevantes encontrados.

En 2011 se reportó un derivado bromado de tetrandrina etiquetado como H1 (**Figura 24**), se probó el compuesto en diferentes líneas celulares y en todas mostró buenos resultados en especial con células KB (células derivadas de la línea HeLa) y BEL-7402 (cáncer de hígado) con valores de IC₅₀ de 1.068 y 0.671 μM, respectivamente. Este mostró una buena actividad anti-MDR (resistencia contra multi-drogas) tanto in vitro como in vivo. Estos hallazgos respaldaron el potencial de H1 para ser usado en un ensayo clínico (Wei *et al.*, 2011).

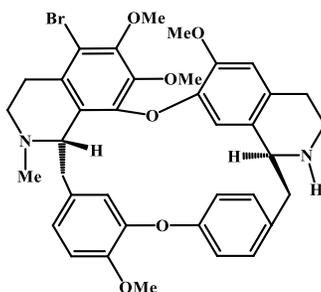


Figura 24. Estructura química de **H1** (Fuente: Wei *et al.*, 2011).

Durante 2012 He *et al.*, se sintetizaron derivados de tetrandrina y fangchinolina y se les evaluó su capacidad para revertir la P-glicoproteína mediadora de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células cancerosas. En la **Figura 25** se muestra la estructura química de los derivados de tetrandrina obtenidos en este reporte y de los derivados de fangchinolina, en estos derivados se incorporaron átomos de bromo en diferentes ubicaciones y se alquilaron los nitrógenos con diferentes sustituyentes pequeños, usando varias combinaciones. Los compuestos fueron probados en células BEL-7402 (cáncer de hígado) y HCT 8 (cáncer ileocecal). Se encontraron resultados prometedores, y en particular se demostró que el compuesto etiquetado como 10 es un potente modulador del MDR (He *et al.*, 2012).

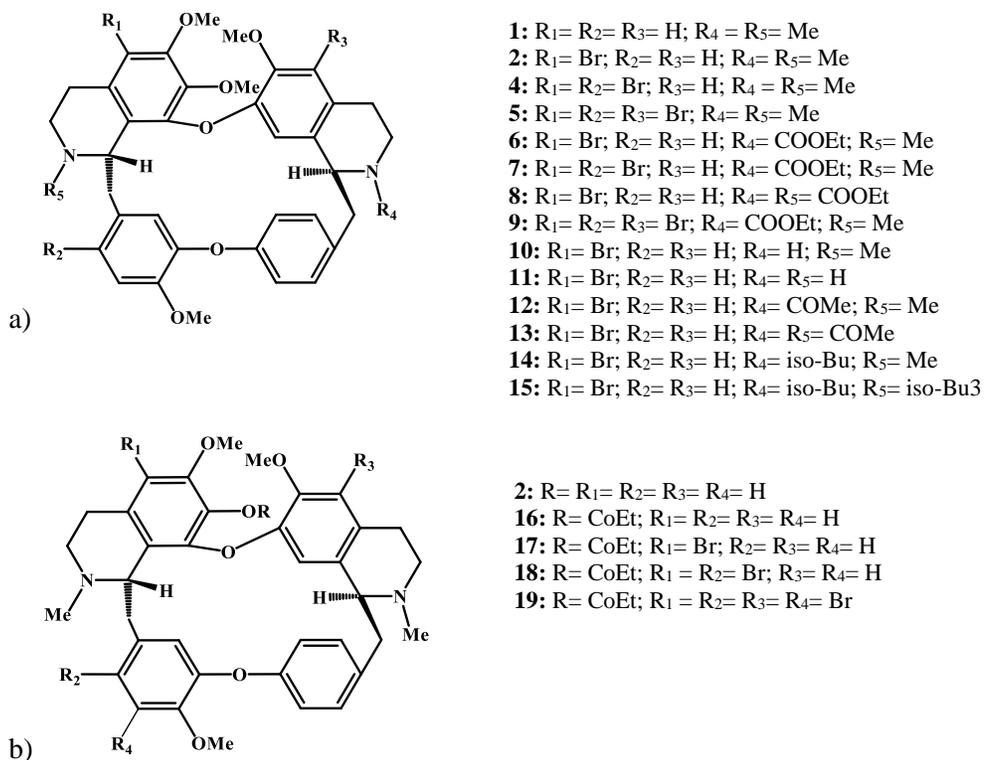


Figura 25. Derivados de a) tetrandrina y b) fangchinolina reportados por He *et al.* (2012).

En 2013 se reportaron 20 derivados con la finalidad de mejorar la actividad antitumoral de la tetrandrina. Estos fueron diseñados y sintetizados por las reacciones de Sonogashira y Suzuki. En la **Figura 26** se observa la estructura química-base de los derivados obtenidos donde R₁ y R₂ son diversos grupos con un anillo aromático y halógenos. Se probaron en tres líneas celulares: A549 (cáncer de pulmón), HepG2 (cáncer de hígado), y BGC-823 (cáncer gástrico). Los resultados mostraron que dos de los compuestos eran potentes contra la línea celular BGC-823 (cáncer de estómago), y otros 4 mostraban potencial contra las células HepG2 (cáncer de hígado). Los resultados mostraron que algunos compuestos pueden usarse en posteriores estudios (Wu *et al.*, 2013).

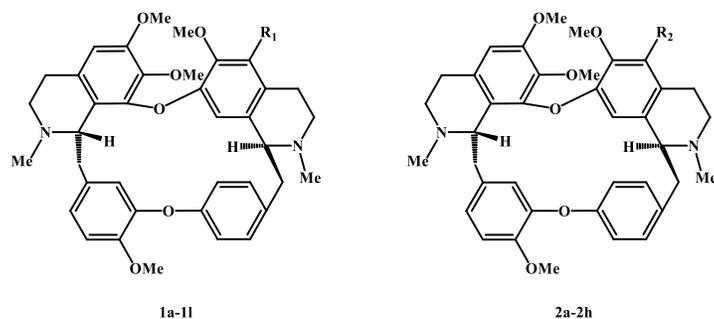


Figura 26. Estructura química-base de los 20 derivados reportados por Wu *et al.*, 2013.

Liu *et al.*, en 2014 reportaron en una patente derivados de la tetrandrina basados en la estrategia sintética de Ochoa-Lara *et al.* Para estos derivados se reporta la actividad antiproliferativa de líneas celulares de cáncer de hígado y pancreático (Patente CN103910738A).

Por otro lado, Liu y colaboradores diseñaron una serie de derivados de tetrandrina y fangchinolina (**Figura 27**), con la finalidad de obtener compuestos activos antitumorales. Se probó la actividad de los compuestos en las células BEL-7402 (cáncer de hígado) y PLC/PRF/5 (cáncer de hígado), también en células A549 (cáncer de pulmón), así como en células de K562 (leucemia humana). Los resultados muestran que los derivados de tetrandrina y fangchinolina son agentes prometedores anticancerígenos (Liu *et al.*, 2014).

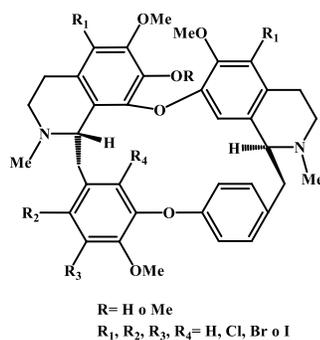


Figura 27. Estructura química de los derivados de tetrandrina y fangchinolina (Liu *et al.*, 2014).

En búsquedas en patentes se encontró una titulada “derivados de la tetrandrina y métodos de preparación de los mismos, y su aplicación en la preparación de medicamentos antitumorales” de Liu *et al.* (2014), en la cual se presenta derivados mono-alquilados de la tetrandrina con ácidos grasos de diferentes longitudes (**Figura 28**), además se realizaron con

los derivados estudios de proliferación celular mostrando que se mejora la inhibición de células HepG2 (cáncer de hígado) y de células de HT29 (cáncer de colón humano) (Liu *et al.*, 2014. Patente: CN103910740A).

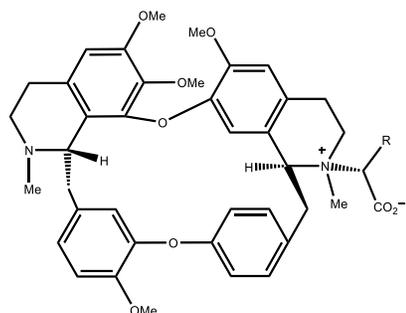


Figura 28. Estructura de los derivados en la patente de Liu *et al.*, 2014.

En 2015 se reportó un derivado de tetrandrina llamado W6, el cual presentó inversión de la resistencia contra multi-drogas (MDR). A concentraciones no citotóxicas, W6 mejoró la eficacia terapéutica de los fármacos contra el cáncer en las células que sobre-expresan P-glicoproteína (P-gp). La P-gp expulsa una gran cantidad de sustancias al exterior de la célula, es un mecanismo de defensa contra sustancias xenobióticas. Una de las principales causas de la falla de diferentes tratamientos contra el cáncer. W6 fue capaz de inhibir la función de transporte y expresión de P-gp, que demuestra la utilidad clínica potencial del derivado (Sun *et al.*, 2015).

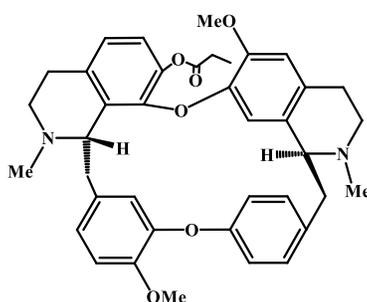


Figura 29. Estructura química de W6 (Sun *et al.*, 2015).

También se ha encontrado otra patente por Pan *et al.*, 2016. En esta se describen derivados de la tetrandrina en los cuales se agregan grupos como halógenos, NO₂, etc., en diferentes carbonos aromáticos, además se prepararon diferentes estereoisómeros. Los

compuestos fueron evaluados en líneas celulares, mostrando buenos resultados en cáncer de hígado (Pan *et al.*, 2016. Patente: WO 2016023404).

Además, Lei *et al.*, reportó en 2016 un nuevo derivado de tetrandrina llamado S1, en este estudio el objetivo fue investigar los efectos antiproliferativos del derivado en cáncer gástrico humano (BGC-823). Dentro de los resultados se observó que S1 induce apoptosis y disminuyó la viabilidad celular. Los valores de IC_{50} fueron de 6.33 ± 0.31 y 4.31 ± 0.60 ($\mu\text{g/mL}$) a las 24 y 48 h después del tratamiento con S1 (Lei *et al.*, 2016).

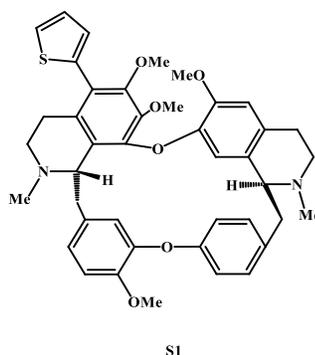
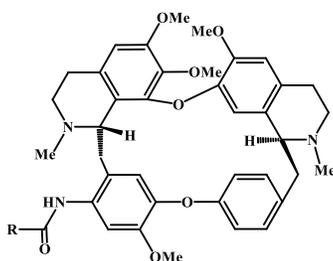


Figura 30. Estructura química de S1 (Fuente: Lei *et al.*, 2016).

Por otro lado, se reportó el diseño y la síntesis de 35 derivados de la tetrandrina, usando para su obtención el método de nitración selectiva, reducción del grupo nitro y su posterior amidación. De esta manera se obtuvieron derivados mono-sustituidos en la posición 14. En la **Figura 31** se puede observar el esqueleto-base de estos compuestos donde la R fueron diferentes grupos halogenados, cadenas alifáticas y grupos carbonilos. Finalmente después de ser obtenidos se estudió la actividad antitumoral de estos compuestos frente a las líneas celulares HCC MHCC97L y PLC/PRF/5 (ambas de cáncer de hígado). Obteniéndose buenos resultados en especial con uno de los derivados que posee en su estructura un grupo furano-2-formil mostrando una IC_{50} de $1.06 \mu\text{M}$ (Lan J. *et al.*, 2017).



1-35

Figura 31. Estructura base química de los 35 derivados reportados por Lan *et al.*, 2017.

También durante 2017, se reportó el diseño y la síntesis de una serie de 25 derivados de tetrandrina y fangchinolina por Li *et al.*, sustituidos con diversos grupos tanto aromáticos como alifáticos en diversas partes de la molécula. Posteriormente se evaluaron contra las células HepG2 (cáncer de hígado) y MCF-7 (cáncer de pecho humano). Se encontró que la incorporación de un grupo aromático en la estructura de la fangchinolina mejoró considerablemente la actividad antiproliferativa en comparación a cuando los sustituyentes eran cadenas alifáticas y en general todos los derivados presentaron mayor selectividad hacia HepG2 en comparación con MCF-7 mostrando valores de $IC_{50} = 0.55\text{--}15.7 \mu\text{M}$. En la **Figura 32** se presenta la estructura química de los derivados estudiados en este trabajo (Li *et al.*, 2017).

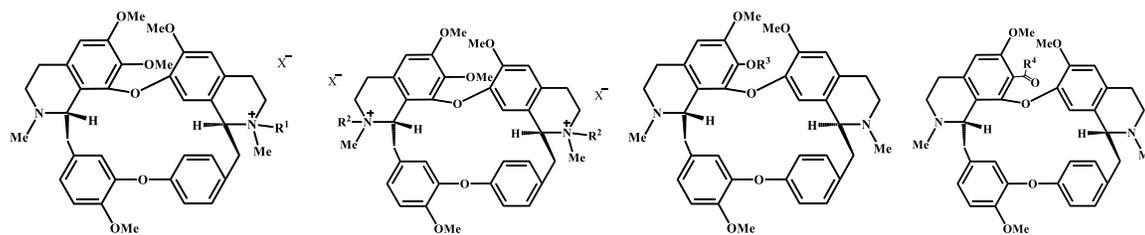


Figura 32. Estructura-base química de los derivados reportados por Li *et al.*, 2017.

Además, en otro reporte se sintetizaron 24 derivados de 14-sulfonamida-tetrandrina como agentes potenciales contra el cáncer. A los derivados se les estudio su actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano MDA-MB-231 (cáncer de pecho), PC-3 (cáncer de próstata), WM9 (melanoma humano), HEL (leucemia humana) y K562 (leucemia mielógena crónica). De los resultados destacó que el compuesto modificado con un grupo 2-naftalenosulfonilo en la posición 14-amino, mostró una impresionante inhibición de las cinco

líneas celulares cancerosas, y especialmente en la línea MDA-MB-231 con un valor IC_{50} de $1.18 \pm 0.14 \mu\text{M}$. En la **Figura 33** se muestra la estructura-base de los 24 derivados, la R corresponde a diferentes grupos desde un CH_3 hasta un naftaleno (Song *et al.*, 2018).

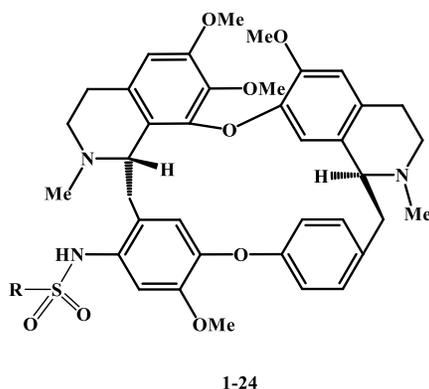


Figura 33. Estructura-base química de los derivados reportados por Song *et al.*, 2018.

Durante 2018 se sintetizaron una serie de derivados de tetrandrina a través de la reacción de Suzuki –Miyaura catalizada por paladio, los autores mostraron que la sustitución en la posición C-5 de la tetrandrina podría mejorar su actividad anti-MDR. En el estudio reportaron 15 nuevos derivados con diferentes grupos aromáticos (**Figura 34**) y posteriormente se probaron su citotoxicidad *in vitro* contra la línea tumoral A549 (cáncer de pulmón). Dentro de los resultados se encontró buena actividad anticancerígena, mejorando los valores de la tetrandrina sin modificar entre un 3.52% hasta un 19.88% (Yang *et al.*, 2018).

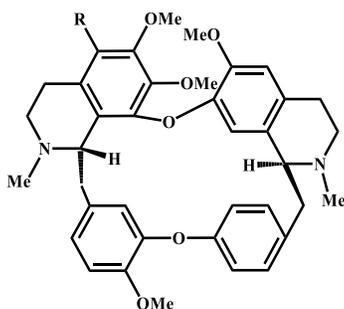


Figura 34. Estructura-base química de los derivados reportados por Yang *et al.*, 2018.

Debido a todo lo anterior, en este trabajo se utilizó como base el alcaloide tetrandrina para obtener dos nuevos derivados mono-alkilados con un grupo acridina y antraceno

respectivamente, esto con la finalidad de que se puedan unir eficientemente a ADN de doble cadena, con la hipótesis de que esta modificación mejore sus propiedades fisicoquímicas, su capacidad de unir ADN y esto pueda ayudar a mejorar sus propiedades biológicas.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Sintetizar y caracterizar dos derivados mono-alquilados del alcaloide tetrandrina, realizar estudios de reconocimiento molecular de estos con una serie de secuencias de ADN y evaluar la actividad biológica de los derivados.

4.2. Particulares

1. Sintetizar y caracterizar por técnicas convencionales dos derivados mono-alquilados del alcaloide tetrandrina a partir de la cuaternización del nitrógeno más reactivo con los halogenuros de alquilo: 9-(bromometil)acridina y 9-(clorometil)antraceno.
2. Caracterizar fisicoquímicamente a los derivados en medio acuoso y pH fisiológico, mediante las técnicas de absorción y emisión electrónica (UV/Vis y Fluorescencia) y potenciometría.
3. Obtener cristales aptos de los derivados para su caracterización por medio de difracción de rayos X de monocristal.
4. Realizar estudios de complejación de los derivados con nucleótidos tipo trifosfato y diversas secuencias de ADN de doble cadena, en medio acuoso y pH fisiológico, por las técnicas de UV/Vis y fluorescencia.
5. Estudiar la complejación de los derivados con un ADN plasmídico por electroforesis.
6. Estudiar la actividad anti-proliferativa de los derivados con las líneas celulares: HeLa (cáncer cervicouterino), A-549 (cáncer de pulmón), LS-180 (cáncer colorrectal), PC-3 (cáncer de próstata), ARPE-19 (células del epitelio de la retina pigmentaria humana) mediante el ensayo MTT.
7. Estudiar la capacidad antioxidante de los derivados contra los radicales libres ABTS^{•+} y DPPH[•].
8. Evaluar la actividad antibacteriana de los derivados contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923TM, *Escherichia coli* ATCC® 25922TM, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883TM y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM por el método de microdilución en caldo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Todos los reactivos y disolventes que se utilizaron se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich. Para la síntesis de los derivados semisintéticos de la tetrandrina se utilizaron los siguientes reactivos: *S,S*-(+)-tetrandrina, ($\geq 90\%$), 9-(bromometil)acridina (97%) y 9-(clorometil)antraceno. Se usaron como disolventes: acetona, cloroformo, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y agua desionizada (Milli-Q[®] Advantage A10). Por otro lado, se emplearon sales y bases para la preparación de soluciones amortiguadoras tales como cloruro de sodio (NaCl 99%), hidróxido de sodio (NaOH 98%), carbonato de sodio (Na₂CO₃ 99%), ácido fosfórico (H₃PO₄ 85%), ácido clorhídrico (HCl 37%), entre otros.

Para los estudios por resonancia magnética nuclear se utilizó como disolvente dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆).

Para los estudios de reconocimiento molecular se utilizaron una serie de nucleótidos tipo trifosfato de las nucleobases adenosina trifosfato (ATP 99 %), citidina trifosfato (CTP 97 %), guanidina trifosfato (GTP 95 %), timidato (TTP 97 %) y uridina trifosfato (UTP 96 %), todos de Sigma-Aldrich.

También se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos adquiridas del laboratorio Integrated DNA Technologies (IDT), las cuales se hibridaron para formar ADN de doble cadena: **ADN-1:** 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3; **ADN-2:** 5' poli (A)₉- poli (T)₉ 3' y 5' poli(A)₉-dC- poli(T)₉ 3'; **ADN-3:** 5' poli(C)₉- poli(G)₉ 3' y 5' poli(C)₉-dTpoli(G)₉ 3'; **ADN-4:** 5' poli(A)₁₈ 3' y 5' poli(T)₁₈ 3'; **ADN-5:** 5' poli(G)₁₈ 3' y 5' poli (C)₁₈ 3'.

5.2. Solución amortiguadora

Para todos los estudios en solución se empleó una solución amortiguadora de fosfatos (0.0064 M) ajustada a un pH=7.2, usando 0.01 M de NaCl para controlar la fuerza iónica y 10% DMSO (v/v) como co-disolvente.

5.3. Equipos

Durante el desarrollo de la parte experimental se emplearon los siguientes equipos:

5.3.1. Lámpara ultravioleta

Se utilizó para monitorear la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). Esta lámpara corresponde al modelo ENF-260C de 115 volts de la marca Spectroline, la cual posee una cámara de la misma marca, modelo CM-10.

5.3.2. Punto de fusión

Para la obtención de los puntos de fusión se utilizó el equipo marca Buchi modelo Melting point B-545 de 200 W de potencia y termómetro electrónico con un intervalo de medición de 0 a 400 °C.

5.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y de ^{13}C

Esta técnica se utilizó para la caracterización de los derivados, se utilizó un espectrómetro marca Bruker modelo Avance 400 que opera a una frecuencia de 400 MHz. Adicionalmente se empleó la técnica bidimensional (COSY) y también de manera complementaria se utilizó resonancia magnética de ^{13}C .

5.3.4. Espectrofotómetro de absorción electrónica (UV/Vis)

Se usó un equipo de Ultravioleta-visible marca Agilent 8435 (Agilent Technologies) de arreglo de diodos, equipado con lámpara de deuterio y halógeno, con un intervalo espectral de 187 a 1100 nm y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Este se utilizó tanto para caracterización de los derivados como para los estudios en solución de los mismos.

Mientras que para los estudios realizados con micro-placa se utilizó un lector de placas de ELISA marca Bio-Rad y un Thermo Scientific™ Espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO.

5.3.5. Espectrofotómetro de emisión electrónica (fluorescencia)

El derivado con antraceno fue estudiado en un equipo de fluorescencia marca Perkin Elmer LS50B equipado con lámpara de xenón y un Shimadzu RF-6000, ambos con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

5.3.6. Espectrómetro de masas

Como parte de la caracterización se obtuvieron los espectros de masas de los derivados con un espectrómetro de masas Agilent 6100 LC/MS (modo ESI⁺).

5.3.7. Potenciómetro

Para medir los pH's de las soluciones utilizadas en los estudios en solución el equipo usado fue un potenciómetro marca Thermo Scientific™ Orion™ 920Aplus con un electrodo Thermo Scientific Orion 8157BNUMD ROSS Ultra pH/ATC Triode, el cual emplea tres soluciones amortiguadoras para su calibración.

Por otro lado, para el estudio de las constantes de protonación del derivado con acridina (MAcT) se utilizó una celda Metrohm de 25 mL a 25.0 ± 0.1 ° C usando recirculador de Julabo FP45-HL y los valores de pH se midieron con un electrodo de vidrio Metrohm (aquatrode plus) conectado a un medidor de pH Metrohm 780.

5.3.8. Lectores de microplacas

Lector de placas marca Bio-Rad (E.U.A) utilizado para la actividad antiproliferativa y un lector Thermo Fisher Scientific Inc. MULTISKAN (E.U.A) utilizado para la medición de la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

5.3.9. Baño de calentamiento

Se usó un baño de calentamiento en seco de bloque marca Thermo Scientific™ para la preparación de los oligos usados en los estudios en solución.

5.3.10. Microcentrífuga

Se utilizó una microcentrífuga FRONTIER™ SERIE 5000 FC5306 de la marca OHAUS para la preparación de los oligos usados en los estudios en solución.

5.3.11. Foto-documentador

Para tomar fotografías de los geles de agarosa se utilizó un Sistema de fotodocumentación GelDoc™ EZ.

5.3.12. Equipo de difracción de Rayos X

Se colectaron datos cristalográficos en un difractómetro Agilent SuperNova Technologies equipado con un detector de área CCD (EosS2) usando radiación Cu-K α ($\lambda =$

1.54184 Å) desde una fuente microfoco de rayos X y un enfriador Cryojet de Oxford Instruments. Las imágenes (frames) para generar el patrón de difracción, se recolectaron a T = 100 K. Las intensidades obtenidas fueron reducidas a F2 (patrones estructurales) y se corrigieron para su absorción con un software.

5.3.13. Microscopio invertido de fluorescencia.

Se utilizó para la observación de las bacterias teñidas con colorantes fluorescentes un microscopio invertido Modelo DMi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Equipado con filtros de fluorescencia (546/10 excitación RHOD). Filtro y emisión 585/40, filtro de excitación DAPI 350/50 y Emisión 460/40 y filtro FITC de excitación 480/40 y 527/30 emisiones) y una cámara DFC 450C monocromática enfriada (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

5.4. Programas computacionales

5.4.1. Ajuste de datos experimentales

Para los ajustes por regresión lineal y no lineal se utilizó el programa Microcal Origin versión 8.0 de Microcal Software. El programa Origin emplea el algoritmo Levenberg-Marquardt (L-M) y el método de simplex. El método L-M está entre los más usados para calcular parámetros ya que realiza el ajuste no lineal y la estimación de los parámetros de un modelo especificado minimizando los valores de chi-cuadrada (χ^2).

5.4.2. Gráficas y figuras

Para graficar los diversos espectros fueron usados los programas MestReNova 9 y Origin 8.0. Además, para la representación gráfica de las moléculas se utilizó el paquete Chem Bio Office Ultra 13.0.

5.4.3. Estudios de potenciometría

Se utilizó el programa HYPERQUAD 2008 para calcular los valores de pKa.

5.4.4. Difracción de rayos X de monocristal

Concluido el experimento de difracción la solución de la estructura, el refinamiento y la salida de datos se realizaron con el programa OLEX2 utilizando SHELXL-2015 para el refinamiento. Las figuras se ilustraron con el programa Diamond.

5.4.5. Microscopia de fluorescencia

Se utilizó un software de superposición (LAS AF ver. 3.1.0, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania) para la captura y manipulación de las imágenes obtenidas por el microscopio.

5.4.6. Modelado molecular

Se realizó el modelado molecular para **MAcT** y tres secuencias de ADN utilizadas en este trabajo. La estructura molecular de **MAcT** fue obtenida de la difracción de rayos X, fue optimizada en la fase gaseosa utilizando el método semiempírico PM3 utilizando el paquete de programas Gaussian 09. El modelado molecular de los complejos con ADN se llevó a cabo usando el Software HyperChem Versión 8.0. El ADN de doble cadena fue generado a partir de la base de datos de ácidos nucleicos. Los ADN utilizados para el modelado fueron el **ADN-1**, **ADN-4** y **ADN-5**, estos fueron optimizados en la fase gaseosa aplicando un campo de fuerza AMBER 99 y un algoritmo conjugado Polak-Ribiere con un criterio de convergencia de $0.001 \text{ kcal } (\text{Å mol})^{-1}$. La conformación optimizada de **MAcT** se acopló manualmente con el ADN de doble cadena basado en los datos obtenidos de las titulaciones espectroscópicas. En la fase inicial, las restricciones de energía fueron aplicadas para mantener los contactos cercanos durante el proceso de optimización de mecánica molecular AMBER 99 y luego fueron eliminados para confirmar que la estructura optimizada fuera la geometría con mínima energía.

5.4.7. Análisis estadístico

Para los ensayos con líneas celulares, capacidad antioxidante y actividad antibacteriana todos los datos se expresaron como media ($IC_{50} \pm SD$) (desviación estándar). Los datos fueron sometidos a análisis estadístico de varianza (ANOVA) comparando medias con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). IBM * SPSS * 20. Las concentraciones inhibitorias se estimaron mediante un análisis Probit, utilizando el programa estadístico NCSS.

5.5. Síntesis de los derivados

Para la obtención de los derivados de la tetrandrina se utilizó la siguiente metodología ilustrada en la **Figura 35**.

5.5.1. Derivado con acridina (MAcT)

Se llevó a cabo en un matraz de tres bocas, con reflujo y agitación constante durante aproximadamente 24 horas, mediante la adición de *S, S*-(+) - tetrandrina (0.200 g, 0.29 mmol) y 9- (bromometil) acridina (0,12 g, 0,44 mmol) en acetona (60 mL). Se obtuvo un precipitado sólido, el cual se lavó con acetona y se secó al vacío por al menos 5 horas.

5.5.2. Derivado con acridina (MAntT)

La síntesis del derivado con antraceno (**MAntT**) se llevó a cabo en un matraz de tres bocas con reflujo y agitación aproximadamente durante 24 horas, usando *S, S*-(+) - tetrandrina (0.250 g, 0.36 mmol) y 9- (clorometil) antraceno (0,126 g, 0,54 mmol) en cloroformo (60 mL), la mezcla de reacción se llevó hasta sequedad y fue lavada con acetona, obteniéndose un sólido, el cual fue secado al vacío por al menos 5 horas.

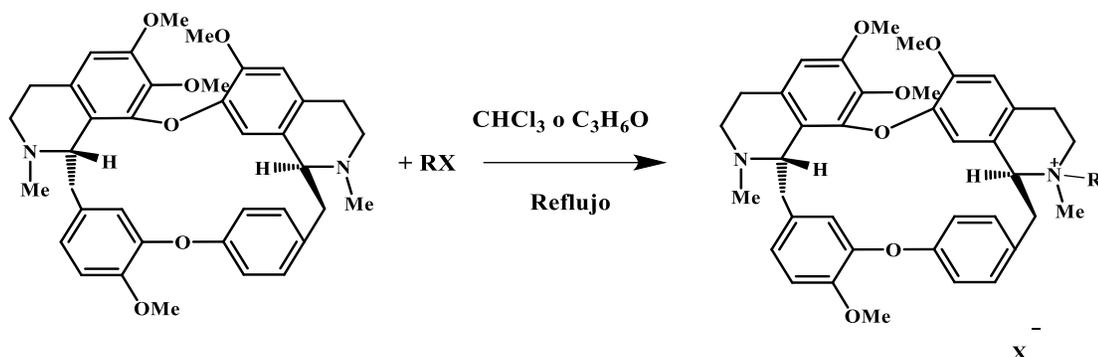


Figura 35. Esquema de reacción general para la obtención de los derivados de la tetrandrina mono-alkilados.

5.6. Análisis por difracción de Rayos X de monocristal

El derivado **MAcT** se cristalizó en metanol por evaporación lenta del disolvente dando un solvato de composición **MAcT**·6H₂O·MeOH. Las estructuras se recogieron a T = 100 K. Las intensidades medidas se redujeron a F² y fue corregida la absorción usando armónicos esféricos (CrysAlisPro). Las intensidades fueron corregidas por Lorentz y efectos de polarización. Los átomos que no son de hidrógeno se refinaron anisotrópicamente. Los

átomos de hidrogeno O-H se localizaron previamente a partir de los mapas de diferencia de Fourier y los átomos de hidrógeno restantes, fueron colocados geoméricamente en posiciones calculadas usando el modelo de conducción.

Se depositó la estructura en la base central de datos cristalográficos de Cambridge (CCDC) como la publicación no. CCDC 1568650. Copias de los datos se pueden obtener de forma gratuita en la aplicación de la CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, Reino Unido (fax: (+44) 1223-336-033; correo electrónico: deposit@ccdc.cam.ac.uk, www: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>).

5.7. Estudios en solución

Como parte de los estudios preliminares, se obtuvieron los espectros de absorción electrónica de ambos derivados a diferentes concentraciones en el rango de 10^{-6} a 10^{-5} M, en solución amortiguadora de fosfatos 0.0064 M, pH = 7.2, 0.01M de NaCl y 10% DMSO (v/v), de este modo se determinaron las características espectrales, tales como los máximos de absorción, así como el coeficiente de extinción molar.

5.7.1. Titulaciones espectrofotométricas con nucleótidos

Se prepararon soluciones de los derivados **MAcT** y **MAnt** disueltos en solución amortiguadora de fosfatos 0.0064 M con un pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). Para los experimentos por espectroscopia de absorción electrónica se empleó una concentración de los derivados de 6×10^{-5} M, mientras que para los estudios de fluorescencia se utilizó una concentración de 6×10^{-6} M. El procedimiento consistió en mantener la concentración fija del derivado e ir agregando sistemáticamente alícuotas de una solución concentrada del nucleótido a estudiar en un rango de concentración de 0 a 0.01 M. Registrando los espectros en cada adición.

Además, los valores de pH fueron medidos al principio y al final de cada titulación y se encontró que eran constantes en todos los casos. Los nucleótidos tipo trifosfato utilizados (adenosina, guanosina, timidina, citidina, uridina) fueron convertidos en sus aniones respectivos ajustando el pH de sus soluciones en agua desionizada mediante la adición de Na_2CO_3 antes de ser utilizados.

Las constantes de afinidad para los complejos por la técnica de UV/Vis se obtuvieron empleando la siguiente ecuación (Schneider y Yatsimirsky, 2000; Thordarson, 2011):

$$A_{obs} = A_H + 0.5\Delta A_{\infty} \left\{ \frac{[H]_T + [G]_T + \frac{1}{K} - \sqrt{\left([H]_T + [G]_T + \frac{1}{K}\right)^2 - 4[H]_T \cdot [G]_T}}{[H]_T} \right\} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A_{obs} es la absorbancia observada, A_H es la absorbancia del derivado libre, ΔA_{∞} es el cambio de absorbancia máximo inducido por la presencia de un huésped, $[G]_T$ es la concentración total del huésped, $[H]_T$ es la concentración total del derivado y K es la constante de afinidad.

Mientras que para los estudios realizados por la técnica de fluorescencia se utilizó la misma ecuación, pero se monitoreó la intensidad de emisión del derivado libre y con las adiciones de nucleótidos.

Para un caso en particular se utilizó la **ecuación 2** correspondiente a un equilibrio 1:2 (Schneider y Yatsimirsky, 2000):

$$I_{obs} = \left\{ \frac{(I_o + I_{11} K_{11} [G]_T + I_{12} K_{11} K_{12} [G]_T^2)}{(1 + K_{11} [G]_T + K_{11} K_{12} [G]_T^2)} \right\} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde I_{obs} es la intensidad de emisión observada, I_o , I_{11} , I_{12} son las intensidades de emisión del huésped libre y los respectivos complejos 1: 1 y 1: 2, K_{11} y K_{12} son las constantes de formación paso a paso correspondientes, y $[G]_T$ es la concentración total del huésped.

5.7.1.1. Método de las variaciones continuas (Job)

Para confirmar la estequiometría del complejo formado por el derivado **MAcT** y el nucleótido adenosín trifosfato (ATP) se realizó el experimento de las variaciones continuas por la técnica de absorción electrónica (UV/Vis), el cual consiste en variar las proporciones de **MAcT** y ATP conservando una concentración total de 6×10^{-5} M e ir tomando los respectivos espectros de absorción (Schneider y Yatsimirsky, 2000). A continuación, la **Tabla 2** muestra de las concentraciones utilizadas, todo el experimento se llevó a cabo en solución amortiguadora de fosfatos 0.0064 M, pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v).

Tabla 2. Concentraciones utilizadas para el método de las variaciones continuas del derivado **MAcT** con ATP y la fracción molar (X) que representa.

[ATP] (M)	[MAcT] (M)	X (MAcT)
0	6×10^{-5}	1
1.2×10^{-5}	4.8×10^{-5}	0.8
2.4×10^{-5}	3.6×10^{-5}	0.6
3×10^{-5}	3×10^{-5}	0.5
3.6×10^{-5}	2.4×10^{-5}	0.4
4.8×10^{-5}	1.2×10^{-5}	0.2
6×10^{-5}	0	0

5.7.2. Estudios potenciométricos

Las constantes de protonación del derivado **MAcT** se obtuvieron tras realizarse titulaciones potenciométricas usando una concentración de **MAcT** de 0.001 M en 10% de DMSO (v/v) en utilizó una celda Metrohm de 25 mL que contenía suficiente HCl para asegurar su protonación completa. Se realizó una retro valoración del resultado para garantizar que se determinaron adecuadamente todos los valores de pKa del compuesto (se usaron correcciones).

Los valores de pH se midieron con un electrodo de vidrio Metrohm durante la adición de pequeñas cantidades del valorante (0.01 M de hidróxido de tetrametilamonio en 10% de DMSO por volumen). El K_w y los valores del factor de corrección f se obtuvieron a partir de un ajuste cuadrado no lineal a partir de la siguiente ecuación (Johansson y Johansson, 1978):

$$V_e = \frac{V_0(C_A + 10^{(pH-pK_w)} - f10^{-pH})}{C_B + f10^{-pH} - 10^{(pH-pK_w)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde V_e es el volumen de equivalencia, V_0 es el volumen inicial de la solución de HCl, C_A es la concentración de ácido, C_B es la concentración de hidróxido. El factor f es un factor de corrección de la medición del pH ($pH_{corr} = pH_{obs} - \log f$). Los valores medios de los logaritmos de protonación con errores estándar se calcularon promediando los datos obtenidos en al menos tres experimentos de titulación independientes.

5.8. Estudios con ADN

5.8.1. Titulaciones espectrofotométricas con ADN

Para los experimentos con ADN de doble cadena, cada oligonucleótido se mezcló en cantidades equimolares con su respectiva secuencia complementaria. Para hibridar las dos cadenas de ADN, se calentó para desnaturalizar a 98 ° C durante 5 minutos en un baño seco seguido de un proceso lento de enfriamiento a temperatura ambiente.

Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: **ADN-1:** 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3; **ADN-2:** 5' poli (A)9- poli (T)9 3' y 5' poli(A)9-dC- poli(T)9 3'; **ADN-3:** 5' poli(C)9- poli(G)9 3' y 5' poli(C)9-dTpoli(G)9 3'; **ADN-4:** 5' poli(A)18 3' y 5' poli(T)18 3'; **ADN-5:** 5' poli(G)18 3' y 5' poli (C)18 3'.

El procedimiento utilizado fue similar al utilizado con nucleótidos, para ello se empleó una concentración del derivado libre de 6×10^{-5} M manteniéndola fija (despreciando la mínima dilución) y se fue agregando sistemáticamente pequeñas alícuotas de una solución de ADN en un rango de 1×10^{-6} M a un máximo de 1×10^{-5} M, todos los experimentos se realizaron en solución amortiguadora de fosfatos 0.0064 M, pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v).

Las constantes de afinidad se obtuvieron monitoreando los cambios en la absorbancia con las concentraciones crecientes de ADN, empleando la siguiente ecuación (Scatchard, 1949):

$$\frac{[ADN]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde [ADN] es la concentración molar de ADN con pares de bases, ε_A corresponde al aparente coeficiente de extinción del derivado, $A_{\text{obsd}} / [\text{derivado}]$, ε_f es el coeficiente de extinción para el derivado libre y ε_b el coeficiente de extinción para el derivado en la forma completamente ligada. La constante de afinidad es calculada de la pendiente obtenida de $\frac{[DNA]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)}$ vs [ADN].

5.8.2. Ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio

Para estudiar la capacidad de intercalación de los derivados **MAcT** y **MAnt** se utilizó un método indirecto conocido como el ensayo del desplazamiento de bromuro de etidio (BrEt), este consistió en medir la intensidad de emisión formada por el complejo ADN-Bromuro de etidio e ir agregando alícuotas concentradas de los derivados a estudiar. El complejo ADN-BrEt estaba formado por una concentración de $[ADN] = 10 \mu M$ y $[BrEt] = 5 \mu M$. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron usando una longitud de onda de excitación de 510 nm. La influencia de cada derivado en el complejo ADN-BrEt se evaluó monitoreando los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia, con los cuales se obtuvieron las constantes de apagamiento K_{sv} empleando la ecuación Stern-Volmer (Jayanthi *et al.*, 2016):

$$\frac{I_0}{I} = K_{sv}[Q] + 1 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde I_0 y I son las intensidades de emisión en ausencia y en presencia del derivado, K_{sv} es la constante de apagamiento, $[Q]$ es la concentración del derivado. K_{sv} es la pendiente obtenida de $\frac{I_0}{I}$ vs $[Q]$.

5.8.3. Movilidad electroforética con ADN plasmídico

Se prepararon mezclas en microtubos como sigue: 1) Plásmido 100 ng, 2) Plásmido 100 ng + DMSO, 3) Plásmido 100 ng + 100 μM tetrandrina, 4) Plásmido 100 ng + 100 μM **MAcT**, 5) Plásmido 100 ng + 100 μM **MAnt**. Estas mezclas se incubaron 2 hrs/24 hrs a 37°C y se corrieron en geles de agarosa 1% por media hora, 1 hora, 2 horas o 3 horas a 60 V. Esto con la finalidad de observar si el tiempo de incubación afectaba y se realizaron diferentes tiempos de corrimiento para observar cambios en la movilidad electroforética o la migración del ADN. Después del corrimiento, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 5 minutos y se destiñeron por 30 minutos o de un día a otro en agua bidestilada. Los geles se observaron en un foto-documentador con luz ultravioleta.

5.9. Estudios de evaluación biológica

5.9.1. Estudios antiproliferativos

5.9.1.1. Cultivo celular

Se utilizaron en este trabajo las líneas celulares humanas: LS-180 (carcinoma colorrectal), HeLa (carcinoma cervical), A-549 (carcinoma de pulmón), PC-3 (carcinoma de próstata) y ARPE-19 (línea celular epitelial pigmentario de la retina humana), todas se compraron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). El cultivo celular fue realizado en medio Eagle modificado Dulbecco's (DMEM) complementado con 5% de suero fetal bovino inactivo con calor (SFB). Se incluyeron penicilina y la estreptomycinina y las células se mantuvieron a una temperatura de 37.0 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora (Fisher Scientific, EE. UU.).

5.9.1.2. Ensayo de evaluación antiproliferativa

Se realizaron ensayos de viabilidad celular para evaluar la actividad inhibidora de tetrandrina y los derivados **MAcT** y **MAnt** en las líneas celulares: HeLa, A-549, LS-180, PC-3 y ARPE-19 usando el ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Las células fueron sembradas en una placa estéril de 96 pocillos con medio DMEM (medio de alta glucosa suplementado con SFB al 5%) a una densidad de 10.000 células / pocillo. Se utilizaron diferentes concentraciones de los derivados y se añadieron seguido de 48 h de incubación. Posteriormente, se agregaron diez microlitros de MTT (5 mg / ml) a cada pocillo al final del período de tratamiento y se incubaron a 37.0 ° C por 4 h. Los cristales de formazan formados se disolvieron en isopropanol ácido, y las placas se leyeron en un lector de placas ELISA Bio-Rad, usando una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Las placas se leyeron normalmente después de 10 min de agregar isopropanol. Todos los experimentos se llevaron a cabo en paralelo con los controles (0.06% -0.50% DMSO). La actividad antiproliferativa de los compuestos se reportó como IC₅₀, siendo esta la concentración que dio una inhibición del 50% del crecimiento celular. Para cada línea celular, se usaron una concentración de los compuestos en un rango desde 25 a 1.5 µg/mL, usando DMSO como control. Cada ensayo se realizó por triplicado.

5.9.2. Evaluación antioxidante por radicales libres

5.9.2.1. Radical ABTS^{•+}

La tetrandrina y los derivados se estudiaron por la técnica del radical libre ABTS^{•+}. Esta emplea el radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) para medir la capacidad antioxidante de la molécula a evaluar. Primeramente, se preparó una solución del reactivo ABTS^{•+} con 19.3 mg de ABTS con 5 mL de agua y una solución de K₂S₂O₈ con 1 mL de agua; se tomaron 88 µL de la segunda y se le agregó a la primera. Se mezclaron adecuadamente y se dejó reposar en la oscuridad 16 horas a temperatura ambiente. De esta solución que estuvo en reposo se tomó 1 mL de solución y se disolvió en 88 mL de etanol, posteriormente se ajustó la absorbancia 0.7 en placa de 96 pozos utilizando 290 µL en cada pozo. Se utilizó como control negativo 290 µL del radical, como blanco se usaron 270 µL del radical + 20 µL del solvente que en este caso fue DMSO y las muestras fueron preparadas con 270 µL + 20 µL de la muestra a evaluar diferentes concentraciones. Se esperó 30 minutos y se leyó la placa en un lector de placa de ELISA a 734 nm. Este experimento se realizó por triplicado utilizando concentraciones de los derivados y la tetrandrina desde 1 a 30 µg/mL usando como solvente metanol. Los resultados se reportaron en % de inhibición del radical evaluado y en IC₅₀. Se calcula con la **Ecuación 6** (Del-Toro-Sánchez *et al.*, 2015), donde Abs_{inicial} es la absorbancia del blanco y Abs_{final} es la absorbancia del compuesto con el radical:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs final}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

5.9.2.2. Radical DPPH[•]

Para este radical se preparó una solución del reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) con 1.25 mg con 50 mL de metanol, se ajustó la absorbancia 0.7 en una placa de 96 pozos utilizando 290 µL en cada pozo. Se utilizó como control negativo 290 µL del radical, como blanco se usaron 270 µL del radical + 20 µL del solvente que en este caso fue metanol y las muestras fueron preparadas con 270 µL + 20 µL de la muestra a evaluar diferentes concentraciones. Se esperó 30 minutos y se leyó la placa a 515 nm. Este experimento se realizó por triplicado utilizando concentraciones desde 1 a 30 µg/mL usando

como solvente metanol. Los resultados se reportaron en % de inhibición del radical evaluado utilizando la **Ecuación 6**.

5.9.3. Actividad antibacteriana

Se probaron los derivados como antibacteriano contra las cepas *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883™ y *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 10145™ de la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las cepas se mantuvieron en caldo BHI (infusión cerebro-corazón) y se monitorearon midiendo la turbidez del cultivo a una densidad óptica (OD) de 600nm, se estandarizaron las cepas a una concentración de 1×10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colonias), comparando con el estándar de McFarland.

Se calcularon los % de inhibición, la IC₅₀ (mínima concentración inhibitoria al 50%) y la IC₉₉ (mínima concentración inhibitoria al 99%) de acuerdo con el método recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, usando la modificación de Lee *et al.*, 2012. Se usó el método de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos con la técnica de doble dilución. Se prepararon soluciones de los derivados y de la tetrandrina sin modificación química en DMSO y posteriormente se diluyeron 1:10 con medio de cultivo BHI, obteniéndose concentraciones totales desde 200 a 6.25 µg/mL, se agregó 100 µL a cada pozo y se añadió un inóculo de 50 µL de la bacteria a evaluar ajustada al estándar de McFarland. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 24 horas. Transcurrido este tiempo se leyeron las microplacas a una OD_{600 nm}. Posteriormente se añadieron 15 µL por pozo del colorante resazurina y se incubó la microplaca aproximadamente 4 horas a 37° C, tomándose de nuevo OD_{600 nm} y capturándose una fotografía. Se utilizó como control negativo DMSO.

5.9.3.1. Análisis de componentes celulares por microscopía de fluorescencia

Para llegar a conocer un poco del mecanismo de acción de la actividad antibacteriana de los derivados y le tetrandrina se realizaron observaciones en un microscopio invertido. Se usó la metodología de Gálvez-Iriqui *et al.*, 2019. Para este experimento se utilizó una placa de 96 pocillos, donde se pusieron 3 pocillos con 200 µg/mL cada uno de cada compuesto a

evaluar y 50 μL del inóculo ajustada a 1×10^8 UFC/mL a cada pocillo. Estos fueron incubados 24 horas y posteriormente se añadieron dos colorantes uno por pocillo:

1) Yoduro de propidio (P 4170, Sigma) se añadió para comprobar la integridad de la membrana, se extrajo el sobrenadante, se usaron dos gotas de solución de yoduro de propidio 3 μM y se incubó durante 15 min en refrigeración en la oscuridad.

2) Se utilizó 2,7'-diclorofluorescina diacetato (diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína o 2,7- DCFH2-DA, D6883, Sigma) para la detección de especies reactivas de oxígeno. Se extrajo el sobrenadante, se añadieron dos gotas de una solución de 2,7-DCFH2-DA 5 μM y se incubó durante 12 h bajo refrigeración.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis y caracterización de los derivados

Para la obtención de los derivados mono-alquilados de la *S*, *S*-(+)-tetrandrina se cuaternizó la amina terciaria más reactiva (etiquetada como N2' en la **Figura 1**). Los valores de los pKa's de los nitrógenos N2 y N2' son respectivamente pKa₁ = 6.33 y pKa₂ = 9.6 (Ochoa-Lara, 2001). Para lograr la monosustitución se utilizaron los alquilantes 9-(bromometil) acridina y 9-(clorometil) antraceno, se utilizaron solventes como acetona y cloroformo y se monitorearon los tiempos de reacción mediante cromatografía en capa fina, los cuales fueron de alrededor de 24 horas, dando como resultado los dos nuevos compuestos etiquetados como **MAcT** y **MAnt** en rendimientos de 54% y 29%, respectivamente (**Figura 1**).

La mono-alquilación de uno de los nitrógenos proporciona un solo estereoisómero debido a la conformación e impedimento estérico del par electrónico del nitrógeno, lo cual es congruente con lo reportado previamente en el grupo de investigación (Ochoa-Lara *et al.* 2001, 2004; Moreno Corral y Lara, 2008). Por consiguiente, los espectros de RMN de ¹H de **MAcT** y **MAnt** muestran un solo conjunto de señales para todos los hidrógenos.

6.1.1. Derivado MAcT

El compuesto obtenido fue un sólido de color amarillo claro, con un punto de descomposición de 205-210 °C y el rendimiento de la reacción fue de 54 %. La obtención y pureza del derivado fueron confirmadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, espectroscopia de absorción (UV-Vis), análisis elemental y espectroscopia de masas.

6.1.1.1. RMN de ¹H de MAcT

En el espectro de RMN de ¹H de **MAcT** en DMSO-*d*₆, se observaron las señales esperadas para el derivado (**Figura 36**). Se llevó a cabo la **asignación parcial** de las señales correspondientes y para efectos de comparación y confirmación de la obtención del derivado se empleó el espectro de RMN de ¹H de la tetrandrina como referencia y los espectros de los derivados reportados por el grupo de investigación. Las señales correspondientes para el N-

CH₃ y O-CH₃ se observaron a $\delta_{\text{H}}=3.81$ (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), y 2.22 (s, 3H) ppm. Las señales para el nuevo metileno (-N-CH₂) incorporado se encontraron a $\delta_{\text{H}}=4.34$ (m, 1H) y 4.95 (m, 1H), mientras que las señales para el -N-CHR aparecieron a $\delta_{\text{H}}=5.76$ (d, $J=14.4$, 1H) y 5.63 (d, $J=14.2$, 1H). Por otro lado, los desplazamientos correspondientes a los 10 protones aromáticos de la tetrandrina se observaron en el rango de 6.21–7.30 ppm, los desplazamientos correspondientes son $\delta_{\text{H}}=7.30$ (d, $J=8.3$ Hz, 1H, H-17'), 7.18 (s, 1H, H-6'), 7.10 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-16'), 6.94 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, H-17), 6.79 (m, 2H, H-14' and H-16), 6.50 (s, 1H, H-6), 6.40 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, H-13'), 6.36 (s, 1H, H-13), y 6.21 (s, 1H, H-9') ppm. Finalmente, las señales correspondientes a los 8 protones de la unidad de acridina se observaron en el rango de 7.68–8.72 ppm correspondiente a los siguientes desplazamientos: $\delta_{\text{H}}=8.72$ (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 8.34 (t, $J=8.4$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 8.02–7.92 (m, 2H), 7.90–7.82 (m, 1H) y 7.78–7.68 (m, 1H) ppm.

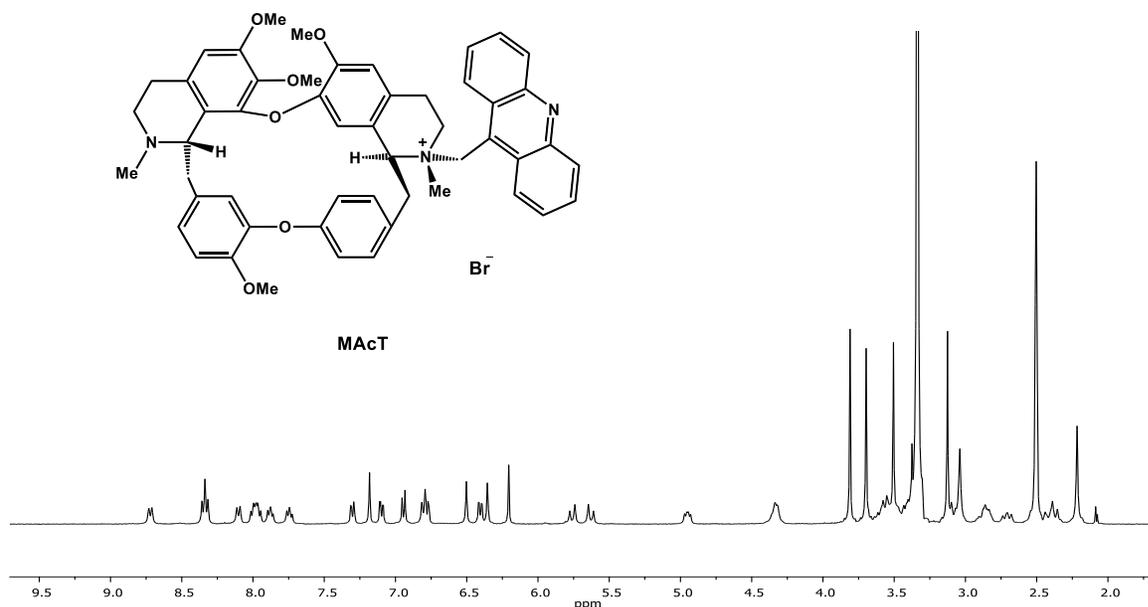


Figura 36. Espectro de RMN de ¹H de MAcT en DMSO-*d*₆ (400 MHz).

6.1.1.2. Análisis elemental de MAcT

Con el análisis elemental se obtuvieron los porcentajes para cada uno de los átomos que constituyen la molécula con la siguiente fórmula molecular: C₅₂H₅₂BrN₃O₆·H₂O: C,

68.41 %; H, 5.96%; N, 4.60 %. Mientras que los porcentajes calculados teóricamente son: C, 68.21 %; H, 5.56 %; N, 4.52 %. Como se observa los porcentajes calculados y teóricos son muy cercanos.

6.1.1.3. Espectroscopia de masas de MAcT (ESI-MS⁺)

El espectro de MAcT presentó un pico a 407.6 m/z. ([MAcT-Br + H]²⁺, 100%). El cual corresponde al ión molecular tras la pérdida del bromuro y presenta dos cargas por la adición de ácido durante el procesamiento de la muestra.

6.1.1.4. Análisis de la estructura cristalina por Difracción de rayos X de monocristal para MAcT

Del análisis por difracción de rayos X de monocristal se obtuvo la siguiente composición para el monocristal MAcT·6H₂O·MeOH (C₅₃H₆₈BrN₃O₁₃, PM = 1035.01 g mol⁻¹) con las siguientes características: aguja incolora con dimensiones de 0.48 × 0.14 × 0.12 mm³ ortorrómbica, grupo espacial P2₁2₁2₁, $a = 9.36784$ (15), $b = 19.3811$ (3), $c = 27.5323$ (5) Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, $V = 4998.75$ (14) Å³, $Z = 4$, $\rho_{\text{calcd}} = 1.375$ g cm⁻³, $\mu = 1.687$ mm⁻¹, 19331 reflexiones totales, 9683 únicas ($R_{\text{int}} = 0.03967$), $R_1 = 0.0438$ para 9340 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$ y $wR_2 = 0.1186$ para todos los datos, 657 parámetros, $GOF = 1.025$.

La asignación correcta de la configuración absoluta se confirma con el parámetro Flack de -0.023. Como era de esperar, la 9- (metil) acridina se incorporó al átomo de nitrógeno etiquetado como N2' (ver **Figura 37**), lo que resulta en la generación de un nuevo centro quiral. La configuración para los átomos C1 y C1' es conocida y durante el refinamiento de los datos de rayos X se confirmó la configuración para N2' como R.

La estructura molecular de la tetrandrina en el cristal comprende un macrociclo de 18 miembros formado por dos restos de tetrahidroisoquinolina unidos entre sí a través de un puente éter y dos grupos bencilo sustituyentes unidos por un segundo puente éter (**Figura 37**). Los cuatro anillos aromáticos están inclinados entre sí por los ángulos formados entre los planos medios correspondientes: A / B, 88.6 °; A / C, 79,1 °; A / D, 14.2 °; B / C, 38,5 °; B / D, 88,0 °; y C / D, 88.2 °. Estos valores son similares a los encontrados para la S, S-tetrandrina natural (Gilmore *et al.*, 1976) y para los solvatos reportados recientemente con acetona y acetonitrilo (Zhou *et al.*, 2014) y el derivado de tetrandrina dimetilado (Liégeois *et al.*, 2014) lo que indica que la conformación molecular es relativamente rígida incluso después de la mono o dialquilación.

El sustituyente metilo en el nitrógeno N2 y el sustituyente de acridina en N2' ocupan ambas orientaciones axiales de la estructura del anillo heterocíclico tetrahydroisoquinolina. La acridina se localiza en la periferia molecular, facilitando las interacciones π - π con otros sustratos. El sustituyente *N*-metilo en N2 muestra una orientación axial también en la *S*, *S*-(+) - tetrandrina y los solvatos mencionados anteriormente con la diferencia de que solo en **MAcT**·6H₂O·MeOH el par de electrones libre de N2 está involucrado en una interacción de enlace de hidrógeno O-H···N con una de las moléculas de agua de la red cristalina.

Además, el apilamiento π - π tampoco se observó en la estructura de rayos X de **MAcT**·6H₂O·MeOH o en cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente. El contraión bromuro está involucrado en cinco interacciones C-H···⁻Br y participa en dos OH···⁻Br se une con moléculas de agua de la estructura cristalina. Se conocen interacciones similares de experimentos de reconocimiento de aniones cloruro con piridina-2,6-carboxamidas dicatiónicas (Dorazco-González *et al.*, 2010).

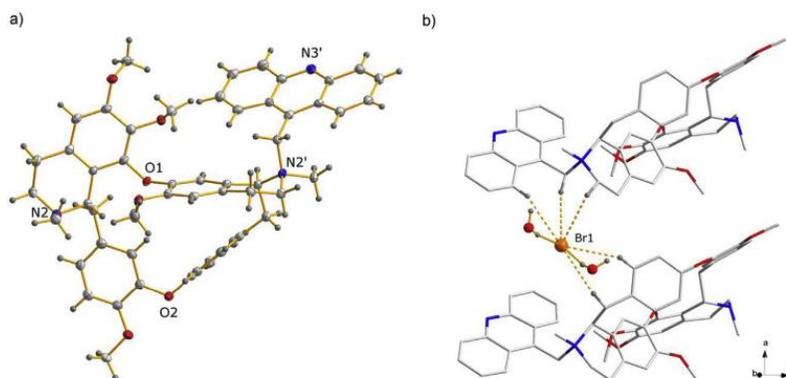


Figura 37. **a)** Vista en perspectiva de la estructura molecular de **MAcT** (sin el contraión Br⁻) extraída de la estructura cristalina de **MAcT**·6H₂O·MeOH. **b)** Vista en perspectiva mostrando los contactos intermoleculares C-H···Br y O-H···Br con el ion bromuro. Los elipsoides de desplazamiento se dibujan en el nivel de probabilidad del 50%.

6.1.2. Derivado MAnT

El producto aislado fue un sólido amarillo con un rendimiento de 29% con un punto de fusión de 190-193 °C. Como en el caso del derivado **MAcT** la obtención y pureza del compuesto fueron confirmadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C,

espectroscopia de absorción (UV-Vis), y emisión electrónica (fluorescencia), análisis elemental y espectroscopia de masas.

6.1.2.1. RMN de ^1H de MAnT

En analogía al derivado previamente mencionado, el espectro de RMN de ^1H de **MAnT** mostró sólo un patrón de señales (**Figura 38**), lo cual confirmó la obtención de un solo estereoisómero. Las señales correspondientes para N-CH₃ y para O-CH₃ se encontraron a: $\delta_{\text{H}}=3.82$ (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), and 2.22 (s, 3H) ppm. Las señales para el nuevo metileno (-N-CH₂) aparecieron a $\delta_{\text{H}}=4.21$ (m, 1H) and 5.08 (m, 1H), mientras que las señales para el N-CHR aparecieron a: $\delta_{\text{H}}=5.67$ (m, 2H). Por otro lado, las señales correspondientes a los 10 protones de la tetrandrina se observaron a los siguientes desplazamientos: $\delta_{\text{H}}=7.38$ (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-17'), 7.20 (s, 1H, H-6'), 7.12 (m, $J=8.1$ Hz, 1H, H-16'), 6.95 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H-17), 6.87–6.72 (m, 2H, H-14' y H-16), 6.50 (s, 1H, H-6), 6.42 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, H-13'), 6.37 (s, 1H, H-13), 6.29 (s, 1H, H-9'). Mientras que las señales para los 9 protones pertenecientes a la unidad de antraceno incorporada fueron las siguientes: $\delta_{\text{H}}=7.69$ ppm (m, 3H), 7.79 ppm (m, 1H), 8.20 ppm (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 8.29 ppm (m, 2H), 8.51 ppm (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 8.99 ppm (s, 1H).

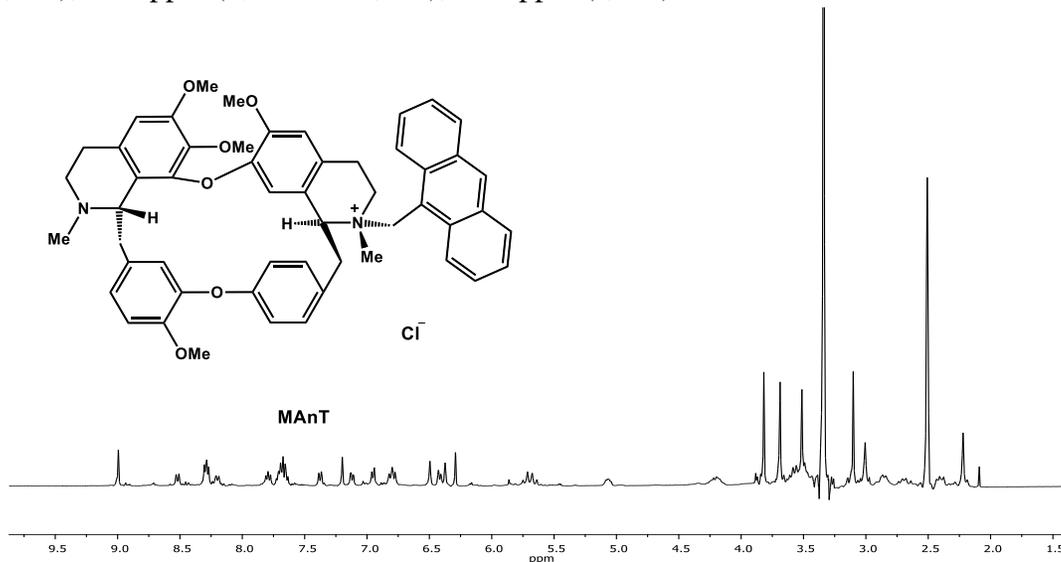


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H de **MAnT** en DMSO- d_6 (400 MHz).

6.1.2.2. Análisis elemental de MAnT

Con el análisis elemental se obtuvieron los porcentajes para cada uno de los átomos que constituyen la molécula con la siguiente fórmula molecular: C₅₃H₅₃ClN₂O₆·2H₂O: C,

71.89 %; H, 6.49 %; N, 3.16 %. Mientras que los porcentajes calculados teóricamente son: C, 71.71 %; H, 6.21 %; N, 2.93 %. Como se observa, los porcentajes calculados y teóricos son muy cercanos.

6.1.2.3. Espectroscopia de masas de MAnT (ESI-MS⁺)

El espectro de **MAnT** presentó un pico a 407.2 m/z. ($[\text{MAnT-Cl} + \text{H}]^{2+}$, con 100% de abundancia). El cual corresponde al ión molecular debido a la pérdida del cloruro y presenta dos cargas por la adición de ácido durante el procesamiento de la muestra.

6.1.2.4. Espectroscopia de fluorescencia para MAnT

Solo el derivado **MAnT** se estudió por esta técnica, se realizó un estudio del derivado a diferentes concentraciones en buffer de fosfatos 0.0064 M, 0.01 de NaCl con 10% de DMSO a pH= 7.2, y se observó la linealidad en un rango de 1×10^{-5} M a 8×10^{-6} M y además se destacó la presencia de tres máximos de intensidad de emisión a $\lambda = 391$ nm, $\lambda = 413$ nm, y $\lambda = 437$ nm tras excitación a una longitud de onda de $\lambda = 350$ nm.

6.2. Estudios en solución

Los derivados obtenidos pueden reconocer diversos huéspedes debido a que tienen la capacidad de interactuar mediante interacciones electrostáticas, apilamiento pi-pi e interacciones de van der Waals. Además, en solución acuosa, existe contribución del efecto hidrofóbico. Por lo tanto, **MAcT** y **MAnT** son potenciales agentes que se unen al ADN de doble cadena.

6.2.1. Caracterización por espectroscopia de absorción electrónica (UV/Vis)

6.2.1.1. Derivado MAcT

Es necesario conocer los espectros de absorción electrónica con el propósito de determinar los coeficientes de extinción molar y conocer los máximos de absorción del derivado **MAcT**. Debido a lo anterior se prepararon varias soluciones acuosas a pH 7.2 en solución amortiguadora de fosfatos con 10% de DMSO y 0.01 M de NaCl a diferentes

concentraciones en el intervalo de 1.5×10^{-5} - 1.65×10^{-4} M, en este estudio se observó un comportamiento lineal absorbancia vs concentración. Los espectros mostraron tres máximos de absorción a 350, 367 y 397 correspondientes a los grupos acridina a los cuales se les determinaron sus correspondientes coeficientes de extinción molar: ϵ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{350} , $\epsilon=4734$; λ_{367} , $\epsilon=5156$; λ_{397} , $\epsilon=2920$. A continuación, la **Figura 39** muestra los espectros de absorción a diferentes concentraciones.

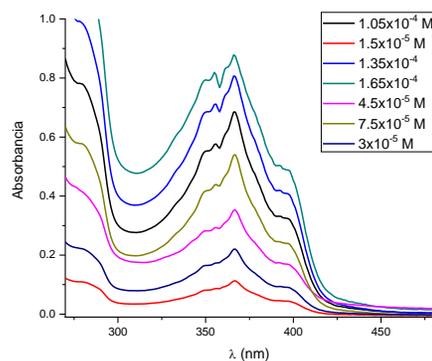


Figura 39. Espectros de absorción de **MAcT** a diferentes concentraciones en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C.

6.2.1.2. Derivado MAnT

Al igual que en el caso anterior fue necesaria la determinación de los coeficientes de extinción molar y de los máximos de absorción del derivado **MAnT**. Debido a lo anterior se prepararon varias soluciones acuosas a pH 7.2 en solución amortiguadora de fosfatos con 10% de DMSO y 0.01 M de NaCl a diferentes concentraciones en el intervalo de 1.05×10^{-5} - 1.65×10^{-4} , en este estudio se observó un comportamiento lineal absorbancia vs concentración al igual que en el caso anterior. Los espectros mostraron tres máximos de absorción a 355, 375 y 395 correspondientes a los grupos antraceno a los cuales se les determinaron sus correspondientes coeficientes de extinción molar: ϵ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{355} , $\epsilon=4046$; λ_{375} , $\epsilon=4320$; λ_{395} , $\epsilon=3610$. En la **Figura 40** se observan los espectros de absorción a las diferentes concentraciones mencionadas.

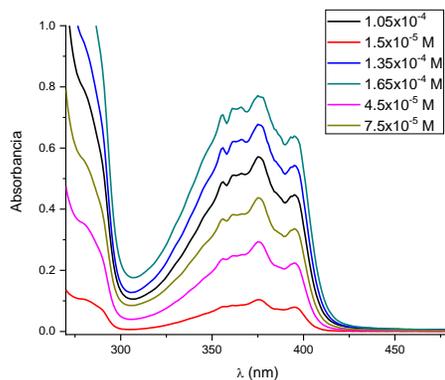


Figura 40. Espectros de absorción de **MAnT** a diferentes concentraciones en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C.

6.2.2. Estudios potenciométricos

En virtud de que el grupo acridina introducido en **MAcT** posee un grupo ionizable, es importante determinar los valores de pKa del derivado. Para esto se realizaron titulaciones potenciométricas con titulando al derivado con HCl y con hidróxido de tetrametilamonio. Los errores de las constantes logarítmicas utilizadas como parámetros de ajuste en cada experimento de titulación fueron menos de 0.01. Los valores de pKa obtenidos para el grupo amino y el grupo acridina en **MAcT** son 10.3 ± 0.2 y 5.1 ± 0.3 , respectivamente. Por tanto, al pH utilizado en los estudios en solución el derivado se encuentra en su forma dicatiónica.

6.2.3. Titulaciones espectrofotométricas con nucleótidos

Se estudió la capacidad de complejación de los derivados **MAcT** y **MAnT** hacia una serie de nucleótidos: adenosina trifosfato, citidina trifosfato, guanidina trifosfato, timidato trifosfato y uridina trifosfato. Los estudios fueron realizados en solución acuosa mediante experimentos de titulación que fueron monitoreados por UV-vis y espectroscopía de fluorescencia.

Todos los nucleótidos se emplearon en su forma de sales de sodio y los estudios se realizaron en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.2, por lo que los nucleótidos estaban completamente ionizados (forma tetraaniónica).

Tras la adición de los nucleótidos a cualquiera de los receptores **MAcT** o **MAnT**, estos provocaron hipocromismo en el espectro de absorción UV-vis de los derivados, evidenciando

complejación. Este efecto se puede atribuir a interacciones de tipo π - π del nucleótido con la unidad de acridina o la unidad antraceno (Moreno-Corral y Ochoa-Lara, 2008).

Sin embargo, durante los estudios de titulación de **MA_nT** con los diferentes nucleótidos se observaron agregados, manifestándose en una elevación de la línea de base del espectro de absorción, esto se puede atribuir a la naturaleza hidrofóbica de los complejos. Por el contrario, esta técnica fue apropiada para estudiar los complejos con **MA_cT** y, por lo tanto, los valores de absorbancia en los máximos a 351, 367 y 397 nm fueron obtenidos de los espectros de las titulaciones y estos se graficaron vs la concentración de nucleótidos. Todos los experimentos dieron cambios significativos en la absorbancia, lo que permitió su reproducción con precisión. En todos los casos se observaron curvas hiperbólicas y puntos isobésticos bien definidos, y los datos se ajustaron con la **Ecuación 1** usando un modelo de complejación con una estequiometría 1: 1 (Schneider y Yatsimirsky, 2000).

Un ejemplo de un experimento de titulación se muestra en la **Figura 41**. Las constantes de unión de los complejos se resumen en la **Tabla 3** y, de acuerdo con estos valores, el derivado **MA_cT** es un buen receptor para los nucleótidos tipo trifosfato con afinidades comparables con los encontrados para otros derivados catiónicos de la tetrandrina (Ochoa-Lara, 2001; Moreno-Corral y Ochoa-Lara 2008). Las constantes de asociación indican una preferencia pequeña por ATP, GTP y CTP en comparación con TTP y UTP.

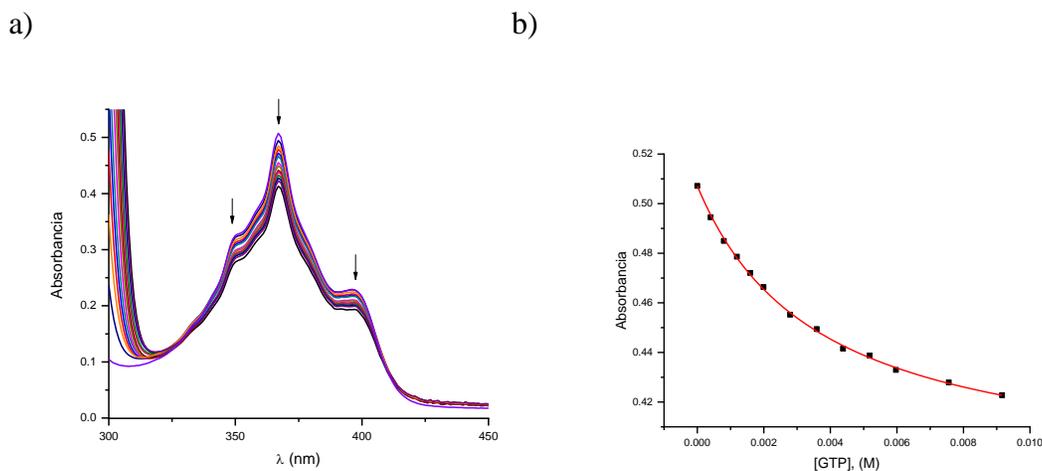


Figura 41. a) Espectros de absorción del derivado **MA_cT** (6×10^{-5} M) tras la adición de GTP (1×10^{-3} -0.01 M), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M NaCl y 10% DMSO (v/v), a 25°C. b) Gráfica de la absorbancia de **MA_cT** (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [GTP], (M). La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con la **Ecuación 1**.

Tabla 3. Constantes de unión (K) para los complejos de los derivados y diferentes nucleótidos, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 ° C.

Huésped	K (M^{-1}) ^a	
	MAcT	MAnt ^b
ATP	230.3	$K_{11} = 240.2$ $K_{12} = 177.7$
GTP	284.8	59.2
TTP	138.9	
CTP	235.0	
UTP	185.5	

^a Errores <10%

^b Determinado por titulaciones utilizando espectroscopia de fluorescencia.

Por otro lado, el receptor **MAnt** exhibió altos rendimientos cuánticos en los estudios de fluorescencia. Los espectros de fluorescencia de este compuesto en una solución amortiguadora de fosfatos a pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) mostraron tres bandas de emisión con máximos a 391, 413 y 437 nm después de la excitación a 350 nm. Por lo tanto, la complejación de ATP y GTP por **MAnt** fue estudiada usando esta técnica. La adición de los nucleótidos provocó un aumento progresivo de la intensidad de emisión de fluorescencia de **MAnt**. Es bien sabido que los nucleótidos inducen esta modificación en la fluorescencia mediante interacciones π - π con derivados del antraceno, lo que resulta en una disminución o aumento de la intensidad de fluorescencia (Kataev *et al.*, 2016). Se graficó la intensidad de emisión de **MAnt** vs la concentración de GTP y la curva fue analizada con una versión modificada de la **Ecuación 1** que es adecuada para estudios de fluorescencia; para un complejo de estequiometría 1:1.

Por otro lado, para el caso de ATP se observó la formación de un complejo con una estequiometría 1:2 derivado:nucleótido, que se pudo analizar con la **Ecuación 2**, ver **Figura 42b**.

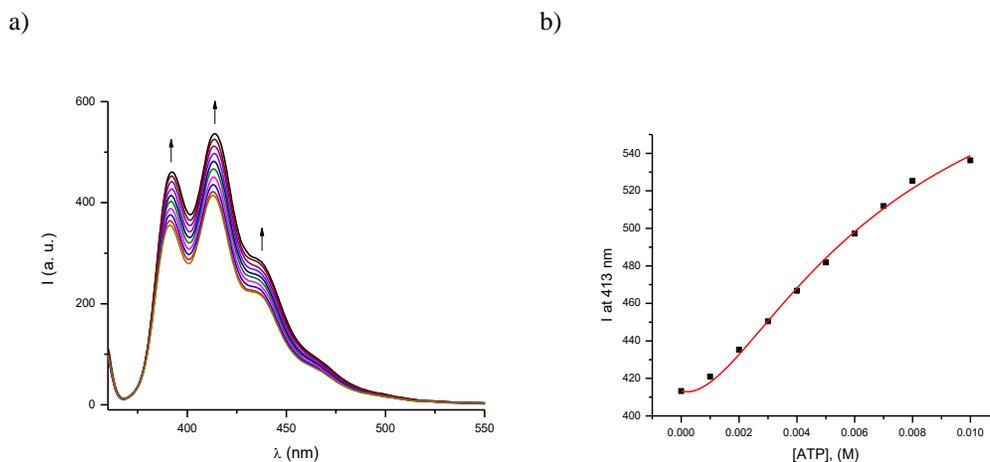


Figura 42. a) Titulación fluorométrica de **MAnT** (6.0×10^{-6} M) con ATP (1×10^{-3} -0.01 M), $\lambda_{exc} = 350$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 °C. b) Representación gráfica de la intensidad de emisión a 413 nm de **MAnT** (6.0×10^{-6} M) vs la concentración de ATP. La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con la **Ecuación 2**.

6.2.3.1. Método de las variaciones continuas (Método de Job)

Se realizó el experimento de Job con nucleótido **ATP** y el derivado **MAcT** con el propósito de confirmar la estequiometría 1:1 del complejo en solución amortiguadora de fosfatos a pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v).

El análisis de los datos permitió graficar los cambios de absorbancia en el máximo a 351 nm vs la fracción molar de **MAcT**. Los resultados obtenidos mediante el experimento Job demostraron que existe un máximo para $X_{MAcT} = 0.5$, lo cual confirma que el complejo es de una estequiometría 1:1 (**Figura 43**).

Cabe mencionar que otra evidencia que confirma dicha estequiometría para este complejo es la formación del punto isobéptico observada en los espectros de la titulación previamente descrita para los estudios de complejación. Por otro lado, a pesar de que para los otros complejos no fue posible realizar el experimento para la determinación de la estequiometría, los resultados obtenidos como el comportamiento típicamente hiperbólico de las titulaciones valida el empleo de la **Ecuación 1** para el cálculo de las constantes de asociación de los complejos.

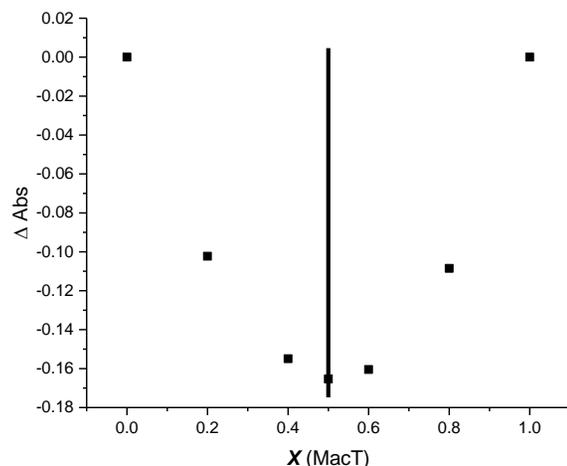


Figura 43. Grafica de JOB para el complejo formado por ATP y **MAcT**.

6.2.4. Titulaciones espectrofotométricas con ADN

6.2.4.1. Experimentos por espectroscopia de absorción (UV/Vis) con ADN

Se estudió la capacidad de unión de los derivados a ADN de doble cadena, igual que en el caso de los nucleótidos solo fue posible estudiar el derivado **MAcT** por esta técnica.

Un ejemplo típico de espectros de absorción (UV/Vis) de **MAcT** en presencia de concentraciones crecientes de ADN de doble cadena se presenta en la **Figura 44 a) y b)**. En la titulación se observa que la adición de ADN causó un hipocromismo significativo con un punto isobéptico bien definido. Los cambios espectrales indican que **MAcT** interactúa con el ADN en forma de intercalación a través del grupo acridina.

Está bien estudiado que los compuestos que intercalan ADN producen cambios estructurales en la doble hélice de ADN, que reduce las energías de transición $\pi-\pi^*$ dando como resultado un efecto hipocrómico. Los compuestos se intercalan al ADN mediante interacciones $\pi-\pi$ entre el cromóforo aromático planar y las nucleobases del ADN (Jayanthi *et al.*, 2016; Kalaiarasi *et al.*, 2017).

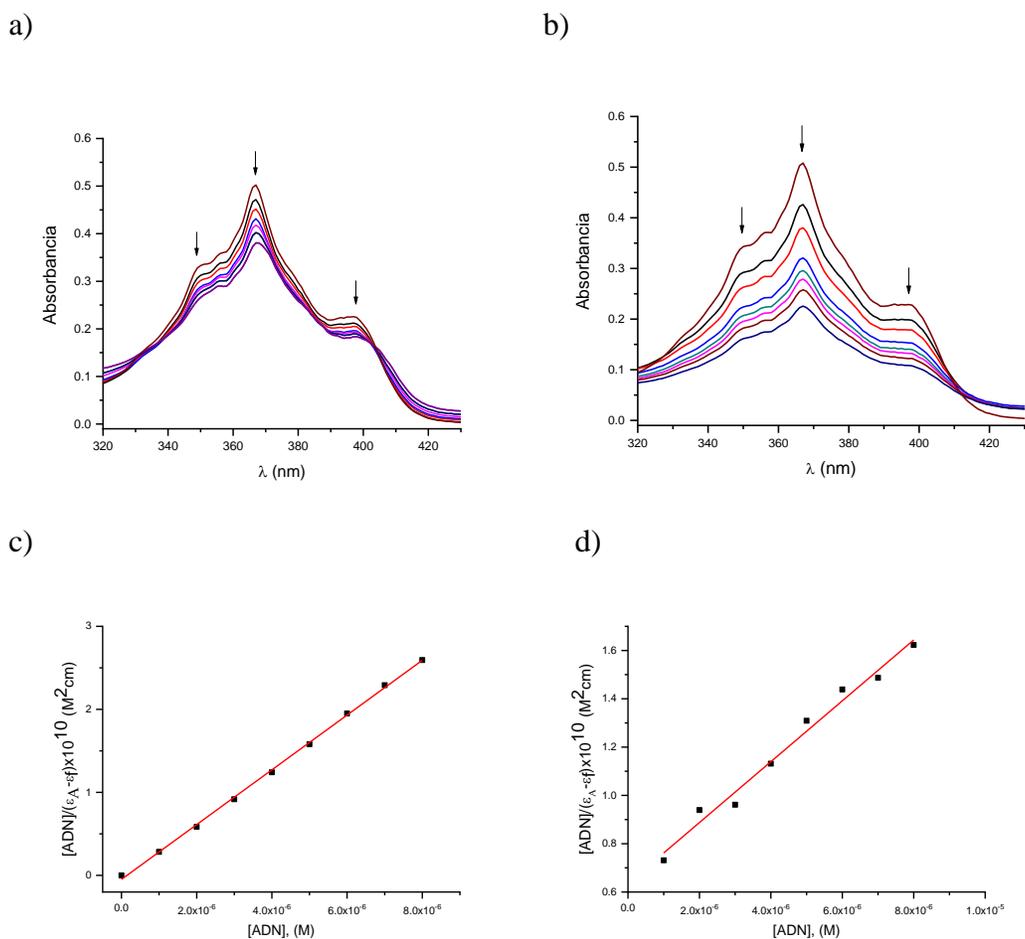


Figura 44. Espectros de absorción para **MAcT** (6.0×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1×10^{-6} - 1×10^{-5} M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, con 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v): a) ADN-2 y b) ADN-5. Gráfica de Scatchard para los complejos de c) ADN-2 (datos de $\lambda_{\max} = 397$ nm) y d) ADN-5 (datos de $\lambda_{\max} = 367$ nm).

Las constantes de afinidad para las cinco secuencias de ADN de doble cadena con **MAcT** se calcularon de acuerdo con el método de McGhee y von Hippel (Lohani *et al.*, 2017) mediante el uso de la representación de Scatchard, con el empleo de la **Ecuación 4**. La **Tabla 4** resume las constantes de afinidad para los complejos formados por **MAcT** con ADN de doble cadena. De los resultados obtenidos destaca que los valores son comparables con otros compuestos reportados (Liu *et al.*, 2010; Kozurková *et al.*, 2007). Se encontró mayor afinidad de **MAcT** por el ADN-2 (enriquecido con A-T) en comparación con ADN-3 (enriquecido con G-C) con una relación $K_{\text{ADN-2}} / K_{\text{ADN-3}} = 2.03$. Por el contrario, **MAcT** se une al ADN-4

(enriquecido con A-T) y ADN-5 (enriquecido con G-C) con prácticamente la misma afinidad, pero se genera un mayor efecto hipocrómico (64.6% y 58.2% respectivamente).

Tabla 4. Constantes de afinidad (K) para complejos de **MAcT** con ADN de doble cadena, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl de 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 ° C.

ds-ADN	% hipocromismo	K (M^{-1})*
ADN-1 (Todas las pares de bases)	33.5	1.09×10^5
ADN-2 (Enriquecido A-T)	25.5	3.30×10^5
ADN-3 (Enriquecido G-C)	18.8	1.63×10^5
ADN-4 (Enriquecido A-T)	64.6	1.83×10^5
ADN-5 (Enriquecido G-C)	58.2	1.90×10^5

* Errores <10%

ADN-1: 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3; **ADN-2:** 5' poli(A)₉- poli(T)₉ 3' y 5' poli(A)₉.dC- poli(T)₉ 3'; **ADN-3:** 5' poly(C)₉- poly(G)₉ 3' y 5' poli(C)₉.dT- poli(G)₉ 3'; **ADN-4:** 5' poli(A)₁₈ 3' y 5' poli(T)₁₈ 3'; **ADN-5:** 5' poly(G)₁₈ 3' y 5' poli(C)₁₈ 3'.

6.2.4.2. Ensayo del desplazamiento del bromuro de etidio

Se estudió el efecto de intercalación de **MAcT** y **MAnt** por medio del ensayo del desplazamiento del bromuro de etidio (BrEt), esta técnica se utiliza frecuentemente como una herramienta de diagnóstico complementario para identificar si una molécula pequeña se está uniendo a ADN vía intercalación. El bromuro de etidio (BrEt) es un intercalador de ADN no específico (Efthimiadou *et al.*, 2010; Banerjee *et al.*, 2014).

Los resultados mostraron que los derivados en todos los casos son capaces de disminuir la intensidad de emisión de fluorescencia de complejo ADN-BrEt ($[BrEt] = 5 \mu M$, $[ADN] = 10 \mu M$). En las **Figuras 45** y **46** se observan ejemplos típicos observados durante los experimentos. Este efecto indica que existe competencia entre los derivados y el BrEt para ocupar los sitios del ADN donde se puede intercalar.

Existen tres posibilidades por las que se apaga la emisión de fluorescencia del complejo bromuro de etidio-ADN. Primero, se pueden unir el bromuro de etidio y los derivados y disminuir por esta razón. En segundo lugar, los derivados desplazan al bromuro de etidio y se unen al ADN, esto pasa usualmente con moléculas que tienen potencial de intercalación

como lo es la fracción antraceno y acridina de los derivados **MAcT** y **MAnt**. En tercer lugar, se puede formar un nuevo complejo no fluorescente BrEt-ADN-derivado, lo que causa el apagamiento de la fluorescencia (Lafayette *et al.*, 2017). Dentro de los resultados con **MAcT** y **MAnt** descartamos la opción uno porque debido a la repulsión electrostática entre las especies cargadas no sería posible la interacción. La segunda hipótesis es la más probable, ya que los derivados cuentan con unidades intercaladoras de ADN y las magnitudes de las constantes son consistentes con las afinidades esperadas para este tipo complejos; los cuales son asistidos además por otras interacciones. Y, estos a su vez son congruentes con los resultados observados por la técnica de UV/vis del complejo de **MAcT** y ADN.

En el caso de **MAcT** (25 μM), la reducción de la emisión corresponde a 60.3%, 49.4%, 29.1%, 53.0% y 28.9% de la intensidad para los complejos BrEt con ADN-1, ADN-2, ADN-3, ADN-4 y ADN-5, respectivamente. Mientras que para el derivado **MAnt** (25 μM) la disminución corresponde a 60.3%, 49.4%, 29.1%, 53.0% y 28.9% de la intensidad para los complejos BrEt de ADN-1, ADN-2, ADN-3, ADN-4 y ADN-5, respectivamente.

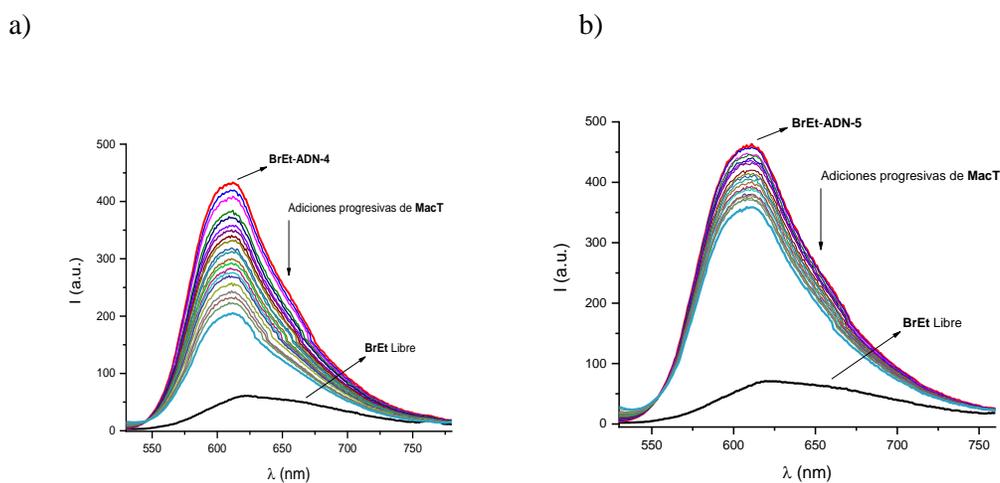


Figura 45. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510 \text{ nm}$, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v). $[\text{EtBr}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{ds-DNA}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{MAcT}] = 0\text{-}25 \mu\text{M}$: a) ADN-4; b) ADN-5.

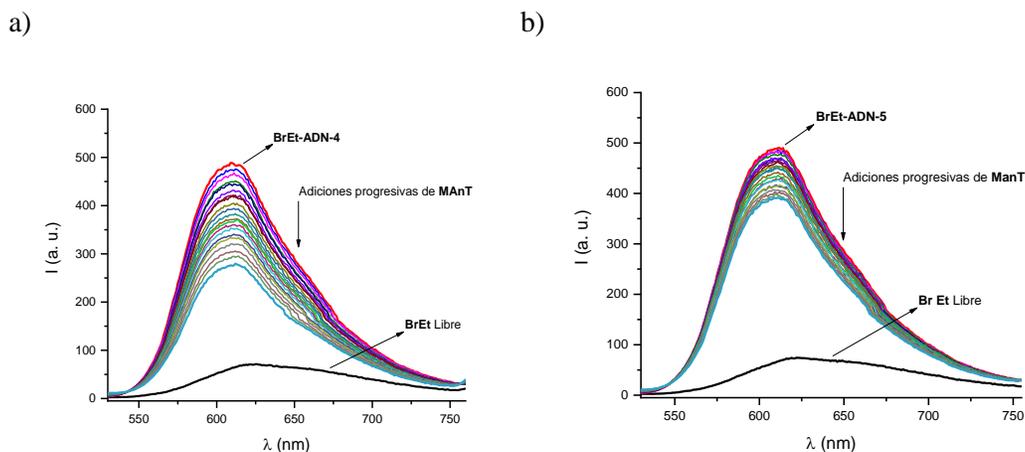


Figura 46. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN en presencia de **MAnT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v). [EtBr] = 5 μ M, [ds-DNA] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M: a) ADN-4; b) ADN-5.

Los resultados fueron analizados por medio de la ecuación de Stern-Volmer (Jayanthi *et al.*, 2016; Kalaiarasi *et al.*, 2017) donde K_{sv} es la constante de apagamiento de fluorescencia determinada por regresión lineal extraída de la gráfica de intensidad de emisión (I_0/I) vs las concentraciones de los derivados (**Figura 47** y **Tabla 5**), los resultados mostraron que los derivados pueden desplazar eficazmente el BrEt del complejo formado por BrEt-ADN por intercalación.

Destaca entre los resultados el hecho de que ambos receptores tienen una preferencia por ADN enriquecido con A-T. La relación encontrada entre las K_{sv} fue la siguiente: $K_{sv\ ADN-2}/K_{sv\ ADN-3}$ y $K_{sv\ ADN-4}/K_{sv\ ADN-5}$ de 2.28 y 2.63 para **MAcT**, y 1.87 y 2.73 para **MAnT**. Para ambos derivados, la constante de apagamiento más alta se obtuvo con el Sistema BrEt-ADN-1, donde el ADN-1 es el ADN de doble cadena formado con 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3'.

Tabla 5. Constantes de apagamiento (K_{sv}) para complejos **MAcT** y **MANt** con ADN, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y 10% DMSO (v/v), a 25 °C.

ADN	K_{sv} (M^{-1})	
	MAcT	MANt
ADN-1 (Todas las pares de bases)	6.40×10^4	4.6×10^4
ADN-2 (Enriquecido A-T)	3.80×10^4	2.8×10^4
ADN-3 (Enriquecido G-C)	1.67×10^4	1.5×10^4
ADN-4 (Enriquecido A-T)	4.30×10^4	3.0×10^4
ADN-5 (Enriquecido G-C)	1.63×10^4	1.1×10^4

ADN-1: 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3; ADN-2: 5' poli(A)₉- poli(T)₉ 3' y 5' poli(A)₉.dC- poli(T)₉ 3'; ADN-3: 5' poly(C)₉- poly(G)₉ 3' y 5' poli(C)₉.dT- poli(G)₉ 3'; ADN-4: 5' poli(A)₁₈ 3' y 5' poli(T)₁₈ 3'; ADN-5: 5' poly(G)₁₈ 3' y 5' poli(C)₁₈ 3'.

Por otro lado, también se realizó este estudio en analogía al realizado con los derivados, pero con la tetrandrina, sin alquilar, con la secuencia enriquecida con todos los pares de bases (ADN-1) con la finalidad de comparar la tetrandrina natural con los derivados. En la **Figura A3.6 a)** en la sección de apéndice 3, se observa como la tetrandrina fue capaz de apagar la intensidad de emisión del complejo BrEt-ADN en 28.7% y en la parte b) de la misma figura se observa la gráfica de Stern-Volmer de la tetrandrina con BrEt-ADN obteniéndose una K_{sv} de $1.70 \times 10^4 M^{-1}$, del mismo orden que las obtenidas pero menor que la presentada por los derivados en este mismo ADN.

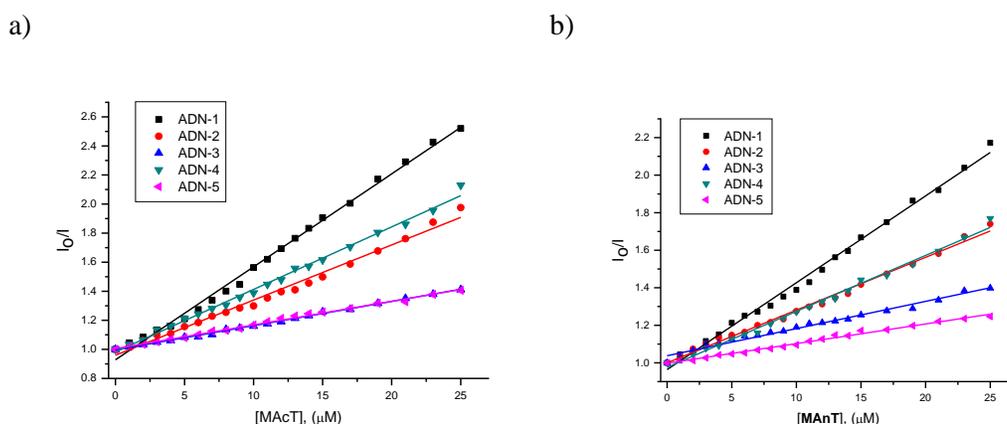


Figura 47. Gráfico de Stern-Volmer de la titulación de fluorescencia de a) **MAcT** y b) **MANt** con BrEt-ADN.

Además, para verificar la afinidad del bromuro de etidio por las cinco secuencias de ADN utilizadas se realizaron titulaciones directas por fluorescencia. Se usó bromuro de etidio en una concentración de 5×10^{-6} M añadiéndose ADN desde 0 a 9.87×10^{-6} M. Los resultados mostraron que el bromuro de etidio tiene constantes de afinidad del orden de 10^5 para las cinco secuencias estudiadas, sin embargo, si discrimina entre una secuencia y otra. En la **Tabla 6** se presentan los valores de las constantes obtenidos, observándose mayores afinidades por el ADN-2 y por el ADN-5. Por otro lado, el valor de la constante para el ADN de timo de ternera con bromuro de etidio reportado es de 5.16×10^5 M⁻¹ en solución amortiguadora Tris-HCl (Lafayette *et al.*, 2017) lo que muestra que los valores obtenidos están en el mismo orden de magnitud y que si sufre cambios el valor dependiendo de la cadena de ADN.

Tabla 6. Constantes obtenidas para el bromuro de etidio y las cinco secuencias estudiadas por fluorescencia.

ADN *	K 10 ⁵ (M ⁻¹)
ADN-1	2.68
ADN-2	7.05
ADN-3	8.94
ADN-4	2.52
ADN-5	7.54

* **ADN-1:** 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3; **ADN-2:** 5' poli(A)₉- poli(T)₉ 3' y 5' poli(A)₉.dC- poli(T)₉ 3'; **ADN-3:** 5' poly(C)₉- poly(G)₉ 3' y 5' poli(C)₉.dT- poli(G)₉ 3'; **ADN-4:** 5' poli(A)₁₈ 3' y 5' poli(T)₁₈ 3'; **ADN-5:** 5' poly(G)₁₈ 3' y 5' poli(C)₁₈ 3'.

6.3. Estudio con un ADN plasmídico por electroforesis

La migración de las moléculas de ADN en geles de agarosa se ve afectada por un mecanismo dependiente del peso molecular en combinación con el efecto de la matriz de gel, además las interacciones no covalentes dificultan significativamente la migración (Silva *et al.*, 2017). Por tanto, la electroforesis en gel de agarosa se puede utilizar para evidenciar cualitativamente las interacciones de unión entre el ADN y moléculas diversas. La unión hacia el ADN con moléculas catiónicas tales como polipéptidos, poliaminas o polímeros catiónicos, implican la neutralización parcial o total de las cargas negativas en la columna vertebral del ADN. Por eso la migración del ADN se dificulta o se impide completamente (Huang *et al.*, 2010). Se realizó este ensayo con la finalidad de observar el comportamiento de los derivados y la tetrandrina sin alquilar con un ADN plasmídico, para observar si las

moléculas eran capaces de escindir, retardar o inhibir la migración del ADN. Por lo mencionado, se usó un plásmido de aproximadamente 3000 pares de bases.

Los resultados se muestran en la **Figura 48 A**. En el primer carril estaba un marcador de peso molecular, en el carril marcado con el inciso a) se encontraba el plásmido solo, en el inciso b) el plásmido incubado con DMSO, donde se observó que el DMSO es capaz de relajar una pequeña porción del plásmido. En el inciso c) se observa a la tetrandrina con el plásmido mostrando una dificultad de migración parcial, evidenciando que el alcaloide es capaz de interactuar ligeramente con el ADN plasmídico. En el inciso d) que corresponde al derivado **MAcT** con el plásmido, el cual presentó una migración parcial y en donde además se observó que una parte del ADN no pudo salir del pozo donde se añadió la mezcla. Por otro lado, destaca el inciso e) el cual en presencia de **MAnt** mostró una total inhibición de la migración del ADN. En otros estudios, como en el reportado por Koparde *et al.*, 2018, la molécula con mayor actividad biológica, tanto antimicrobiana como antiproliferativa, era la molécula que inhibía totalmente la migración del ADN, atribuyéndose a que la molécula que se unió más efectivamente impidió la migración e indica que unión a ADN es clave en el actividad biológica de las moléculas. En la parte b) de la **Figura 48** se observa el gel de agarosa a simple vista. Los resultados fueron reproducibles, se realizaron 10 diferentes geles de agarosa cambiando algunos parámetros, sin embargo, no hubo diferencias significativas. Además, se observó que estos fueron congruentes con el resto de los estudios de complejación de ADN.

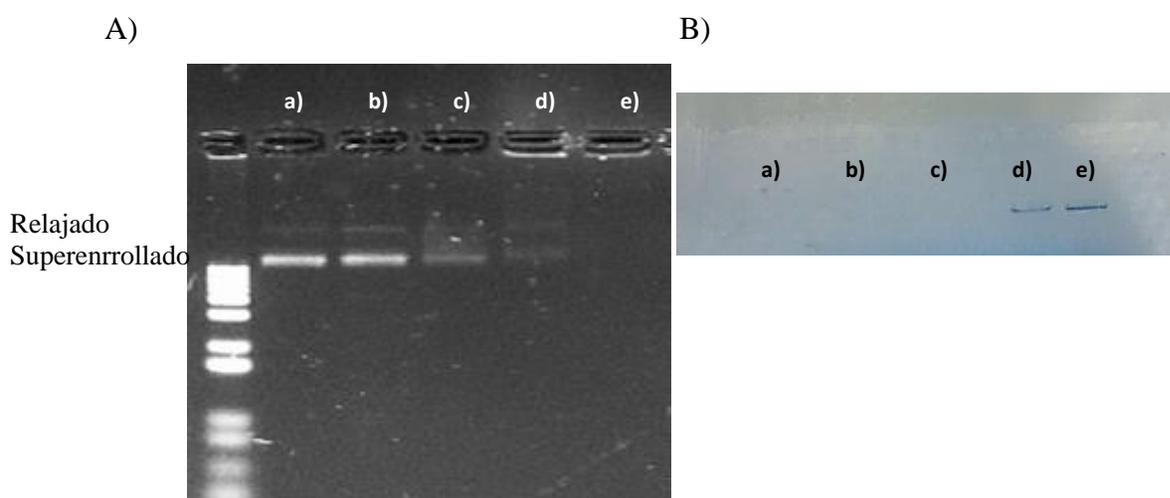


Figura 48. A) Primer carril marcador de peso molecular, a) plásmido 100 ng, b) plásmido 100 ng + DMSO, c) plásmido 100 ng + tetrandrina 100 μ M, d) plásmido 100 ng + **MAcT** 100 μ M, e) plásmido

100 ng + **MAnt** 100 μ M. **B)** Observación a simple vista del gel de agarosa (1%), **MAcT** y **MAnt** provocan la retención de los colorantes en los pozos del gel de agarosa.

6.4. Modelado Molecular

El modelado molecular imita el comportamiento de las moléculas solas o en presencia de otras y puede predecir las interacciones que se verán favorecidas. El modelado molecular se utiliza para estudiar desde moléculas pequeñas hasta sistemas de gran tamaño como el ADN. Por esa razón para comprender mejor las interacciones y geometrías que se dieron entre el derivado **MAcT** y el ADN-1 (todas las bases), ADN-4 (enriquecido con A-T) y ADN-5 (enriquecido con G-C), se utilizaron modelos construidos en HyperChem, en un intento de realizar una aproximación y representación de las interacciones que se están dando en los complejos formados por **MAcT** y ADN.

La **Figura 49** muestra el modelo representativo del complejo formado por **MAcT**-ADN-1 con la energía más baja encontrado por mecánica molecular.

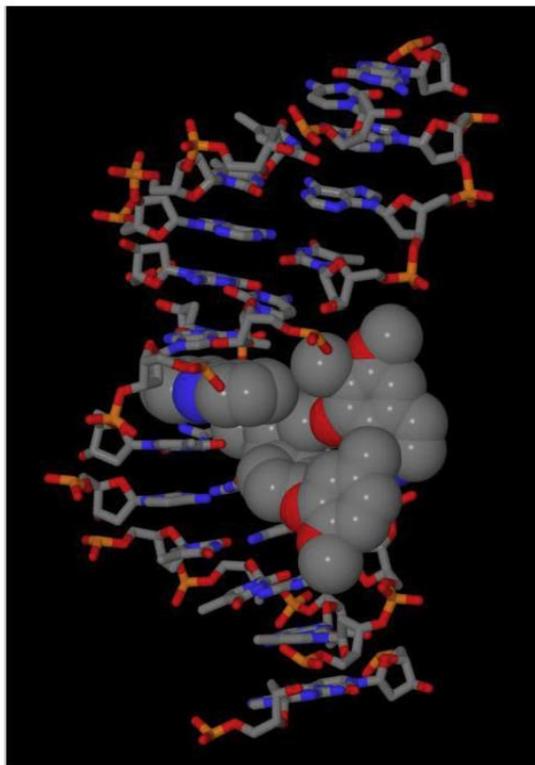


Figura 49. Estructura molecular para complejo entre ADN-1 y **MAcT** (Obtenido usando método semiempírico PM3 usando Gaussian y el modelado con ADN usando el programa HyperChem).

De acuerdo con la estructura mostrada en la **Figura 49**, el derivado se localiza en el surco mayor del ADN permitiendo interacciones no covalentes como electrostáticas de tipo par iónico, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, que presumiblemente podrían dar como resultado cierta selectividad por una secuencia de ADN. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas se dan entre los átomos con carga positiva (N2) de **MAcT** y dos átomos de oxígeno (cargados negativamente) de las cadenas principales de fosfato del ADN.

Para los tres sistemas modelados **MAcT**-ADN, los átomos de N2 de **MAcT** interactúan con dos oxígenos de fosfato con distancias de 2.80 Å y 2.99 Å, 3.97 Å y 4.38 Å, y 3.78 Å y 5.39 Å, respectivamente para los complejos de ADN-1, ADN-4 y ADN-5, lo que indica interacción de pares iónicos (Moreno-Corral y Ochoa-Lara, 2007).

Los resultados encontrados mediante el modelado son consistentes con las constantes de afinidad y las constantes de Stern-Volmer obtenidas experimentalmente para los tres complejos. Al respecto, hay algunos ejemplos de intercaladores con este tipo de comportamiento como la daunomicina, un fármaco quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas que se emplea para tratar determinados tipos de cáncer, más concretamente algunos tipos específicos de leucemia, como la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoide aguda (Gonzalez-Garcia y Vilar, 2007). Los resultados experimentales y los de modelado indican que existe una suma de interacciones lo que le confiere a los derivados mayores afinidades hacia el ADN que los reportados en la literatura hasta en un orden de magnitud.

6.5. Evaluación biológica

6.5.1. Ensayo de evaluación antiproliferativa

Se probó la actividad antiproliferativa de los dos derivados **MAcT** y **MAnt** contra la línea celular no tumoral ARPE-19 (Células de retina pigmentaria humana) y contra las líneas celulares HeLa (Cáncer cervicouterino), A-549 (Cáncer de pulmón), LS-180 (Cáncer de colon), PC-3 (Cáncer de próstata) mediante el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se reportó el valor de IC₅₀. Este ensayo MTT se basa en la capacidad metabólica de la enzima oxidoreductasa succinato deshidrogenasa en células

viabiles para reducir el colorante MTT a formazán de color púrpura, que se detecta colorimétricamente. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viabiles presentes, para este ensayo se utilizó el procedimiento modificado por Leyva-Peralta (Leyva-Peralta *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7**, en ellos se observa que los derivados **MAcT** y **MAnt** tienen diferentes valores de IC_{50} en las cinco líneas celulares probadas. Destaca que **MAnt** exhibe valores muy bajos de IC_{50} en dos de los cuatro tipos de líneas celulares de cáncer utilizadas, que son significativamente más pequeñas que las observadas para tetrandrina sin alquilar, dando los mejores valores IC_{50} en células HeLa y PC-3 con valores IC_{50} de 2.74 y 4.71 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para las líneas celulares A-549 y LS-180, los valores de IC_{50} son significativamente mayores ($> 10 \mu\text{g/mL}$). En este sentido, es importante mencionar que el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (US-NCI) considera un compuesto como activo cuando el valor de IC_{50} es inferior a 4 $\mu\text{g/mL}$ (Leyva-Peralta *et al.*, 2015), lo que demuestra que **MAnt** es activo para células de cáncer cervicouterino. Por otro lado, el derivado **MAcT** mostró actividad moderada en este cáncer línea celular ($IC_{50} = 13.60 \mu\text{g/mL}$). Ambos derivados solo difieren entre ellos por el átomo de nitrógeno en el sustituyente del derivado **MAcT** y esto produce un gran cambio en la actividad biológica de las moléculas, aunque se necesita más evidencias puede que el nitrógeno de la acridina, el cual es susceptible a la protonación ($pK_a = 5.1 \pm 0.3$), interaccione con ciertas partes de la célula y le confiera menos actividad. A pesar de los resultados prometedores mostrados en la **Tabla 7**, el compuesto **MAnt** mostró efectos citotóxicos contra la línea celular normal de control (ARPE-19), similares a los observados para la tetrandrina sin alquilar.

Existen diferentes cambios morfológicos que se presentan en las células a consecuencia de la exposición a un compuesto químico tóxico que pueden proporcionar pistas sobre el mecanismo de la muerte celular, las cuales pueden ser apoptosis, autofagia, oncosis, entre otras (Elmore, 2007). Los cambios morfológicos que ocurren durante los procesos de muerte celular se pueden identificar mediante microscopía óptica o mediante citometría de flujo.

Durante el proceso temprano de apoptosis, disminuye el tamaño celular y se observa picnosis esta como resultado de la condensación de la cromatina. Además, se presenta formación de vesículas (blebbing) alrededor de la membrana plasmática y se produce

cariorrexis y un proceso llamado "brotación", que consiste en la separación de las vesículas (cuerpos apoptóticos). Además, la autofagia se caracteriza por el secuestro de citoplasma y organelos en vesículas y su posterior entrega a los lisosomas de la célula para la degradación. Mientras que en la oncosis, las células presentan un rápida rotura de membrana, los núcleos aumentan sin fragmentación de ADN, y presenta hinchazón de los núcleos y orgánulos (Fink y Cookson, 2005).

Como ejemplo, en la **Figura 50** se muestran los cambios morfológicos en la línea celular HeLa en presencia del derivado **MAnt**. En esta, se observa una reducción del tamaño celular, condensación del citoplasma y formación de cuerpos apoptóticos, lo que parece indicar que la vía de muerte celular primaria inducida por **MAnt** es apoptosis.

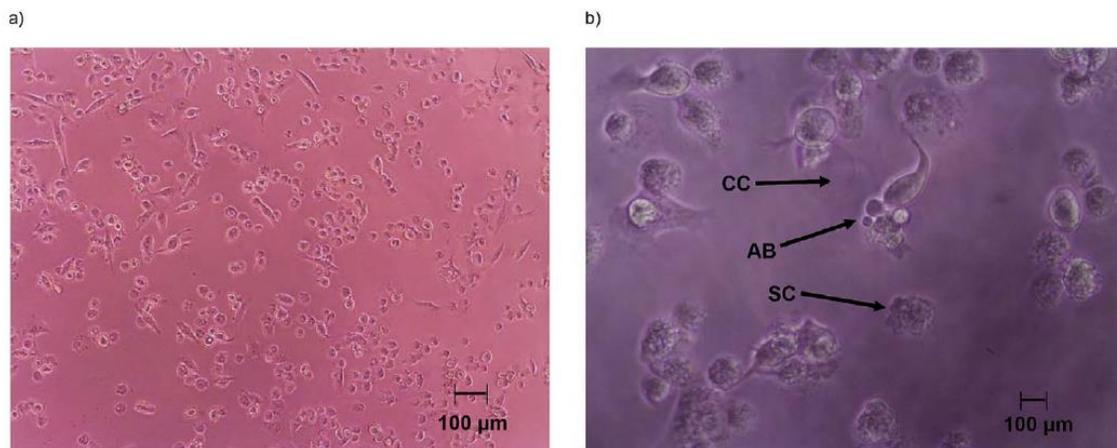


Figura 50. Actividad antiproliferativa de **MAnt** (6.25 µg/ml) en la línea celular HeLa. Observación a las 48 h en un microscopio invertido: a) 10X y b) 40X. Cambios morfológicos: cuerpos apoptóticos (AB), célula pequeña (SC), citoplasma condensado (CC). Las imágenes que se muestran son representativas de al menos cuatro campos de vista por muestra y tres ensayos independientes.

Tabla 7. Actividad antiproliferativa (valores de IC₅₀) de los nuevos derivados en varias líneas celulares.

	IC₅₀ µg/mL ± DE (µM ± DE)				
	Línea Celular				
Compuesto	HeLa	A-549	LS-180	PC-3	Arpe-19
MAct	13.60 ± 0.53 ^a (15.20 ± 0.60)	> 25 (> 27)*	> 25 (> 27)*	> 25 (> 27)*	21.67 ± 1.85 ^a (24.21 ± 2.07)
MAnT	2.74 ± 0.40 ^c (3.06 ± 0.46)	10.04 ± 0.11 ^a (11.23 ± 0.12)	10.82 ± 0.37 ^a (12.10 ± 0.41)	4.71 ± 0.58 ^b (5.26 ± 0.64)	2.25 ± 0.37 ^b (2.51 ± 0.41)
Tetrandrina	9.14 ± 0.86 ^b (14.60 ± 1.29)	6.50 ± 0.04 ^b (10.43 ± 0.06)	4.62 ± 0.26 ^b (7.41 ± 0.41)	15.27 ± 0.55 ^a (24.52 ± 0.88)	2.63 ± 0.26 ^b (4.22 ± 0.41)

Se indican diferencias significativas (p <0.05), comparación de medias con letras diferentes (a-c). El asterisco (*) representa la concentración máxima probada que no alcanzó los valores de IC₅₀.

6.5.2. Capacidad antioxidante

Los radicales libres (RL) presentan un electrón no apareado en el último orbital, lo que los hace inestables y altamente reactivos. Debido a que intentan lograr la estabilidad electroquímica, necesitan de un electrón que les pueda dar otra molécula. Las moléculas conocidas como antioxidantes estabilizan a los RL mediante diferentes mecanismos: transferencia de un solo electrón (SET) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). Por otro lado, la propiedad antioxidante de un compuesto se ha relacionado con su capacidad de prevenir o tratar enfermedades (Bharathi-Dileepan *et al.*, 2018).

Por otro lado, existen reportes para el alcaloide tetrandrina relacionados con su capacidad antioxidante. Al respecto, se sabe que la tetrandrina, a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, es capaz de atrapar radicales de aniones superóxido. Además, la capacidad antioxidante de la tetrandrina fue probada usando espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica con una trampa de espín electrónico, con lo que se demostró que a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, se observa una pronunciada disminución del consumo de hexosa-monofosfato y de la producción de peróxido de hidrógeno (Bhagya y Chandrashekar, 2016). Se realizó una búsqueda intensiva y no se encontraron más datos de la posible capacidad antioxidante de la tetrandrina ni del mecanismo de acción, ni de la capacidad antioxidante de derivados de este alcaloide, a pesar de que en múltiples artículos se le atribuye dicha actividad.

Por lo tanto, y considerando que los derivados mostraron propiedades de unión a ADN y propiedades antiproliferativas, se evaluó para estos y para la tetrandrina (**TET**) la capacidad antioxidante contra dos radicales libres por los métodos estándar (Del-Toro-Sánchez *et al.*, 2015). Se utilizó el radical $\text{ABTS}^{•+}$ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), el cual se basa en medir la capacidad de otra molécula de donarle de un electrón o un protón y también se utilizó el radical DPPH^{\bullet} (2,2-difenil-1-picrilhidracil), el cual se fundamenta en la reducción del mismo en presencia de algún compuesto antioxidante.

En la **Tabla 8** se muestran los porcentajes de inhibición alcanzados a la máxima concentración probada para los tres compuestos (30 $\mu\text{g/mL}$) contra ambos radicales probados y los valores de IC_{50} obtenidos. Dentro de los resultados destacan los valores obtenidos para el radical $\text{ABTS}^{•+}$ con los tres compuestos; al respecto, se observa que el derivado **MAnt**

(% de inhibición: 92.92 ± 0.23 e IC_{50} : 4.59 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$) se compara con la tetrandrina sin modificar, mientras que el derivado **MAcT** presenta un porcentaje de inhibición e IC_{50} por debajo.

Comparando estos resultados con los reportes en la literatura se observa que los valores obtenidos son realmente prometedores. Ejemplos importantes son los encontrados con la efarantina y la fangchinolina, dos alcaloides con estructura muy similar a la tetrandrina que tienen valores de IC_{50} de 7.26 y 3.90 $\mu\text{g/mL}$ frente al radical $ABTS^{+\cdot}$. En este mismo reporte, estos valores se comparan con conocidos estándares antioxidantes como el BHA, BHT, α -tocoferol y trolox que poseen IC_{50} de 7.5, 8.4, 18.6 y 4.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Gülçin *et al.*, 2010). Los valores obtenidos con **MAnt** y **TET** son comparables y menores que estos estándares. Por otro lado, Makhaeva *et al.*, reportaron compuestos derivados de la acridina con valores de IC_{50} entre 18.9-47.2 μM , similares a **MAcT** (26.74 ± 0.27 μM) (Makhaeva *et al.* 2017). En general, otros autores informan una menor actividad de inhibición del radical libre frente al a $ABTS^{+\cdot}$ con compuestos puros (Hemessi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Hevesi-Tóth *et al.*, 2009; da Silva-Andrade *et al.*, 2018). La determinación del IC_{50} por $DPPH^{\cdot}$ no fue posible obtenerla con las concentraciones utilizadas en este estudio.

Las estructuras **TET**, **MAnt** y **MAcT** son capaces de donar protones y de transferir electrones para estabilizar radicales libres, en este estudio se ha demostrado que **TET** y sus derivados (**MAnt** y **MAcT**) poseen capacidad antioxidante. Sin embargo, la capacidad de eliminación del radical $DPPH^{\cdot}$ por acción de los derivados muestra valores más bajos (3-9% de inhibición), probablemente esto se debe a que el sitio del electrón desapareado en el radical $DPPH^{\cdot}$ es de difícil acceso para moléculas de mayor tamaño (Prior *et al.*, 2005). Además, la afinidad por la polaridad de los compuestos juega un papel importante en la capacidad de eliminación. El radical $ABTS^{+\cdot}$ reacciona con antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos, mientras que el $DPPH^{\cdot}$ es más selectivo (Prior *et al.*, 2005). Debido a las características estructurales de los derivados, estos son anfifílicos (hidro- y lipofílicos). Esto podría explicar la mayor afinidad con el radical $ABTS^{+\cdot}$.

En resumen, los resultados de capacidad antioxidante correlacionan con los anteriores mostrando que el derivado **MAnt**, posee mayor actividad biológica y posee la capacidad de unirse eficientemente a ADN, además es sabido que los antioxidantes son efectivos en el

tratamiento de diversas enfermedades, por tanto su capacidad antioxidante puede estar relacionada con su actividad biológica.

Tabla 8. Efecto de los derivados sobre los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] en % de inhibición y su concentración inhibitoria mínima (IC₅₀).

	% de inhibición			IC ₅₀ µg/mL ± DE (µM ± DE)		
	TET	MAnT	MAcT	TET	MAnT	MAcT
ABTS^{•+}	96.71±0.54 ^a	92.92±0.23 ^b	60.85±2.51 ^c	2.13 ± 0.08 ^a (3.39±0.13)*	4.59 ± 0.2 ^b (5.08±3.03)*	23.94 ± 0.24 ^c (26.74±0.27)*
DPPH[•]	3.74±1.50 ^b	9.32 ±2.62 ^a	8.31 ±0.67 ^a	N/D	N/D	N/D

La concentración de MAcT, MAnT y TET fue de 30 µg / mL

IC₅₀ = concentración mínima inhibitoria (µg/mL ± DE)

Resultados en µM ± DE para cada derivado.

N / D = No se determinó.

Los valores son la media ± desviación estándar de tres repeticiones (n = 3). Los diferentes superíndices muestran diferencias significativas entre cada compuesto con un nivel de significancia de 0.05 (ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey, p <0.05).

6.5.2. Actividad antibacteriana

Con el uso generalizado de antibióticos en la medicina, la agricultura y la ganadería, la resistencia bacteriana se ha convertido en una gran amenaza para la salud humana. La resistencia a los antibióticos conduce a mayores costos médicos, hospitalización prolongada, y mayor riesgo de mortalidad. Algunas de las principales cepas resistentes y con mayor incidencia son *S. aureus* resistente y en los últimos años se ha encontrado *E. coli* multi resistente. Por tanto, son necesarias nuevas estrategias tanto de manejo de antibióticos de las personas como la creación de nuevos agentes con menos efectos secundarios (Shao-bin *et al.*, 2017). Entre las fuentes naturales de estos agentes se ha reportado la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, extractos animales, vegetales y metabolitos de origen microbiano (es decir, antibióticos, enzimas de defensa y ácidos orgánicos, entre otros)

(Gálvez-Iriqui *et al.*, 2019). Además, los metabolitos secundarios de plantas como fitoalexinas, saponinas, terpenoides, fenólicos, alcaloides, etc., han sido probados con éxito.

Considerando lo anterior, se probaron los dos derivados obtenidos **MA_nT** y **MA_cT**, además de la tetradrina contra cuatro cepas bacterianas una Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ y tres bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883™ y *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 10145™, estas fueron elegidas por su amplia importancia clínica.

En la literatura hay pocos trabajos de la actividad antimicrobiana del alcaloide tetradrina. Algunos de los más destacados incluye actividad inhibitoria contra aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *S. aureus* resistente a meticilina, además actividad contra hongos dermatofitos y especies de *Candida* (Bhagya y Chandrashekar, 2016). Es importante destacar que estas actividades reportadas se dieron la mayoría en sinergia con algún medicamento ya utilizado, esto debido a que la tetradrina tiene la capacidad de revertir la resistencia a algunos antibióticos debido a su capacidad de inhibir la P-glicoproteína que aparece en la membrana celular y actúa como una bomba extrusora de drogas confiriendo multiresistencia. Ejemplo de este tipo de sinergia es el caso de la actividad observada en conjunto con isoniacida y etambutol frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2015). Uno de los valores de IC₅₀ reportados en la literatura para la tetradrina, es un valor de 250 µg/mL contra la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ (Lee *et al.*, 2012). Otro valor interesante de IC₅₀ para la tetradrina, es el reportado contra la cepa de *E. coli* ATCC® 13025™ con un valor de 160 µg/mL (Shao-bin *et al.*, 2017).

En la **Figura 51** se presentan las gráficas de las UFC/mLx10⁸ contra la concentración en µg/mL de cada compuesto probado, mientras que en la **Tabla 9** se resumen los resultados encontrados en IC₅₀ e IC₉₉, podemos observar ninguno de los casos se pudo determinar la IC₅₀ para la tetradrina dado que en comparación con los derivados, no presentó actividad antibacteriana contra las especies estudiadas, observando crecimiento de los microorganismos en especial en las concentraciones más altas analizadas. En contraste, se encontró gran actividad de **MA_nT** sobre *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, observando un mayor (P < 0.05) efecto inhibitorio sobre *S. aureus*. El derivado **MA_cT** mostró actividad contra las cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*, y en particular con *S. aureus* se determinó la IC₉₉.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, no fue posible analizar el efecto de los derivados de **TET** sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Esto se puede atribuir a que *P. aeruginosa* es una bacteria capaz de formar biopelículas, compuesta principalmente por exopolisacáridos, ADN extracelular y polipéptidos que en conjunto forman una mezcla polar altamente hidratada. Esta biopelícula permite que la bacteria sea resistente a diversos agentes antibacterianos, haciendo que la bacteria prolifere abundantemente (Rasamiravaka *et al.*, 2015), lo que puede explicar el nulo efecto inhibitorio encontrado en este estudio (**Figura 52**).

Como se mencionó la actividad inhibitoria más destacada se obtuvo con **MAnT** sobre *S. aureus* con una IC₅₀ de 1.51 µg/mL (1.68 µM), un valor particularmente muy bajo comparado con el valor reportado para la tetrandrina sin modificar de 250 µg/mL en esta misma cepa bacteriana (Lee *et al.*, 2012). Tales resultados también superan a los observados para derivados de aminotiazolil norfloxacina reportados por Wang *et al.*, los cuales son capaces de unirse a ADN y provocar la muerte bacteriana (Wang *et al.*, 2019).

Tabla 9. Concentración requerida para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas en un 50 y 99% (IC₅₀ e IC₉₉, respectivamente).

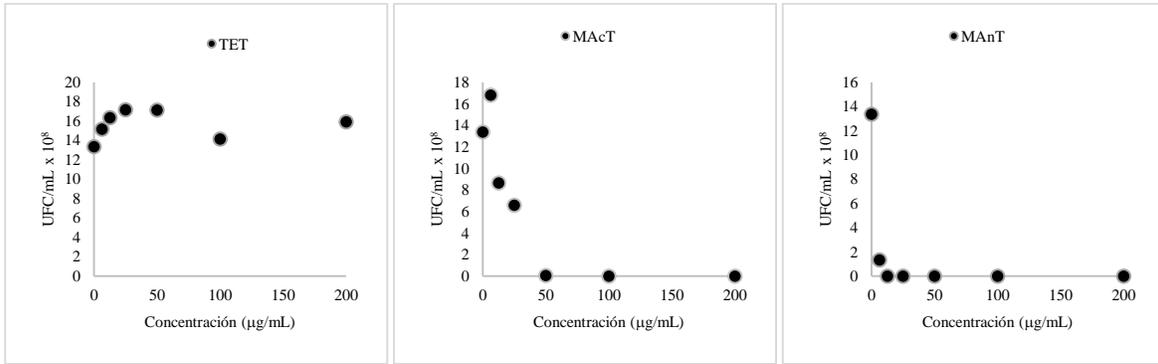
	IC ₅₀ µg/mL ± DE (IC ₉₉ µg/mL ± DE) IC ₅₀ µM ± DE (IC ₉₉ µM ± DE)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>
MAcT	22.01±0.71 ^a (79.36 ± 6.05)	ND*	78.39 ± 4.97 ^b (>200)	ND**
	24.60 ± 0.80 (88.69 ± 6.84)		87.61 ± 5.62	
MAnT	1.51 ± 0.45 ^b (64.19±14.77)	61.51 ± 1.41 ^a (160.95±8.62)	30.19 ± 1.06 ^a (134.37±11.07)	ND**
	1.68 ± 0.51 (71.68±16.98)	68.69 ± 1.62 (179.74 ± 9.91)	33.71±1.21 (150.06±12.7)	
TET	ND*	ND*	ND*	ND**

Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0.05), ANOVA de una sola vía.

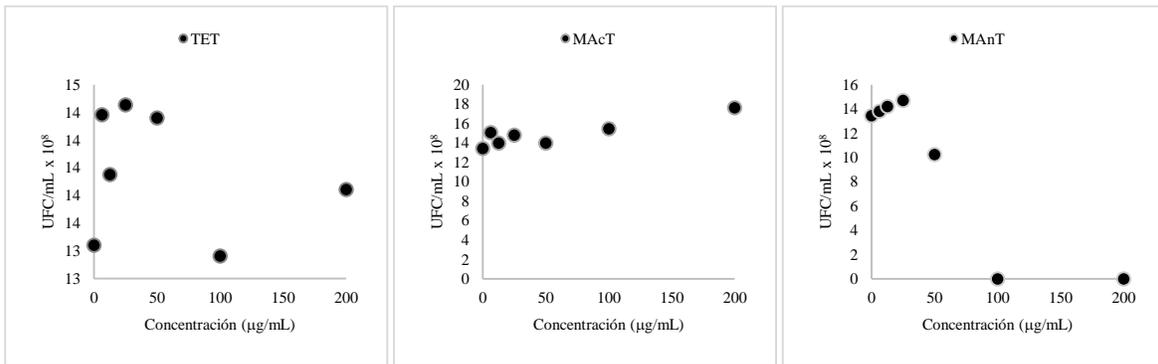
* No se obtuvo el valor de IC₅₀ a la máxima concentración utilizada.

**La variación de los datos obtenidos no permitió el cálculo de la IC₅₀ adecuadamente, pero los porcentajes de inhibición obtenidos experimentalmente indican que las IC₅₀ están por arriba del máximo probado.

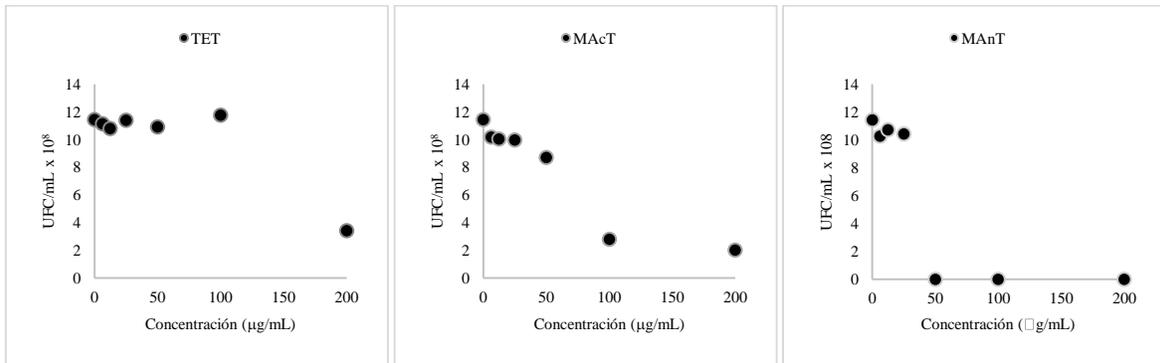
a) *S. aureus*



b) *E. coli*



c) *K. pneumoniae*



d) *P. aeruginosa*

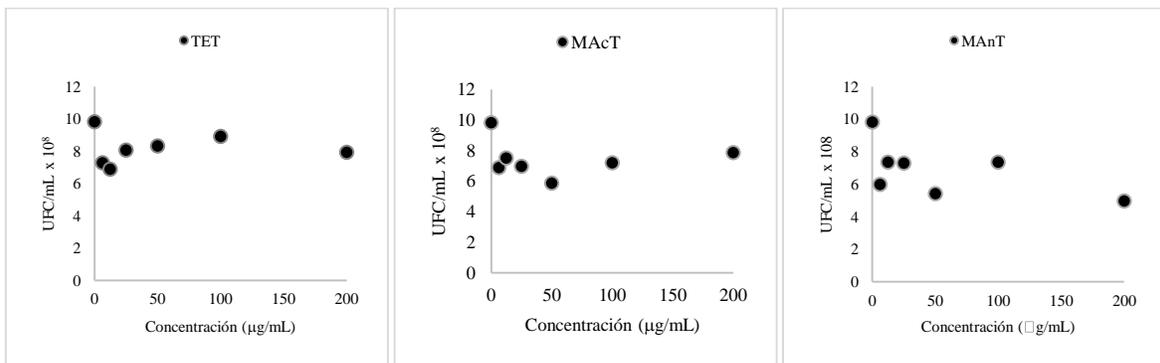


Figura 51. Gráficas de la concentración de cada tratamiento utilizado **TET**, **MA_nT** y **MA_cT** ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs crecimiento bacteriano en $\text{UFC} / \text{mL} \times 10^8$ para cepas de: a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *K. pneumoniae* y d) *P. aeruginosa*.

Después de obtener las IC_{50} mediante la densidad óptica se utilizó el colorante resazurina para determinar la viabilidad bacteriana. Este método se basa en un mecanismo redox, el colorante resazurina posee una tonalidad azul y no es fluorescente y por la acción del metabolismo celular es reducido a un compuesto rosa/rojo, el cual es altamente fluorescente. La señal fluorescente o colorimétrica generada a partir del ensayo es proporcional al número de células vivas en la muestra. El cambio de resazurina a resorufina en las placas de cultivo se debe a la enzima oxidoreductasa presente dentro de las bacterias.

Por tanto, los pocillos que se observan morados o azules son indicativos de la ausencia o pérdida de viabilidad de las bacterias mientras que los pocillos rosas indican que a pesar de la presencia de los compuestos las células aún son viables (Hudman y Sargentini, 2013; Prakash *et al.*, 2018). En la **Figura 52** se observan 4 placas representativas de este experimento, una por cada cepa, en la primera línea de cada los pocillos **A1-A7** representan los controles, los tres primeros pocillos solamente con medio de cultivo BHI notándose el color azul/morado del colorante, posteriormente en todos los casos se observan los tres pocillos rosados que corresponden a medio de cultivo con el respectivo inóculo bacteriano, y los otros 6 pozos contienen DMSO como control para observar su efecto en los inóculos. En las filas B y C de todas las placas se presenta el medio de cultivo con el inóculo y concentraciones crecientes de tetrandrina, en donde se puede observar el color rosa que indica que las bacterias aún son viables para reducir el colorante. Sin embargo, en los medios de cultivo adicionados con los derivados se observaron diferencias en la viabilidad de cada cepa. Los pozos de las filas D y E contiene concentraciones crecientes de **MA_cT**, mientras que los pozos de las filas F y G contienen el derivado **MA_nT**. Al analizar el efecto sobre *Staphylococcus aureus* (a) se observó un fuerte efecto inhibitorio de los derivados **MA_cT** (a partir de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$) y **MA_nT** (a partir de $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que para *Escherichia coli* (b) se encontró una actividad inhibitoria moderada solo para el derivado **MA_nT** a concentraciones $> 100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Al evaluar la actividad contra *Klebsiella pneumoniae* (c) se observó actividad moderada de **MA_cT** a $200 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que con **MA_nT** las células son viables hasta $25 \mu\text{g}/\text{mL}$.

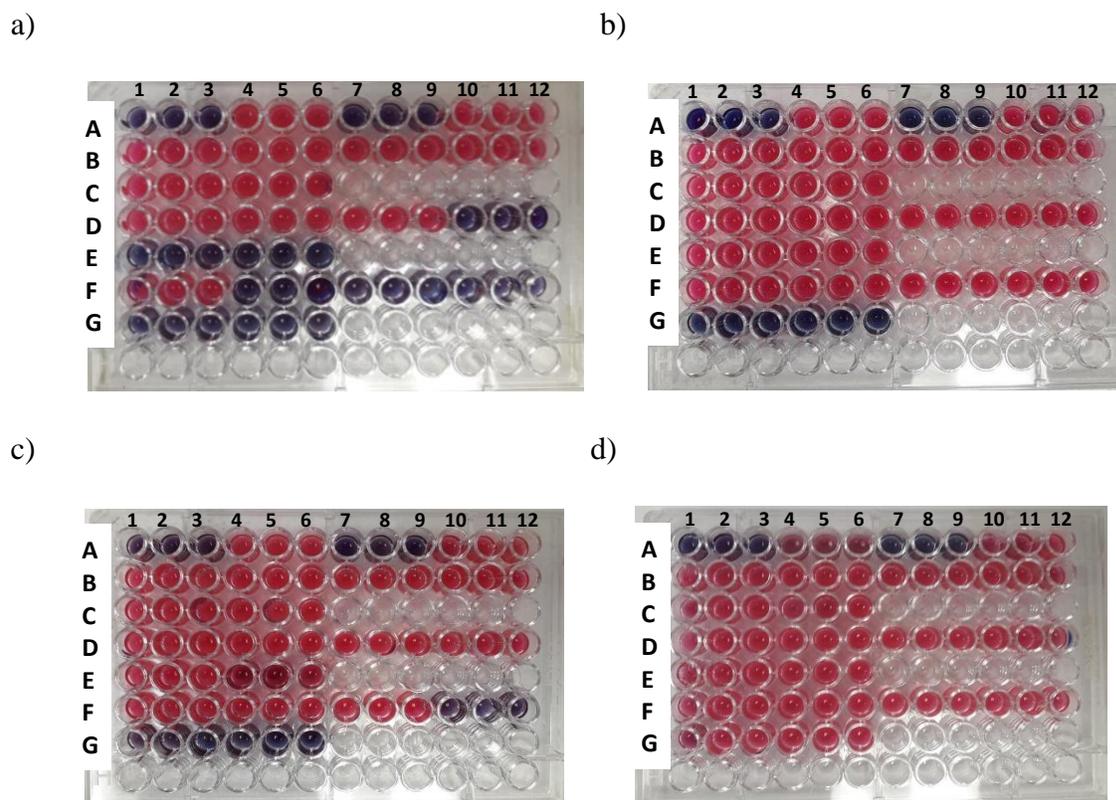


Figura 52. Cultivos en microplaca de las diferentes cepas bacterianas, teñidas con resazurina: a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *K. pneumoniae*, d) *P. aeruginosa*. En todos los casos: pozos A1-A3: Medio BHI, A4-A6: BHI + inóculo respectivo, A7-A9: BHI + DMSO, A10-A12: BHI+ inóculo respectivo + DMSO, B1-C6: Tetrandrina (**TET**) a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D1-E6: **MAnT** a 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las mediciones de viabilidad de bacterias se aplican en diversos ámbitos de investigación y de la industria, es común el uso del yoduro de propidio como un indicador de células muertas (Shi *et al.*, 2007). Este colorante es excluido de la membrana celular cuando esta se encuentra íntegra. Sin embargo, cuando la célula sufre un daño en la membrana o bien cuando la integridad de esta se encuentra comprometida debido a diversos factores, el yoduro de propidio se intercala el ADN de doble cadena y presenta una coloración roja (Gálvez-Irquí *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 1997). En la **Figura 53** se presentan imágenes de células de *S. aureus* expuestas durante 24 horas en medio de cultivo adicionado con **MAnT** y teñidas con yoduro de propidio, en donde se puede observar una gran cantidad de células teñidas de rojo. Esta evidencia es congruente con los resultados de

viabilidad utilizando resazurina, lo cual indica que este derivado del alcaloide es el más potente biológicamente contra esta cepa. El derivado **MAcT** presentó un efecto similar, lo que sugiere que las bacterias Gram (+) como *S. aureus* exhiben una mayor susceptibilidad contra este tipo de compuestos.

Los derivados **MAcT** y **MAnt** presentaron una inhibición moderada contra *E. coli* y *K. pneumoniae*. La tetrandrina sin modificar no afectó la integridad de la membrana de las bacterias estudiadas, lo cual confirma los resultados observados de crecimiento microbiano medido a través de los valores de densidad óptica. En la literatura se han reportado resultados similares, por ejemplo algunos derivados de flavonoides presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, la cual podría estar vinculada a alteraciones de la membrana bacteriana (Olleik *et al.*, 2019).

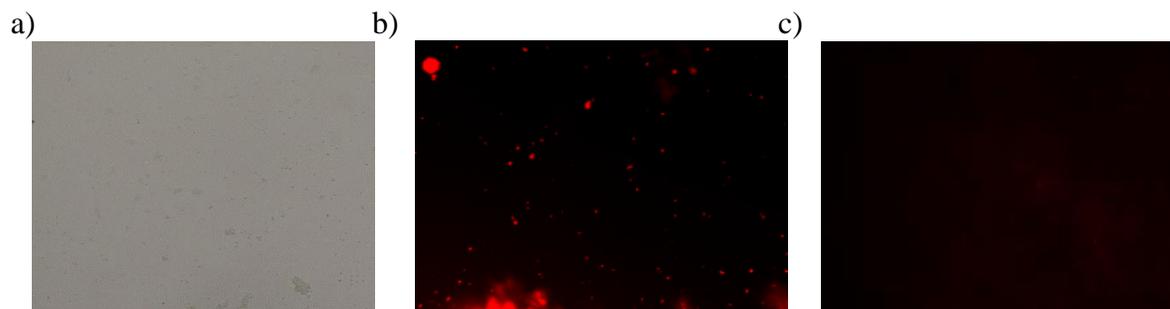


Figura 53. Fotografías tomadas con microscopio invertido (40x) de la tinción con yoduro de propidio: a) Campo claro de *S. aureus* a) *S. aureus* expuesto a **MAnt** 200 µg/mL, c) Control.

En la **Figura 54** se observan imágenes de células de *S. aureus* expuestas al derivado **MAnt** teñidas con el colorante dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH₂-DA). Para este colorante una vez dentro la célula, sus grupos lipófilicos son liberados por la acción de las enzimas esterasas en respuesta al metabolismo oxidativo dejando la molécula cargada (compuesto polar DCFH₂). Cuando es oxidado por especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares o peroxidasas, el 2,7-DCFH₂-DA se desesterifica en una forma altamente verde fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína tras la oxidación. Por tanto, una coloración verde evidencia un estado de estrés oxidativo general en la célula, asociado al desarrollo de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este colorante es permeable a la célula, aunque tiene limitaciones debido a que varias especies pueden oxidarlo como lo son el óxido nítrico, los aniones de peroxinitrito e incluso los hidropéroxidos orgánicos (Gálvez-Irqui *et al.*, 2019;

Ravichandiran *et al.*, 2019). Los resultados encontrados indican que el derivado **MAntT** es capaz de inducir un estado de estrés oxidativo general en *S. aureus* y *E. coli*, mientras que el derivado **MAcT** induce una respuesta oxidativa en *S. aureus*, de menor intensidad que **MAntT**. Para la tetrandrina sin modificar no se observa este comportamiento en ninguno de los casos. De acuerdo a los resultados para **MAntT** con *S. aureus* podemos deducir que en el caso de este derivado con esta cepa en específico es probable que el estrés oxidativo presentado fue el causante de la muerte celular total. El mismo tipo de estrés se reportó por Ravichandiran *et al.*, donde se estudiaron una serie de 1,4-naftoquinonas contra varias cepas bacterianas y se utilizó este colorante con *E. coli* y varios de sus compuestos mostraron actividad demostrando que la muerte bacteriana se correlacionaba con la aparición de ROS (Ravichandiran *et al.*, 2019).

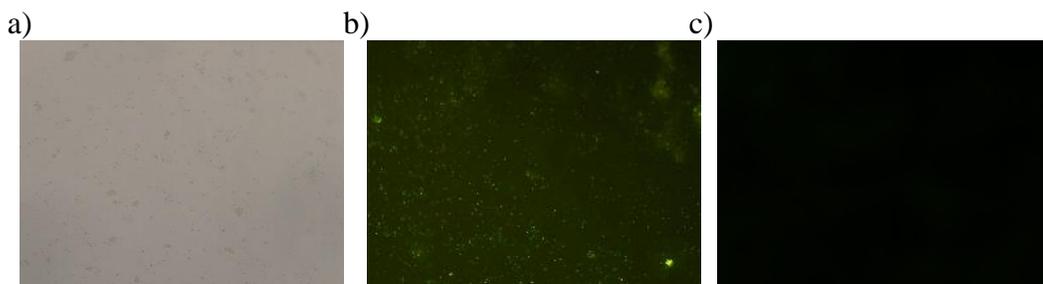


Figura 54. Fotografías tomadas con microscopio invertido 40x de la tinción con DCFH₂-DA: a) Campo claro de *S. aureus* a) *S. aureus* expuesto a **MAntT** (200 µg/mL), c) Control.

Las evidencias experimentales y datos obtenidos de los estudios antibacterianos indican que los derivados de la **TET** exhiben una mayor actividad contra *S. aureus*. Al respecto, un posible mecanismo de acción puede estar relacionado con la estructura de la membrana de las bacterias Gram positivas, ya que presentan un alto porcentaje de fosfolípidos cargados negativamente que pudieron interactuar con los derivados cargados positivamente, dañando la membrana y haciéndola permeable (Benoit *et al.*, 2014; Hoque *et al.*, 2012). Además, Lee *et al.*, reportaron que la tetrandrina tiene un mecanismo de acción contra *S. aureus* basado en su interacción con la pared de peptidoglicano, presentándose una interferencia potencial en la biosíntesis de la pared celular (Lee *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estos derivados se unen al ADN bacteriano, lo cual se demostró mediante electroforesis en gel de agarosa. Por tal razón, esto podría implicar que una vez que estos compuestos entran a la célula bacteriana pudieran interactuar con el ADN. Es

importante enfatizar, que aún falta realizar más estudios para esclarecer el mecanismo de muerte bacteriana, sin embargo, los derivados presentan un gran potencial como agentes antibacterianos destacándose la actividad de los derivados contra *S. aureus*.

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron dos derivados **MA_nT** y **MA_cT** los cuales fueron caracterizados estructuralmente por técnicas convencionales. Además, para **MA_cT** se obtuvo un cristal apto para difracción de rayos X de monocristal. La alquilación del nitrógeno más reactivo de la tetrandrina modifica las propiedades físicas, químicas y biológicas.
- La incorporación de cargas y unidades poli aromáticas en **MA_cT** y **MA_nT** resulta en derivados con alta afinidad por ADN. Los resultados demostraron que son intercaladores y además se ven involucradas otras interacciones no covalentes en la estabilización de los complejos. Se observó que este conjunto de interacciones aumentó la afinidad de los derivados por el ADN.
- El derivado **MA_nT** es 5 veces más activo que la tetrandrina en la línea celular de cáncer de cuello cérvico-uterino (HeLa).
- Los estudios de capacidad antioxidante mostraron que el derivado **MA_nT** y tetrandrina poseen buena capacidad de inhibir el radical libre ABTS^{•+}.
- Los resultados de la actividad antibacteriana demostraron que **MA_nT** tiene una buena actividad inhibitoria contra *S. aureus*.
- Estas sales de tetrandrina tienen un equilibrio hidrofóbico-hidrofílico que puede estar relacionada con el daño observado en la membrana de las células bacterianas, así como con la posible internalización celular, por tanto posiblemente podrían causar daño al ADN, produciendo la muerte celular.
- El derivado **MA_nT** es el derivado con mayor actividad biológica. Entre otros aspectos, esto pudiera estar relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno.
- En general, los resultados del presente trabajo demuestran que el diseño molecular de los derivados de la tetrandrina modifica las propiedades físicas, químicas y biológicas de la tetrandrina natural.

8. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. Optimizar la síntesis y purificación del derivado **MAnT**.
2. Obtener un cristal apto para difracción de rayos X de mono-cristal del derivado **MAnT**.
3. Completar la serie con estudios con ADN genómico, ya sea por la técnica de UV/Vis, fluorescencia y de desplazamiento del bromuro de etidio u otros estudios tales como viscosimetría, dicroísmo circular e ITC.
4. Estudios con células para conocer si los derivados logran traspasar la membrana celular.
5. Realizar estudios para conocer con certeza el modo de muerte celular producido por los derivados estudiados, en especial con el derivado **MAnT** en la línea celular de cáncer cérvicouterino (HeLa). Tales como citometría de flujo, haciendo uso de la tinción Anexina V-yoduro de propidio.
6. Utilizar otras tinciones como JC-1, algunas caspasas y ciclo celular para conocer el tipo de daño celular y que parte del ciclo celular se ve afectado por los derivados en células cancerígenas.
7. Realizar ensayo anti-topoisomerasa I o II para conocer si debido a la inhibición de alguna de estas por la acción de los derivados se está dando la muerte celular.
8. Estudiar otros radicales libres para complementar y se recomienda estudiar el tipo de mecanismo que se está dando con los derivados y los radicales libres.
9. Estudiar a profundidad mecanismos antibacterianos y complementar estudios con más cepas bacterinas y fármacos control.
10. Se recomiendan pruebas *in vivo* con modelos murinos haciendo uso de los derivados pues estos mostraron potente actividad biológica tanto como antiproliferativos, antioxidantes y como antibióticos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ali A., y Bhattacharya S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy, *Bioorganic Med. Chem.* 22 (2014) 4506–4521.
- Almaqwashil A. A., Paramanathan T., Rouzina I., Williams M. C. Mechanisms of small molecule–DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy, *Nucleic Acids. Res.* 44 (9) (2016) 3971–3988.
- Banerjee S., Bright S.A., Smith J.A., Burgeat J., Martinez-Calvo M., Williams D. C., Kelly J.M., Gunnlaugsson T. Supramolecular Approach to Enantioselective DNA Recognition Using Enantiomerically Resolved Cationic 4 Amino-1,8-naphthalimide-Based Tröger's Bases. *J. Org. Chem.* 79 (2014) 9272–9283.
- Baraldi P. G., Bovero A., Fruttarolo F., Preti D., Tabrizi M. A., Pavani M. G., Romagnoli R. DNA Minor Groove Binders as Potential Antitumor and Antimicrobial Agents, *Med. Res. Rev.* 24 (4) (2004) 475-528.
- Bhagya, N. y Chandrashekar K.R. Tetrandrine – A molecule of wide bioactivity. *Phytochemistry* 125 (2016) 5-13.
- Bharathi-Dileepan A.G., Prakash T. D., Ganesh-Kumar A., Rajam P. S., Violet Dhayabaran V., Rajaram R., Isatin based macrocyclic Schiff base ligands as novel candidates for antimicrobial and antioxidant drug design: In vitro DNA binding and biological studies, *J. Photochem. Photobiol. B.* 183 (2018) 191-200.
- Baudoin O., Gonnet F., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Tabet J.-C., Lehn J.-M. Molecular recognition of nucleotide pairs by a cyclo-bis-intercaland-type receptor molecule: a spectrophotometric and electrospray mass spectrometry study, *Chem. Eur J.* 5 (1999) 2762–2771.
- Benoit A. R., Schiaffo C., Salomon C. E., Goodell J. R., Hiasa H., Ferguson D. M. Synthesis and evaluation of N-alkyl-9-aminoacridines with antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3014–3017.
- Da-Silva-Andrade, da-Silva-Julião M. S., Vera Cruz R. C., Soares-Rodrigues T. H., Dos-Santos-Fontenelle R. O., Coelho-da-Silva A. L. Antioxidant and antifungal activity of carnauba wax powder extracts, *Ind. Crops. Prod.* 125 (2018) 220-227.

- Del-Toro-Sánchez C. L., Gutiérrez-Lomelí M., Lugo-Cervantes E., Zurita F., Robles-García M. A., Ruiz-Cruz S., Aguilar J. A., -Del Rio J. A., Guerrero-Medina P. J. Storage Effect on Phenols and on the Antioxidant Activity of Extracts from *Anemopsis californica* and Inhibition of Elastase Enzyme. *J. Chem.* (2015) 1-8.
- Dorazco-González A., Höpfl H., Medrano F., Yatsimirsky A.K. Recognition of anions and neutral guests by dicationic pyridine-2,6-dicarboxamide receptors, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 2259–2273.
- Efthimiadou E.K., Karaliota A., Psomas G. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: structure and biological evaluation, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 455–466.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (4) (2007) 495–516.
- Escobar-Picos R., Vasquez-Ríos M. G., Sotelo-Mundo R. R., Jancik V.; Martínez-Otero D., Calvillo-Páez V., Höpfl H. and Ochoa Lara K. A Chiral Bis-Naphthylated Tetrandrine Dibromide: Synthesis, Self-Assembly into an Organic Framework Based On Nanosized Spherical Cages, and Inclusion Studies, *ChemPlusChem.* 84 (2019) 1–6.
- Farooqi S. I., Arshad N., Channar P. A., Perveen F., Saeed A., Larik F. A., Javeed A. Synthesis, theoretical, spectroscopic and electrochemical DNA binding investigations of 1, 3, 4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and ciprofloxacin: Cancer cell line studies, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 189 (2018) 104-118.
- Fink S., Cookson B. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infect. Immun.* 73 (4) (2005) 1907–1916.
- Gálvez-Iriqui A. C., Cortez-Rocha M. O., Burgos-Hernández A., Calderón-Santoyo M., Argüelles-Monal W. M. y Plascencia-Jatomea M. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (7) (2019) 2985-3000.
- Gilmore C.J., Bryan R.F., Kupchan S.M. Conformation and reactivity of the macrocyclic tumor-inhibitory alkaloid tetrandrine, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (7) (1976) 1947–1952.
- Gonzalez-Garcia, J. y Vilar, R. Supramolecular principles for small molecule binding to DNA structures, in: J.L. Atwood (Ed.), Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, Oxford, 2017, 39–70.

- Gülçin I., Elias R., Gepdiremen A., Chea A., Topal F. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25 (1) 44-53
- Hannon M. J., Supramolecular DNA recognition, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 280–295.
- He P., Sun H., Jian X.-X., Chen Q.-H., Chen D.-L., Liu G.-T., Wang F.-P. Partial synthesis and biological evaluation of bisbenzylisoquinoline alkaloids derivatives: potential modulators of multidrug resistance in cancer, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 14 (6) (2012) 564–576.
- Hemissi H., Fezai R., Mezni A., Besbes-Hentati S., Rzaigui M., First copper(II)-cyclophosphato complex with macrocyclic N-donor ligand: Single crystal structure elucidation with Hirshfeld surface analysis, optical, electrochemical and antioxidant properties, *J. Solid State Chem.* 263 (2018) 1-10.
- Hevesi-Tóth B., Blazics B, Kéry A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of *Epilobium* species, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (1) (2009) 26-31.
- Hoque J., Akkapeddi P., Yarlagadda V., Uppu D. S. S. M., Kumar P., and Haldar J. Cleavable Cationic Antibacterial Amphiphiles: Synthesis, Mechanism of Action, and Cytotoxicities, *Langmuir* 28 (2012) 12225–12234.
- Hudman D. A. and Sargentini N. J. Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity, *SpringerPlus.* 2 (55) (2013) 1-6.
- Huang Y., Liu J., Zhang J., Liu Q., Hou J., Zhang Y., Zhang D., Lu Q., Chen S., Lin H. y Yu x. Interaction of bis-aryl functionalized molecules with nucleosides and nucleic acids, *Sci. China.* 53 (2010) 103-112.
- Jayanthi E., Kalaiselvi S., Padma V.V., Bhuvanesh N.S.P., Dharmaraj N., Solvent assisted formation of ruthenium(III) and ruthenium(II) hydrazone complexes in one-pot with potential in vitro cytotoxicity and enhanced LDH, NO and ROS release, *Dalton Trans.* 45 (2016) 1693–1707.
- Kalaiarasi G., Jain R., Puschman H., Chandrika S.P., Preethi K., Prabhakaran R. New binuclear Ni(II) metallates containing ONS chelators: synthesis, characterization, DNA binding, DNA cleavage, protein binding, antioxidant activity, antimicrobial and in vitro cytotoxicity, *New J. Chem.* 41 (2017) 2543–2560.

- Kataev E.A., Shumilova T.A., Fiedler B., Anacker T., Friedrich J. Understanding stacking interactions between an aromatic ring and nucleobases in aqueous solution: experimental and theoretical study, *J. Org. Chem.* 81 (2016) 6505–6514.
- Kim S. K. y Nordén B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug, *FEBS Lett.* 315 (1) (1993) 61-64.
- Koparde S., Hosamani K. M., Barretto D. A., Joshi S. D. Microwave synthesis of coumarin-maltol hybrids as potent antitumor and anti-microbial drugs: An approach to molecular docking and DNA cleavage studies, *Chem. Data Collec.* 15–16 (2018) 41-53.
- Kozurková M., Sabolová D., Pulíková H., Janovec L., Kristian P., Bajdichová M., Busa J., Podhradský D., Imrich J. DNA binding properties and evaluation of cytotoxic activity of 9,10-bis-N-substituted (aminomethyl)anthracenes, *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 415–422.
- Lafayette E. A., de Almeida S. M. V., Santos R. V. C., de Oliveira J. F., da Cruz Amorim C. A., Ferreira da Silva R. M., da Rocha Pitta M. G., da Rocha Pitta I., de Moura R. O., Bezerra de Carvalho Júnior L., Barreto de Melo Rêgo M. J., Alves de Lima M. d. C., Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 511-522.
- Lan, J., Wang, N., Huang, L., Liu, Y., Ma, X., Lou, H., Chen, C., Feng, Y., Pan, W. Design and synthesis of novel tetrandrine derivatives as potential antitumor agents against human hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* 127 (2017) 554-566.
- Lebedeva N. S., Yurina E. S., Gubarev Y. A., Syrbu S. A. Interactions of tetracationic porphyrins with DNA and their effects on DNA cleavage, *Spectrochim. Acta A.* 199 (2018) 235-241.
- Lee Y.-S., Han S.-H., Lee S.-H., Kim Y.-G., Park C.-B., Kang O.-H., Keum J.-H., Kim S.-B., Mun S.-H., Seo Y.-S., Myung N.-Y., Kwon D.-Y. The Mechanism of Antibacterial Activity of Tetrandrine Against *Staphylococcus aureus*, *Foodborne Pathog. Dis.* 9 (8) (2012) 686-691.
- Lei R.R., Hu H.F., Bai F., Liu Y., Wu C.Z., Huang X.X., Xie L.P. y Hu Y.J. Anti-proliferative and apoptotic effects of S1, a tetrandrine derivative, in human gastric cancer BGC-823 cells, *Chin. J. Nat. Med.* 14 (2016) 527-533.

- Leyva-Peralta M.A., Robles-Zepeda R.E., Garibay-Escobar A., Ruiz-Bustos E., Alvarez-Berber L.P., Gálvez-Ruiz J.C. In vitro anti-proliferative activity of *Argemone gracilentia* and identification of some active components, *BMC Compl. Alternative Med.* 15 (13) (2015) 1–7.
- Li D., Liu H., Liu Y., Zhang Q., Liu C., Zhao S., Jiao B. Design, synthesis and biological activities of tetrandrine and fangchinoline derivatives as antitumor agents, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 533–536.
- Liégeois J.F., Wouters J., Seutin V., Dilly S. Bis(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinium): a chiral scaffold for developing High Affinity ligands for SK channels, *Chem. Med. Chem.* 9 (4) (2014) 737–740.
- Liu Q., Zhang J., Wang M.-Q., Zhang D.-W., Lu Q.-S., Huang Y., Lin H.-H., Yu X.-Q. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5302–5308.
- Liu T., Liu X. y Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy, *Oncotarget* 7 (26) (2016) 40800–40815.
- Liu Y., Huang L., Sun Q., Zhang M., Li T., Liang G., Pan W. Derivatives of Tetrandrine and Fangchinoline. *Chem. Res. Chin. Univ.* 30 (6) (2014) 937-940.
- Liu Y., Zhang M, Li D., Qian X., Du H. Tetrandrine derivative, its preparation method and application as antitumor agent. 2014, Patent number: CN103923092A.
- Liu Y., Wu G., Zhang M., Wang R., Gu Q. New bis-benzyl isoquinoline quaternary ammonium salt derivative used for preparing drug for treating tumor. Patent number: 2014, CN103910378A.
- Long E.C. y Barton J.K. On demonstrating DNA intercalation, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 273–279.
- Lohani N., Singh H.N., Rajeswari M.R. Assessment of binding properties of Actinomycin-D to 21nt DNA segment of hmgbl gene promoter using spectroscopic and calorimetric techniques, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35 (2017) 1–8.
- Lorente A. y Fernández M. J., Interacciones no covalentes con el ADN, *An. Quím.* 104 (4) (2008) 280–289.

- Lu J.-J., Bao J.-L., Chen X.-P., Huang M. y Wang Y.-T., Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents, *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* (2012) 1-12.
- Makhaeva G. F., Lushchekina S.V., Boltneva N. P., Serebryakova O. G., Rudakova E. V., Ustyugov A. A., Bachurin S. O., Shchepochkin A. V., Chupakhin O.N., Charushin V. N., Richardson R. J. 9-Substituted acridine derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors possessing antioxidant activity for Alzheimer's disease treatment, *Bioorganic Med. Chem.* 25 (21) (2017) 5981–5994.
- Miller N.J., Diplock A.T., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84 (1993) 407-12.
- Moreno-Corral, R. y Lara, K. O. Complexation Studies of Nucleotides by Tetrandrine Derivatives Bearing Anthraquinone and Acridine Groups, *Supramol. Chem.* 20 (4) (2008) 427-435.
- Nelson S. M., Ferguson L. R., Denny W. A. Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents, *Mutat. Res.* 623 (2007) 24–40.
- Ochoa-Lara K., Godoy-Alcántar C., León R. I., Elseev A.V., Yatsimirsky A. K. Complexation of dicarboxylates and phosphates by a semisynthetic alkaloid-based cyclophane in water, *J. Phys. Org. Chem.* 14 (2001) 453-462.
- Ochoa-Lara K., Godoy-Alcántar C., Elseev A.V., Yatsimirsky, A. K. Ester cleavage by S,S-(+)-tetrandrine derivative bearing thiol groups, *ARKIVOC* vi (2005) 293-306.
- Ochoa-Lara K. O., Godoy-Alcántar C., León R. I., Elseev A.V., Yatsimirsky A. K. Recognition of α -amino acid derivatives by N,N'-dibenzylated S,S-(+)-tetrandrine, *Org. Biomol. Chem.* 2 (2004) 1712-1718.
- Olleik H., Yahiaoui S., Roulier B., Courvoisier-Dezord E., Perrier J., Pérès B., Hijazi A., Baydoun E., Raymond J., Boumendjel A., Maresca M., Haudecoeur R. Aurone derivatives as promising antibacterial agents against resistant Gram-positive pathogens, *Eur. J. Med. Chem.* 165 (2019) 133-141.
- Organización Mundial de la Salud (OMS): 12 de septiembre de 2018
<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- Pan W., Feng Y., Liu Y., Wang N., Huang L., Liang G., Zhang M., Li T.; Lou H., Hu Z., Liu S., Cao P., Ruan J. Bi-benzyl isoquinoline derivative useful in treatment of liver diseases and its preparation. 2016. Patent number: WO 2016023404.
- Paul A. y Bhattacharya S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules, *Curr. Sci.* 102 (2) (2012) 212-231.
- Prakash G., Boopathy M., Selvam R., Kumar S. J., Subramanian K. The effect of anthracene-based chalcone derivatives in the resazurin dye reduction assay mechanisms for the investigation of Gram-positive and Gram-negative bacterial and fungal infection, *New J. Chem.* 42 (2018) 1037.
- Prior R. L., Wu X., Schaichj K.. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290-4302.
- Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El-Jaziri M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, *Biomed. Res. Int.* (2015) 1-17.
- Rehman S.U., Sarwar T., Husain M. A., Ishqi H. M., Tabish M., Studying non-covalent drug–DNA interactions, *Arch. Biochem. Biophys.* 576 (2015) 49–60.
- Sánchez M. I., Jiménez A., Mascareñas J. L. y Vázquez M. E. Sensores fluorescentes de secuencias específicas de ADN de doble cadena, *An. Quím.* 105 (3) (2009) 180–188.
- Schneider H.-J., Yatsimirsky A., Principles and Methods in Supramolecular Chemistry, John Wiley and Sons, England, 2000.
- Secretaria de Salud: 08 de agosto de 2017. <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
- Shao-bin F., Hong-qiang Y., Jia-jia T., Qing-feng M., Shi-ji X., Mao-sheng Z., Ze-Hui C. Separation and Activity against Drug-resistant Bacteria of Tetrandrine and Fangchinoline in Lipophilic Alkaloids from *Stephania tetrandra*, *Der Chemica Sinica*, 8 (3) (2017) 298-304.
- Shi L., Günther S., Hübschmann T., Lukas Y. Wick, Harms H., Müller S. Limits of Propidium Iodide as a Cell Viability Indicator for Environmental Bacteria, *Cytometry*. A. 71 (2007) 592-598.

- Silva M. M., Nascimento E. O.O., Silva E. F., de Araújo J. X., Santana C. C., Grillo L. A. M., de Oliveira R. S., Costa P. R. R., Buarque C. D., Santos J. C. C., Figueiredo I. M. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 223-233.
- Steed, J. W., Turner, D.R., Wallace, K.J. Core Concepts In Supramolecular Chemistry And Nanochemistry. Ed. Wiley, Inglaterra, 2007.
- Song J., Lan J., Chen C., Hu S., Song J., Liu W., Zeng X., Lou H., Ben-David Y. y Pan W. Design, synthesis and bioactivity investigation of tetrandrine derivatives as potential anti-cancer agents, *Med. Chem. Commun.* 9 (2018) 1131-1141.
- Sun H., Liu X.-D., Liu Q., Wang F.-P., Bao X.-Q., Zhang D. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the novel tetrandrine derivative W6. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 17 (6) (2015) 638–648.
- Thordarson P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1305–1323.
- Wang B., Tan J., Zhu L. Selective binding of small molecules to DNA: Application and perspectives, *Colloids Surf. B.* 79 (2010) 1–4.
- Wang L.-L., Battini N., Bheemanaboina R. R. Y., Zhang S.-L., Zhou C.-H. Design and synthesis of aminothiazolyl norfloxacin analogues as potential antimicrobial agents and their biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 167 (2019) 105-123.
- Wei N., Liu G.-T., Chen X.-G., Liu Q., Wang F.-P., Sun H. H1, a derivative of Tetrandrine, exerts anti-MDR activity by initiating intrinsic apoptosis pathway and inhibiting the activation of Erk1/2 and Akt1/2, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1593–1603.
- Wong-Molina, A., Lara, K. O., Sánchez, M., Burboa, M. G., Gutiérrez-Millán, L. E., Marín, J. L. Valdez, M.A. Interaction of Calf Thymus DNA with a Cationic Tetrandrine Derivative at the Air–Water Interface, *J. Biomed. Nanotechnol.* 4 (2008) 1-10.
- Wu C.-Z., Lai L., Hu X., Lei R.-R. y Yang Y.-F. Synthesis and antitumor activity of tetrandrine derivatives, *J. Asian Nat. Prod. Res.* 15 (9) (2013) 993–1002.

- Williams S.C., Hong Y., Danavall D.C.A., Howard-Jones M.H., Gibson D., Frischer M.E., Verity P.G. Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples, *J. Microbiol. Methods*. 32 (1998) 225–236.
- Yang Q.-H., Jiang C.-S., Jin T., Xua J.-F., Qu T.-L., Guo Y.-W y Zhao Z.-B., Synthesis of novel tetrandrine derivatives and their inhibition against NSCLC A549 cells, *J. Asian Nat. Prod. Res.* (2018) 1–11.
- Zhang E., Wei Y., Huang F., Yu Q., Bian H., Liang H., Lei F. Synthesis, crystal structure and bioactivity of manganese complexes with asymmetric chiral Schiff base, *J. Mol. Struct.* 1155 (2018) 320-329.
- Zhou Y., Xu Z., Yoon J., Fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of nucleotides, FAD and NADH: highlighted research during 2004–2010, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2222–2223.
- Zhou Z., Tong H.H.Y., Li L., Shek F.L.Y., Lve Y., Zheng Y. Synthesis, crystal structures and phase transformation of the new solid-state forms of tetrandrina, *RSC Adv.* 4 (2014) 62586–62593.

10. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Estudios de reconocimiento molecular de nucleótidos.

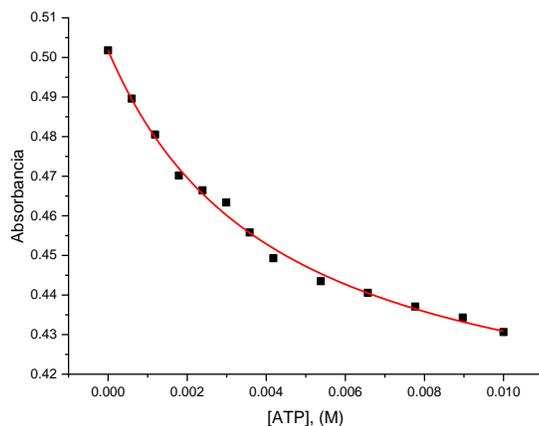


Figura A1.1. Gráfica de la absorbancia de MAcT (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [ATP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la Ecuación 1.

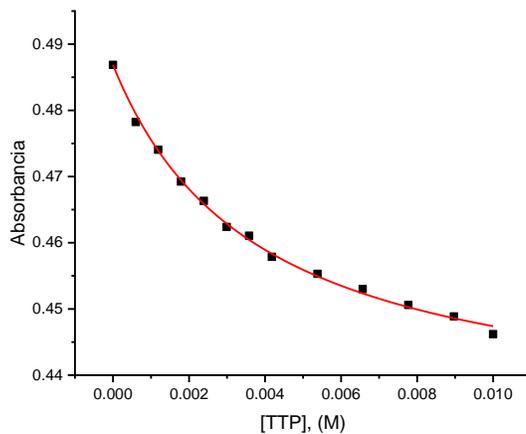


Figura A1.2. Gráfica de la absorbancia de MAcT (6×10^{-5} M) a 367 nm vs [TTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la Ecuación 1.

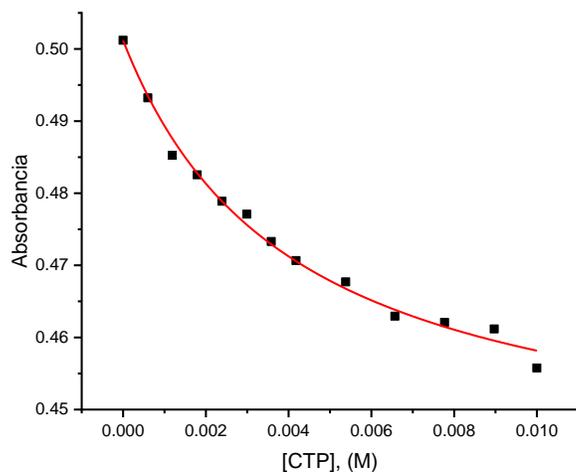


Figura A1.3. Gráfica de la absorbancia de MAcT ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$) a 367 nm vs [CTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la Ecuación 1.

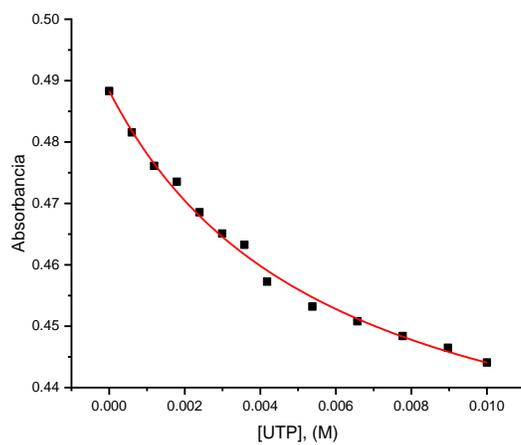


Figura A1.4. Gráfica de la absorbancia de MAcT ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$) a 367 nm vs [UTP]. La línea sólida representa el ajuste teórico de acuerdo a la Ecuación 1.

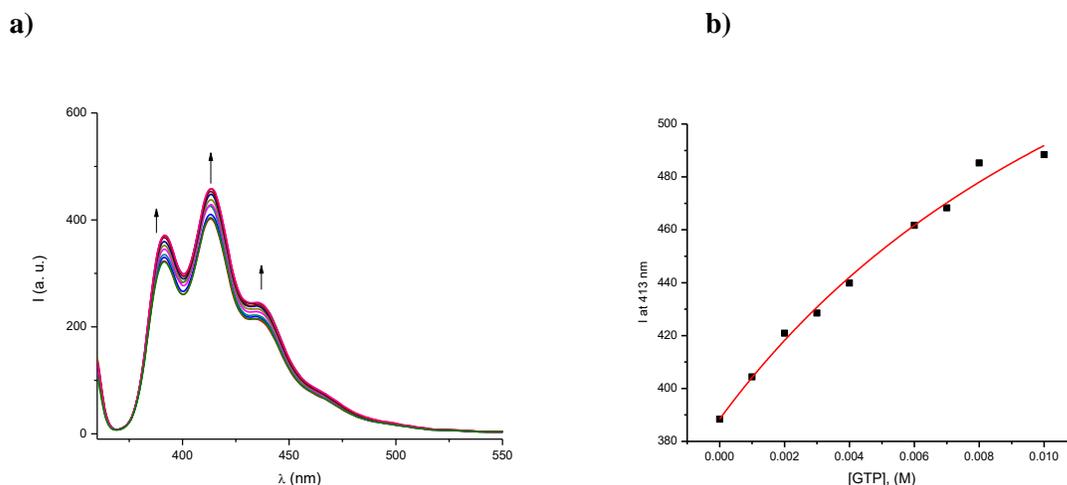


Figura A1.5. a) Titulación fluorométrica de **MAnT** (6×10^{-6} M) con GTP (0.001-0.01 M), $\lambda_{exc} = 350$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v), a 25 °. b) Gráfica de la intensidad de emisión a 413 nm de **MAnT** (6×10^{-6} M) vs la concentración de GTP. La línea continua es la curva de ajuste de acuerdo con una ecuación modificada.

APÉNDICE 2. Estudios de reconocimiento molecular de ADN por UV/Vis.

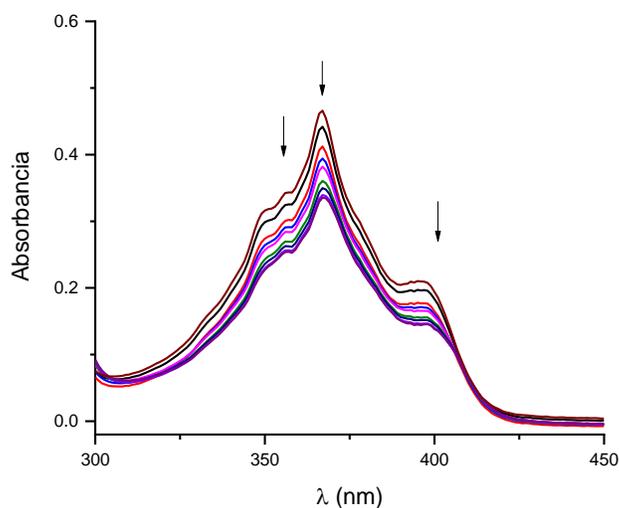


Figura A2.1. Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-1.

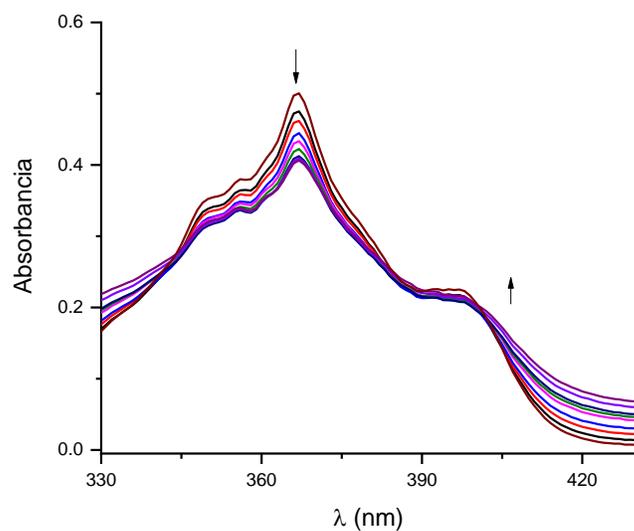


Figura A2.2. Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-3.

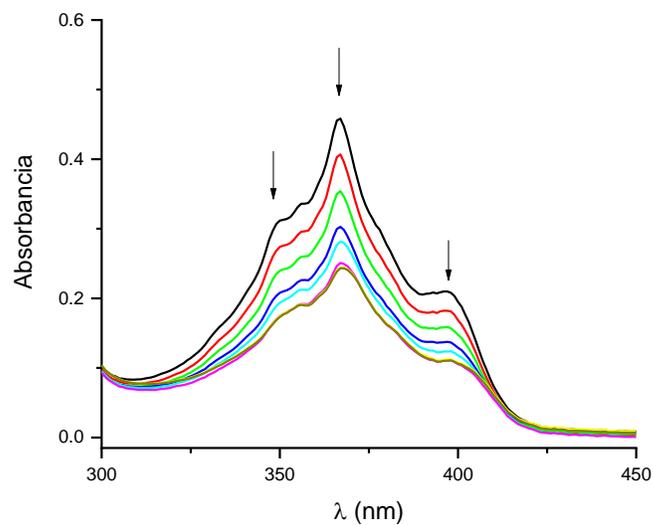


Figura A2.3. Variación de los espectros de absorción para **MAcT** (6×10^{-5} M) tras la adición de ADN de doble cadena (1-10 μ M) en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, 0.01 M de NaCl y 10% DMSO (v/v) con ADN-4.

APÉNDICE 3. Estudios del desplazamiento del bromuro de etidio.

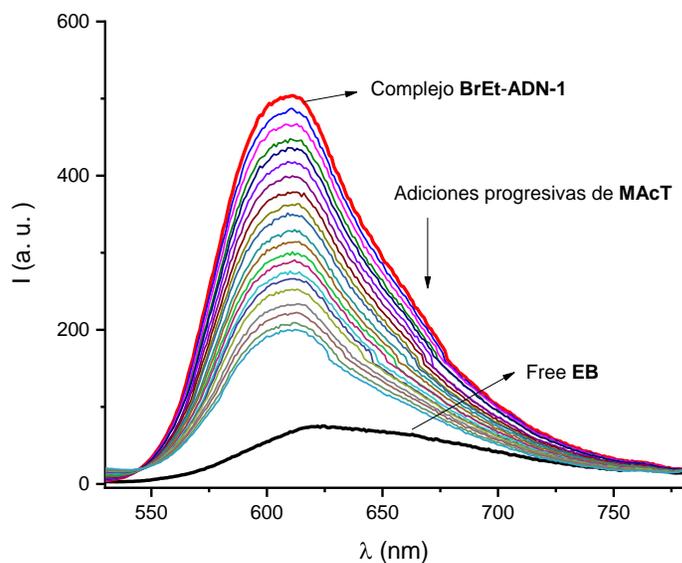


Figura A3.1. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M.

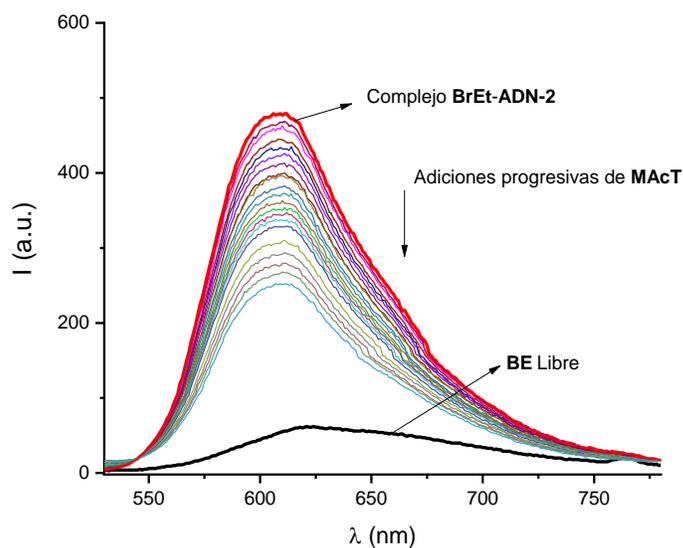


Figura A3.2. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-2 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-2] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M.

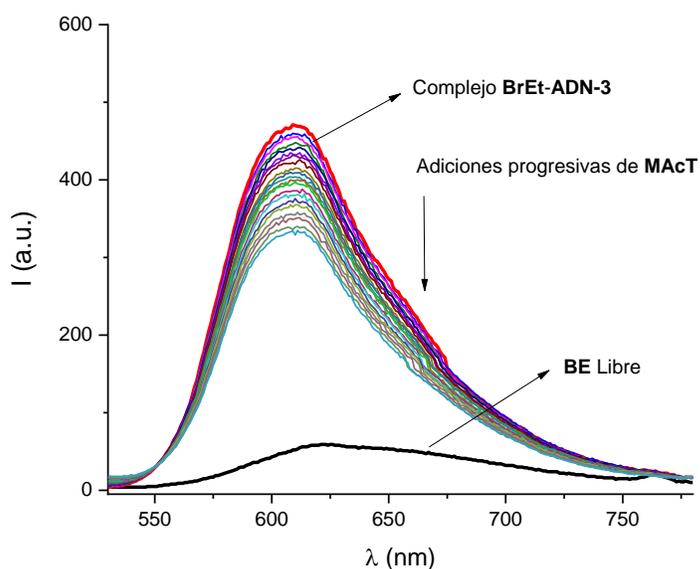


Figura A3.3. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-3 en presencia de **MAcT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-3] = 10 μ M, [MAcT] = 0-25 μ M.

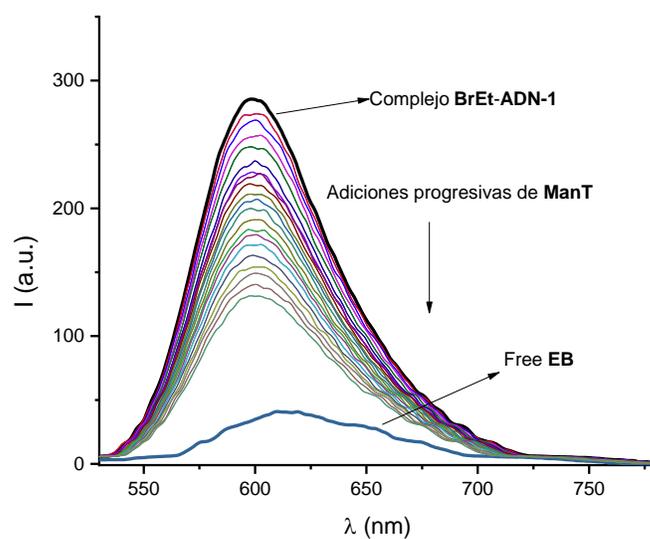


Figura A3.4. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **ManT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [ManT] = 0-25 μ M.

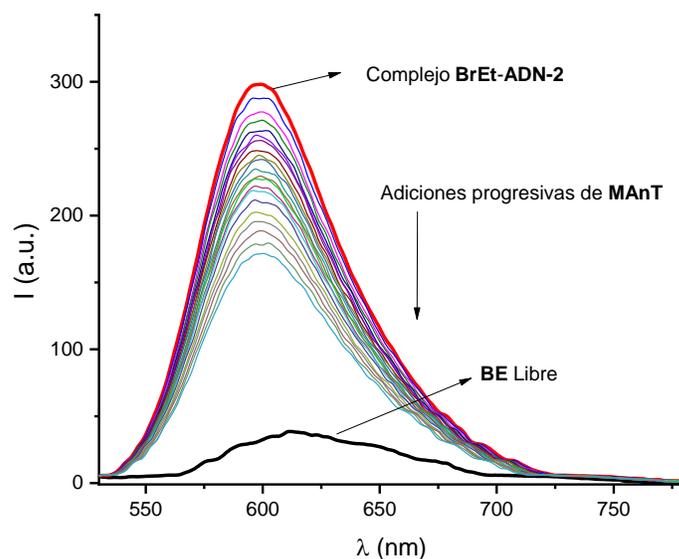


Figura A3.5. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-2 en presencia de **MAnT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-2] = 10 μ M, [MAnT] = 0-25 μ M.

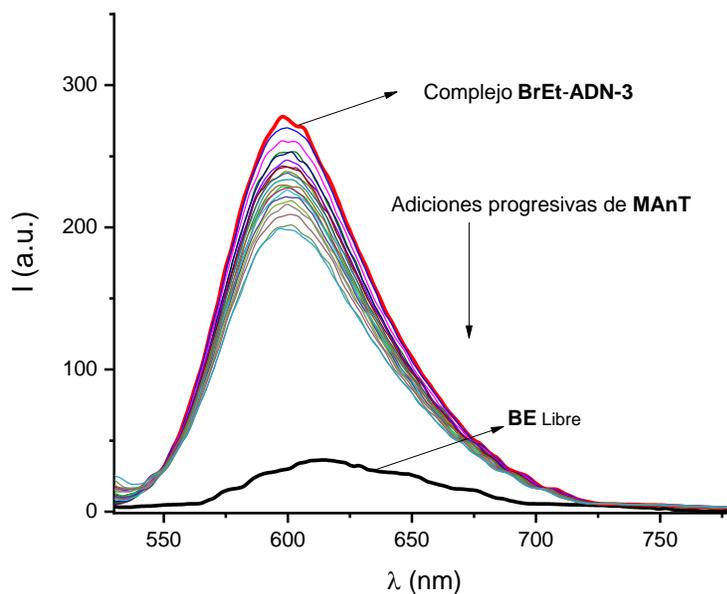
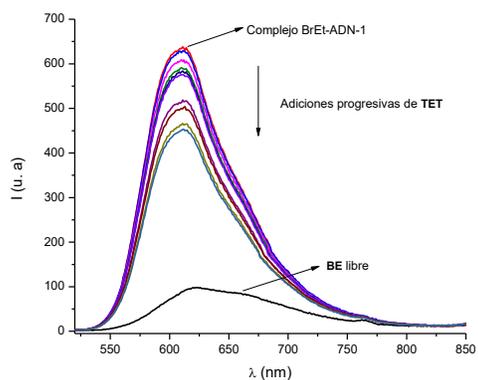


Figura A3.6. Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-3 en presencia de **MAnT**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-3] = 10 μ M, [MAnT] = 0-25 μ M.

a)



b)

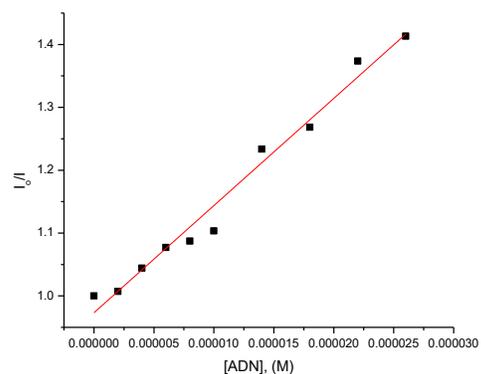
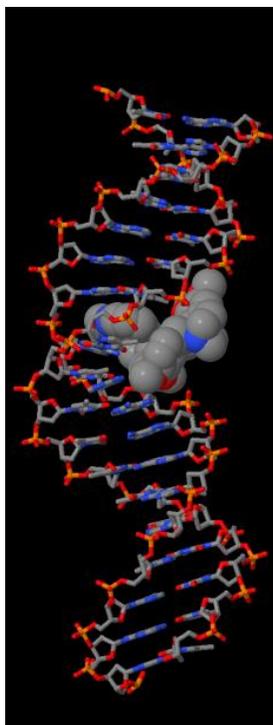


Figura A3.7. a) Espectros de emisión del sistema BrEt-ADN-1 en presencia de **TET**, $\lambda_{exc} = 510$ nm, en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.2, NaCl 0.01 M y DMSO al 10% (v/v). [BrEt] = 5 μ M, [ADN-1] = 10 μ M, [TET] = 0-25 μ M. b) Grafica de concentración de ADN vs I_0/I ajustada mediante la ecuación de Stern-Volmer.

APÉNDICE 4. Modelado molecular.

a)



b)

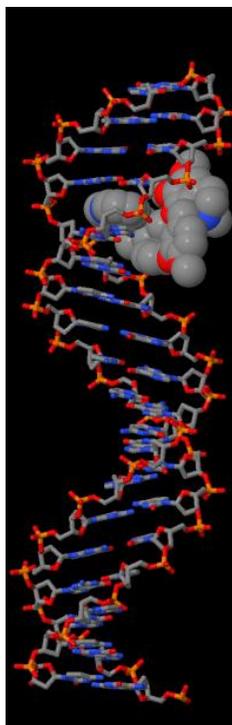


Figura A4.1. Estructura molecular para complejo MAcT: a) ADN-1 y b) ADN-4.

Figura A4.2. Energía total para diez poses diferentes (estructuras de energía mínima) del complejo entre ADN-1 y MAcT.

Energía total (kcal/mol)	ΔE (kcal/mol)*
-1064.169	0
-1055.131	+9.0380
-1054.616	+9.5530
-1051.222	+12.947
-1049.919	+14.250
-1037.633	+26.536
-1035.076	+29.093
-1032.291	+31.878
-1028.378	+35.791
-1026.432	+37.737

ADN-1: 5'-GTA AGA TGA TTC-3' y 5'-GAA TCA TCT TAC-3

* ΔE = Diferencia en energía

APÉNDICE 5. Fotografías de microscopio invertido con filtros de fluorescencia

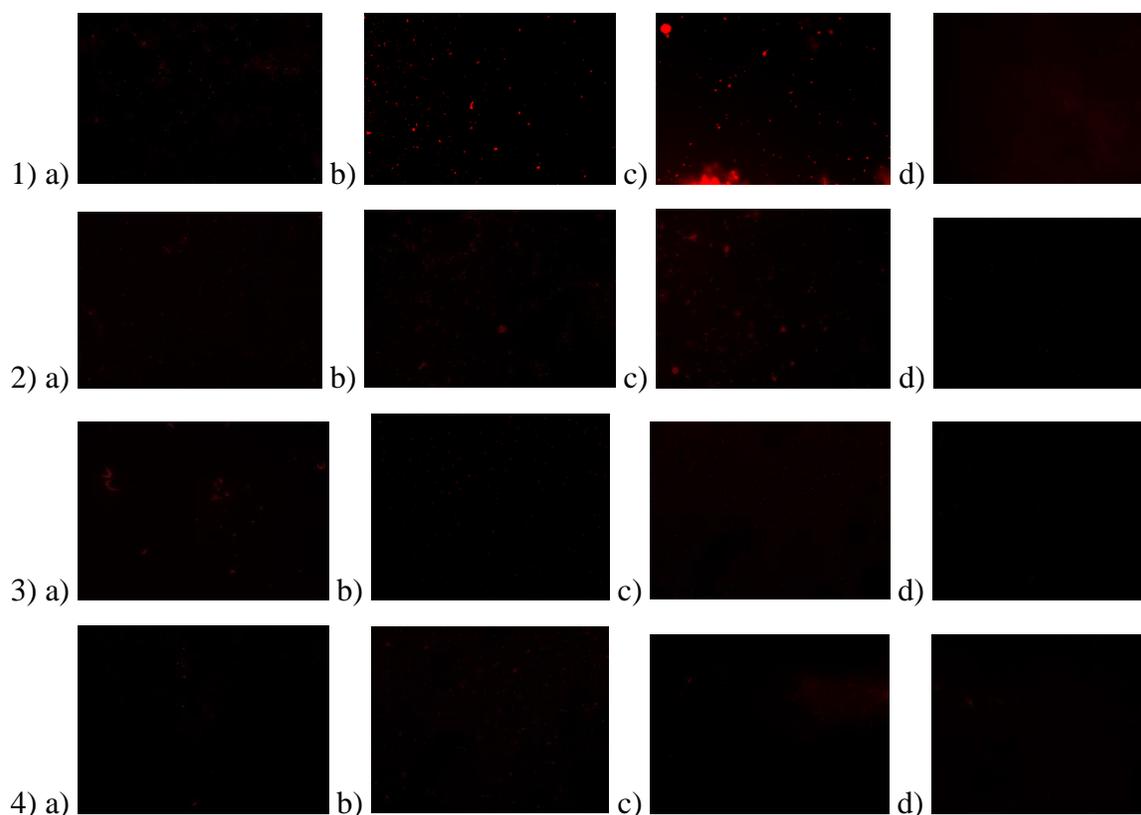


Figura A.5.1. Fotografías tomadas con microscopio invertido 40x de las cepas bacterianas 1) *S. aureus*, 2) *E. coli*, 3) *K. pneumoniae*, 4) *P. aeruginosa* incubadas 24 horas en medio BHI con a) tetrandrina, b) MAcT, c) MAnT, d) Control, todas teñidas con yoduro de propidio.

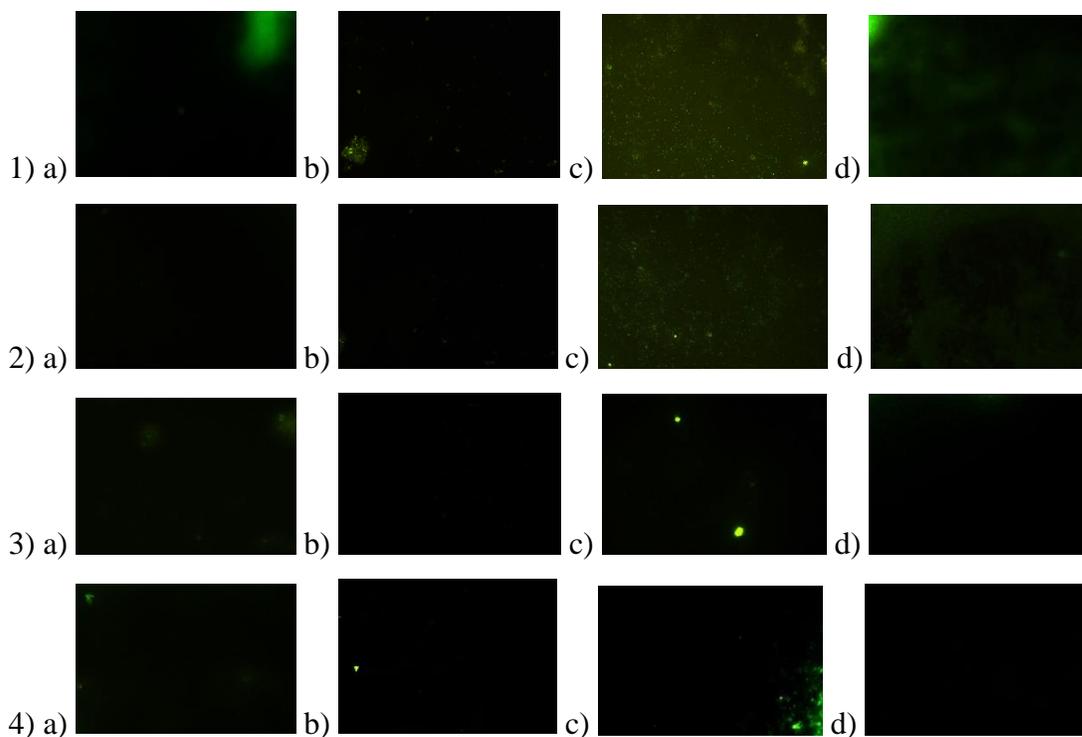


Figura A.5.2. Fotografías tomadas con microscopio invertido de las cepas bacterianas 1) *S. aureus* 2) *E. coli*, 3) *K. pneumoniae*, 4) *P. aeruginosa* incubadas 24 horas en medio BHI con a) tetrandrina, b) MAcT, c) MAnT, d) Control, todas teñidas con dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH₂-DA).

APÉNDICE 6. Productos obtenidos.

Calvillo-Páez V., Sotelo-Mundo R., Leyva-Peralta M., Gálvez-Ruiz J.-C., Corona-Martínez D. O., Moreno-Corral R., Escobar-Picos R., Höpfl H., Juárez-Sánchez O., Ochoa Lara K. Synthesis, spectroscopic, physicochemical and structural characterization of tetrandrine-based macrocycles functionalized with acridine and anthracene groups: DNA binding and anti-proliferative activity, *Chem. Biol. Int.* 286 (2018) 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.013>