



---

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo  
Regional Integral Unidad Oaxaca

Maestría en Ciencias en Conservación y  
Aprovechamiento de Recursos Naturales

## **“Diseño *in silico* y obtención de derivados del 17- $\alpha$ - etinilestradiol como potenciales antimicrobianos”**

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestra en Ciencias**

Presenta:  
Elia Donají Juárez Niño

Directora de tesis:  
Dra. Delia Soto Castro

# Agradecimientos

Al programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales del CIIDIR, Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con No. De becario: 1008405.

Al programa de Apoyo complementario a mujeres indígenas becarias CONACyT 2021-1.

Al Instituto Politécnico Nacional quien a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado me otorgó la beca BEIFI en los periodos Febrero-Junio 2020, Agosto-Diciembre 2020; y Agosto-Diciembre 2021 con los proyectos 20201696 y 20210814.

Al instituto Politécnico Nacional por el financiamiento a través de los proyectos de investigación SIP 20201696 y 20210814.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto de infraestructura 300802, con el cual se adquirió un RMN 80 MHz que me permitió caracterizar los compuestos obtenidos.

A la Dra. Adriana Moreno Rodríguez de la Facultad de Ciencias Químicas de la UABJO por la evaluación antimicrobiana de los derivados obtenidos.

A la Dra. Rosa Luisa Santillan del CINVESTAV Zacatenco por la donación del 17- $\alpha$ -etinilestradiol y por el apoyo en la caracterización por RMN (500 MHz) de los compuestos obtenidos.

Al Dr. Prisciliano Felipe De Jesus Cano Barrita por las facilidades para la caracterización por FTIR.

A mi comité tutorial por los aportes, comentarios y sugerencias para la realización y mejora de este trabajo.

A la Dra. Delia Soto Castro por el asesoramiento y dirección de esta tesis, pero en especial por compartir conmigo sus conocimientos y sabiduría, así como por su paciencia, apoyo y comprensión durante la realización de este proyecto.

*Agradezco y dedico esta tesis a mi madre y hermanos por su apoyo incondicional y por motivarme a seguir adelante.*

## Productos derivados de este trabajo

- XIII Jornadas Politécnicas 2020 realizadas en IPN CIIDIR – Oaxaca con el trabajo denominado “Evaluación teórica de derivados de etinilestradiol como antimicrobianos” por Elia Donajé Juárez Niño y Delia Soto Castro
- #LatinXChem Twitter conference 2020 con el poster denominado “Síntesis y evaluación antiproliferativa sobre MCF-7 del ácido 4-(17-alfa-etinilestradiol) benzoico por Delia Soto Castro, Elia Donajé Juárez Niño, Rosa Santillan, Laydi Carrillo Cocom y Ma. Eugenia Ochoa
- Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021: “Al ritmo de nuevos tiempos” con el trabajo profesional en modalidad cartel titulado “Obtención de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol como inhibidores de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*” por Elia Donajé Juárez Niño, Delia Soto Castro, Rosa Santillan y Adriana Rodríguez Moreno

## Tabla de contenido

Resumen .....	4
Abstract .....	5
Introducción .....	6
Planteamiento del problema .....	8
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivos .....	10
Antecedentes .....	11
<b>1.1 Bioactividad de alquinos</b> .....	11
<b>1.2 Uso de 17-<math>\alpha</math>-etinilestradiol como precursor y/o como agente antimicrobiano</b> .....	11
Capítulo 1 Marco teórico.....	13
<b>1.1 Fármacos antimicrobianos</b> .....	13
<b>1.1.1 Antibacteriales</b> .....	15
<b>1.1.2 Antimicóticos</b> .....	16
<b>1.1.3 Antivirales</b> .....	16
<b>1.1.4 Antiparasitarios</b> .....	17
<b>1.2 Tamoxifeno como agente antimicrobiano</b> .....	17
<b>1.3 Esteroides</b> .....	19
<b>1.3.1 Generalidades del 17-<math>\alpha</math>-etinilestradiol</b> .....	20
<b>1.3.2 Esteroides como fuente de carbono para la replicación de microorganismos</b> .....	21
<b>1.4 Reacción de acoplamiento cruzado</b> .....	23
<b>1.4.1 Reacción de Sonogashira</b> .....	24
<b>1.5 Consideraciones en el diseño de fármacos</b> .....	26
<b>1.5.1 Reglas de Lipinski</b> .....	26
<b>1.5.2 Reglas de Ghose</b> .....	27
<b>1.5.3 Reglas de Veber</b> .....	28
<b>1.5.4 Reglas de Egan</b> .....	29
<b>1.5.5 Reglas de Muegge</b> .....	29
<b>1.6 Simuladores</b> .....	30
<b>1.6.1 SwissADME</b> .....	31
<b>1.6.2 admetSAR</b> .....	32
<b>1.6.3 PASSonline</b> .....	33

Capítulo 2 Materiales y métodos.....	35
2.1 Metodología general.....	35
2.2 Instrumentación y equipo.....	36
2.2.1 Espectroscopia de infrarrojo.....	36
2.2.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.....	36
2.2.3 Punto de fusión.....	36
2.3 Reactivos y disolventes.....	36
2.4 Evaluación <i>in silico</i> de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	37
2.4.1 Simulador PASSonline.....	37
2.4.2 Simulador SwissADME.....	38
2.4.3 Simulador admetSAR.....	38
2.5 Síntesis de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	39
2.5.1 Purificación de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	39
2.5.2 Síntesis del ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico (1).....	39
2.5.3 Síntesis del 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) nitrobenzeno (3).....	41
2.5.4 Síntesis de la 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) anilina (4).....	42
2.6 Evaluación del potencial antimicrobiano de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	44
2.6.1 Parásitos.....	44
2.6.2 Evaluación <i>in vitro</i> de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol frente a epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	44
2.6.3 Ensayo de citotoxicidad.....	45
2.6.4 Bacterias.....	45
2.6.5 Evaluación antibacterial <i>in vitro</i> de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	45
2.6.6 Hongos.....	46
2.6.7 Evaluación antifúngica <i>in vitro</i> de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	46
Capítulo 3 Resultados y discusión.....	47
3.1 Evaluación <i>in silico</i> de la actividad y propiedades de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	47
3.1.1 Actividad antimicrobiana de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador Passonline.....	47
3.1.2 Propiedades fisicoquímicas de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador SwissADME.....	48
3.1.3 Propiedades de farmacocinética de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador Swiss ADME.....	51
3.1.4 Ecotoxicidad de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	54
3.2 Síntesis y caracterización de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	56

<b>3.3. Evaluación de la actividad biológica de los derivados del 17-<math>\alpha</math>-etinilestradiol</b> .....	<b><u>5</u></b>
Conclusiones .....	<u>10</u>
Referencias .....	<u>11</u>
Anexos.....	<u>17</u>
Anexo 1. Tabla de actividad antimicrobiana de los derivados del EE2 expresada como probabilidad obtenida del simulador PASSonline.....	<u>17</u>
Anexo 2. Matriz de priorización de síntesis con base en la probabilidad de actividad antimicrobiana <i>in silico</i> .....	<u>18</u>
Anexo 3. Matriz de priorización de síntesis con base en la predicción <i>in silico</i> de las propiedades fisicoquímicas y de farmacocinética .....	<u>19</u>
Anexo 4. Matriz de priorización de síntesis con base en la probabilidad de ecotoxicidad <i>in silico</i> .....	<u>21</u>
Anexo 5. Priorización de síntesis de los derivados del EE2 final .....	<u>22</u>
Anexo 6. Espectro $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>1</b> .....	<u>23</u>
Anexo 7. Espectro ATP- $^{13}\text{C}$ -RMN (20 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>1</b> .....	<u>24</u>
Anexo 8. Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>1</b> .....	<u>25</u>
Anexo 9. Espectro $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>3</b> .....	<u>26</u>
Anexo 10. Espectro ATP- $^{13}\text{C}$ -RMN (20 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>3</b> .....	<u>27</u>
Anexo 11. Espectro $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>4</b> .....	<u>28</u>
Anexo 12. Espectro $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>4</b> .....	<u>29</u>
Anexo 13. Espectro ATP- $^{13}\text{C}$ -RMN (20 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>4</b> .....	<u>30</u>
Anexo 14. Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado <b>4</b> .....	<u>31</u>

## Abreviaturas utilizadas

$(\text{PPH}_3)_2\text{PdCl}_2$	Bis (trifenilfosfina)paladio (II)
ABS	Puntaje de biodisponibilidad
AcOEt	Acetato de etilo
ADMET	Propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
$\text{Ag}_2\text{O}$	Óxido de plata
ATCC	Del acrónimo en inglés American Type Culture Collection
ATR	Reflectancia total atenuada
BBB	Permeabilidad pasiva a través de la membrana hematoencefálica
$\text{CaCl}_2$	Cloruro de calcio
CASRN	Número de registro en el servicio de consulta a químicos
$\text{CC}_{50}$	Concentración máxima de citotoxicidad
CCF	Cromatografía en capa fina
$\text{CD}_3\text{OD}$	Metanol deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE2	$17\alpha$ -etinilestradiol
ESI-TOF	Del acrónimo en inglés ElectroSpray Ionization- Time Of Flight
FTIR	Del acrónimo en inglés Fourier Transform Infrared
HIA	Absorción gastrointestinal pasiva
Hex	Hexano
CuI	Yoduro de cobre
$\text{CI}_{50}$	Concentración inhibitoria media máxima
IS	Índice de selectividad
log KP	Coeficiente de permeabilidad en piel
LogP	Coeficiente de partición octanol-agua
MeCN	Acetonitrilo
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Sulfato de sodio
PAINS	Compuestos de interferencia del ensayo PAN
Pf	Punto de fusión
PGP+	Glicoproteína P
pIGC50	Logaritmo negativo de concentración requerida para inhibir el 50% del crecimiento, $\mu\text{g}/\text{L}$
PM	Peso molecular (g/mol)
PSA	Área de superficie polar
RM	Refractividad molar
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SMILES	Especificación de Introducción Lineal Molecular Simplificada
SNC	Sistema Nervioso Central
TAM	Tamoxifeno
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TPSA	Área de superficie polar topológica ( $\text{Å}^2$ )



## Resumen

El alarmante aumento de microorganismos farmacorresistentes ha encaminado la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos alternativos a los ya existentes, con la finalidad de reducir las tasas de mortalidad, costo y dificultad de tratamientos provocados por infecciones complejas; así como para reducir la generación de contaminantes de manejo especial que dañan el medio ambiente como son los fármacos caducos. Por esta razón en el presente trabajo se establece la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos a partir del diseño racional de derivados acetilénicos del 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), mediante evaluaciones *in silico* con simuladores de acceso libre, seguidas de la síntesis por medio de una reacción de Sonogashira y determinaciones *in vitro* de la actividad antimicrobiana.

Se propusieron 6 derivados de EE2 [ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)benzoico (1), 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)fenol (2), (4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)nitrobenceno (3), 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)anilina (4), 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)benzaldehído (5) y 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol)benceno (6)], los cuales, con base en el análisis *in silico*, tienen mayor probabilidad de actividad antimicrobiana relativa (*Par*) al tamoxifeno (TAM) de actuar como antimicrobianos de amplio espectro, a excepción del derivado 5, que sólo tiene probabilidad de actuar como antifúngico. Además, todos los derivados cumplen con las características para convertirse en fármacos de administración oral y absorción por difusión pasiva con buena biodisponibilidad. Con base en las propiedades ADME y probabilidad de ecotoxicidad solo se obtuvieron los derivados **1, 3 y 4** vía reacción de Sonogashira en condiciones clásicas con rendimientos superiores al 60 %. La obtención de los derivados se corroboró mediante técnicas espectroscópicas de RMN (1D y 2D) y FTIR; y se determinó el punto de fusión. Finalmente, las determinaciones de la actividad antimicrobiana *in vitro* mostraron que ninguno de los derivados posee actividad antibacterial (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*), ni antifúngica (*Candida albicans*), pero resalta la alta actividad antiprotozoaria del derivado **1** contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Ninoa). Además, este compuesto mejora la actividad antiproliferativa contra *T. cruzi* (cepa Ninoa) en comparación con los fármacos comerciales usados como referencia (Nifurtimox y Benznidazol). Aunque es necesario realizar estudios *in vivo*, este compuesto representa una alternativa promisoriosa en el desarrollo de nuevos antiparasitarios para una enfermedad olvidada como lo es el Chagas.

## Abstract

The alarming increase of drug-resistant microorganisms have allowed the search and the development of novel antimicrobial drugs as an alternative to existing ones to reduce mortality rates, cost, and difficulty of treatments caused by complex infections; as well as to reduce the generation of special handling waste that damage the environment, such as expired drugs. For this reason, the search for new antimicrobial drugs is established in the present work based on the rational design of acetylenic derivatives of 17- $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) through *in silico* evaluations with open access simulators, followed by its synthesis via Sonogashira reaction and *in vitro* determinations of the antimicrobial activity.

Six derivatives of EE2 were proposed [4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol)benzoic acid (1), [4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol) phenol (2), (4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol) nitrobenzene (3), 4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol) aniline (4), 4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol)benzaldehyde (5), and 4- (17- $\alpha$ -ethynylestradiol)benzene (6)], which, based on *in silico* analysis, have higher relative antimicrobial activity (*Par*) to tamoxifen (TAM) of acting as broad-spectrum antimicrobials, with the exception of derivative 5, which only show probability of acting as antifungal. In addition, all derivatives meet the characteristics to become drugs for oral administration and absorption by passive diffusion with good bioavailability. Based on ADME properties and ecotoxicity probability only derivatives **1**, **3**, and **4** were obtained via Sonogashira reaction under classical conditions with yields above 60%. The obtaining of the derivatives were corroborated by NMR (1D and 2D) and FTIR spectroscopic techniques, and the melting point was determined to each compound. Finally, *in vitro* antimicrobial activity determinations showed that none of the derivatives possesses antibacterial (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*), or antifungal activity (*Candida albicans*), but the high antiprotozoal activity of derivative **1** against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Ninoa strain) stands out. In addition, this compound improves the antiproliferative activity against *T. cruzi* (Ninoa strain) compared to the commercial drugs used as reference (Nifurtimox and Benznidazole). Though *in vivo* studies are needed, this compound represents a promising alternative in the development of novel antiparasitics for a neglected disease such as Chagas disease.

# Introducción

Existen distintos tipos de fármacos antimicrobianos que inducen la muerte o detienen el crecimiento de virus, hongos, bacterias y/o parásitos; y en función del organismo al que ataquen se les denomina antivirales, antimicóticos (antifúngicos), antibacteriales o antiparasitarios, respectivamente (Morón-Rodríguez et al., 2002; Seija & Vignoli, 2006). Sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), algunos microorganismos han comenzado a presentar resistencia debido al uso excesivo e irracional de estos fármacos dando lugar a las “superbacterias”, lo que representa uno de los mayores riesgos a la salud mundial, seguridad y producción alimentaria (OMS, 2020).

La farmacorresistencia (resistencia a los antimicrobianos) se produce por diferentes factores, entre los que destacan la prescripción excesiva de fármacos, mal seguimiento del tratamiento, control inadecuado de infecciones en centros de salud, falta de higiene y saneamiento, y uso excesivo de medicamentos en la cría de animales y/o conservación de vegetales, originando que los microorganismos evolucionen de tal forma que los medicamentos se vuelven ineficaces contra el tratamiento de infecciones, volviéndolas ultrarresistentes. Lo anterior incrementa los costos del tratamiento, el número de contagios, y dificulta el tratamiento del paciente, pudiéndolo llevar hasta la muerte. El problema de resistencia microbiana es de carácter mundial, por lo que en la sexagésima octava Asamblea Mundial de la Salud, celebrada en mayo de 2015, se adoptó el Plan de Acción Mundial para mejorar su vigilancia e investigación (OMS, 2020).

Por lo anterior, son necesarias nuevas investigaciones para el desarrollo de nuevos tratamientos, en los cuales se recurra a complementar los fármacos ya existentes o bien, al desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos, se han abierto diversas líneas, entre las cuales destacan: *i*) el estudio de plantas como recurso de compuestos bioactivos (Álvarez-Martínez et al., 2020; Condò et al., 2020; Farhadi et al., 2018); *ii*) el estudio de nanopartículas de plata por su amplio espectro de actividad antimicrobiana (Mussin et al., 2019); *iii*) síntesis de nuevos derivados bioactivos a partir de estructuras conocidas, azoles, cumarinas pirrolidonas, chalconas, entre otros (Mani Chandrika & Sharma, 2020); e incluso derivados esteroidales con actividad antiproliferativa sobre *T. cruzi* (Juárez Chavez, 2019).

Con la finalidad de racionalizar la síntesis de nuevos derivados bioactivos se recurre al diseño de fármacos asistido por computadora haciendo uso de simuladores como SwissADME, admetSAR y

PASSonline; los cuales son de acceso libre y funcionan mediante la comparación de diversos fármacos y moléculas bioactivas precargadas en su base de datos (Navarrete-Vázquez, 2016), en estos simuladores se consideran diversos criterios, como son las reglas de Lipinski, propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET), actividad biológica, y posibles sitios metabólicos.

Teniendo en consideración la necesidad mundial de nuevos agentes antimicrobianos, y bajo la premisa de que estos sean de administración oral, que se absorban a nivel gastrointestinal, que lleguen a la circulación general, que actúen a nivel sistémico, y ejerzan su acción antes de ser degradados por el hígado y eliminados en el organismo (Brunton et al., 2007), el objetivo del presente trabajo fue proponer nuevos e innovadores derivados acetilénicos del 17- $\alpha$ -etinilestradiol y determinar *in silico* sus propiedades ADMET, así como su potencial como agentes antimicrobianos. Posteriormente se obtuvieron los derivados más activos y con menores efectos adversos, y se realizaron las evaluaciones antimicrobianas pertinentes *in vitro*.

## Planteamiento del problema

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia antimicrobiana representa uno de los mayores riesgos a la salud mundial. El alarmante aumento de microorganismos patógenos resistentes a los fármacos antimicrobianos se debe a diversos factores, entre los que destacan el uso indiscriminado de fármacos, así como, las altas tasas de crecimiento de los agentes patógenos y la capacidad de adaptación e intercambio de material genético de los microorganismos, principalmente entre bacterias (OMS, 2020). Razón por la cual a través de la historia se han desarrollado diferentes agentes antimicrobianos, desde el descubrimiento de la penicilina en 1929, hasta el descubrimiento de los lipopéptidos en 2003 (Belloso, 2009). No obstante, la resistencia microbiana continúa siendo una problemática que hace necesario desarrollar nuevos fármacos como alternativa a los ya existentes o tratamientos basados en la combinación de fármacos nuevos y/o existentes.

Como alternativa de solución a este problema histórico, y considerando i) que de manera natural y sintética se producen derivados acetilénicos que han demostrado actividad antifúngica, principalmente; y ii) que el estudio de Juárez Chávez y colaboradores (2019), demostró que un derivado acetilénico del EE2 (ácido p-(17 $\alpha$ -etinilestadiol)benzoico) posee actividad tripanocida contra epimastigotes de *T. cruzi*, en el presente trabajo se busca proponer una nueva gama de antimicrobianos basados en el 17- $\alpha$ -etinilestradiol de manera racional. Para disminuir el impacto al medio ambiente por la síntesis indiscriminada de nuevos compuestos, la viabilidad y potencialidad antimicrobiana de los nuevos derivados serán determinadas *in silico* mediante el uso de simuladores de acceso libre. Posteriormente, se sintetizarán solo aquellos derivados que resulten farmacéuticamente viables y se evaluará *in vitro* la actividad biológica pertinente.

## Justificación

Los fármacos antimicrobianos son utilizados para detener o mitigar enfermedades causadas por microorganismos. Sin embargo, estos pueden mutar en respuesta al uso indiscriminado de fármacos, volviéndose farmacorresistentes. La farmacorresistencia conlleva a infecciones (bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias) difíciles de tratar, incremento en gastos médicos y hospitalarios, aumento en las tasas de mortalidad humana (OMS, 2020), así como a la generación de medicamentos caducos que terminan siendo una fuente de contaminación ambiental (SINGREM, 2017).

En México hasta el año 2014 las tasas de morbilidad fueron encabezadas por enfermedades infecciosas, donde los tres primeros lugares fueron ocupados por infecciones respiratorias agudas, intestinales y de vías urinarias (Soto-Estrada et al., 2016). Aunado a la pandemia por COVID-19, en el 2020 se reportan casi cuatro millones de nuevos casos de infecciones respiratorias agudas, y casi 25 mil casos de neumonías y bronconeumonías, con altos índices de mortalidad, y aunque con números más bajos las enfermedades parasitarias y fúngicas, siguen presentes (*Boletín Epidemiológico - Semana 08, 2021*)

Considerando las recomendaciones de la OMS de investigar y desarrollar nuevos antimicrobianos (OMS, 2020) en el presente trabajo se busca sentar las bases para el desarrollo de derivados acetilénicos del 17- $\alpha$ -etinilestradiol, a través de una reacción de Sonogashira, como potenciales antimicrobianos alternativos a los ya existentes.

Desde un punto de vista científico se generará nuevo conocimiento en cuanto a la obtención, purificación, caracterización y actividad de derivados acetilénicos del 17- $\alpha$ -etinilestradiol como potenciales antimicrobianos, y se evaluará la viabilidad farmacéutica, posibles efectos secundarios y propiedades ADMET de los derivados *in silico*. Además, nuevos antimicrobianos pueden redundar en la disminución de residuos debido a la ausencia de mecanismos de resistencia en los microorganismos, impactando en la conservación del medio ambiente, así como en la disminución de costos asociados al tratamiento de pacientes.

## Hipótesis

La modificación en la posición acetilénica del 17- $\alpha$ -etinilestradiol mediante una reacción de Sonogashira generará derivados con actividad antimicrobiana *in silico* e *in vitro*, debido a que los microbios usan hormonas como fuente de carbono y los nuevos derivados actuarán como antimetabolitos.

Al menos un derivado será buen candidato para convertirse en fármaco de administración oral y absorción por difusión pasiva.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar *in silico*, obtener y caracterizar derivados acetilénicos del 17- $\alpha$ -etinilestradiol como potenciales agentes antimicrobianos

### Objetivos específicos

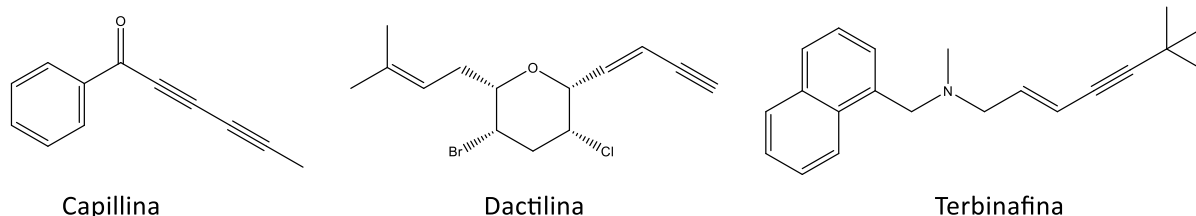
- 1) Determinar *in silico* la actividad antimicrobiana y las propiedades ADMET de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol modificados en el alquino de la posición 17 con ácido p-iodobenzoico, p-iodofenol, p-iodonitrobenzoceno, p-iodoanilina, p-iodobenzaldehído y p-iodobenceno
- 2) Seleccionar los derivados con mayor potencial teórico de convertirse en antimicrobianos y obtenerlos mediante una reacción de Sonogashira
- 3) Asignar inequívocamente las señales de protón y carbono en los espectros correspondientes mediante RMN de 2D
- 4) Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana pertinente de los derivados de 17- $\alpha$ -etinilestradiol con mayor probabilidad de actividad

# Antecedentes

## 1.1 Bioactividad de alquinos

Los alquinos como elemento estructural suele estar presentes en diferentes productos de origen natural con actividad biológica, por ejemplo: la Capillina A (Figura 1) es un compuesto de origen natural proveniente de especies del género *Artemisia* (Joshi et al., 2010), al cual se le atribuye actividad antifúngica y la capacidad de inducir apoptosis en células de leucemia HL-60 (Masuda et al., 2015); o la Dactilina (Figura 1), un dibromocloroeter acetilénico aislado de la liebre marina *Aplysia dactylomela* (McDonald et al., 1975) al cual también se le atribuye actividad antifúngica y otras actividades biológicas (Kaul & Kulkarni, 1978).

En compuestos sintéticos los alquinos están presentes en moléculas como la terbinafina (Figura 1). La terbinafina es un fármaco de administración oral y tópico que ha mostrado actividad promisorio contra varios tipos de micosis y como agente anticancerígeno, y es conocida como el primer agente farmacéutico que contiene un enino en su estructura (Stiitz, 1987). La terbinafina también ha sido aislada de medios de cultivo de *Streptomyces* sp. KH-F12 (Abdel-Kader & Muharram, 2017).



**Figura 1** Estructura de compuestos bioactivos de origen natural con alquinos en su estructura

Derivado de la actividad biológica de los eninos y compuestos acetilénicos, trabajos como el de Azerang et al., (2012) han estudiado *in silico* (PASS) y corroborado *in vitro* la actividad antifúngica de diferentes estructuras mostrando que efectivamente la presencia de triples enlaces brindan la actividad sobre *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 5052) y *Aspergillus niger* (A402) (Azerang et al., 2012).

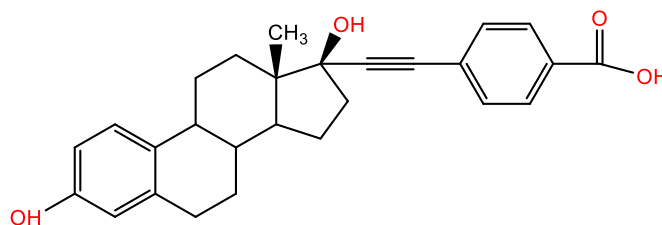
## 1.2 Uso de 17- $\alpha$ -etinilestradiol como precursor y/o como agente antimicrobiano

En la búsqueda de nuevos agentes contra *Trypanosoma cruzi*, Juárez-Chávez en 2019 mostraron que ciertas modificaciones sobre el 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) brindan actividad antiproliferativa en parásitos,



estadio epimastigote, de *Trypanosoma cruzi*, así mismo, estructuras dendriméricas tipo Frechet modificadas con EE2 mostraron actividad tripanocida *in vitro* superior a la del fármaco comercial benznidazol (Juárez Chavez, 2019). De manera paralela, con la finalidad de determinar el origen de la actividad, sintetizaron otros derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol variando los grupos funcionales en la posición 3 (esterificación con iodobenceno y bromobenceno), y modificando el alquino de la posición 17 con un derivado triazólico, dando lugar a dos derivados halogenados; un tercer compuesto, ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico (EE-IAC), se obtuvo a través de una reacción de Sonogashira entre el EE2 y el ácido 4-p-iodobenzoico.

Las evaluaciones preliminares de la actividad de dichos derivados sobre epimastigotes de *T. cruzi*, mostraron que los derivados con yodo y bromo no son efectivos al compararlos con el derivado no halogenado y con fármacos comerciales como el nifurtimox y el benznidazol, lo que sugiere que el hidroxilo en la posición 3 actúa como sitio de reconocimiento por moléculas diana. Mientras que el derivado EE2-IAC (Figura 2) a concentraciones de 1.27 a 20 mmol/mL, y en periodos de incubación desde 2 horas, produjo un 87 % de muerte a los epimastigotes, lo cual podría estar asociado, al menos en parte, a la presencia del alquino intermedio en la posición 17 del EE2. Frente a células sanas, en un estudio preliminar, dicho derivado produce la muerte de más del 90 % de linfocitos. Lo anterior, demuestra la poca selectividad del compuesto, y abre el panorama al estudio de la actividad biológica de éste y otros compuestos similares, es decir, con otros sustituyentes, frente a microorganismos patógenos farmacorresistentes, así como a la búsqueda de la selectividad del compuesto.



**Figura 2** Estructura del compuesto ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico

# Capítulo 1 Marco teórico

## 1.1 Fármacos antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen como aquellas moléculas de origen natural, sintético o semisintético, capaces de inducir la muerte o detener el crecimiento de bacterias, virus, hongos o parásitos (Seija & Vignoli, 2006; Vargas-Flores & Villazante-Condori, 2014). Éstos se utilizan en medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas. Aunque en ocasiones se emplean sustancias como los antisépticos en tejidos vivos, o desinfectantes en objetos inanimados para tratar y prevenir infecciones superficiales; dichas sustancias suelen ser muy tóxicas. En cambio, los antimicrobianos poseen toxicidad selectiva que permite su administración por vía sistémica (Morón-Rodríguez et al., 2002).

Los fármacos antimicrobianos se clasifican desde distintos puntos de vista, ya sea su origen, mecanismo de acción o con base en su grupo farmacológico (estructura química). En la Tabla 1-1, se muestran algunos ejemplos de antimicrobianos clasificados por su grupo farmacológico o familia.

**Tabla 1-1** Clasificación de los antimicrobianos por grupo farmacológico

<b>Familia (grupo farmacológico)</b>	<b>Antimicrobiano</b>
Alilamidas	Terbinafina, naftifina
Aminociclitodes	Espectiomicina <sup>5</sup>
Aminoglucósidos	Estreptomina <sup>5</sup> , neomicina, kanamicina, gentamicina <sup>5</sup> , tobramicina, amikacina, dibekacina, netilmicina
Azoles	
Imidazoles	Miconazol, clotrimazol, ketoconazol
Benzimidazoles	Mebendazol, tiabendazol, albendazol
Nitroimidazoles	Metronidazol <sup>5</sup> , tinidazol, ornidazol, secnidazol
Triazoles	Fluconazol, itraconazol,
Triazoles de segunda generación	Voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Betalactámicos	
Penicilinas	
Bencilpenicilinas	Penicilina G (cristalina <sup>5</sup> , procaínica <sup>5</sup> , benzatínica <sup>5</sup> ) fenoximetilpenicilina <sup>5</sup>
Aminopenicilinas	Ampicilina <sup>5</sup> , amoxicilina <sup>5</sup>
Isoxazolilpenicilinas <sup>1</sup>	Oxacilina, cloxacilina <sup>5</sup> , meticilina, nafcilina
Carboxipenicilinas <sup>2</sup>	Carbenicilina, ticarcilina, carfenicilina
Ureidopenicilinas <sup>2</sup>	Azlocilina, mezlocilina, piperacilina, alpalicilina
Cefalosporinas	
1ª generación	Cefalexina, cefazolina, cefalotina, cefadroxil
2ª generación	Cefamandol, cefonicid, cefoxitin <sup>5</sup> , cefuroxima
3ª generación	Cefotetan, cefotaxima, ceftazidima <sup>5</sup> , ceftriaxona <sup>5</sup>

**Tabla 1-1** Clasificación de los antimicrobianos por familia (Continuación)

<b>Familia (grupo farmacológico)</b>	<b>Antimicrobiano</b>
Carbapenémicos	Imipenem <sup>5</sup> , meropenem
Monobactámicos	Aztreonam, carumonam, tige, onan
Inhibidores de las betalactamasas	Ácido clavulánico <sup>5</sup> , sulbactam, tazobactam
Diaminopiridinas	Trimetroprima <sup>5</sup> , metioprime, pirimetamina
Estreptograminas	Pristinamicina, virginamicina, quinopristina /dalfopristina
Fenicoles	Cloranfenicol <sup>5</sup> , tianfenicol
Fosfomicinas	Fosfomicina, fosmidomicina
Fusidanos	Ácido fusídico
Glicopéptidos	Vancomicina <sup>5</sup> , teicoplanina, ramoplanina
Licosamidas	Lincomicina, clindamicina <sup>5</sup>
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Equinocandinas (caspofungina, anidulofungina, micafungina)
Macrólidos	Eritromicina <sup>5</sup> , oledomicina, josamicina, roxitromicina, azitromicina, claritromicina
Nitrofuranos	Nitrofurantoína <sup>5</sup> , nitrofurazona, furazolidona
Nucleótidos antivirales	Aciclovir <sup>5</sup> , vidarabina, citarabina, zidovudina <sup>5</sup>
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Polienos	Nistatina <sup>5</sup> , natamicina, anfotericina B <sup>5</sup>
Polipéptidos	Polimixina B, colistina, bacitracina
Quinolonas	
1ª generación	Ácido nalidíxico <sup>5</sup> , ácido oxolínico, cinoxacina, ácido pipemídico
2ª generación <sup>3</sup>	Ciprofloxacina <sup>5</sup> , norfloxacina, ofloxacina, enoxacina
3ª generación <sup>4</sup>	Temafloxacina, difloxacino, lomefloxacino
Rifamicinas	Refamicina, rifampicina, rifaxcimen
Sulfonas	Daspone <sup>5</sup>
Sulfonamidas	Sulfacetamida, mafenida, sulfasalacina, ftalil sulfatiazol, sulfadiacina <sup>5</sup> , sulfisoxazol, sulfimetoxazol <sup>5</sup> , sulfadoxine, sulfametoxazol
Tetraciclínas	Clortetraciclina, doxiciclina <sup>5</sup> , minociclina

Fuente: (Aparicio et al., 2003; Gregori-Valdés, 2005; Morón-Rodríguez et al., 2002)

<sup>1</sup>También llamadas resistentes a las penicilinas

<sup>2</sup>También llamadas antipsudomónicas

<sup>3</sup>También llamadas quinolonas monofluoradas o fluoroquinolonas

<sup>4</sup>También llamadas quinolonas bi y trifluoradas

<sup>5</sup>Incluidos en la oncen de medicamentos esenciales de la OMS

Los antimicrobianos suelen tener toxicidad selectiva, sin embargo, es común que se presenten efectos secundarios (Morón-Rodríguez et al., 2002), en la Tabla 1-2 se muestran algunos efectos adversos de las familias de antimicrobianos de uso común.

**Tabla 1-2** Efectos adversos más relevantes de algunos antimicrobianos de uso frecuente

<b>Familia de antimicrobianos</b>	<b>Efectos adversos</b>
Penicilinas	Urticaria, broncospasmo, anafilaxia, diarrea, colitis pseudomembranosa, convulsiones en dosis elevadas
Aminoglucósidos	Nefrotoxicidad, ototoxicidad, bloqueo neuromuscular
Quinolonas	Alteraciones en el sistema nervioso central, intolerancia gastrointestinal
Sulfonamidas	Alteraciones hematológicas y renales, eritema uniforme, síndrome de Stevens-Johnson
Fenicoles	Aplasia medular, síndrome gris del recién nacido
Rifamicinas	Hepatotoxicidad

Fuente: (Morón-Rodríguez et al., 2002)

### 1.1.1 Antibacteriales

Los fármacos antibacteriales ejercen acción específica sobre alguna estructura o función de la bacteria; tienen elevada potencia biológica a bajas concentraciones y presentan toxicidad selectiva, con baja toxicidad a las células de nuestro organismo (Seija & Vignoli, 2006). Generalmente, los fármacos antibacteriales se clasifican en bactericidas y bacteriostáticos. Los primeros son de acción letal y conducen a lisis bacteriana; mientras que los segundos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana sin llegar a destruir las células bacterianas (Malgor & Valsecia, 2000a; Seija & Vignoli, 2006). Los fármacos bactericidas incluyen a los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), aminoglucósidos, glicopéptidos, quinolonas, fosfomicinas (fosfomicina), nitrofuranos, rifamicinas y algunas mezclas como el cotrimoxazol (trimetoprima y sulfametoxazol). Dentro de los bacteriostáticos, se encuentran macrólidos, fenicoles (cloranfenicol), tetraciclinas, sulfonamidas, y lincosamidas (Malgor & Valsecia, 2000a; Morón-Rodríguez et al., 2002).

Los antibacteriales también se clasifican con base en el mecanismo de acción. Éstos se diferencian por: inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana; afectar la membrana celular citoplasmática; inhibir la síntesis proteica a nivel ribosomal; inhibir el metabolismo de los ácidos nucleicos; o producir antimetabolitos que bloquean la síntesis del ácido fólico (Brunton et al., 2007; Malgor & Valsecia, 2000a; Morón-Rodríguez et al., 2002).

Otra clasificación de fármacos antibacteriales diferencia entre antibióticos y quimioterápicos. Los primeros son sustancias químicas producidas por microorganismos vivos capaces de provocar la muerte o lisis de otros microorganismos, mientras que los segundos son producidos de forma sintética o semisintética en un laboratorio bioquímico farmacológico (Malgor & Valsecia, 2000a). Finalmente,

también se clasifican con base en su espectro de acción, el cual puede ser amplio o reducido. Los de amplio espectro se refieren al activo que afecta un amplio número de especies y géneros diferentes. Mientras que los de espectro reducido el activo afecta un grupo reducido de bacterias (Seija & Vignoli, 2006).

### **1.1.2 Antimicóticos**

Los tratamientos antifúngicos (antimicóticos) son más complejos que los antibacterianos debido a que los hongos presentan lento crecimiento y su pared celular es más difícil de penetrar, ya que cuenta con quitina, poliosidos, fosfolípidos y esteroides; elementos que generalmente están ausentes en las bacterias. Además, los fármacos antifúngicos suelen ser poco solubles y presentan mayor grado de toxicidad (Malgor & Valsecia, 2000a). La mayoría de los antimicóticos interfieren con la biosíntesis o integridad del ergosterol; sin embargo, existen otros que causan disrupción en la pared celular del hongo (Rivas-Gonzales & Cardona-Castro, 2009).

Dependiendo del tipo de micosis a tratar, los fármacos antifúngicos se clasifican en: locales (tópicos) para micosis superficiales provocadas por dermatofitos; y sistémicos (profundos) para micosis sistémicas generadas por hongos patógenos u oportunistas (Malgor & Valsecia, 2000a). Los fármacos antimicóticos también se clasifican de acuerdo con su origen, el cual puede ser natural (proveniente de organismos vivos) o sintético (derivado de síntesis química). Otras clasificaciones de los fármacos antifúngicos se realizan con base en su espectro de acción (amplio o reducido); sitio de acción (membrana citoplasmática, pared celular o núcleo); y de acuerdo con su estructura química (polienos, azoles, alilamidas, lipopéptidos, pirimidinas, entre otros) (Allevato et al., 2007; Gregorí-Valdés, 2005).

### **1.1.3 Antivirales**

Los fármacos antivirales son utilizados específicamente para tratar infecciones virales (Vardanyan & Hruby, 2016). Los antiviricos eficaces poseen un espectro de actividad reducida puesto que sólo inhiben alguna de las fases de multiplicación del virus; razón por la cual, antivirales específicos son utilizados para virus específicos (Brunton et al., 2007; Vardanyan & Hruby, 2016). Sin embargo, la replicación vírica también depende de algunas moléculas de la célula hospedadora, por lo cual, es probable que moléculas con actividad antivírica presenten toxicidad para la célula huésped (Brunton et al., 2007; Wang-Shick, 2017).

Los antivirales, con base en la etapa o fase de replicación vírica objetivo, pueden clasificarse como inhibidores de adherencia, de entrada, de revestimiento, de la proteasa, de la polimerasa, de nucleósidos y nucleótidos de la transcriptasa inversa, de la transcriptasa inversa no nucleósidos; y de la integrasa (Vardanyan & Hruby, 2016). Los nucleótidos antivirales como el aciclovir, vidarabina, citarabina, y zidovudina son ejemplo de fármacos antivíricos (Morón-Rodríguez et al., 2002).

#### **1.1.4 Antiparasitarios**

Los antiparasitarios se utilizan para tratar infecciones causadas por un grupo complejo de organismos que abarcan tanto a los protozoarios unicelulares como a los helmintos. De manera general, los antiparasitarios se clasifican como antiprotozoarios o antihelmínticos dependiendo el tipo de organismo al que ataquen. Los fármacos antiprotozoarios incluyen polienos (anfotericina B), nitroimidazoles (benznidazol), lincosamidas (clindamicina), nitrofuranos (nifurtimox), entre otros. Mientras que, los antihelmínticos incluyen benzimidazoles (albendazol, flubendazol, mebendazol), lactonas (ivermectina), antihelmínticos misceláneos (piperazina, dietilcarbamazina), cestocidas (niclosamida), quinoleínas (oxamniquina, praziquantel), tetrahidropirimidina (pamoato de pirantel) y compuestos organofosforados (metrifonato) (Stanley, 2010).

En términos generales, los agentes antiprotozoarios afectan el metabolismo biosintético, inhibiendo la síntesis de cofactores, de ácidos nucleicos, de proteínas, y la función microtubular; mientras que, los antihelmínticos afectan al metabolismo energético o la función neuromuscular (Aparicio et al., 2003).

#### **1.2 Tamoxifeno como agente antimicrobiano**

El tamoxifeno (TAM), es un modulador selectivo del receptor de estrógeno más utilizado para los medicamentos contra el cáncer de mama, debido a que se une competitivamente a los receptores de estrógeno inhibiendo una importante señal proliferativa (Montoya & Krysan, 2018; Zhang et al., 2015). Sin embargo, el TAM también ha sido utilizado para tratar afecciones independientes al receptor de estrógeno como el glioblastoma multiforme, los tumores desmoides y el trastorno bipolar. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de estas actividades, se cree que el TAM tiene la capacidad de inhibir la proteína quinasa C (Montoya & Krysan, 2018).

Por otro lado, el TAM también ha mostrado actividad frente a una amplia gama de microorganismos patógenos humanos, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y virus (Montoya & Krysan, 2018). Como **antibacterial**, el TAM es activo contra *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Mycobacterium tuberculosis*, mejorando para esta última especie la inhibición *in vitro* en comparación con la rifampicina, isoniacida, etambutol (C. Luxo et al., 2003; Miró-Canturri et al., 2020; Montoya & Krysan, 2018); como **antifúngico** para *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *Cryptococcus neoformans*, mostrando idéntica actividad antifúngica en comparación con el miconazol a concentraciones equimolares para esta última especie (Dolan et al., 2009; Montoya & Krysan, 2018; Zhang et al., 2015); como **antiparasitario** para *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*; y como **antiviral** para el virus del Ébola, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis C (VHC) y el Virus del Herpes Simplex-Tipo I (VHS-1) (Montoya & Krysan, 2018).

Cabe destacar que la acción antiproliferativa del TAM puede implicar mecanismos no restringidos al sistema clásico de unión al receptor de estrógenos (Cristina Luxo et al., 1998; Zhang et al., 2015); puesto que en bacterias como *B. stearothermophilus* puede perturbar el comportamiento de los lípidos en la membrana por una posible rotura con fuga de material citoplasmático (C. Luxo et al., 2003).

En el caso de los hongos, como *C. albicans* o *C. neoformans*, el TAM puede inhibir la unión de la calmodulina a la calcineurina (Butts et al., 2014; Montoya & Krysan, 2018; Zhang et al., 2015); además, tiene la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica *in vitro*, y, aunque se desconoce el mecanismo, la biosíntesis del ergosterol mediada por los genes Erg1 y Erg11 también está relacionada con la acción antifúngica del TAM (Zhang et al., 2015). Sin embargo, el TAM también puede afectar la fluidez de la membrana y provocar lisis en levaduras (Montoya & Krysan, 2018).

Como antiparasitario contra *Leishmania*, el TAM tiene la capacidad de alterar la membrana e inducir apoptosis; contra *T. gondii* reduce significativamente la replicación e invasión del parásito al interferir con el contacto inicial y la adhesión a la célula huésped; contra *T. solium* el TAM puede afectar la fisiología del huésped para protegerlo contra la invasión de parásitos e interrumpir el proceso de infección del parásito de manera dependiente al estradiol; del mismo modo, la actividad anti *Trypanosoma* parece estar relacionada con la actividad antiestrogénica del TAM; mientras que contra *Plasmodium*, la actividad del TAM está relacionada con otros mecanismos además de la inhibición de los canales de aniones regulados por volumen (VRAC), de la inhibición del desarrollo intracelular del parásito y de la vía biosintética de esfingolípidos (Montoya & Krysan, 2018).

Finalmente, como antiviral, el TAM ha sido identificado como disruptor de la replicación viral del VIH durante una infección crónica; también, ha inhibido la replicación en linfocitos no estimulados a través de vías independientes de su actividad antiestrogénica mediante la inhibición de la proteína quinasa C y su interacción con el complejo NF- $\kappa$ B. Por otra parte, el TAM es capaz de inhibir la replicación del VHC mediante la interferencia en la asociación del estrógeno alfa con la ARN polimerasa NS5B dependiente de ARN. Otros estudios indican que el TAM inhibe la adhesión, replicación y la salida del virus (Montoya & Krysan, 2018).

### 1.3 Esteroides

Los esteroides son compuestos orgánicos con núcleo de esterano con 17 átomos de carbono, formado por cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos y uno con cinco. En los esteroides la estructura básica se modifica por adición de grupos funcionales como carbonilos, hidroxilos o cadenas hidrocarbonadas en diversas posiciones. Estos compuestos agrupan sustancias vitales como el colesterol, ácidos biliares, vitamina D, corticosteroides, agliconas cardiacas, antibióticos, hormonas sexuales, entre otras. (García et al., 2015). Las hormonas esteroidales sexuales, también llamadas estrógenos, desempeñan varios roles fisiológicos importantes como la reproducción, diferenciación, desarrollo, proliferación celular, apoptosis, inflamación, metabolismo, homeostasis y función cerebral (García-Gómez et al., 2013). Los estrógenos se categorizan de acuerdo con su origen, ya sea natural (estradiol, estrona, estriol) o sintético (etinilestradiol, mestranol) (Brunton et al., 2007).

**Tabla 1-3** Esteroides estrogénicos

Esteroides Estrogénicos			
Derivados	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Estradiol	-H	-H	-H
Valerato de estradiol	-H	-H	
Etinilestradiol	-H	-C≡CH	-H
Mestranol	-CH <sub>3</sub>	-C≡CH	-H
Sulfato de estrona	-SO <sub>3</sub> H	-*	=O*
Equilina <sup>†</sup>	-H	-*	=O*

Fuente: (Brunton et al., 2007)

\*Designa la cetona C17

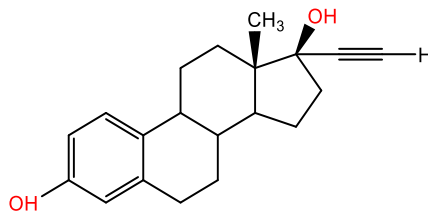
<sup>†</sup> También contiene una doble ligadura entre C7 y C8



Estructuralmente los estrógenos tienen un anillo fenólico (A), dos anillos de ciclohexano (B, C) y uno de ciclopentano (D), con un hidroxilo (-OH) en la posición 3 del anillo A, y un grupo  $\beta$ -OH o cetónico en la posición 17 del anillo D. Cabe mencionar que la unión selectiva y avidéz de los receptores estrogénicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) dependen del anillo A; por lo cual, casi todas las sustituciones en este anillo disminuyen la capacidad de unión selectiva. Sin embargo, las sustituciones son tolerables en el anillo C y D. En la Tabla 1-3 se muestran las fórmulas estructurales de algunos estrógenos (Brunton et al., 2007; Malgor & Valsecia, 2000b).

### 1.3.1 Generalidades del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

El 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) es un estrógeno sintético que constituye el ingrediente principal de la píldora anticonceptiva. También se utiliza en terapias de reemplazo estrogénico y en el tratamiento de cáncer de mama (Oropeza-Jiménez, 2008). La diferencia con el estradiol, de origen natural, es la sustitución etinílica del C17 (Figura 1-1), lo que aumenta la potencia estrogénica al ser administrado por vía oral, ya que la presencia del alquino inactiva el metabolismo en el hígado y en consecuencia la eliminación del organismo se ralentiza (13 a 17 horas). Cabe destacar que la vía primaria de biotransformación del EE2 es a través de la 2-hidroxilación y la formación posterior de 2 y 3 metilésteres (Brunton et al., 2007; Malgor & Valsecia, 2000b).



**Figura 1-1** Estructura del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

En contraparte a los efectos positivos en el control de la natalidad, el EE2 tiene la capacidad de alterar la homeostasis de los sistemas endócrinos de los organismos; provocando efectos adversos en la salud, crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos, su progeñe o las poblaciones que los constituyen (Oropeza-Jiménez, 2008). Situación que genera una problemática ambiental, ya que el EE2 tiene un efecto ecotoxicológico a concentraciones muy bajas (ng/L), y la eliminación de éste por vías urinarias y su posterior arribo a afluentes acuáticos propicia la contaminación de los cursos de agua a través de la descarga directa de efluentes contaminados o mediante la lixiviación de lodos provenientes de estaciones depuradoras de aguas residuales y que fueron usados como fertilizantes en cultivos agrícolas (Oropeza-Jiménez, 2008).

### 1.3.2 Esteroides como fuente de carbono para la replicación de microorganismos

Las hormonas sexuales tienen la capacidad de afectar el metabolismo, crecimiento, morfogénesis, susceptibilidad farmacéutica o virulencia de bacterias, hongos y parásitos, ya que participan en la comunicación entre microorganismos y huéspedes (mamíferos), donde además de afectar la inmunidad del huésped, alteran la expresión y el comportamiento de los genes que influyen en la susceptibilidad y la resistencia a las infecciones (García-Gómez et al., 2013; Prasad et al., 2012). La respuesta del sistema inmune frente a esteroides como la testosterona, el estradiol y la progesterona está relacionada con un dimorfismo sexual en las infecciones bacterianas, donde los mamíferos (humanos y animales) machos son más susceptibles que las hembras (García-Gómez et al., 2013).

Por lo anterior, en algunos casos el curso de infecciones bacterianas puede controlarse mediante la administración de esteroides como un complemento de la terapia con antibióticos. Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de degradación de esteroides para utilizarlos en su beneficio como fuente de carbono y energía a través de la actividad de distintas enzimas, como la hidroxisteroide deshidrogenasa, que regula el equilibrio entre los esteroides activos e inactivos. En la Tabla 1-4 se muestran algunas especies o familias bacterianas capaces de metabolizar (degradar para su beneficio) hormonas sexuales esteroidales (García-Gómez et al., 2013).

Por otro lado, se sabe que varios organismos fúngicos además de *Candida albicans* cuentan con proteínas de unión a esteroides como la proteína de unión a estradiol (EBP), proteína de unión a corticosteroides (CBP) y la proteína de unión a progesterona (PBP); que les permiten experimentar cambios en su morfología y tasa de crecimiento tras la suplementación con esteroides en el medio de crecimiento. Cabe destacar que estas proteínas de unión no son análogas a los receptores de estrógeno de los mamíferos, pero sus relaciones dosis-respuesta podrían ser similares; debido a que los organismos fúngicos, al igual que las bacterias, son capaces de utilizar las hormonas de mamíferos, en rangos fisiológicos, como fuente de carbono para promover su efectiva germinación, sin embargo, en rangos farmacológicos de hormonas la reproducción fúngica se ve disminuida (G. Cheng et al., 2006; Prasad et al., 2012; White & Larsen, 1997).

Algunos estudios mostraron que el isómero alfa no estrogénico del estradiol tiene poca actividad promotora de la germinación de *C. albicans* en comparación con el isómero beta (White & Larsen, 1997). Otras investigaciones mostraron que tanto el 17- $\beta$ -estradiol como el 17- $\alpha$ -etinilestradiol, a una concentración de  $10^{-5}$  M, promueven el aumento en la formación de tubos germinales de diferentes

cepas de *C. albicans*. Así mismo, se demostró que el aumento en la formación y longitud del tubo germinal era dependiente de la dosis; lo cual sugiere que en presencia de estrógenos exógenos las células cultivadas de *C. albicans* podrían responder como si estuvieran en presencia de antimicóticos y regularían la producción de bombas de flujo para eliminar al estrógeno de la célula (G. Cheng et al., 2006).

**Tabla 2** Especies bacterianas con capacidad de metabolizar hormonas esteroidales

Especies o familias de especies	Hormonas esteroidales		
	Estradiol	Progesterona	Testosterona
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>			✓
<i>Aminobacter</i>	✓		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	✓		
<i>Bacillus cereus</i>	✓	✓	✓
<i>Bacillus subtilis</i>	✓		
<i>Brevundimonas</i>	✓		
<i>Escherichia</i>	✓		
<i>Flavobacterium</i>	✓		
<i>Microbacterium</i>	✓		
<i>Microbacterium marinum</i>			✓
<i>Nocardioides</i>	✓		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			✓
<i>Prevotella intermedius</i>	✓	✓	
<i>Rhodococcus</i>	✓		
<i>Salmonella enterica</i>		✓	
<i>Salmonella typhimurium</i>		✓	
<i>Sphingomonas</i> <sup>1</sup>	✓		✓
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓		
<i>Steroidobacter dentrificans</i>	✓	✓	
<i>Streptococcus mutans</i>		✓	✓
<i>Treponema denticola</i> <sup>2</sup>		✓	✓

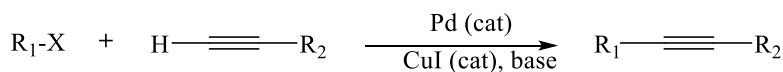
<sup>1</sup>También es capaz de degradar estrona

<sup>2</sup>También es capaz de degradar colesterol

El cambio morfológico de la levadura a la forma hifal se ha considerado como uno de los rasgos importantes de virulencia, la cual puede estar regulada hacia arriba o hacia abajo dependiendo del medio hormonal del huésped (Prasad et al., 2012; White & Larsen, 1997). Por lo cual, los estrógenos exógenos, como los anticonceptivos orales o estrógenos asociados con terapias de reemplazo hormonal, se asocian con una mayor colonización de *C. albicans* (G. Cheng et al., 2006).

## 1.4 Reacción de acoplamiento cruzado

La reacción de acoplamiento cruzado (cross-coupling) es la reacción entre un nucleófilo (compuesto organometálico) con un electrófilo orgánico (halogenuro) catalizada por un complejo de un metal de transición que proporciona un producto de acoplamiento (Figura 1-2) (Alonso-Marañón, 2012). En general, la reacción se lleva a cabo en tres pasos: adición oxidante, transmetalación y eliminación reductora, como se muestra en la Figura 1-3. La reacción inicia con la especie catalíticamente activa, Pd (0), proveniente de un complejo de Pd (II) o del propio reactivo organometálico; a la cual se une un halogenuro (R<sub>1</sub>-X) mediante una reacción de adición oxidante, formando una especie de Pd (II). Esta especie dará lugar a la transmetalación del reactivo organometálico presente en el medio (R<sub>2</sub>-M) a través de una sustitución en la posición de coordinación del halogenuro para formar un nuevo complejo de Pd (II) que cuenta con los dos componentes carbonados a acoplar enlazados al metal; y como subproducto se formará una sal (M-X). Finalmente, en la etapa de eliminación reductora, se generará el producto de acoplamiento cruzado (R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>); y se regenerará la especie catalíticamente activa, el complejo de Pd (0), reiniciando así el ciclo catalítico (Alonso-Marañón, 2012; Fernández-Rodríguez, 2008).



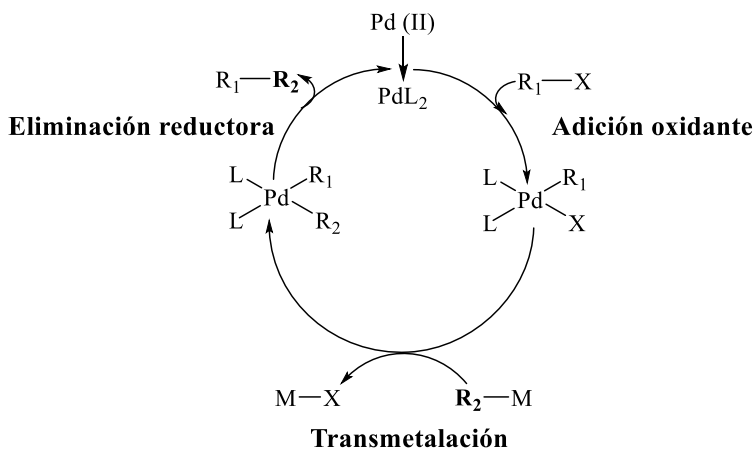
R<sub>1</sub>: alqueno, arilo, heteroarilo

X: Cl, Br, I, OTf

Base: Et<sub>3</sub>N, i-Pr<sub>2</sub>NH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Figura 1-2** Reacción de acoplamiento cruzado

Fuente: (Alonso-Marañón, 2012)



**Figura 1-3** Mecanismo de reacción de acoplamiento cruzado

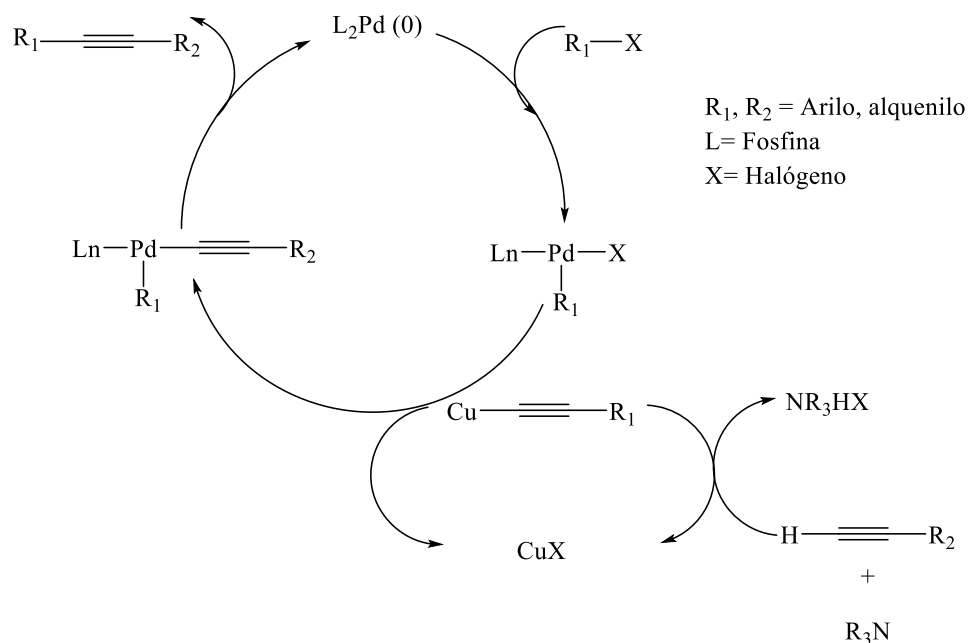
Fuente: (Alonso-Marañón, 2012)

### 1.4.1 Reacción de Sonogashira

La reacción de Sonogashira-Hagihara es el acoplamiento de acetilenos terminales con haluros de arilo o vinilo, es uno de los métodos más utilizados en la preparación de alquilo y arilacetilenos así como eninos conjugados (Buxaderas-Pérez de Armiñán, 2014). Sonogashira y colaboradores reportaron que el hidrógeno acetilénico puede ser fácilmente sustituido por iodoarenos, bromoalquenos o bromopiridinas en presencia de un catalizador de bis (trifenilfosfina) dicloruro de paladio-yoduro cuproso en dietilamina bajo condiciones muy leves, obteniendo resultados más satisfactorios para la síntesis directa de acetilenos disustituídos simétricamente a partir de gas acetileno (Sonogashira et al., 1975).

En condiciones clásicas, la reacción de Sonogashira es una reacción de un alquino con un halogenuro de arilo o alquénico bajo dos ciclos catalíticos independientes (Figura 1-4), uno de cobre (Cu) y el otro de paladio (Pd) en presencia de una base (representada en la Figura 1-4 por una amina terciaria) (Alonso-Marañón, 2012; Chinchilla & Nájera, 2007). La reacción comienza con la generación de la especie catalíticamente activa de  $Pd(0)L_2$ , formada por complejos de  $Pd(0)$ ,  $Pd(II)$  o complejos formados después de la etapa de eliminación reductiva; esta especie catalítica es estabilizada por los ligantes presentes (incluyendo la base y/o moléculas de disolvente). La primera etapa del ciclo catalítico de paladio está dada por la adición oxidativa del  $R_1-X$  a la especie catalítica  $Pd(0)L_2$  que da lugar a la formación del complejo de  $Pd(II)$ ; esta etapa es favorecida si  $X = I$  o  $OTf$ , y si los grupos arilo o vinilo tienen sustractores de electrones. El siguiente paso consiste en la transmetalación del acetiluro de cobre formado en el otro ciclo catalítico, para dar origen al complejo  $R_1Pd(-C\equiv CR_2)L_2$ , el cual por isomerización cis/trans y eliminación reductiva da origen al producto de acoplamiento  $R_1-C\equiv R_2$ , y regenera la especie catalíticamente activa de  $Pd(0)$  (Buxaderas-Pérez de Armiñán, 2014; Chinchilla & Nájera, 2007; Islas-Vigueras, 2013).

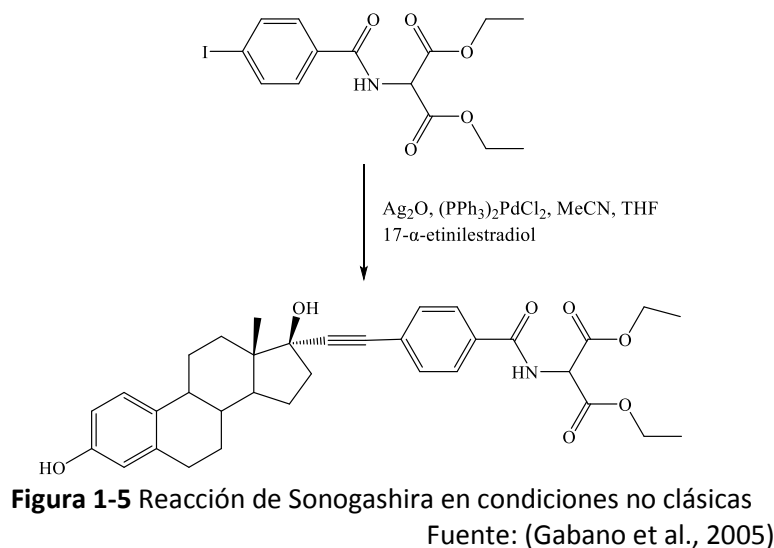
En el ciclo catalítico de cobre, teóricamente, se propone la formación del acetiluro de cobre (I) por medio de la coordinación del Cu al triple enlace del alquino ( $\pi$ -alquino-Cu), lo que permite el incremento de la acidez del protón acetilénico y la subsecuente desprotonación del alquino terminal por la base (Buxaderas-Pérez de Armiñán, 2014; Chinchilla & Nájera, 2007; Islas-Vigueras, 2013). Cabe destacar que entre más fuerte sea la base, la desprotonación se verá más favorecida, ya que la velocidad de reacción disminuye en el orden de  $n-BuNH_2 > NEt_3 > i-Pr_2NH > NHEt_2 > K_2CO_3$  (Buxaderas-Pérez de Armiñán, 2014).



**Figura 1-4** Mecanismo de reacción del acoplamiento de Sonogashira  
 Fuente: (Varnado & Bielawski, 2012)

Algunas metodologías han sido desarrolladas para llevar a cabo la reacción tanto en medios acuosos como en presencia de oxígeno; sin embargo, en esas condiciones el cocatalizador de cobre favorece el homoacoplamiento del alquino terminal (reacción de Glaser). Por lo cual se han desarrollado sistemas catalíticos capaces de llevar a cabo la reacción en ausencia del cocatalizador (Buxaderas-Pérez de Armiñán, 2014).

La reacción de Sonogashira en condiciones no clásicas, en una de sus versiones, describe el uso de óxido de plata (I) ( $Ag_2O$ ) en cantidades estequiométricas para el yoduro de arilo en ausencia de cobre y amina (Figura 1-5), estas condiciones fueron presentadas para la reacción entre un éster malónico (1.5 mmol) y el 17- $\alpha$ -etinilestradiol (1.5 mmol), los cuales fueron disueltos en tetrahidrofurano (THF) (15 mL). Posteriormente, se añadieron el complejo de paladio dicloruro de bis (trifenilfosfina)paladio (II) [ $(PPH_3)_2PdCl_2$ ] (5%) y el  $Ag_2O$  (1.5 mmol) y se dejó reaccionar a 60 °C. Una vez terminada la reacción y después de un proceso de purificación por columna cromatográfica, se reportó un rendimiento del 61.1 % para el producto de acoplamiento (Gabano et al., 2005).



## 1.5 Consideraciones en el diseño de fármacos

La semejanza farmacológica, establecida a partir de inspecciones estructurales o fisicoquímicas, permite evaluar la posibilidad de que una molécula se convierta en un fármaco de administración oral y difusión pasiva con respecto a la biodisponibilidad (Daina, Michielin, et al., 2017). Dicha evaluación permite hacer relaciones cuantitativas de propiedades-estructura; así como, la exclusión de moléculas con propiedades incompatibles a un perfil farmacocinético aceptable. La evaluación puede realizarse mediante el cumplimiento de reglas establecidas por las principales compañías farmacéuticas: Pfizer (Lipinski), Amgen (Ghose), GSK (Veber), Pharmacia (Egan) y Bayer (Mueggue) (Daina, Blatter, et al., 2017; Daina, Michielin, et al., 2017).

### 1.5.1 Reglas de Lipinski

La regla de los 5 de Lipinski, establecida en la División Central de Investigación de Pfizer, es una regla empírica considerada en el diseño de fármacos. Esta regla permite predecir problemas de permeabilidad o absorción por difusión pasiva cuando el fármaco en cuestión sea administrado por vía oral (Lipinski et al., 2012; Navarrete-Vázquez, 2016). La regla de Lipinski establece que la permeabilidad o absorción es más probable cuando:

1. No hay más de 5 donadores de puente de hidrógeno (expresado como la suma de OH y NH)
2. Hay menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (expresado como la suma de N y O)

3. Peso molecular (PM) < 500 g/mol
4. El coeficiente de partición en octanol-agua, medido como CLogP < 5 ó MLogP < 4.15
5. No más de una violación a estas reglas

Las dos primeras reglas tienen que ver con la polaridad de la molécula para que ésta pueda atravesar la membrana celular. La tercera indica que las moléculas no deben ser grandes ni pesadas. La cuarta representa la tendencia de una molécula a disolverse en membranas celulares; y la quinta dice que, si hay más de una violación a estas, la molécula de estudio tendrá bajas propiedades farmacológicas para la administración oral. Cabe resaltar que estas reglas no se deben aplicar a compuestos que son sustratos para transportadores biológicos, productos naturales, o compuestos de absorción activa (Lipinski et al., 2012; Palma-Arellano, 2017).

### **1.5.2 Reglas de Ghose**

Ghose y colaboradores proveen una serie de características consensuadas que debe cumplir una molécula con semejanza farmacológica para convertirse en fármaco. Los autores abordan dos caracterizaciones: i) cuantitativa, basada en perfiles de propiedades fisicoquímicas; y ii) cualitativa, basada en la presencia de grupos funcionales y subestructuras importantes. Los rangos con cobertura superior al 80 % de los compuestos evaluados se describen a continuación (Ghose et al., 1999):

i. Un compuesto orgánico debe tener:

- a. Log P calculado y expresado como ALogP (WLogP) entre -0.4 y 5.6
- b. Refractividad molar entre 40 y 130
- c. Peso molecular entre 160 y 480 g/mol
- d. Número total de átomos entre 20 y 70

ii. Combinación estructural de algunos de los siguientes grupos:

- a. Anillo de benceno
- b. Anillo heterocíclico (tanto alifático como aromático)



- c. Amina alifática (preferiblemente terciaria)
- d. Grupo carboxamida
- e. Grupo hidroxilo alcohólico
- f. Éster
- g. Grupo ceto

iii. Químicamente estable en el tampón fisiológico (por la ausencia de un grupo funcional reactivo o resto estructural)

La lipofilicidad (ALogP) y refractividad molar (RM) de las moléculas farmacológicas son características importantes que influyen en la unión del receptor, captación celular y biodisponibilidad; y se utilizan como constantes fragmentarias para representar la hidrofiliicidad y fuerzas dispersivas (Van der Waals). Por otra parte, la refractividad molar al igual que el peso molecular y el número de átomos están relacionados con el tamaño molecular (Ghose et al., 1999).

### 1.5.3 Reglas de Veber

Las reglas de Veber, propuestas por GlaxoSmithKline (GSK), establecen que la flexibilidad molecular reducida (dada por el número de enlaces rotatorios), el área de superficie polar baja, y el número total de aceptores y donadores de hidrógeno; son predictores determinantes para una buena biodisponibilidad oral en ratas independientemente del peso molecular. Estas reglas proporcionan una selección dentro del rango de 20-100 % de biodisponibilidad oral de manera similar a la selección basada en el cumplimiento de 3 de los 4 criterios de la regla de Lipinski, pero proporciona una mejor selección contra los compuestos que tienen baja biodisponibilidad oral. Por lo cual, los compuestos tendrán buena biodisponibilidad oral cuando cumplan con las siguientes reglas (Veber et al., 2002):

1. Enlaces rotatorios  $\leq 10$
2. Superficie polar  $\leq 140 \text{ \AA}^2$  o suma de donadores y aceptores de hidrógeno  $\leq 12$

### 1.5.4 Reglas de Egan

Las reglas de Egan describen un modelo estadístico de reconocimiento de patrones de absorción intestinal pasiva que se basa en datos de literatura de compuestos con buena y mala absorción en humanos. Los descriptores del modelo son el área de superficie polar (PSA) y el coeficiente de partición octanol-agua (AlogP98). Y aunque el peso molecular se utiliza en diversos modelos de absorción pasiva, este modelo demuestra que es superfluo, debido a que el PM es una componente de PSA y AlogP98. Las reglas para que un compuesto tenga buena absorción intestinal pasiva con un nivel de confianza del 95 % son las siguientes (Egan et al., 2000):

1.  $PSA \leq 131.6 \text{ \AA}^2$
2.  $AlogP98 (WLOGP) \leq 5.88$

Cabe destacar que el modelo matemático utilizado por Egan y colaboradores para determinar la lipofilidad (AlogP98) fue adaptado al modelo WLogP para implementarse en el simulador SwissADME como descriptor de la lipofilidad. Sin embargo, el valor del logaritmo es el mismo en ambos modelos (Daina, Michielin, et al., 2017).

### 1.5.5 Reglas de Muegge

Estas reglas, establecidas por el Centro de Investigación de Bayer, discriminan significativamente a sustancias químicas semejantes y no semejantes a drogas farmacéuticas. Basándose en un filtro de farmacoros (heteroátomos no separados por más de un átomo de carbono) dependientes del peso molecular que considera a los grupos funcionales (amina, amida, alcohol, cetona, sulfona, sulfonamida, ácido carboxílico, carbamato, guanidina, amidina, urea y éster) que garantizan la capacidad de unión de H con sus objetivos específicos. Y excluye a los grupos nitro e imina debido a que no se consideran enlazantes a través de hidrógeno. También descarta moléculas con más de 7 farmacoros debido a una sobre funcionalización. Las reglas de semejanza estructural farmacológica aplicadas se enuncian a continuación (Muegge et al., 2001):

- i. Aminas primarias, secundarias y terciarias son consideradas farmacoros pero no el pirrol, imidazol, tiazol, isoxazol, y otros azoles o diazinas
- ii. Compuestos con más de un ácido carboxílico son descartados

iii. Compuestos sin un anillo en su estructura son descartados

iv. Aminas intracíclicas que se encuentran fusionadas en el mismo anillo cuentan como un solo farmacoforo

Sin embargo, el filtro de Muegge fue adaptado para implementarse en el simulador SwissADME y usado para calcular XLogP como descriptor de la lipofilicidad. Las inspecciones estructurales y fisicoquímicas para los candidatos a fármacos orales establecidas son (Daina, Michielin, et al., 2017):

1.  $200 \text{ g/mol} \leq \text{PM} \leq 600 \text{ g/mol}$
2.  $-2 \leq \text{XLogP} \leq 5$
3. Área de superficie topológica polar  $\leq 150$
4. Número de anillos  $\leq 7$
5. Número de carbonos  $> 4$
6. Número de heteroátomos  $> 1$
7. Número de enlaces rotatorios  $\leq 15$
8. Número de aceptores de hidrógeno  $\leq 10$
9. Número de donadores de hidrógeno  $\leq 5$

## 1.6 Simuladores

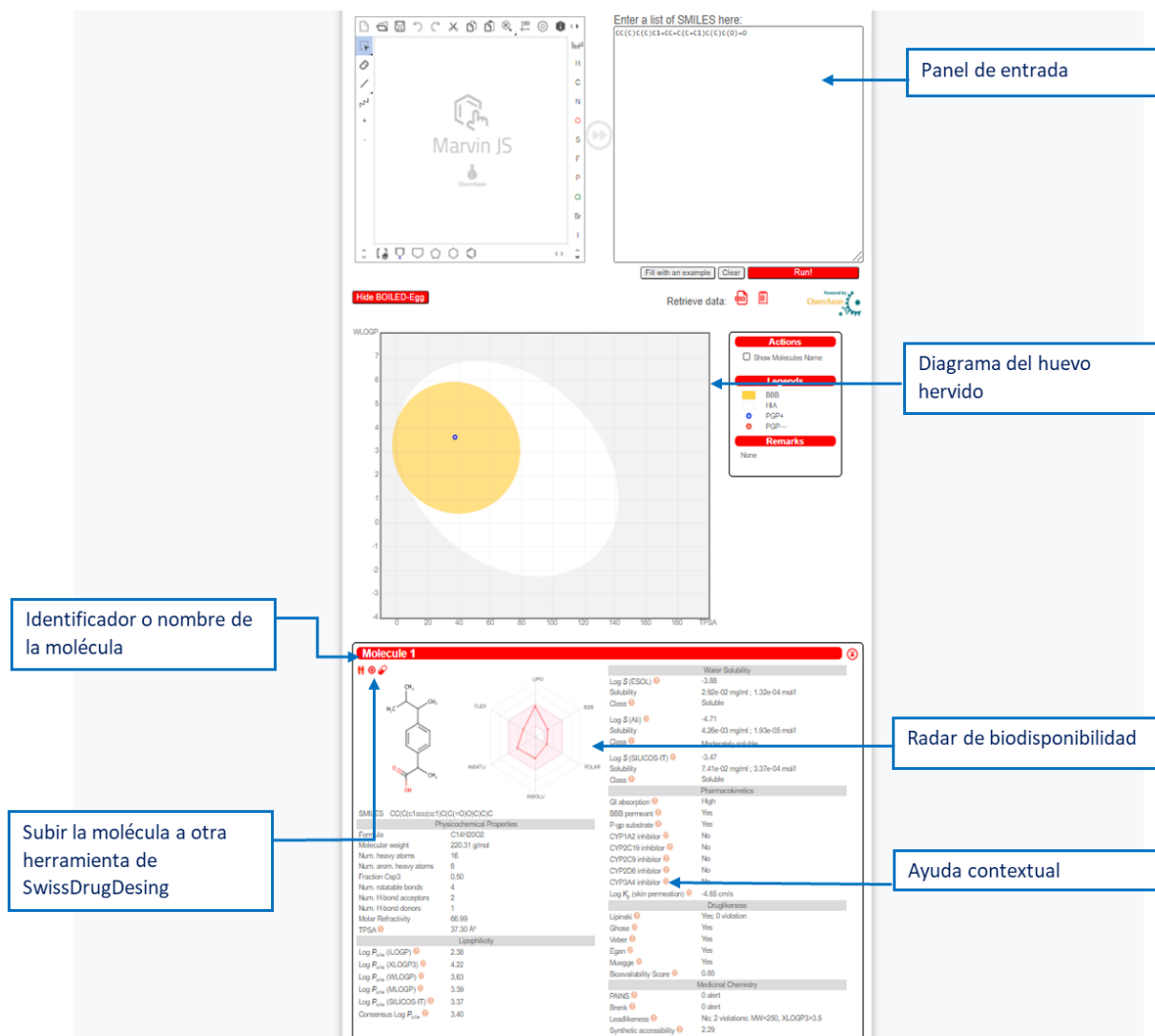
El uso de simuladores para el diseño de fármacos permite predecir *in silico* las propiedades, actividades, mecanismos de acción y sitios metabólicos de los compuestos asumidos como bioactivos. Su funcionamiento se basa en la comparación de las propiedades de diversos fármacos y moléculas bioactivas registradas en las bases de datos de los simuladores, que son retroalimentadas constantemente, y provienen de bibliografía, bases de medicamentos avalados por la FDA, y publicaciones de revistas científicas de alta calidad. Además, este tipo de software, permite evaluar los compuestos potencialmente terapéuticos de manera teórica previo a su síntesis, evitando así costosos

y difíciles procesos de síntesis, purificación y evaluaciones experimentales de las propiedades (F. Cheng et al., 2012; Navarrete-Vázquez, 2016).

### **1.6.1 SwissADME**

El programa computacional SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) es una herramienta de libre acceso desarrollada por el Grupo de Modelado Molecular del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), que cuenta con una interfaz fácil de usar. Este software permite predecir propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y fisicoquímicas; además hace una evaluación de similitud con drogas farmacológicas, farmacocinética y química medicinal de una o múltiples moléculas a la vez. También el programa cuenta con salidas gráficas como la del huevo hervido que muestra de manera rápida la lipofilicidad, y el radar de biodisponibilidad que permite apreciar rápidamente la semejanza con fármacos por medio de la evaluación de seis propiedades fisicoquímicas (lipofilicidad, tamaño, polaridad, solubilidad, flexibilidad y saturación) las cuales deben estar dentro del área rosa para que la molécula sea considerada como fármaco (Figura 1.6).

La estimación de las distintas propiedades se puede realizar mediante el dibujo de la estructura de la molécula directamente en el espacio destinado para ello o al introducir la estructura a través de la Especificación de Introducción Lineal Molecular Simplificada [SMILES, por sus siglas en inglés (Simplified Molecular Input Line Entry Specification)], es decir, el SMILE de la molécula. Una vez introducida la estructura de la molécula los resultados en diferentes secciones se obtienen en un lapso de 1 a 5 s (Figura 1-6) (Daina, Michielin, et al., 2017).

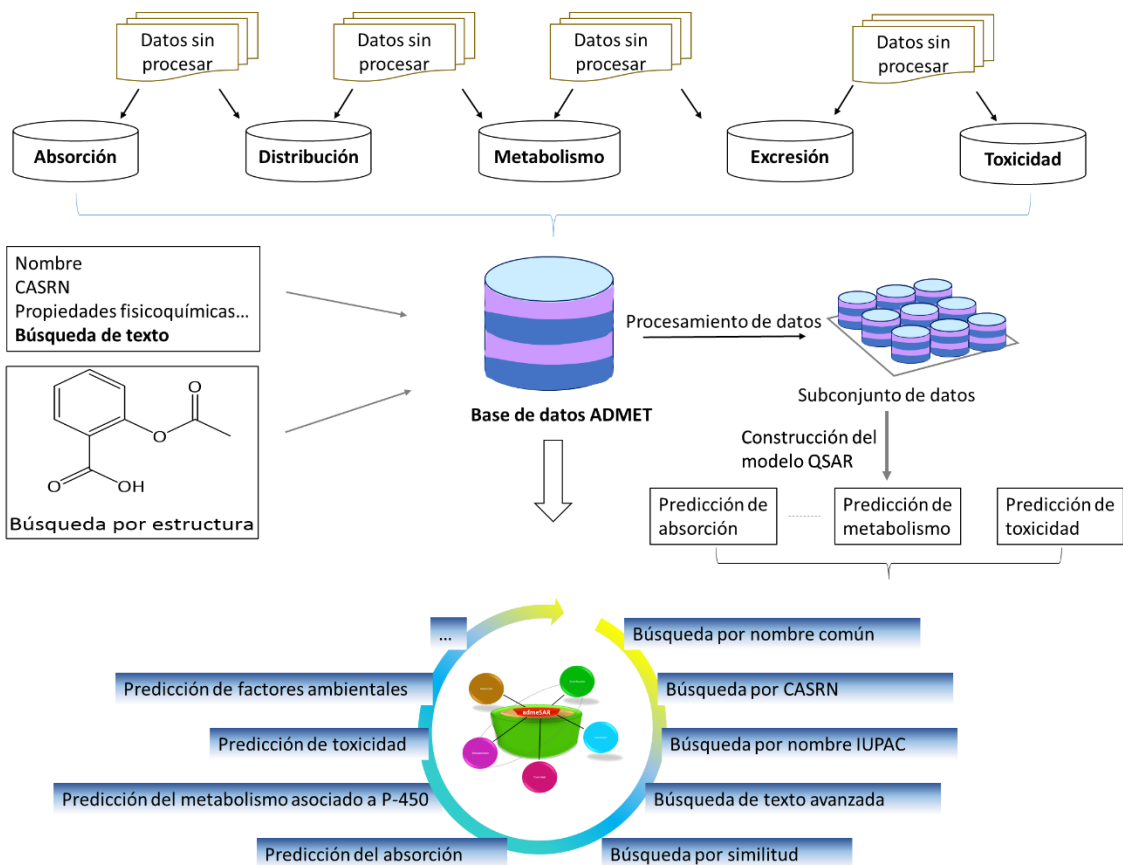


**Figura 1-6** SwissADME: secciones de entrada y salida de información por molécula  
Fuente: (Swiss Institute of Bioinformatics, 2021)

## 1.6.2 admetSAR

El software admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) es una base de datos gratuita de relación estructura-actividad que permite buscar perfiles de propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) por nombre, Número de Registro en el Servicio de Consulta a Químicos [CASRN, por sus siglas en inglés (Chemical Abstracts Service Registry Number)] o por el SMILE de las moléculas de interés, candidatos a fármacos y/o productos químicos ambientales, Figura 1-7. Este tipo de programa computacional también permite evaluar de manera teórica las propiedades de

persistencia, bioacumulación y toxicidad (PBT) de los productos químicos en estudio para el descubrimiento o desarrollo de medicamentos, pesticidas, aditivos alimenticios, productos de consumo y químicos industriales; previendo así riesgos ambientales y humanos (F. Cheng et al., 2012).



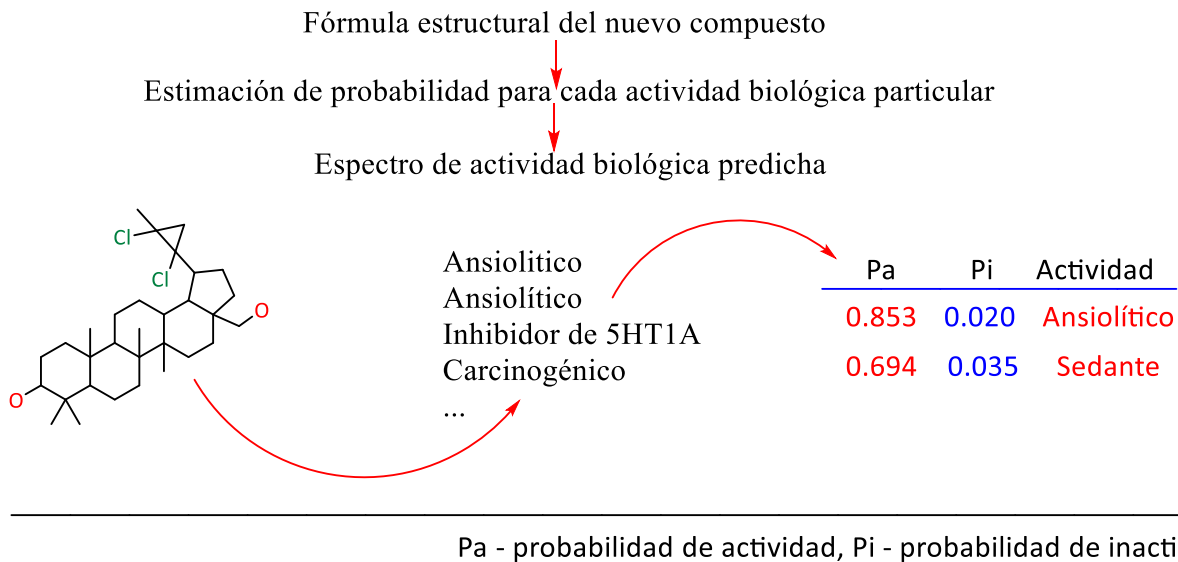
**Figura 1-7** Funcionamiento de admetSAR

Fuente: (F. Cheng et al., 2012)

### 1.6.3 PASSonline

PASSonline (<http://www.way2drug.com/passonline/>) es un software gratuito que predice más de 4000 tipos de actividad biológica (efectos farmacológicos, tóxicos y adversos, mecanismos de acción, etc.) con 95 % de precisión, para este fin solamente se alimenta al simulador una fórmula estructural, por lo cual la molécula en estudio no necesita estar sintetizada. Este simulador basa sus predicciones en el principio de similitud, analiza la estructura del compuesto en cuestión; y lo compara con más de 300,000 sustancias orgánicas biológicamente activas obtenidas de bases de datos internas y comerciales

(Filimonov et al., 2014). En la Figura 1-8 se muestra esquemáticamente el funcionamiento del simulador PASSonline.



**Figura 1-8** Funcionamiento de PASS-online

Fuente: (Navarrete-Vázquez, 2016)

# Capítulo 2 Materiales y métodos

## 2.1 Metodología general

La metodología propuesta para la investigación consta de dos fases, una teórica y otra experimental, como se muestra en la Figura 2-1.

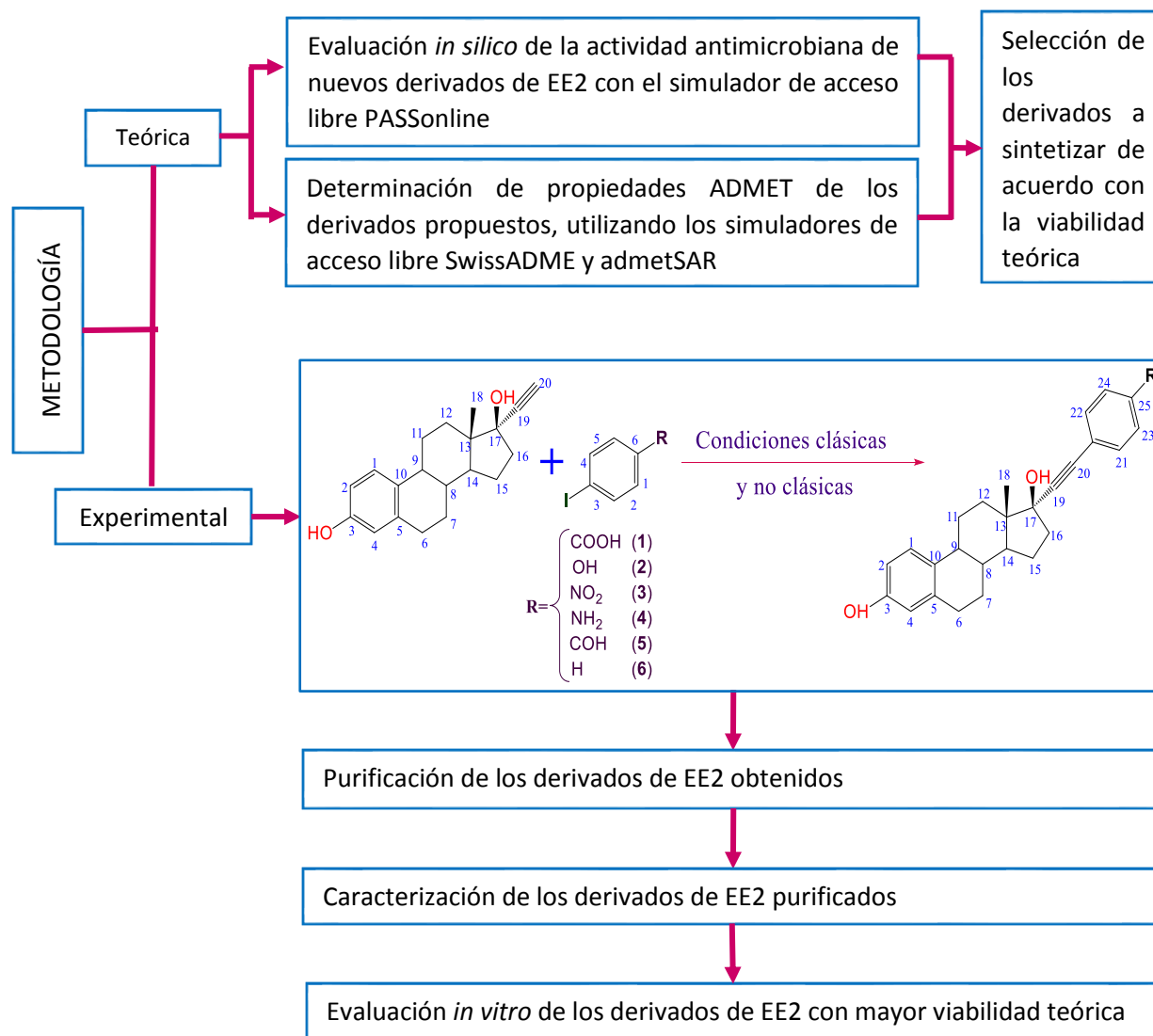


Figura 2-1 Metodología general propuesta



## **2.2 Instrumentación y equipo**

### **2.2.1 Espectroscopia de infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron en un equipo Nicolet 6700 (ThermoScientific, USA) de 32 escaneos a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  mediante la técnica de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) de Reflectancia Total Atenuada (ATR) en un rango de 4000 a  $650\text{ cm}^{-1}$ . Los principales datos de los máximos de absorción se expresan en números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### **2.2.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear**

Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se adquirieron en un equipo Spinsolve 80 MHz y JEOL-ECA 500 MHz, utilizando el disolvente deuterado pertinente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) fueron expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) fueron dadas en Hertz (Hz). Para asignar las señales se utilizaron las siguientes abreviaturas: s= señal simple, d= señal doble, dd= señal doble de dobles, dt= señal doble de triples y m= señal múltiple.

### **2.2.3 Punto de fusión**

El punto de fusión (Pf) se determinó en un equipo Electrothermal 9100 y se reporta sin corrección alguna.

## **2.3 Reactivos y disolventes**

Todos los reactivos se obtuvieron de la fuente comercial Sigma-Aldrich-Corporation, a excepción del THF que fue Fermont, y el 17- $\alpha$ -etinilestradiol puro fue una donación de la Dra. Rosa Luisa Santillan del CINVESTAV Zacatenco. Los reactivos fueron usados sin purificación previa; y los disolventes fueron puestos en condiciones anhidras, posteriormente se desgasificaron por inmersión en baño ultrasónico.

Para secar el THF, éste se mantuvo en reflujo con  $\text{Na}^0$  (metálico) y benzofenona hasta que viró a color azul intenso (36.76 h); posteriormente se destiló, para separar el disolvente anhidro, y con ayuda de una cánula se trasvasó el THF seco a un matraz con atmósfera inerte de argón (Ar). Finalmente, el matraz con el disolvente anhidro fue sonificado por 15 minutos para eliminar el gas disuelto. El acetonitrilo (MeCN) se secó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (10 %) en un recipiente con atmósfera inerte (Ar), previo a su uso se sonicó 15 min para eliminar el gas disuelto. En el caso de la trietilamina (TEA) solamente se deshidrató en atmósfera inerte dentro de un matraz que contenía 25 % en peso de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 25 % de  $\text{CaCl}_2$  anhidros.

## 2.4 Evaluación *in silico* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

### 2.4.1 Simulador PASSonline

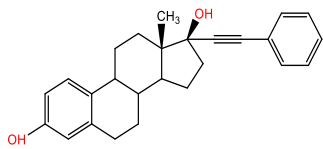
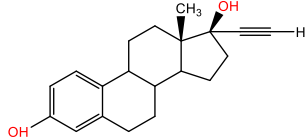
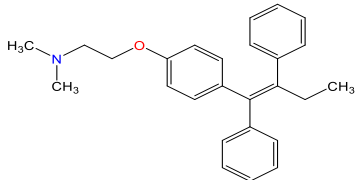
La actividad antimicrobiana de los derivados del EE2 fue evaluada en el simulador PASSonline, considerando únicamente la actividad antifúngica, antiparasitaria (*Amoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Tricomonas*, *Schistosoma*, *Histomonas*, *Toxoplasma*), antiviral (*Rhinovirus*, Influenza, *Trachoma*); y antibacteriana (*Rickettsia*, *Treponema*). Para realizar la simulación se accedió al sitio electrónico del simulador (<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php>), y se ingresó el SMILE de cada una de las moléculas (Tabla 2-1), obteniendo el valor de Probabilidad de actividad (*Pa*).

El tamoxifeno (TAM) fue utilizado con fines comparativos para reportar las probabilidades de actividad de los compuestos propuestos en términos relativos a éste, es decir, *Pa* compuesto / *Pa* tamoxifeno (la información referente a la bioactividad del TAM se encuentra en la sección 1.2).

**Tabla 2-1** Datos generales de identificación de los derivados del EE2 propuestos

No. de molécula	Estructura de la molécula	Datos generales de la molécula
1		Ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico Fórmula: C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> SMILE: <chem>Oc1ccc2c(c1)CCC1C2CC[C@]2(C1CC[C@@]2(O)C#Cc1ccc(c1)C(=O)O)C</chem>
2		4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) fenol Fórmula: C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> SMILE: <chem>Oc1ccc(cc1)C#C[C@]1(O)CCC2[C@]1(C)CCC1C2CCc2c1ccc(c2)O</chem>
3		4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) nitrobeneno Fórmula: C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> SMILE: <chem>Oc1ccc2c(c1)CCC1C2CC[C@]2(C1CC[C@@]2(O)C#Cc1ccc(c1)[N+](=O)[O-])C</chem>
4		4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) anilina Fórmula: C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub> SMILE: <chem>Nc1ccc(cc1)C#C[C@]1(O)CCC2[C@]1(C)CCC1C2CCc2c1ccc(c2)O</chem>
5		4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzaldehído Fórmula: C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> SMILE: <chem>O=Cc1ccc(cc1)C#C[C@]1(O)CCC2[C@]1(C)CCC1C2CCc2c1cc(c2)O</chem>

**Tabla 2-1** Datos generales de identificación de los derivados del EE2 propuestos (Continuación)

No. de molécula	Estructura de la molécula	Datos generales de la molécula
6		4-(17-α-etinilestradiol) benceno <u>Fórmula:</u> C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> <u>SMILE:</u> <chem>Oc1ccc2c(c1)CCC1C2CC[C@]2(C1CC[C@@]2(O)C#Cc1ccccc1)C</chem>
7		17- α-tinilestradiol <u>Fórmula:</u> C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> <u>SMILE:</u> <chem>C#C[C@]1(O)CCC2[C@]1(C)CCC1C2CCc2c1ccc(c2)O</chem>
8		Tamoxifeno (TAM) <u>Fórmula:</u> C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> NO <u>SMILE:</u> <chem>CC/C(=C(\c1ccccc1)/c1ccc(cc1)OCCN(C)C)/c1ccccc1</chem>

### 2.4.2 Simulador SwissADME

Las propiedades ADME se evaluaron en el simulador SwissADME, para lo cual se accedió al sitio electrónico del simulador (<http://www.swissadme.ch/>). Se ingresó el SMILE de cada una de las moléculas (Tabla 2-1) y se realizó la simulación. Una vez terminada la simulación, el simulador permitió conocer algunas propiedades fisicoquímicas como: el peso molecular (PM), número de enlaces rotables, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, refractividad molar (RM) y área de superficie topológica polar (TPSA); además se obtuvieron datos de lipofilicidad (logP), solubilidad en agua (logS), farmacocinética, semejanza farmacológica y otros datos de química farmacéutica de las moléculas.

### 2.4.3 Simulador admetSAR

La ecotoxicidad de las moléculas fue evaluada en el simulador admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>), obteniendo la probabilidad de biodegradación, toxicidad en abejas, toxicidad acuática para crustáceos y peces; así como datos sobre la concentración requerida para terminar con el 50 % de la población de *Tetrahymena pyrimorffis* (pIGC50). Para realizar la simulación se accedió al sitio electrónico del simulador (<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php>), y se ingresó el SMILE de cada una de las moléculas (Tabla 2-1).

## 2.5 Síntesis de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

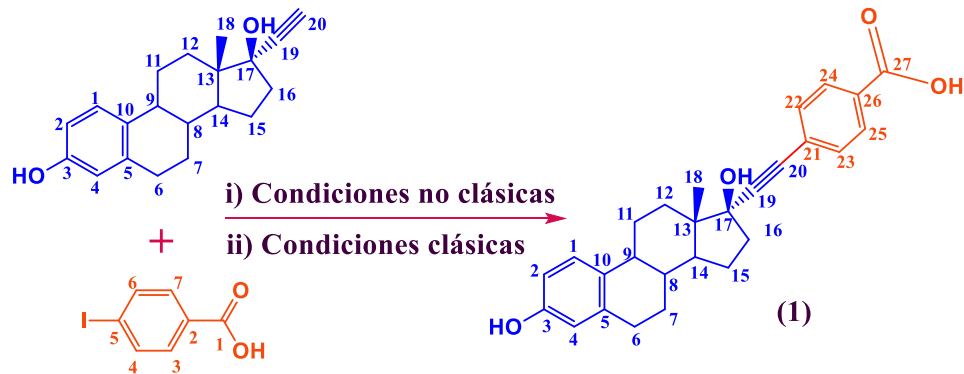
Los derivados del EE2 que resultaron con mayor factibilidad teórica para convertirse en agentes antimicrobianos fueron sintetizados. La síntesis se realizó por medio de una reacción de Sonogashira bajo condiciones clásicas y no clásicas. Estas últimas similares a las reportadas por Gabano y colaboradores (Gabano et al., 2005).

### 2.5.1 Purificación de derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

Una vez concluidas las reacciones, las mezclas reaccionantes se sometieron a procesos de filtración para separar todos los residuos sólidos, y/o fueron lavadas para remover las sales formadas. Posteriormente, se removieron los disolventes remanentes con rotavapor a vacío. Los derivados del EE2 fueron purificados en una columna empacada con sílice utilizando un sistema ascendente de polaridades con hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt). Las fracciones obtenidas de las columnas correspondientes a los productos de interés fueron concentradas por rotaevaporación y secadas a 10 mba para obtener los compuestos puros.

### 2.5.2 Síntesis del ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico (1)

**Reacción de Sonogashira en condiciones no clásicas del derivado 1:** en un matraz de vidrio de 50 mL de una boca con junta 24/40 se pesaron en una balanza (marca VELAB, modelo VE-204) 100 mg (337.38 mmol) del EE2, 83.68 mg (337.38 mmol) de ácido 4-p-iodobenzoico, 78.19 mg (337.38 mmol) de Ag<sub>2</sub>O, 11.84 mg (16.87 mmol) de (PPH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>. Posteriormente, se introdujo al matraz una barra de agitación magnética de 15 mm de PTFE (Fisherbrand™), y se le acopló un refrigerante; el sistema resultante se purgó con argón (Ar). Como siguiente paso, se trasvasaron con cánula 7.5 mL de THF y 7.5 mL de MeCN anhidros y desgasificados. La mezcla de reacción se sometió a agitación (400 rpm) y calentamiento en un baño temperado de parafina a 129 °C (temperatura en el medio de reacción de 76 °C). El calentamiento y agitación se realizaron sobre una parrilla de calentamiento con agitación magnética Ohaus, modelo 5000T-PRO. La reacción (Figura 2-2) fue monitoreada por medio de la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) a partir de las 4 horas, y se mantuvo bajo las condiciones especificadas hasta que se alcanzó el equilibrio (24 h), es decir, cuando no se observó cambio en la proporción de las marcas en la CCF. Seguidamente, se filtró la mezcla de reacción y se removieron los disolventes remanentes por rotaevaporación.



i)  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ , MeCN, THF

ii)  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ , TEA, CuI

**Figura 2-2** Esquema de obtención del derivado **1** en condiciones clásicas y no clásicas

**Reacción de Sonogashira en condiciones clásicas del derivado 1:** en un matraz de vidrio de 10 mL, se pesaron 100 mg (337.38  $\mu\text{mol}$ ) del EE2, 83.68 mg (337.38  $\mu\text{mol}$ ) de ácido 4-p-iodobenzoico, 5 mg (26.25  $\mu\text{mol}$ ) de CuI, y 11.84 mg (16.87  $\mu\text{mol}$ ) de  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ . Posteriormente, se introdujo al matraz una barra de agitación magnética de 15 mm de PTFE (Fisherbrand<sup>TM</sup>), y se le acopló un refrigerante de 10 cm; el sistema resultante se purgó con Ar. Como siguiente paso, se agregaron 2 mL de trietilamina (TEA) seca. Subsecuentemente se burbujeó el sistema de reacción con Ar por 10 min. La mezcla de reacción resultante se sometió a agitación a 460 rpm en un baño temperado de parafina a 180 °C (temperatura en el medio de reacción de 100 °C). El calentamiento y agitación se realizaron en una parrilla de calentamiento con agitación magnética Ohaus, modelo 5000T-PRO. La reacción (Figura 2-2) se monitoreó por CCF a partir de las 3 horas; y se mantuvo bajo las condiciones establecidas hasta que se alcanzó el equilibrio (18 a 24 h). Al finalizar la reacción se adicionaron 10 mL de cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), para obtener una fase orgánica y se agregaron 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 4 % para alcanzar un pH de 4; posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua destilada (3 X 10 mL), y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se removió a vacío y se purificó el compuesto por cromatografía en columna con AcOEt/Hex 4:6.

**$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm):** 0.92 (s, 3H, H-18), 1.24 – 1.53 (m, 4H, H-7, H-8, H-11, H-15), 1.72 – 1.90 (m, 4H, H-7, H-14, H-15, H-16), 1.94 – 2.01 (m, 1H, H-16), 2.01 – 2.10 (m, 1H, H-12), 2.16 – 2.21 (m, 1H, H-9), 2.36 (m, 2H, H-11, H-12), 2.66 – 2.87 (m, 2H, H-6), 6.48 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-4), 6.54 (dd,  $J =$

8.4, 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-1), 7.48 – 7.54 (m, 2H, H-22, H-23), 7.95 – 8.02 (m, 2H, H-24, H-25)

**$^1\text{H}$ -RMN (80 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm):** 0.93 (s, 3H, H-18), 1.09 – 2.57 (m br, 13H, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16), 2.76 (m, 2H, H-6), 6.54 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H, H-2, H-4), 7.11 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-1), 7.51 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, H-22, H-23), 7.99 (d,  $J=7.9$  Hz, 2H, H-24, H-25)

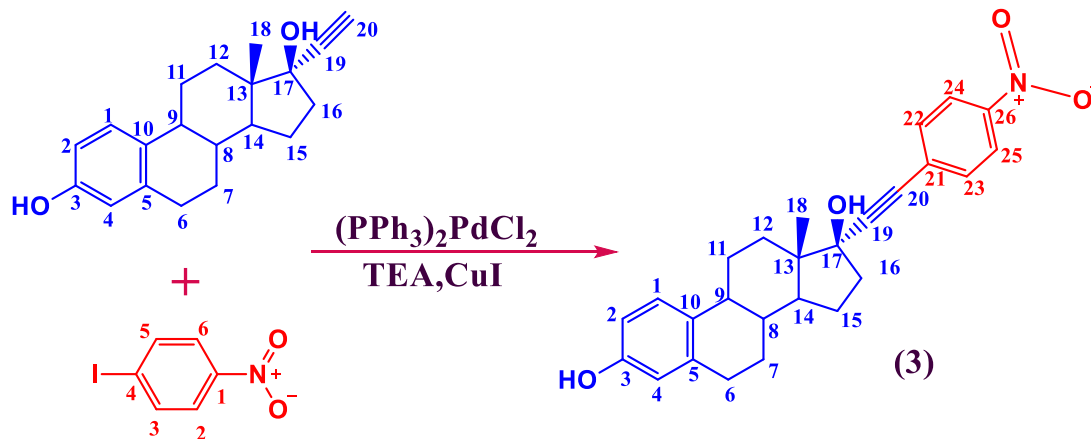
**$^{13}\text{C}$  PENDANT-RMN (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm):** 13.5 (C18), 23.9 (C15), 27.8 (C11), 28.6 (C7), 30.7 (C6), 34.4 (C16), 39.9 (C12), 41.2 (C8), 45.2 (C9), 48.9 (C13), 51.2 (C14), 80.9 (C17), 85.7 (C19), 97.6 (C20), 113.7 (C2), 116.0 (C4), 127.3 (C1), 129.3 (C21), 130.8 (C24, C25), 131.0 (C26), 132.4 (C10, C22, C23), 138.8 (C5), 155.9 (C3), 169.4 (C27)

**$^{13}\text{C}$  ATP-RMN (20 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm):** 13.5 (C18), 23.8 (C15), 27.7 (C11), 28.6 (C7), 30.7 (C6), 34.4 (C16), 39.9 (C12), 41.0 (C8), 45.1 (C9), 48.8 (C13), 51.1 (C14), 80.9 (C17), 85.7 (C19), 97.6 (C20), 113.7 (C2), 116.1 (C4), 127.3 (C1), 129.2 (C21), 130.7 (C24, C25), 131.3 (C26), 132.4 (C10, C22, C23), 138.7 (C5), 155.8 (C3), 169.3 (C27)

**FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3300 (3700-1800) (O-H, st), 2926, 2868 (C-H cicloalcano, st), 2217 (C $\equiv$ C, st), 1694 (C=O ácido, st), 1605, 1498 (C=C aromático, st), 1246 (C-O fenol, st)

### 2.5.3 Síntesis del 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) nitrobenceno (3)

La síntesis del 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) nitrobenceno se llevó a cabo a través de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas (Figura 2-3), siguiendo la misma metodología que para el derivado **1** con las siguientes cantidades: 100 mg (337.38  $\mu\text{mol}$ ) de EE2, 84.01 mg (337.38  $\mu\text{mol}$ ) de 1-yodo-4-p-nitrobenceno, 5 mg (26.25  $\mu\text{mol}$ ) de CuI, y 11.84 mg (16.87  $\mu\text{mol}$ ) de  $(\text{PPH}_3)_2\text{PdCl}_2$ . La reacción se monitoreó por CCF a partir de las 3 horas; y se mantuvo bajo las condiciones establecidas hasta que se alcanzó el equilibrio (16 h). Al finalizar la reacción se adicionó AcOEt (10 mL) para obtener una fase orgánica, ésta se lavó con solución saturada de  $(\text{NH}_4^+)\text{Cl}$ , hasta que ya no se observó el azul característico del  $\text{Cu}^{2+}$ . Posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua destilada ( $4 \times 10$  mL) y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El AcOEt se removió a vacío y el producto se purificó mediante cromatografía en columna con AcOEt/Hex 4:6.



**Figura 2-3** Esquema de obtención del derivado **3** en condiciones clásicas

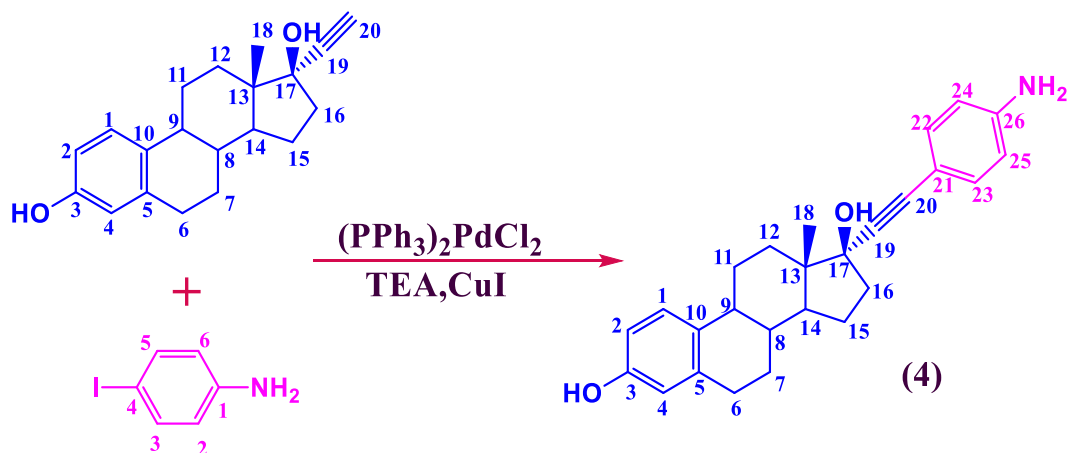
**<sup>1</sup>H-RMN (80 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 0.94 (s, 3H, H-18), 1.09 - 2.57 (m br, 13H, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16), 2.77 (m, 2H, H-6), 6.37 - 6.72 (m, 2H, H-2, H-4), 7.10 (d, J=8.3 Hz, 1H, H1), 7.64 (d, J=8.7 Hz, 2 H, H-22, H-23), 8.22 (d, J=8.7 Hz, 2H, H-24, H-25)

**<sup>13</sup>C ATP-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 13.5 (C18), 23.9 (C15), 27.7 (C11), 28.6 (C7), 30.7 (C6), 34.5 (C16), 39.9 (C12), 41.1 (C8), 45.2 (C9), 48.4 (C13), 51.4 (C14), 80.9 (C17), 84.8 (C19), 100.1 (C20), 113.8 (C2), 116.1 (C4), 124.6 (C24, C25), 127.2 (C1), 131.4 (C21), 132.4 (C10), 133.4 (C22, C23), 138.8 (C5), 148.4 (C26), 155.9 (C3)

**FT-IR (cm<sup>-1</sup>):** 3608, 3430, 3239 (O-H, st), 3104 (C-H aromático, st), 2929, 2862 (C-H cicloalcano, st), 2218 (C≡C, st), 1621, 1593 (O-N=O, st), 1518 (N=O asimétrico, st), 1499, 1463 (C=C, aromático st), 1339 (N=O simétrico, st), 1289 (C-H aromático, bending), 1251 (C-O fenol, st)

#### 2.5.4 Síntesis de la 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) anilina (**4**)

La síntesis de la 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) anilina se llevó a cabo a través de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas (Figura 2-4). Para ello se siguió la misma metodología que para el derivado **1** con las siguientes cantidades: 100 mg (337.38  $\mu$ mol) de EE2, 73.89 mg (337.38  $\mu$ mol) de p-yodoanilina, 5 mg (26.25  $\mu$ mol) de CuI, y 11.84 mg (16.87  $\mu$ mol) de (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>. La reacción se monitoreó por CCF a partir de las 3 horas; y se mantuvo bajo las condiciones establecidas hasta que se alcanzó el equilibrio (4 h). Al finalizar la reacción se adicionó AcOEt (10 mL) para obtener una fase orgánica, ésta se lavó con solución saturada de (NH<sub>4</sub>)Cl, hasta que ya no se observó el azul característico del Cu<sup>2+</sup>. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua destilada (3  $\times$  10 mL) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El AcOEt se removió a vacío y el producto se purificó mediante cromatografía en columna con AcOEt/Hex 4:6.



**Figura 2-4** Esquema de obtención del derivado **4** en condiciones clásicas

**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 0.91 (s, 3H, H-18), 1.13 - 1.53 (m, 4H, H-7, H-8, H-11, H-15), 1.75 - 1.94 (m, 4H, H-7, H-14, H-15, H-16), 1.96 - 2.09 (m, 2H, H-12, H-16), 2.13 - 2.21 (m, 1H, H-9), 2.23 - 2.41 (m, 2H, H-11, H-12), 2.69 - 2.86 (m, 2H, H-6), 6.44 - 6.49 (m 1H, H-4), 6.54 (dt, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H-2), 6.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-22, H-23), 7.06 - 7.17 (m, 3H, H-1, H-24, H-25)

**<sup>1</sup>H-RMN (80 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 0.90 (s, 3H, H-18), 1.11 - 2.60 (m, 13H, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16), 2.77 (m, 2H, H-6), 6.37 - 6.78 (m, 4H, H-2, H-4, H-22, H-23), 6.92 - 7.31 (m, 3H, H-1, H-24, H-25)

**<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 13.6 (C18), 23.8 (C15), 27.8 (C11), 28.7 (C7), 30.8 (C6), 34.4 (C16), 40.0 (C12), 41.3 (C8), 45.2 (C9), 48.8 (C13), 51.0 (C14), 80.9 (C17) 87.3 (C19), 91.3 (C20), 113.0 (C21), 113.7 (C2), 115.8 (C24-C25), 116.0 (C4), 127.3 (C1), 132.6 (C10), 133.6 (C22-C23), 138.9 (C5), 149.4 (C26), 155.9 (C3)

**<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 13.5 (C18), 23.8 (C15), 27.7 (C11), 28.5 (C7), 30.7 (C6), 34.3 (C16), 40.0 (C12), 41.1 (C8), 45.0 (C9), 48.7 (C13), 50.9 (C14), 81.0 (C17) 87.2 (C19), 91.3 (C20), 113.0 (C21), 113.7 (C2), 115.8 (C24-C25), 116.0 (C4), 127.3 (C1), 132.5 (C10), 133.5 (C22-C23), 138.7 (C5), 149.2 (C26), 155.7 (C3)

**FT-IR (cm<sup>-1</sup>):** 3353, 3225 (NH<sub>2</sub>, st), 2923, 2855, (C-H cicloalcano, st), 2180 (C≡C, st), 1716 (C=C, aromático st), 1591 (N-H, bending; C-C aromático, skeletal st), 1497, 1442 (C-C aromático, skeletal st), 1283, 1234, 1175 (C-O fenol, st)



## **2.6 Evaluación del potencial antimicrobiano de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol**

Las pruebas antiparasitarias, antibacteriales y antifúngicas (*Candida albicans*) fueron realizadas por la Dra. Adriana Moreno Rodríguez en de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca (UABJO) bajo las metodologías establecidas en su grupo.

### **2.6.1 Parásitos**

Se utilizaron dos aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*, la cepa Ninoa (MHOM / MX / 1994 / Ninoa), extraída en 1986 de un caso agudo de tripanosomiasis en México; y la cepa TH (ITRI / MX / 2018 / TH), obtenida en 2018 de *Triatoma dimidiata* en Tehuantepec en Oaxaca, México. Las cepas se mantuvieron mediante pases seriados en medio LIT (infusión de hígado y triptona) y un modelo murino (cepa de ratón CD1) en la Universidad Autónoma Benito Juárez; fueron manejados siguiendo las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) NOM-062-ZOO-1993 (Díaz-Chiguer et al., 2012).

### **2.6.2 Evaluación *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Los epimastigotes de los aislados de *T. cruzi* Ninoa y TH utilizados para la evaluación *in vitro* con los diferentes fármacos se obtuvieron manteniéndolos en medio de caldo hígado-triptosa, suplementado con suero fetal bovino al 10 % y penicilina-estreptomicina al 0.1 %. Se realizaron pases consecutivos para su mantenimiento de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL cada ocho días para transferirlos a un nuevo medio.

Se determinó la actividad de los derivados del EE2 **1**, **3** y **4**, Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bz) como controles positivos y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2 % como blanco y control negativo. Todas las moléculas se disolvieron en DMSO al 2 %. Se realizaron diluciones seriadas a concentraciones de 200  $\mu$ M a 0.46  $\mu$ M, utilizando sus pesos moleculares para el cálculo correspondiente. El volumen utilizado en el ensayo fue de 200  $\mu$ L en placas de 96 pocillos, incubando a 28 °C durante 48 h. Luego se agregaron 20  $\mu$ L de MTT para evaluar la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio usado en una concentración de 2.5 mM, incubando durante 4 h, y leyendo la absorbancia a 630 nm. Los resultados se realizaron por triplicado en tres réplicas independientes y la  $CI_{50}$  se determinó mediante análisis probit (Adasme et al., 2020; Moreno-Rodríguez et al., 2014).

### 2.6.3 Ensayo de citotoxicidad

La línea celular de macrófagos de ratón J774.2 se cultivó en medio RPMI suplementado con FBS al 10 %, estreptomina al 0.1 %, a 37 °C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo se reemplazó a intervalos de 2-3 días, según la confluencia celular. Para evaluar la citotoxicidad de los derivados del EE2 **1**, **3** y **4**, se colocaron 50,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se añadieron los derivados del EE2 de 0.8 a 100 µg/mL en un volumen final de 200 µL y las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se incluyó DMSO al 0.2 % (la concentración máxima utilizada) como control negativo; y Nfx y Bz como controles positivos. La actividad metabólica de las células se determinó siguiendo el método de resazurina. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular y se determinó la mitad de la concentración máxima de citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) mediante análisis probit. Se realizaron tres pruebas independientes por triplicado. El índice de selectividad (IS) se calculó con la fórmula:  $CC_{50} / CI_{50}$  (Díaz-Chiguer et al., 2012).

### 2.6.4 Bacterias

Se utilizaron cuatro cepas de bacterias donadas por la Dra. Adriana Moreno Rodríguez de la Facultad de Ciencias Químicas de la UABJO *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection [ATCC] 29203), *Escherichia coli* (64321) y *Pseudomonas aeruginosa* (cepa silvestre).

### 2.6.5 Evaluación antibacteriana *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

Se preparó una solución stock de los derivados del EE2 **1**, **3** y **4** (100 µg/mL) con DMSO al 5 %, a partir de la cual se hicieron diluciones sucesivas para determinar su actividad. Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de micro dilución en caldo como reporta Torres-Rosas et. al (2020); para ello cada cepa se cultivó en medios selectivos, después de la incubación durante la noche, cada cepa se transfirió a agar Mueller-Hinton y se incubó durante 24 horas. La suspensión inicial de cada organismo se emparejó con el estándar 0.5 de McFarland. Posteriormente cada suspensión bacteriana se diluyó a 1:20. En cada microplaca de 96 pocillos se colocó caldo Mueller-Hinton (100 µL) preparado bajo las instrucciones del fabricante, se inocularon 5 µL por pocillo de cada cepa. Se evaluó el efecto de los compuestos de 12.5 a 100 µg/mL en diluciones sucesivas, y para la validez de esta prueba, se utilizaron controles de esterilidad y crecimiento bacteriano. Las pruebas se realizaron en dos experimentos independientes para cada cepa. Las microplacas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se registró la presencia o ausencia de turbidez en cada pocillo. La absorbancia óptica se

determinó a 595 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de bacterias viables en comparación con los controles. Se realizaron subcultivos en placas de agar Mueller-Hinton de los pocillos sin turbidez (Torres-Rosas et al., 2020).

### **2.6.6 Hongos**

Se utilizaron dos cepas de hongos, *Candida albicans* ATCC 14053, donada por la Dra. Adriana Moreno Rodríguez de la Facultad de Ciencias Químicas de la UABJO; y *Botrytis cinerea*, donada por el Dr. Alfonso Vásquez del CIIDIR-Oaxaca.

### **2.6.7 Evaluación antifúngica *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol**

***Evaluación in vitro de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol frente a Candida albicans ATCC 14053:*** Se preparó una solución stock de cada uno de los derivados del EE2 sintetizados con DMSO al 2 %. Para evaluar la actividad antifúngica de los derivados del EE2 **1**, **3** y **4**, se utilizó el método de difusión por disco (Kirby-Bauer) modificado por triplicado. El agar papa dextrosa (BD Bioxon) se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante; posteriormente se esterilizó el medio en autoclave por 20 minutos y se vació en cajas Petri. Una vez solidificado el agar, se realizó la inculación de *Candida albicans* al centro de la caja, y se colocaron los cuatro discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles, asegurando el contacto de los discos con el agar (Cavalieri, 2005). Finalmente, se colocaron los derivados del EE2 a distintas concentraciones 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , así como un control negativo (DMSO) (Adasme et al., 2020). Se incubaron las cajas a  $25 \pm 2$  °C hasta que el hongo cubrió la superficie y se observó si había presencia de halos de inhibición (Cavalieri, 2005).

***Evaluación antifúngica in vitro de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol frente a Botrytis cinerea:*** Se preparó una solución stock de cada uno de los derivados del EE2 (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) con acetona; posteriormente se hicieron diluciones con solución buffer pH 7 para obtener diferentes cantidades de compuesto (50, 75 y 100  $\mu\text{g}$ ), a partir de las cuales se determinó la actividad antifúngica en función de la concentración. Como control negativo se utilizó acetona en la misma proporción que en las diluciones de los compuestos.

Se utilizó un cultivo puro de *Botrytis cinerea* cultivado en agar dextrosa papa (BD Bioxon) al 2 % a 25 °C. La evaluación de la actividad antifúngica de los derivados del EE2 **1**, **3** y **4**, se realizó bajo el método de difusión por disco modificado por triplicado como se describe para *C. albicans*.

## Capítulo 3 Resultados y discusión

### 3.1 Evaluación *in silico* de la actividad y propiedades de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

Como se describe en la metodología, para los derivados propuestos así como la molécula base (EE2) y el TAM, se obtuvieron los índices de probabilidad de actividad ( $Pa$ ) relativa al TAM ( $Pa$  compuesto/ $Pa$  TAM) de la actividad antimicrobiana *in silico*, para lo cual se utilizó el simulador PASSonline considerando la actividad antifúngica, antiparasitaria (*Amoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Tricomonas*, *Schistosoma*, *Histomonas*, *Toxoplasma*), antiviral (*Rhinovirus*, Influenza, *Trachoma*); y antibacterial (*Rickettsia*, *Treponema*). Posteriormente las moléculas fueron analizadas en SwissADME con la finalidad de predecir sus propiedades ADME, semejanza farmacológica y química farmacéutica. La absorción y distribución del fármaco se pudieron determinar a partir de la estimación de algunas otras propiedades fisicoquímicas; mientras que la metabolización y excreción se determinaron por medio de las propiedades de farmacocinética. El análisis en el programa admetSAR permitió obtener los parámetros de ecotoxicidad.

#### 3.1.1 Actividad antimicrobiana de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador Passonline

Como puede observarse en la Tabla 3-1 los derivados propuestos **1**, **2**, **3** y **6**, teóricamente podrían actuar como antimicrobianos de amplio espectro, pues presentarían actividad contra todas las familias de microorganismos en al menos una de sus formas. Mientras que el derivado **4** reduciría su espectro ya que no es activo como antimicótico; y el derivado **5** sería de espectro reducido, debido a que únicamente presenta probabilidad de actividad antifúngica. No obstante, con la finalidad de establecer una jerarquía para su síntesis se estableció una matriz priorizando en función de la *Par* y el número de actividades teóricas (ver Anexo 2), de tal forma que la prioridad de síntesis quedó como **4** > **3** > **2** > **1** > **6** > **5**. Donde el derivado **4**, a pesar de no ser potencialmente activo contra hongos, sería el más potente como antibacterial y antiviral, y el segundo mejor antiparasitario; mientras que el derivado **3** presentaría la mayor actividad antiparasitaria, la segunda mejor antifúngica y la cuarta antiviral y antibacterial.

**Tabla 3-1** Probabilidad de actividad antimicrobiana relativa al TAM (Par) de los derivados del EE2

Molécula	Antifúngica	Actividad				
		Antibacterial			Antiviral	
		<i>Rickettsia</i>	<i>Treponema</i>	<i>Rhinovirus</i>	<i>Influenza</i>	<i>Trachoma</i>
1	179	187	120	1	1.3	0
2	172	159	114	0.8	1	0
3	183	202	0	0	1.0	0
4	0	194	132	0	1.4	89
5	266	0	0	0	0	0
6	169	156	111	0	1.0	0
7	0	48	113	0	0.9	0
8	1	1	1	1	1	1

Molécula	Actividad						
	Antiparasitaria						
	Antiprotozoarios					Antihelmínticos	
	<i>Amoeba</i>	<i>Histomonas</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Schistosoma</i>
1	0.9	0	0	0	0	1	0
2	1	0	271	201	0	1	0
3	1.4	80	308	177	0	1.3	142
4	0.9	0	0	204	180	1	115
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0.9	0	268	198	0	1	0
7	0.9	0	239	0	0	0.9	0
8	1	1	1	1	1	1	1

\*Los datos de probabilidad arrojados por el programa se encuentran en el Anexo 1

### 3.1.2 Propiedades fisicoquímicas de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador SwissADME

Las propiedades fisicoquímicas obtenidas del simulador SWISSADME se muestran en la Tabla 3-2; mientras que los parámetros de lipofilidad y solubilidad en agua se muestran en la Tabla 3-3. Estas propiedades son descritas por modelos y reglas que permiten estimar algunas propiedades ADME, especialmente las relacionadas con el cruce de barreras biológicas, como la absorción y acceso al cerebro (Daina, Michielin, et al., 2017). También permiten evaluar la semejanza farmacéutica (Tabla 3-4), misma que representa la posibilidad de que una molécula se convierta en medicamento de administración oral y difusión pasiva en función del número de violaciones a las reglas establecidas por las principales compañías farmacéuticas como Pfizer (Lipinski), Amgen (Ghose), GSK (Veber), Pharmacia (Egan) y Bayer (Mueggue).

**Tabla 3-2** Propiedades fisicoquímicas de los derivados del EE2

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>							
Molécula	PM, g/mol	No. de átomos	No. de enlaces rotatorios	No. aceptores de H	No. donadores de H	RM	TPSA, Å <sup>2</sup>
1	416.51	59	1	4	3	120.29	77.76
2	388.50	56	0	3	3	115.35	60.69
3	417.50	58	1	4	2	122.15	86.28
4	387.51	58	0	2	3	117.73	66.48
5	400.51	57	1	3	2	118.72	57.53
6	372.50	56	0	2	2	113.33	40.46
7	296.40	46	0	2	2	88.84	40.46
8	371.51	57	8	2	0	119.72	12.47

**Tabla 3-3** Parámetros de lipofilidad y solubilidad de los derivados del EE2

<b>Parámetros de lipofilidad y solubilidad</b>						
Molécula	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Solubilidad, <sup>1</sup> Log S	Solubilidad, <sup>2</sup> (mg/mL)	Solubilidad cualitativa <sup>3</sup>
1	4.97	4.81	4.41	-5.99	4.94E-04	Moderada
2	5.09	4.82	4.32	-5.93	4.79E-04	Moderada
3	5.27	5.02	3.85	-6.22	3.65E-04	Moderada
4	4.76	4.7	4.32	-5.86	6.28E-04	Moderada
5	4.91	4.92	4.18	-5.98	5.37E-04	Moderada
6	5.44	5.11	4.93	-6.15	3.09E-04	Pobre
7	3.67	3.69	3.9	-4.15	2.14E-02	Moderada
8	7.14	6	5.1	-7.58	3.94E-05	Pobre

<sup>1</sup>Se reporta el promedio de resultados los tres modelos mostrados por el simulador.

<sup>2</sup>Se reporta el promedio de resultados los tres modelos mostrados por el simulador.

<sup>3</sup>Se reporta la moda de resultados de los tres modelos mostrados por el simulador.

**Tabla 3-4** Violaciones a las reglas de semejanza farmacéutica de los derivados del EE2

<b>Semejanza farmacéutica</b>							
Molécula	No. de violaciones a las reglas					ABS	
	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge		
1	1	0	0	0	0	0.56	
2	1	0	0	0	1	0.55	
3	0	0	0	0	1	0.55	
4	1	0	0	0	0	0.55	
5	1	0	0	0	0	0.55	
6	1	0	0	0	1	0.55	

7	0	0	0	0	0	0.55
8	1	1	0	1	1	0.55

En el caso de la evaluación de la regla de Lipinski (Tabla 3-4), el peso molecular de los derivados propuestos no excede de 417.50 g/mol; y el número máximo de aceptores y donadores de hidrógeno es 4 y 3 respectivamente, por lo cual todos los derivados cumplen con tres de los cuatro parámetros establecidos en esta regla. En cuanto al parámetro de lipofilicidad, se marca 1 violación para los derivados **1**, **2**, **4**, **5** y **6** debida a que el valor de MLOGP se encuentra por arriba de 4.15. Sin embargo, los valores obtenidos para estos derivados no están muy alejados de ese valor, y están por debajo del valor para el TAM, por lo que no se prevén problemas de permeabilidad en la membrana.

Respecto a la regla de Ghose (Tabla 3-4), ninguno de los derivados propuestos viola alguno de los parámetros establecidos en esta regla. El peso molecular de los compuestos se encuentra en un rango de 417.50 y 387.51 g/mol; la lipofilicidad (WLOGP) entre 4.70 y 5.1; la refractividad molar entre 113.33 y 120.29; y el número de átomos va de 56 a 59. Por su parte, el compuesto de referencia 8 (TAM) presenta una violación a esta regla, debido a que el valor de lipofilicidad (WLOGP) supera el valor máximo permisible de 5.6.

En cuanto a las reglas de Veber y Egan (Tabla 3-4), todos los derivados propuestos se encuentran dentro de los parámetros establecidos, por lo cual sugiere que todos los derivados propuestos tendrán la capacidad de permear la membrana celular, presentarán absorción intestinal pasiva y tendrán buena biodisponibilidad oral (Egan et al., 2000; Veber et al., 2002). Sin embargo, el compuesto de referencia 8 (TAM) presenta una violación a esta última regla, debido a que el valor de lipofilicidad sobrepasa el máximo permisible (5.88) con un valor cercano a éste de 6.

En cuanto a la regla de Muegge (Tabla 3-4), al igual que en la regla de Lipinski, los compuestos propuestos cumplen con la mayoría de los parámetros, pero se presenta una violación a la lipofilicidad (XLOGP), ya que los derivados **2**, **3** y **6** muestran valores de 5.09, 5.27 y 5.44 respectivamente; mismos que son ligeramente superiores al valor máximo de 5 establecido en esta regla, por lo cual tampoco se prevén problemas de permeabilidad. Por otra parte, el compuesto de referencia 8 también presenta una violación debida a la lipofilicidad que sobrepasa el valor máximo permisible con un valor de 7.14, no obstante, es de uso comercial.

En relación con la solubilidad de una molécula (Tabla 3-3), ésta facilitará principalmente el manejo y formulación del posible fármaco, además, para fármacos pensados para una administración oral por difusión pasiva, este parámetro define la facilidad de absorción del fármaco en membranas celulares

(Daina et al., 2014). Como se puede observar, solo el derivado propuesto 6 y el compuesto de referencia 8 presentan baja solubilidad debido a las sustituciones bencílicas, lo cual se corrobora con los valores de lipofilidad que presentan estos compuestos.

Referente al puntaje de biodisponibilidad (ABS, Tabla 3-4) entendido como la probabilidad de que un compuesto tenga una biodisponibilidad en ratas y/o permeabilidad medible en células Caco-2 mayor al 10 %, y que está sujeto a la carga predominante en un pH biológico (Martin, 2005); el derivado 1 presenta un valor de 0.56 debido a que tiene una TPSA de 77.76 Å<sup>2</sup> y se considera que a pH biológico es capaz de generar un anión, mientras que el resto de los derivados tienen un valor del 0.55 debido a que se consideran moléculas neutras, de ion híbrido o catiónicas. Por lo tanto, todos los derivados propuestos e incluso los compuestos de referencia presentan un puntaje de 0.55, lo que indica que el 55 % del posible fármaco llegará a su sitio de acción (Martin, 2005; Rey, 2001).

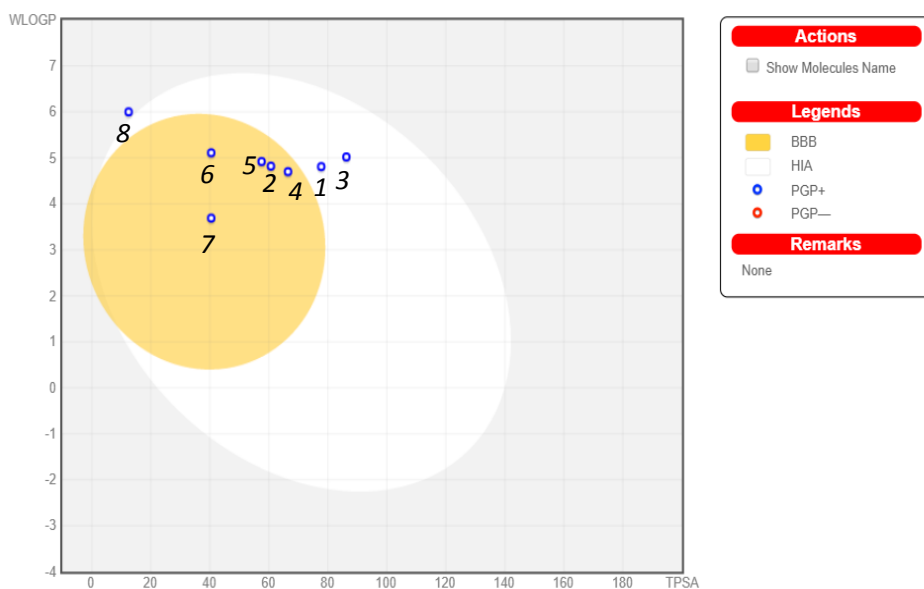
### **3.1.3 Propiedades de farmacocinética de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol en el simulador Swiss ADME**

Los parámetros de farmacocinética se muestran en la Figura 3-2 y Tabla 3-5. En la Figura 3-2 se observa gráficamente que todos los derivados propuestos son candidatos de absorción gastrointestinal pasiva (HIA) y que los compuestos 1 y 3 no tendrán permeabilidad pasiva a través de la membrana hematoencefálica (BBB) como los derivados 2, 4, 5 y 6. Lo cual, haría a estos últimos buenos candidatos para el tratamiento de infecciones a nivel cerebral. Además, en la Figura 3-2, mediante la representación de los derivados en color azul; se reportan de manera cualitativa como sustrato de la glicoproteína P (PGP+), lo cual indica que los compuestos tendrán un flujo de salida activo de las membranas biológicas y que podrán liberarse del sistema nervioso central (SNC). Por lo cual, no se prevén problemas de acumulación del fármaco en el SNC y por ende se evitaría la acentuación de efectos adversos (Brunton et al., 2007).

La inhibición de los principales citocromos P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4) permite inferir cómo será la eliminación del fármaco mediante la biotransformación metabólica (Ver Tabla 3-5), así como los posibles efectos adversos debidos a la acumulación del fármaco o de sus metabolitos. En este caso, los derivados 1, 2, 5 y 6 tienen mayor probabilidad de permanecer en el organismo aumentando en consecuencia su concentración y eficacia terapéutica; mientras que el derivado 4 no inhibe ni activa esos citocromos lo cual podría resultar en acumulación de éste en el organismo



aumentando la eficacia terapéutica y/o causando toxicidad. Sin embargo, esto dependerá de la dosis y capacidad del compuesto de unirse a la enzima CYP-450 (Santoyo et al., 2014).



**Figura 3-2** Representación de huevo hervido para los derivados propuestos del EE2, EE2 y TAM

Respecto a la farmacocinética, el simulador SwissADME determina el coeficiente de permeabilidad en piel (log KP) (Tabla 3-5), el cual entre más negativo sea nos indicará menor permeabilidad. Para los derivados propuestos la tendencia de permeabilidad en piel es la siguiente: 6 > 2 > 3 > 5 > 4 > 1 y en todos los casos se mejora la absorción con respecto a los compuestos de referencia 7 (EE2) y 8. Por lo tanto, podemos decir que los derivados propuestos también podrían actuar como antimicóticos locales, es decir, de administración tópica.

**Tabla 3-5** Parámetros de farmacocinética de los derivados del EE2

Molécula	Inhibidor de CYP1A2	Inhibidor de CYP2C19	Inhibidor de CYP2C9	Inhibidor de CYP2D6	Inhibidor de CYP3A4	log Kp (cm/s)
1	Si	No	Si	No	No	-5.31
2	Si	No	Si	No	No	-5.06
3	No	No	Si	No	No	-5.11
4	No	No	No	No	No	-5.28
5	Si	No	Si	No	No	-5.26
6	No	No	Si	Si	No	-4.71
7	No	No	Si	Si	No	-5.50
8	No	Si	No	Si	No	-3.50

Por otro lado, los resultados obtenidos de las alertas estructurales para la química medicinal (Tabla 3-6) permiten identificar fragmentos potencialmente problemáticos (Daina, Michielin, et al., 2017). En el

caso de los compuestos de interferencia del ensayo PAN [PAINS, por sus siglas en inglés (PAN-Asay Interference Compounds)], no se mostró ninguna alerta, lo que significa que las moléculas propuestas no contienen subestructuras con potente respuesta a proteínas biológicas diferentes a su proteína objetivo.

**Tabla 3-6** Alertas estructurales para la química medicinal de los derivados del EE2

Molécula	No. de alertas PAINS	No. de alertas de Brenk	Violaciones de semejanza farmacéutica	Accesibilidad sintética
1	0	1	2	4.84
2	0	1	2	4.87
3	0	3	2	4.87
4	0	2	2	4.76
5	0	2	2	4.82
6	0	1	2	4.81
7	0	1	1	4.01
8	0	1	3	3.01

Las alertas de Brenk refieren a fragmentos estructurales identificados como tóxicos, reactivos, metabólicamente inestables o con propiedades de farmacocinética deficiente. Todos los derivados propuestos e incluso el EE2 muestran una alerta estructural debida al triple enlace de la posición 17, ya que induce la formación de estructuras planas facilitando la intersección en las zonas planas del ADN (Navarrete-Vázquez, 2016). Sin embargo, se sabe que moléculas como la capillina A, la dactilina y la Terbinafina (origen sintético y uso comercial), cuentan con esos grupos en su estructura y poseen actividad antimicrobiana sin reportes de daño al ADN (Azerang et al., 2012; Kaul & Kulkarni, 1978; Masuda et al., 2015). Así mismo, el derivado **3** muestra dos alertas más debidas al doble enlace N=O y al enlace sencillo N-O del grupo nitro; ya que esta funcionalidad se considera mutagénica; sin embargo, existen algunos fármacos de uso común para el tratamiento de infecciones bacterianas y parasitarias, como el nifurtimox, metronidazol, tinidazol, etc.; que cuentan con el grupo nitro en su estructura, debido a que su alta reactividad y toxicidad induce un mayor porcentaje de muerte en los organismos patógenos, resultando mayor el beneficio que el daño causado. Por lo anterior, se considera que las alertas en las moléculas propuestas no son razón para descartarlas. Por su parte, el derivado **4** muestra una alerta más debida a la alta reactividad de la anilina y a la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos de la cadena principal de los aminoácidos, además de que las aminas primarias y secundarias tienden a reaccionar con la carga negativa en las membranas de las células y generar lisis de manera inespecífica, no obstante, existen estrategias para substituir la amina y reducir su toxicidad,

por ejemplo, la N-alkilación con algún acrilato. Por último, el derivado 5 en adición a la alerta por el triple enlace  $C\equiv C$ , marca una alerta más por la reactividad del aldehído frente a las aminas (Brenk et al., 2008).

El parámetro de violaciones a la semejanza farmacéutica (Tabla 3-6) establece los límites fisicoquímicos para que una molécula sea susceptible para optimización, es decir, cuando una molécula propuesta puede modificarse para mejorar sus parámetros. En el caso de las moléculas propuestas, todas presentan dos violaciones, (cabe aclarar que éstas son independientes de las reglas de Lipinsky, Veber, etc.) ya que el peso molecular es mayor a 350 g/mol y el XLOGP es mayor a 3.5 (Teague et al., 1999), lo que limita futuras modificaciones estructurales con la finalidad de mejorar sus parámetros fisicoquímicos o potenciar su actividad, es decir, considerando los límites establecidos por las diferentes reglas los derivados ya no serían susceptibles de mejoras estructurales.

Tomando en cuenta únicamente los parámetros fisicoquímicos y de farmacocinética se estableció una matriz de prioridad en función de las estimaciones otorgadas por el simulador mediante el cumplimiento de las reglas establecidas por las principales compañías farmacéuticas y la predicción de farmacocinética (ver Anexo 3), de modo que a los compuestos propuestos se les asigna la siguiente prioridad de síntesis  $4 > 2 > 1 > 5 > 3 > 6$ . Sin embargo, debido a la complejidad de las reacciones y efectos secundarios a nivel cerebral, los derivados con potencial de cruzar la BBB serán considerados en segundo término. Por lo cual, la prioridad de síntesis se modifica anteponiendo aquellos derivados que son incapaces de acceder a la BBB, quedando de la siguiente manera  $1 > 3 > 4 > 2 > 5 > 6$ . Donde el compuesto **1** viola únicamente la regla de Lipinski en cuanto a la lipofilidad con un valor muy cercano al límite máximo, es incapaz de acceder a la BBB, es inhibidor de dos CYP (CYP1A2 y CYP2C9) encargados de la metabolización de fármacos y esteroides, lo cual conllevaría a un aumento de la actividad terapéutica, y presenta la mayor biodisponibilidad (ABS). Mientras que el derivado **3** se eligió como el segundo en prioridad de síntesis, a pesar de la alerta estructural por el grupo nitro, por su similitud con compuestos de uso actual, por su inhibición del CYP2C9, y porque es incapaz de acceder a la BBB. Los derivados **4**, **2**, **5** y **6** fueron asignados con esa prioridad debido a que teóricamente podrían acceder a la BBB y al grado de lipofilidad que presentan, lo que podría generar problemas de permeabilidad.

### **3.1.4 Ecotoxicidad de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol**

Los datos de biodegradación y ecotoxicidad se presentan en la Tabla 3-7. En cuanto a la biodegradación, las probabilidades exhibidas, en un rango de 0 a 1, por todos los derivados propuestos son superiores al

0.77. En cuanto a toxicidad, ésta se evalúa como probabilidad de toxicidad en abejas, crustáceos y peces, y en *Tetrahymena pyriformis*, como pIGC50. Todos los derivados presentan probabilidades superiores al 0.50 de toxicidad para especies como las abejas, crustáceos y peces, siendo los derivados **3** y **4** los de menor riesgo para las abejas, y los derivados **1** y **3** para los crustáceos, mientras que para los peces todos los derivados exhiben una probabilidad de toxicidad por encima del 0.98. Para *Tetrahymena pyriformis*, los valores de pIGC50 muestran que se requiere mayor concentración de los derivados **3** y **5** para eliminar el 50 % de la población, es decir, son los compuestos menos tóxicos para este protozooario (F. Cheng et al., 2012). Sin embargo, no se debe perder de vista que si el fármaco realiza su actividad no se generaran desechos a través de la orina y las heces fecales que puedan llegar al medio ambiente, y deberíamos considerar que se dará un buen manejo a los compuestos para impedir que se desechen al medio ambiente.

**Tabla 3-7** Parámetros de ecotoxicidad de los derivados del EE2 expresados como probabilidad

Molécula	Biodegradación	Toxicidad en abejas	Toxicidad acuática para crustáceos	Toxicidad acuática para peces	<i>Tetrahymena pyriformis</i> , pIGC50 (µg/L)	
1	-	0.8000	+ 0.7204	+ 0.5100	1.0000	0.5830
2	-	0.7750	+ 0.6836	+ 0.7500	+ 0.9963	1.1680
3	-	0.8000	- 0.5581	- 0.5100	+ 0.9971	1.5320
4	-	0.8500	- 0.5450	+ 0.7600	+ 0.9886	0.6840
5	-	0.7750	+ 0.6693	+ 0.6200	+ 0.9973	1.1990
6	-	0.8250	+ 0.6901	+ 0.7400	+ 0.9947	1.1600
7	-	0.8750	+ 0.7254	+ 0.7900	+ 0.9886	1.1820
8	-	0.9750	+ 0.6845	+ 0.5400	+ 0.8588	1.0480

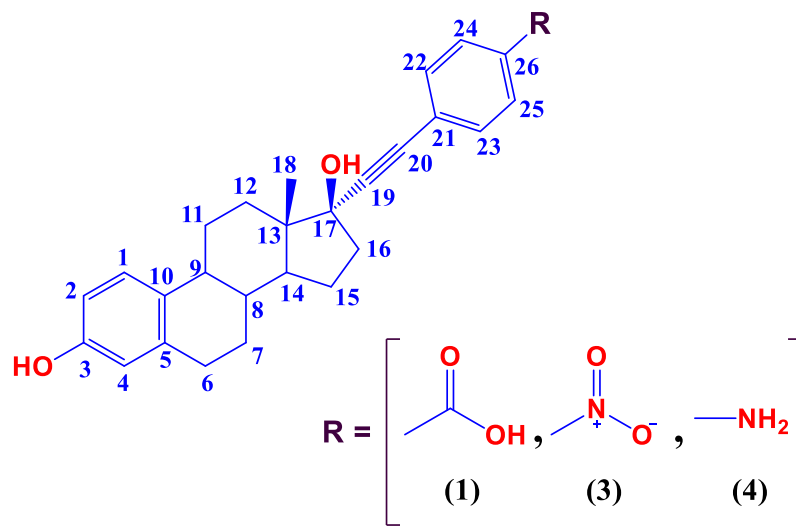
Considerando únicamente los resultados obtenidos de la evaluación teórica de ecotoxicidad, se estableció una matriz de priorización en función de la probabilidad (ver Anexo 4), de tal forma que la prioridad de síntesis de los derivados es **3 > 4 > 5 = 6 > 2 > 1**; donde el compuesto **3** es el que presenta menor probabilidad de ecotoxicidad. No obstante, debemos considerar que la toxicidad está fuertemente ligada a la bioactividad de los compuestos, es imposible pensar que un fármaco es inocuo, ya que entonces no tendría actividad antimicrobiana, sin embargo, debemos inclinarnos a los que puedan generar la mayor actividad con las menores ecotoxicidades.

Teniendo en consideración las prioridades de síntesis establecidas con las determinaciones teóricas y que el objetivo es proponer moléculas con potencial actividad antimicrobiana de administración oral que actúen a nivel sistémico en general, se absorban a nivel gastrointestinal, lleguen a la circulación

general y que ejerzan su acción antes de ser degradados por el hígado y eliminados del organismo (Brunton et al., 2007); así como, que presenten menor probabilidad de ecotoxicidad; se estableció una prioridad de síntesis final de los derivados del EE2, siendo  $4 > 3 > 2 > 1 > 6 > 5$  (Anexo 5). Sin embargo, se sintetizó el compuesto **1** en lugar de 2 debido a que se contaba con antecedentes previos de la ruta de síntesis y de la actividad biológica contra *T. cruzi* en la cepa Querétaro (Juárez-Chávez et al., 2019).

### 3.2 Síntesis y caracterización de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

Con base en el orden de prioridad de síntesis establecido a partir de las determinaciones teóricas, se obtuvieron por medio de una reacción de Sonogashira los tres derivados con mayor prioridad. En la Figura 3-3 se muestra la estructura general de los derivados **1**, **3** y **4**.



**Figura 3-3** Estructura general de los derivados sintetizados

**Síntesis del ácido 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) benzoico (1):** Para la obtención del derivado **1** se probaron diferentes condiciones de reacción; se varió la temperatura y tiempo de reacción, tipo de catalizador y disolventes, en condiciones clásicas y no clásicas.

Durante los primeros experimentos, en condiciones no clásicas, se utilizó únicamente THF como medio de reacción; sin embargo, se pudo observar que para incrementar el porcentaje de conversión era importante agregar MeCN en proporción 1:1 con el THF, como disolvente; así como mantener el sistema de reacción sobrecalentado a una temperatura promedio de 76 °C y no sólo temperatura de ebullición (66 °C) como menciona Gabano et. al (2005).

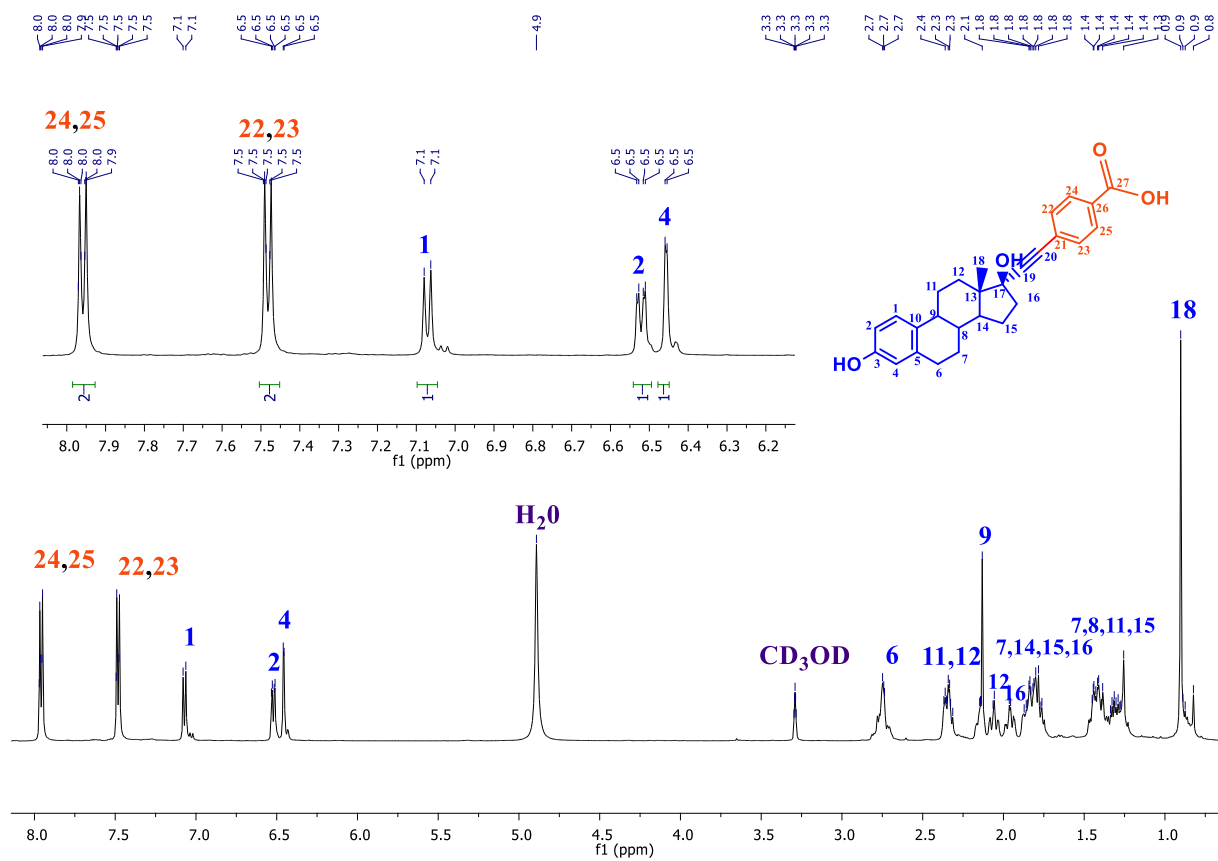
Finalmente, el compuesto **1** se obtuvo mediante de una reacción de Sonogashira en condiciones no clásicas, similares a las reportadas por Gabano et al. (2005), con un porcentaje de conversión promedio de 37.3 %, antes de purificación, con un tiempo de reacción promedio de 24 horas y a temperatura de 76 °C.

Con el fin de incrementar el porcentaje de conversión se cambiaron las condiciones de reacción a un sistema en condiciones clásicas (TEA y CuI), obteniendo un porcentaje de conversión promedio del 68.20 %, y un rendimiento del 61.63 % después de purificar en columna; en un tiempo de reacción de 18 a 24 horas a 89 °C. De manera análoga, se probaron condiciones similares a las clásicas, manteniendo la misma temperatura (89 °C) y agregando Ag<sub>2</sub>O como cocatizador, sin embargo, el porcentaje de conversión promedio antes de purificación disminuyó a 56.90 %, y el tiempo de reacción fue de 23 horas.

En todas las condiciones de reacción evaluadas se obtuvo el mismo producto como un sólido de color amarillo, con un punto de fusión de 148-149 °C, y un factor de retención (Rf) de 0.34 con AcOEt/Hex 4:6; el cual fue caracterizado por RMN (80 y 500 MHz) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y por ATR-FTIR. En la Tabla 3-8 se muestran los desplazamientos químicos de las señales características y distintivas del compuesto **1** a 500 MHz; mientras que en la Figura 3-8 se muestra el espectro de ATR-FTIR y en la Tabla 3-9 los máximos de absorción obtenidos en esta técnica espectroscópica.

La asignación de las señales tanto en protón como en carbono se realizaron empleando técnicas de RMN en 2D, y la asignación del EE2 en la literatura (França et al., 2017). En el espectro de <sup>1</sup>H del compuesto **1** (Figura 3-4), inicialmente en la región de los aromáticos se asignaron las señales 1, 2 y 4 del anillo aromático del EE2 (con base en la literatura y las integraciones), así como las correspondientes al anillo acoplado en el alquino terminal (con base a los desplazamientos teóricos) 22, 23, 24 y 25. Con estas señales asignadas y con ayuda del espectro en 2D, HETCOR, Figura 3-5, se asignaron los carbonos correspondientes (1, 2, 4, 22-25), lo que permitió asignar los carbonos 3, 5, 6, 21 y 26 con valores teóricos calculados, así como el carbono 27 (más desplazado por el ácido carboxílico). Los carbonos 17, 19 y 20, todos ellos cuaternarios son fácilmente asignados con base en los desplazamientos teóricos, ya que la zona es completamente distinguible (75 - 100 ppm). Posteriormente, considerando la asignación del espectro de <sup>1</sup>H del EE2, se asignaron las señales correspondientes a los protones alifáticos, y con ayuda del HETCOR y un espectro de carbono que permite diferenciar entre carbonos cuaternarios, terciarios, secundarios y primarios, como es el ATP o el Pendant (Figura 3-6), se realizó la asignación del resto de los carbonos. Cabe resaltar que los espectros obtenidos a 80 MHz permiten ver claramente los productos

de acoplamiento (ver Anexo 6 y 7), incluso el espectro de  $^{13}\text{C}$  tiene una coincidencia casi exacta con aquel obtenido en un equipo de 500 MHz (ver Tabla 3-8 y Anexo 8).



**Figura 3-4** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado **1**

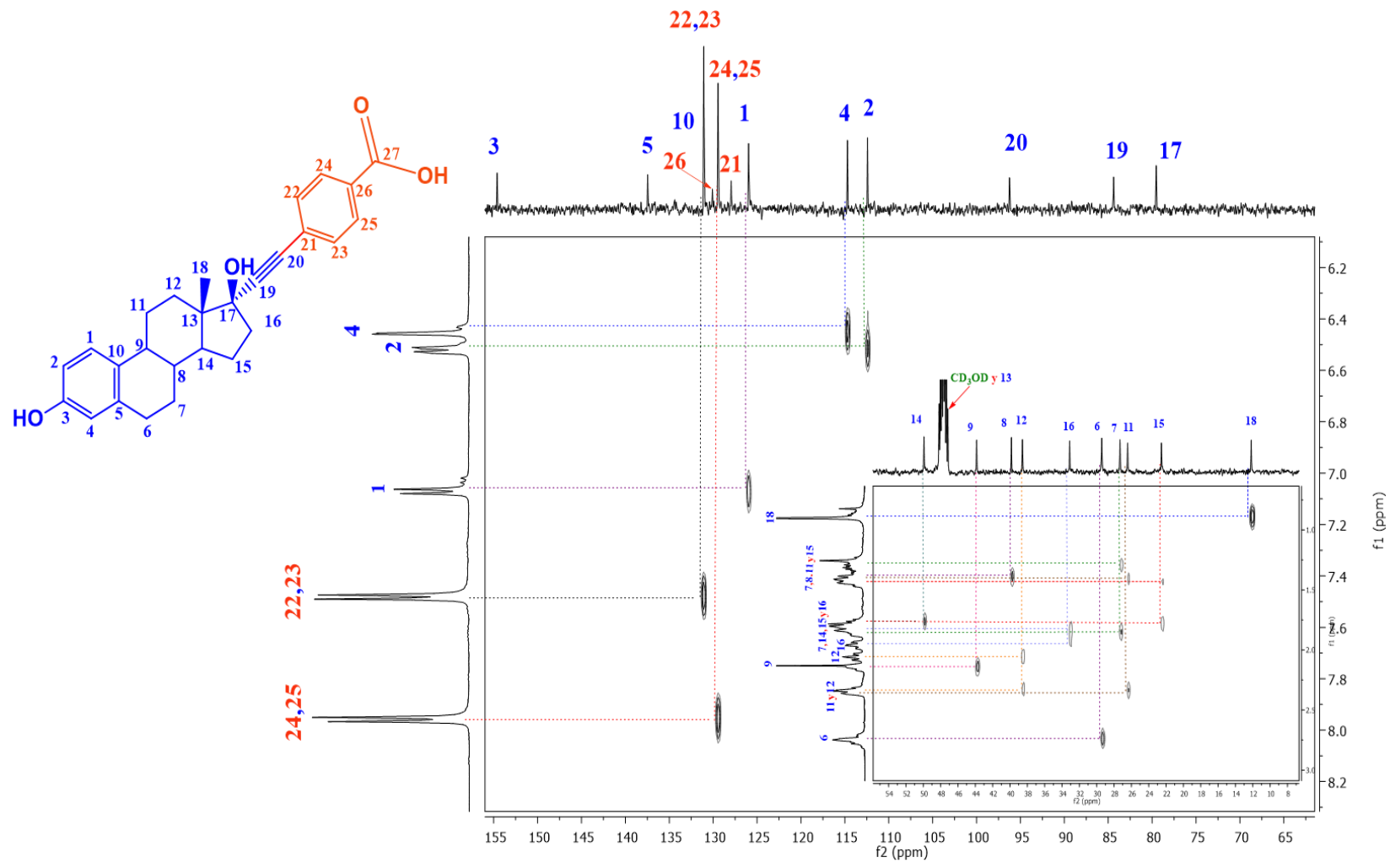


Figura 3-5 Espectro HETCOR-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del derivado 1



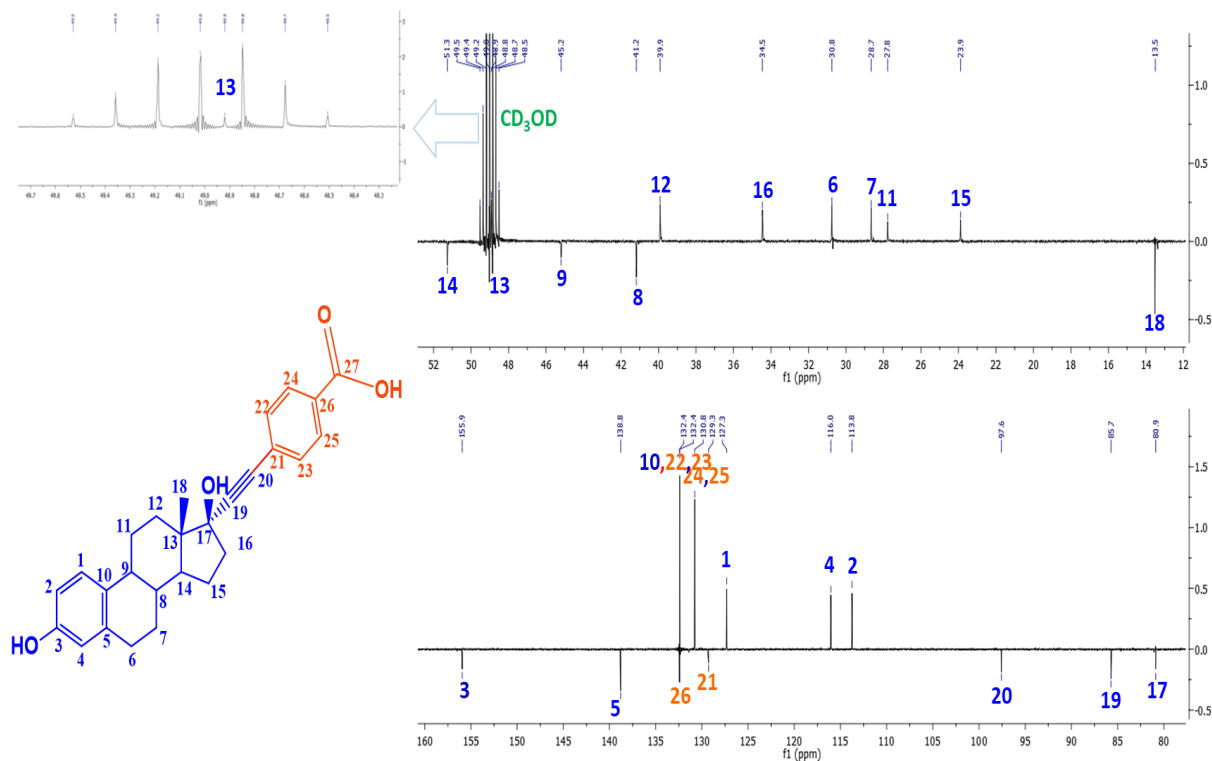


Figura 3-6 Espectro PENDANT- $^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado 1

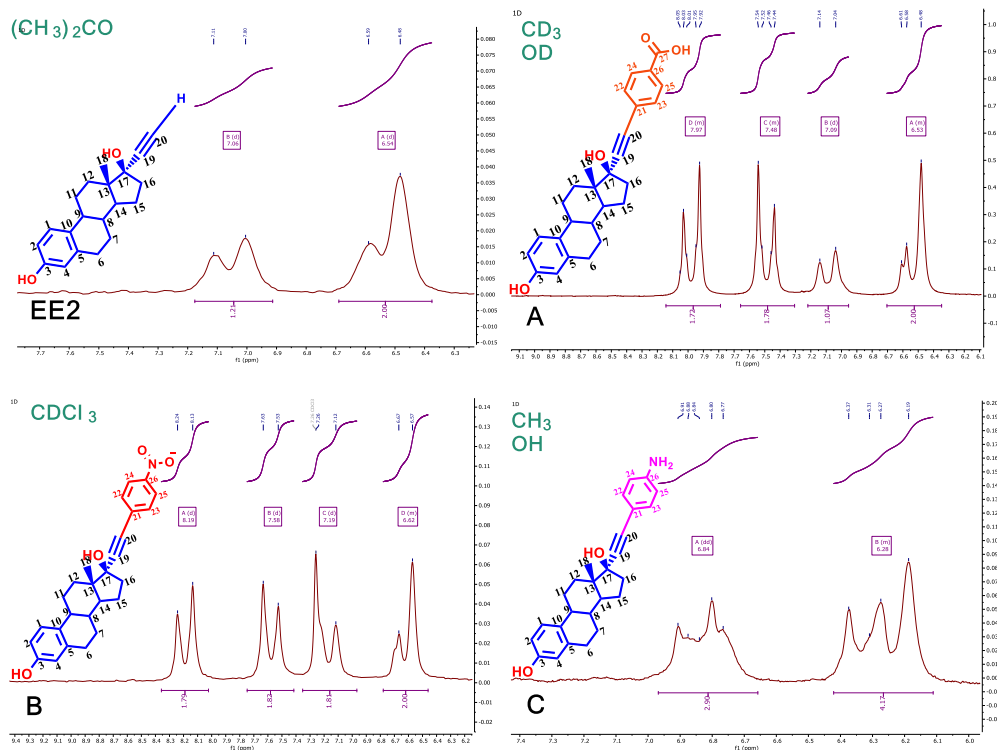


Figura 4-7 Región aromática de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del EE2 y derivados 1, 3 y 4

Eliminad

En la Figura 3-4 se observa el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del producto de acoplamiento **1**, la presencia del anillo aromático del ácido benzoico acoplado al EE2 se evidencia por las señales múltiples de 7.48 - 7.54 y 7.95 - 8.02 ppm, asociadas a los protones H-22 y H-24. Además, ambas señales integran para dos protones, como se espera, ya que las señales correspondientes al anillo aromático del EE2 en 6.54, y 7.09 ppm integran para los protones H-1, H-2 y H-4 (Figura 3-7). Las señales que dan cuenta inequívoca de que el acoplamiento se llevó a cabo son las de los carbonos 17, 19 y 20, que para el EE2 se encuentran en 80.0, 87.6 y 74.2 ppm, respectivamente, mientras que en el compuesto **1** se encuentran en 80.9, 85.7 y 97.6 ppm. Además, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  se asignaron las señales aromáticas para el fragmento del ácido benzoico y la señal en 169.4 ppm el carbonilo del ácido.

**Tabla 3-8** Desplazamientos químicos de las señales características de los derivados del EE2

Derivado	Posición	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (ppm) (multiplicidad, J en Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta_{\text{C}}$ (ppm)
<b>1<sup>1</sup></b>	1	7.11 (d, J=8.5 Hz) [7.09 (d, J=8.5Hz)]	127.3 (127.3)
	2	6.54 (d, J=8.2 Hz) [6.54 (dd, J=8.4, 2.7 Hz)]	113.7 (113.7)
	4	6.54 (d, J=8.2 Hz) [6.48 (d, J=2.6 Hz)]	116.1 (116.0)
	17	-	80.9 (80.9)
	18	0.93 (s) [0.92 (s)]	13.5 (13.5)
	22, 23	7.51 (d, J=8.4 Hz) [7.48-7.54 (m)]	132.4 (132.4)
	24, 25	7.99 (d, J=7.9 Hz) [7.95 – 8.02 (m)]	130.7 (130.8)
	26	-	131.3 (131.0)
	27	-	169.3 (169.4)
<b>3</b>	1	7.10 (d, J=8.3 Hz)	127.2
	2	6.37 – 6.72 (m)	113.8
	4	6.37 – 6.72 (m)	116.1
	17	-	80.9
	18	0.94 (s)	13.5
	22, 23	7.64 (d, J=8.7 Hz)	133.4
	24, 25	8.22 (d, J=8.7 Hz)	124.6
	26	-	148.4
<b>4</b>	1	6.92-7.31 (m) [7.06 – 7.17 (m)]	127.3 (127.3)
	2	6.37-6.78 (m) [6.54 (dt, J=8.5, 2.4 Hz)]	113.7 (113.7)
	4	6.37-6.78 (m) [6.44 – 6.49 (m)]	116.0 (116.0)
	17	-	81.0 (80.9)
	18	0.90 (s) [0.91 (s)]	13.5 (13.6)
	22, 23	6.37-6.78 (m) [6.62 (d, J=8.5 Hz)]	133.5 (133.6)
	24, 25	6.92-7.31 (m) [7.06 – 7.17 (m)]	115.8 (115.8)
	26	-	149.2 (149.4)

<sup>1</sup>Se presentan entre corchetes y paréntesis los datos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos en el equipo de RMN de 500 MHz respectivamente

**Síntesis de 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) nitrobenzeno (3):** El compuesto **3** se sintetizó a través de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas obteniendo un 62.2 % de conversión en 15.8 horas; con un Rf de 0.61 en un sistema de elución AcOEt/Hex 4:6. El compuesto obtenido fue un sólido de color

amarillo con punto de fusión de 118-119 °C; el cual se caracterizó por ATR-FTIR y RMN por RMN (80 MHz) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

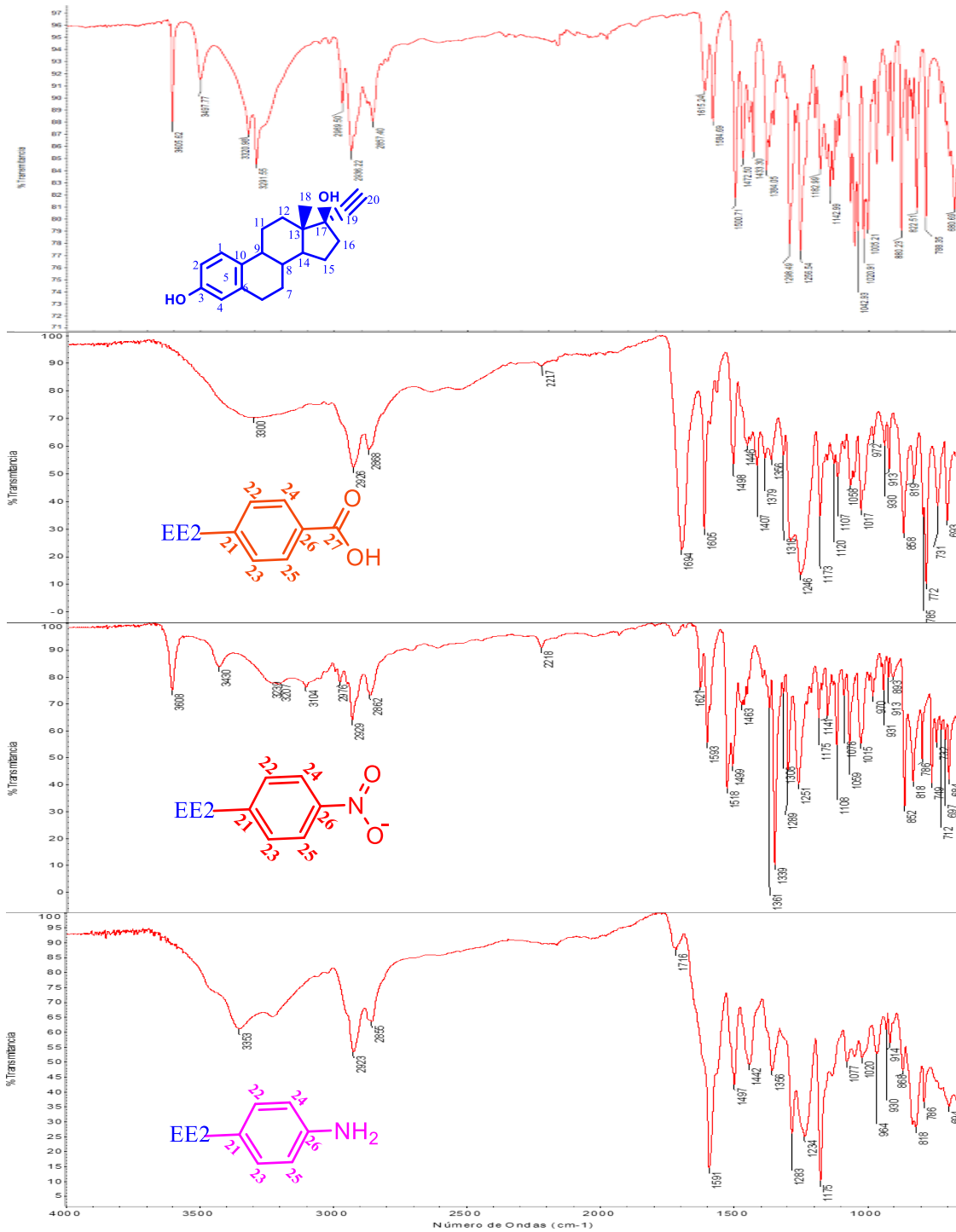
En la Tabla 3-8 se muestran los desplazamientos químicos de las señales características y diferenciadas del compuesto **3**; mientras que en la Tabla 3-9 se muestran los datos obtenidos por espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR) (Figura 3-8). En la Figura 3-7 se observa la presencia del anillo aromático del nitrobenzono en 7.64 y 8.22 ppm mediante señales dobles (ver espectro completo en Anexo 9). Referente al espectro de ATP- $^{13}\text{C}$  (20 MHz), se asignaron las 26 señales de los carbonos presentes en la estructura (ver Anexo 10); y se pudo observar que las señales de los carbonos 17, 19 y 20 del derivado se encuentran desplazadas a 80.9, 84.8 y 100.1 ppm. Además, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  se asignaron las señales para el fragmento del nitrobenzono en 131.4, 133.4, 124.6 y 148.4 ppm, que corresponden a los carbonos 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del anillo aromático.

**Síntesis de 4-(17- $\alpha$ -etinilestradiol) anilina (4):** El compuesto **4** se sintetizó a través de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas obteniendo un 70.84 % de conversión en 4 horas; con un Rf de 0.35 en un sistema de elución AcOEt/Hex 4:6. El compuesto obtenido fue un sólido de color ocre con punto de fusión de 140-141 °C, que vira a color naranja al exponerlo a radiación UV a 365 nm; y que se caracterizó por RMN (500 y 80 MHz) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y por ATR-FTIR.

En la Tabla 3-8 se muestran los desplazamientos químicos de las señales características y diferenciadas del compuesto **4**; mientras que en la Tabla 3-9 y Figura 3-8 se muestran los datos obtenidos de la técnica espectroscópica de ATR-FTIR. En la Figura 3-7 se puede corroborar la presencia del anillo aromático de la anilina en las señales múltiples que van de 6.36 - 6.86 y de 7.49 – 8.04 ppm (ver espectro completo en Anexos 11 y 12). Con respecto al espectro de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz), se asignaron las 26 señales presentes en la estructura (ver Anexos 13 y 14); y se pudo observar que las señales de los carbonos 17, 19 y 20 de la molécula se encuentran desplazadas a 66.7, 80.6 y 90.6 ppm. Además, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  se asignaron las señales correspondientes al fragmento de la anilina en 112.5, 133.1, 114.9 y 146.6 ppm que corresponden a los carbonos 21, 23, 22, 24, 25 y 26 del anillo aromático.

**Tabla 3-9** Máximos de absorción de las señales características de los derivados del EE2

<b>Derivado</b>	<b>Máximos de absorción (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Señal asociada</b>
<b>1</b>	3300 (3700-1800)	(O-H, st)
	2926, 2868	(C-H cicloalcano, st)
	2217	(C≡C, st)
	1694	(C=O ácido, st)
	1605, 1498	(C=C aromático, st)
	1246	(C-O fenol, st)
<b>3</b>	3608, 3430, 3239	(O-H, st)
	3104	(C-H aromático, st)
	2929, 2862	(C-H cicloalcano, st)
	2218	(C≡C, st)
	1621, 1593	(O-N=O, st)
	1518	(N=O asimétrico, st)
	1499, 1463	(C=C aromático, st)
	1339	(N=O simétrico, st)
	1289	(C-H aromático, bending)
1251	(C-O fenol, st)	
<b>4</b>	3353, 3225	(NH <sub>2</sub> , st)
	2923, 2855	(C-H cicloalcano, st)
	2180	(C≡C, st)
	1716	(C=C aromático, st)
	1591	(N-H, bending; C-C aromático, skeletal, st)
	1497, 1442	(C=C aromático, st)
1283, 1234, 1175	(C-O fenol, st)	



**Figura 3-8** Espectros de FTIR-ATR del EE2 y derivados **1**, **3** y **4** (Nota: El espectro FTIR-ATR del EE2 fue tomado de (Ortiz, 2018))

### 3.3. Evaluación de la actividad biológica de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol

De acuerdo con el análisis *in silico* realizado, los derivados de EE2 **1**, **3** y **4** tienen la capacidad de actuar como fármacos de administración oral y absorción por difusión pasiva; y de acuerdo con en el simulador Passonline, tienen la capacidad de actuar como antimicrobianos de amplio espectro. Por lo cual, para corroborar la validez del simulador Passonline, la evaluación biológica debió realizarse en las mismas cepas para las cuales el simulador mostró resultados favorables; sin embargo, por cuestiones de accesibilidad debidas a la pandemia por COVID-19, esto no fue posible. No obstante, la evaluación biológica *in vitro* se realizó en las cepas microbianas disponibles, de modo que los resultados teóricos no guardan una correlación directa con los experimentales.

**Evaluación antiparasitaria *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol:** Se realizaron tres pruebas *in vitro* por triplicado para determinar la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de los derivados **1**, **3** y **4** en dos cepas de *T. cruzi* (Ninoa y TH) de aislados oaxaqueños en su estadio epimastigote. Adicionalmente, se realizaron pruebas de CC<sub>50</sub> para determinar la citotoxicidad de los derivados en la línea celular J774.2, correspondiente al macrófago monocito de tumor de ratón, con el fin de identificar la selectividad que tienen las moléculas propuestas contra células sanas o tejidos.

En la Tabla 3-10 se muestran los valores de concentración requerida para inhibir el 50 % de la población de epimastigotes de *T. cruzi* del EE2 y de los derivados **1**, **3** y **4**, así como de los fármacos de referencia, Nfx y Bz, ya que son los únicos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi* (OPS, 2021). Se puede observar que la cepa TH es más resistente que la cepa Ninoa debido a que se requiere mayor concentración de Nfx y Bz para inhibir al 50 % de su población. Además, el EE2 no presenta actividad antiparasitaria *in vitro* a las concentraciones evaluadas para Ninoa ni para TH.

Respecto a los nuevos compuestos de EE2, el acoplamiento de un derivado aromático en el alquino de la posición 17 aumenta la actividad contra la cepa Ninoa para los derivados **1** y **4**, y disminuye para el derivado **3**, referente al EE2. No obstante, sólo el derivado **1** resulta más activo que Nfx y Bz.

En cuanto a la cepa TH, solo el derivado **3** mostró mejora en actividad inhibitoria respecto al EE2, casi 5 veces menos; sin embargo, requiere casi 4 veces más de compuesto que el Nfx y casi el doble de la concentración del Bz.

**Tabla 3-10** Evaluación *in vitro* de los derivados del EE2 en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Compuesto	Ninoa, CI <sub>50</sub> uM	TH, CI <sub>50</sub> uM	Citotoxicidad J774.2 Macrófago ratón, CC <sub>50</sub> uM	Índice de selectividad (IS) contra Ninoa	Índice de selectividad (IS) contra TH
Nfx	7.09 ± 0.05	19.30 ± 0.08	164.20 ± 0.25	23.16	8.51
Bz	30.27 ± 0.07	39.08 ± 0.25	133.90 ± 0.06	4.42	3.42
EE2	222.99 ± 0.02	366.26 ± 0.02	65.54 ± 0.02	0.29	0.18
1	4.00 ± 0.19	383.69 ± 0.02	61.81 ± 0.01	15.45	0.16
3	292.93 ± 0.01	78.09 ± 0.01	> 100	0.34	1.28
4	102.50 ± 0.02	516.12 ± 0.02	27.88 ± 0.02	0.27	0.05

El derivado **1**, del cual previamente se había determinado la actividad antiproliferativa contra epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro (Juárez-Chávez et al., 2019), nuevamente mostró actividad contra epimastigotes de la cepa Ninoa; más no así para la cepa TH. También se puede observar que el derivado **1** es más citotóxico, comparado con Nfx y Bz, ya que requiere menor concentración para inhibir la proliferación del 50 % de las células sanas (J774.2). Sin embargo, este derivado mejora el índice de selectividad (IS) para la cepa Ninoa con respecto al Bz lo que lo coloca como un potencial fármaco alternativo a los actuales, para lo cual se deben realizar pruebas *ex vivo* e *in vivo*.

De acuerdo con cálculos teóricos la probabilidad de actividad antiparasitaria para los derivados **3** y **4** debería ser mayor que para el derivado **1**, aunque cabe resaltar que los resultados del Passonline no incluyeron específicamente a estas cepas; sin embargo, en la evaluación *in vitro* se pudo observar que la actividad antiproliferativa contra epimastigotes de la cepa Ninoa es mucho menor con **3** y **4** que con **1**, mientras que para la cepa TH, el derivado **3** (terminal nitro, NO<sub>2</sub>) efectivamente muestra mayor actividad antiprotozoaria que el EE2 y el derivado **1**, por lo cual, la actividad anti *Trypanosoma* de estos derivados podría estar relacionada con la actividad antiestrogénica como se menciona para el TAM (Montoya & Krysan, 2018). En cuanto al efecto de los diferentes grupos sustituyentes en el alquino del EE2 sobre las células sanas, se observa que la anilina es la que causa el mayor incremento en la citotoxicidad, mientras que el nitrobenzeno disminuye la citotoxicidad respecto al EE2.

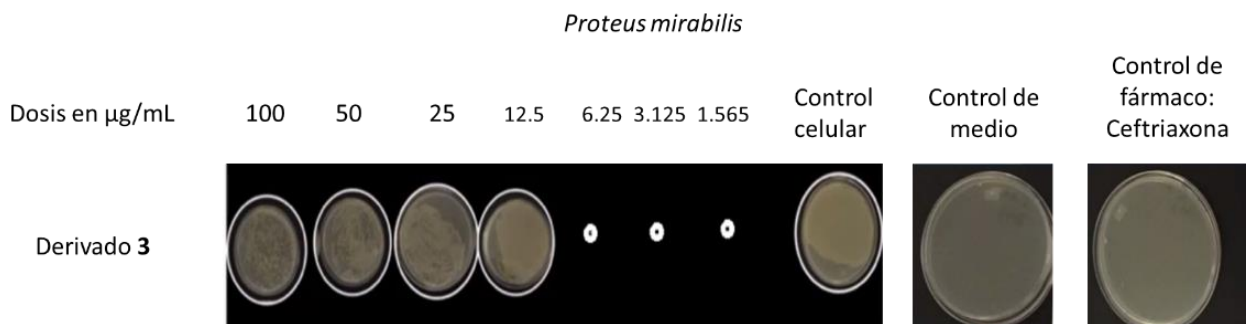
**Evaluación antibacteriana *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol:** Se realizaron pruebas por duplicado para determinar la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de los derivados **1**, **3** y **4** en tres cepas Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aureuginosa*), y una Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 29203). En la Tabla 3-11 se puede observar que a pesar de que los derivados **4** y **1**, de acuerdo a Passonline tenían la mayor probabilidad de actividad antibacteriana contra

*Rickettsia* (Gram-negativa), ninguno de los derivados propuestos mostró actividad antibacteriana para ninguna de las cepas evaluadas incluyendo al EE2; ya que todos requirieron una concentración mayor a 100 µg/mL para inducir inhibición. Concentración a la cual la muerte de las bacterias ocurre por “ahogamiento” debido a la cantidad y no por la actividad de las moléculas propuestas. Adicionalmente, en la Figura 3-9 se muestra de manera ilustrativa una de las corridas del derivado **3** y uno de los controles.

**Tabla 3-11** Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los derivados del EE2

Derivado	<i>Proteus mirabilis</i> , µg/mL	<i>E. coli</i> 64321, µg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , µg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29203, µg/mL
EE2	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>1</b>	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>3</b>	> 100*	> 100	> 100	> 100
<b>4</b>	> 100	> 100	> 100	> 100

\*Se aprecia una ligera inhibición, sin embargo, no fue cuantificada



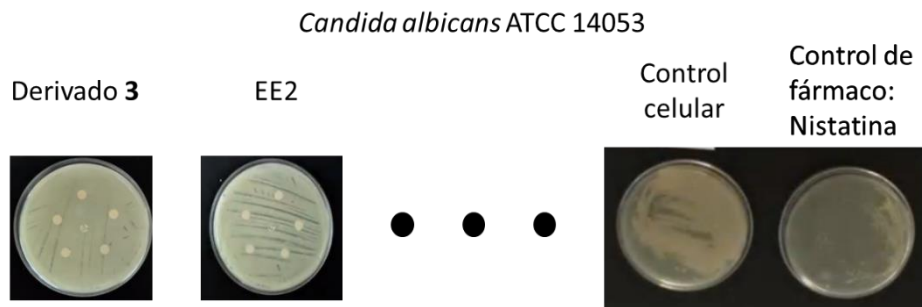
**Figura 3-9** Determinación *in vitro* de la actividad anti *Proteus mirabilis* del derivado **3**

**Evaluación antifúngica *in vitro* de los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol:** Se realizaron pruebas preliminares para determinar la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de los derivados **1**, **3** y **4** en el hongo patógeno humano *Candida albicans* ATCC 14053. En la Tabla 3-12 se observa que, pese a que el simulador PASSonline predijo mayor probabilidad de actividad antifúngica para los derivados **1** y **3**, ninguno de estos incrementó la bioactividad respecto al EE2 *in vitro*; y que tanto el EE2 como los compuestos propuestos requieren una concentración mayor a 100 µg/mL para inhibir al 50 % de la población; lo que recae en una baja bioactividad *in vitro* contra esta cepa.

De manera ilustrativa, en la Figura 3-10, se muestra una de las corridas de la evaluación *in vitro* del derivado **3** y uno de los controles sobre *C. albicans*. Donde se puede observar que pese a las



modificaciones estructurales hechas al EE2, y que pese a que White & Larsen (1997) mencionan que la reproducción de *C. albicans* se ve disminuida en rangos de concentraciones farmacológicas de estradiol; los derivados **1**, **3** y **4** no mostraron actividad antifúngica a las concentraciones evaluadas y únicamente funcionaron en su beneficio como fuente de carbono. Debido a que *C. albicans* cuenta con proteínas de unión a esteroides que les permiten experimentar cambios en su morfología y tasa de crecimiento tras la suplementación con esteroides en el medio de crecimiento como lo son: la proteína de unión a estradiol (EBP), proteína de unión a corticosteroides (CBP) y la proteína de unión a progesterona (PBP) (G. Cheng et al., 2006; Prasad et al., 2012; White & Larsen, 1997). Por lo cual, estos compuestos podrían ser viables para hongos que no tengan tan desarrollado el sistema de receptores de estrógenos.



**Figura 3-10** Determinación *in vitro* de la actividad anti *Candida albicans* a diferentes concentraciones del derivado **3**

Por otra parte, se evaluó la actividad antimicótica contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* a 3 cantidades de compuesto distintas (50, 75 y 100 µg) (Tabla 3-12) y se pudo observar que a 50 µg el hongo presentaba resistencia a las tres moléculas, es decir, su crecimiento no se observó diferente al control. A 75 µg se observó que el crecimiento micelial del hongo se ve disminuido sólo por el derivado **1**, y a 100 µg fue evidente que el hongo mostró susceptibilidad a la molécula **1**, pero se mantuvo resistente a los derivados **3** y **4**.

**Tabla 3- 12** Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los derivados del EE2

Derivado	<i>Candida albicans</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		
	ATCC 14053, µg/mL		50 µg	75 µg	100 µg
EE2	> 100		R	R	R
1	> 100		R	I	S
3	> 100		R	R	R
4	> 100		R	R	R

*Nota:* R=resistente, I=intermedio, S=susceptible

Lo anterior indica que el acoplamiento del ácido 4-iodobenzoico podría ser promisorio en el combate a la enfermedad causada por *B. cinerea* que a diferencia de *C. albicans* podría no tener tan desarrollados

los mecanismos para utilizar los esteroides en su beneficio. No obstante, se tienen que considerar y evaluar los posibles efectos ecotóxicos obtenidos con los simuladores.

Hay evidencia del uso de hormonas como fuente de carbono para la replicación tanto en hongos (G. Cheng et al., 2006; Prasad et al., 2012; White & Larsen, 1997) como en bacterias (García-Gómez et al., 2013; Prasad et al., 2012), lo que da pauta a sugerir que los compuestos análogos a dichas hormonas podrían actuar como antimetabolitos, es decir, que los derivados de estradiol podrían ser reconocidos como fuente de carbono y energía para su replicación; sin embargo, debido a la diferencia estructural, los microorganismos se verían imposibilitados para replicarse y habrían bloqueado sus receptores de alimento, lo que conduciría a un bloqueo en su replicación. Lo anterior explica los resultados *in vitro* de la actividad antiparasitaria contra *T. cruzi* de las cepas Ninoa y TH; y antifúngica contra *B. cinérea*. Además, da pauta a sugerir que la nula actividad antibacteriana y anti *C. albicans* de los derivados **1**, **3** y **4** a las concentraciones probadas se debe a que los cambios estructurales del EE2 no imposibilitan la replicación de las bacterias probadas y del hongo patógeno; por lo cual, únicamente las moléculas propuestas estarían funcionando como fuente de carbono.

A pesar de que no se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* en las cepas que Passonline mostró favorables, es claro que el simulador aún tiene muchas deficiencias, puesto que en su base de datos no existe información suficiente de moléculas similares que permita predecir la bioactividad *in silico* a diferentes concentraciones o en distintas etapas de desarrollo de los microorganismos, como es el caso del estadio epimastigote de *T. cruzi*.

## Conclusiones

El uso de los simuladores SwissADME, admetSAR y PASSonline nos permite concluir que los derivados del 17- $\alpha$ -etinilestradiol modificado en el alquino de la posición 17 con ácido p-iodobenzoico (1), p-iodofenol (2), p-iodonitrobenceno (3), p-iodoanilina (4), p-iodobenzaldehído (5) y p-iodobenceno (6) tienen una probabilidad de actividad mayor o igual al TAM de actuar como antibacteriales, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios, excepto el derivado 5 (terminal aldehído) que solo tiene probabilidad de actuar como antifúngico. De acuerdo con las reglas de Veber y Egan, todos los derivados propuestos tendrán la capacidad de convertirse en potenciales fármacos de administración oral y absorción por difusión pasiva, ya que serán capaces de permear las membranas celulares; y tendrán buena biodisponibilidad oral. Con base en el simulador Swiss ADME, todos los derivados se presentan como sustrato de la PGP+, por lo cual, no se prevén problemas de acumulación del fármaco en el SNC y por ende se evitaría la acentuación de efectos adversos. Además, todos los derivados propuestos mejoran la permeabilidad en piel con respecto al EE2 y al TAM; por lo cual tendrán la capacidad de administrarse vía tópica.

Con base en la priorización realizada los derivados **1, 3 y 4** fueron sintetizados bajo condiciones clásicas de la reacción de Sonogashira con rendimientos superiores al 60 %. Las condiciones no clásicas, para el derivado **1** presentaron menor grado de conversión, y la utilización de Ag<sub>2</sub>O en condiciones clásicas como co-catalizador no mejoró la conversión.

De la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana se concluye que sólo el derivado **1** posee actividad antifúngica contra *B. cinérea*; y antiparasitaria (antiprotozoaria) contra *T. cruzi* (epimastigotes de las cepas Ninoa y TH) con valores de CI<sub>50</sub> menores a los fármacos de referencia (Nfx y Bz). Además, ninguno de los derivados mostró actividad antibacteriana contra *P. mirabilis*, *E. coli* 64321, *P. aeruginosa*, y *S. aureus* ATCC 29203.

## Referencias

- Abdel-Kader, M. S., & Muharram, M. M. (2017). New microbial source of the antifungal allylamine "Terbinafine." *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 440–442. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.006>
- Adasme, M. F., Bolz, S. N., Adelmann, L., Salentin, S., Haupt, V. J., Moreno-Rodríguez, A., Noguera-Torres, B., Castillo-Campos, V., Yopez-Mulia, L., De Fuentes-Vicente, J. A., Rivera, G., & Schroeder, M. (2020). Repositioned drugs for chagas disease unveiled via structure-based drug repositioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21228809>
- Allevato, M. A. J., Negroni, R., & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos Ayer, hoy y mañana. *Actualizaciones Terapeuticas Dermatologicas*, 30(1), 8–19. [http://www.atdermae.com/pdfs/atd\\_30\\_01\\_02.pdf](http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf)
- Alonso-Marañón, L. (2012). *Diversidad molecular mediante reacciones de acoplamiento cruzado*. Universidade Da Coruña.
- Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., & Micol, V. (2020). Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(15), 2576–2606. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008115650>
- Aparicio, P., Rodríguez, E., Gárateb, T., Molinab, R., Sotoa, A., & Alvara, J. (2003). Terapéutica antiparasitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(10), 579–594. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)73013-4](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)73013-4)
- Azerang, P., Rezayan, A. H., Sardari, S., Kobarfard, F., Bayat, M., & Tabib, K. (2012). Synthesis and biological evaluation of propargyl acetate derivatives as anti-mycobacterial agents. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 2–6. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-90>
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires Dic*, 29, 102-11. *Revista Del Hospital Italiano de Buenos Aires.*, 29(2), 102–111. [https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias\\_attachs/47/documentos/7482\\_102-111-belloso.pdf](https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf)
- Boletín epidemiológico - semana 08*. (2021). Boletín Epidemiológico- Semana 08. <https://www.salud.gov.sb/boletines-epidemiologicos-2021/>
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., & Wyatt, P. G. (2008). Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem*, 3(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2007). *Goodman & Gilman- Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Undécima). McGraw-Hill. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
- Butts, A., Koselny, K., Chabrier-Roselló, Y., Semighini, C. P., Brown, J. C. S., Wang, X., Annadurai, S., DiDone, L., Tabroff, J., Childers, W. E., Abou-Gharbia, M., Wellington, M., Cardenas, M. E., Madhani, H. D., Heitman, J., & Krysan, D. J. (2014). Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. *MBio*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00765-13>

- Buxaderas-Pérez de Armiñán, E. (2014). *Reacciones de acoplamiento de alquinos catalizadas por paladaciclos derivados de oxima*. Universidad de Alicante.
- Cavalieri, S. J. (2005). Prueba de Difusión por Disco. In M. B. Coyle (Ed.), *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* (pp. 39–52). Library of Congress Cataloging-in-Publication Data Manual.
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P. W., & Tang, Y. (2012). AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(11), 3099–3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
- Cheng, G., Yeater, K. M., & Hoyer, L. L. (2006). Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryotic Cell*, *5*(1), 180–191. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.180-191.2006>
- Chinchilla, R., & Nájera, C. (2007). The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry. *Chemical Reviews*, *107*(3), 874–922. <https://doi.org/10.1021/cr050992x>
- Condò, C., Anacarso, I., Sabia, C., Iseppi, R., Anfelli, I., Forti, L., de Niederhäusern, S., Bondi, M., & Messi, P. (2020). Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Natural Product Research*, *34*(4), 567–574. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1490904>
- Daina, A., Blatter, M. C., Baillie-Gerritsen, V., Palagi, P. M., Marek, D., Xenarios, I., Schwede, T., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). Drug Design Workshop: A Web-Based Educational Tool to Introduce Computer-Aided Drug Design to the General Public. *Journal of Chemical Education*, *94*(3), 335–344. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00596>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(12), 3284–3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics , drug- likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*(42717), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Díaz-Chiguer, D. L., Márquez-Navarro, A., Noguera-Torres, B., de la Luz León-ávila, G., Pérez-Villanueva, J., Hernández-Campos, A., Castillo, R., Ambrosio, J. R., Nieto-Meneses, R., Yépez-Mulia, L., & Hernández-Luis, F. (2012). In vitro and in vivo trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, *122*(1), 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.12.009>
- Dolan, K., Montgomery, S., Buchheit, B., DiDone, L., Wellington, M., & Krysan, D. J. (2009). Antifungal activity of tamoxifen: In vitro and in vivo activities and mechanistic characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(8), 3337–3346. <https://doi.org/10.1128/AAC.01564-08>
- Egan, W. J., Merz, K. M., & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2018). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, *33*(1), 13–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- Fernández-Rodríguez, M. (2008). Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por complejos de

- paladio y su aplicación a la síntesis de tioéteres aromáticos. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, 104(2), 104–110.
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014). Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3), 444–457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>
- França, J. A. A., Navarro-Vázquez, A., Lei, X., Sun, H., Griesinger, C., & Hallwass, F. (2017). Complete NMR assignment and conformational analysis of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol by using RDCs obtained in grafted graphene oxide. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 55(4), 297–303. <https://doi.org/10.1002/mrc.4526>
- Gabano, E., Cassino, C., Bonetti, S., Prandi, C., Colangelo, D., Ghiglia, A., & Osella, D. (2005). Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: Biological activity of the resulting complexes. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(19), 3531–3539. <https://doi.org/10.1039/b507716h>
- García-Gómez, E., González-Pedrajo, B., & Camacho-Arroyo, I. (2013). Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed Research International*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/928290>
- García, J. L., Ramos, R., Gómez, J., Vázquez, J. C., & Cano, A. (2015). Biotransformación de esteroides con diferentes microorganismos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(1), 17–32. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952015000100017](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000100017)
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>
- Gregorí-Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1–15.
- Islas-Vigueras, R. E. (2013). *Obtención de eninos conjugados, arilalquinos e inonas mediante reacciones de acoplamiento C-C empleando el precursor catalítico difenilfosfinito de Pd(II). Síntesis de anemarchalconina*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Joshi, R. K., Padalia, R. C., & Mathela, C. S. (2010). Phenyl Alkynes Rich Essential Oil of *Artemisia capillaris*. *Natural Product Communications*, 5(5), 815–816. <https://doi.org/10.1177/1934578x1000500528>
- Juárez-Chávez, L., Pina-Canseco, S., Soto-Castro, D., Santillan, R., Magaña-Vergara, N. E., Salazar-Schettino, P. M., Cabrera-Bravo, M., & Pérez-Campos, E. (2019). In vitro activity of steroidal dendrimers on *Trypanosoma cruzi* epimastigote form with PAMAM dendrons modified by “click” chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 86(January), 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.056>
- Juárez Chavez, L. V. (2019). *Evaluación in vitro de la actividad antiproliferativa de dendrímeros y dendrones derivados del etinilestradiol sobre epimastigotes de Trypanosoma cruzi*. Instituto Tecnológico de Oaxaca.
- Kaul, P. N., & Kulkarni, S. K. (1978). New Drug Metabolism Inhibitor of Marine Origin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(9), 1293–1296. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670927>

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(SUPPL.), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Luxo, C., Jurado, A. S., Madeira, V. M. C., & Silva, M. T. (2003). Tamoxifen induces ultrastructural alterations in membranes of *Bacillus Stearothermophilus*. *Toxicology in Vitro*, *17*(5–6), 623–628. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00113-9)
- Luxo, Cristina, Jurado, A. S., & Madeira, V. M. C. (1998). Lipid composition changes induced by tamoxifen in a bacterial model system. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1369*(1), 71–84. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00217-4)
- Malgor, L. A., & Valsecia, M. E. (2000a). Farmacología antimicrobiana, farmacología dermatológica. In *Farmacologia medica general (Vol.3)* (pp. 1–117).
- Malgor, L. A., & Valsecia, M. E. (2000b). Farmacología De Las Hormonas Sexuales Femeninas. In *Temas de Farmacología médica (Vol.2)* (pp. 192–210). [http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap26\\_femen.pdf](http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap26_femen.pdf)
- Mani Chandrika, K. V. S., & Sharma, S. (2020). Promising antifungal agents: A minireview. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *28*(7). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115398>
- Martin, Y. C. (2005). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(9), 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
- Masuda, Y., Asada, K., Satoh, R., Takada, K., & Kitajima, J. (2015). Capillin, a major constituent of *Artemisia capillaris* Thunb. flower essential oil, induces apoptosis through the mitochondrial pathway in human leukemia HL-60 cells. *Phytomedicine*, *22*(5), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.03.008>
- McDonald, F. J., Campbell, D. C., Vanderah, D. J., Schmitz, F. J., Washecheck, D. M., Burks, J. E., & Van der Helm, D. (1975). Marine Natural Products. Dactylone, an Acetylenic Dibromochloro Ether from the Sea Hare *Aplysia dactylomela*. *The Journal of Organic Chemistry*, *40*(5), 665–666. <https://doi.org/10.1021/jo00893a031>
- Miró-Canturri, A., Ayerbe-Algaba, R., del Toro, R., Pachón, J., & Smani, Y. (2020). Tamoxifen repurposing to combat infections by multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.017475>
- Montoya, M. C., & Krysan, D. J. (2018). Repurposing estrogen receptor antagonists for the treatment of infectious disease. *MBio*, *9*(6), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02272-18>
- Moreno-Rodríguez, A., Salazar-Schettino, P. M., Bautista, J. L., Hernández-Luis, F., Torrens, H., Guevara-Gómez, Y., Pina-Canseco, S., Torres, M. B., Cabrera-Bravo, M., Martínez, C. M., & Pérez-Campos, E. (2014). In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *87*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.027>
- Morón-Rodríguez, F. J., Levy-Rodríguez, M., Álvarez-Corredera, M., Borroto-Regalado, R., Cruz-Barrios, M. A., Salazar-Domínguez, L. E., Fernández-Manchón, E. J., Furones-Mourelle, J. A., Groning-Roque, E., Hernández-Rodríguez, A., Peña-Machado, M. de los A., Hernández-Pérez, B. G., & Zapata-Martínez, A. (2002). Farmacología General. In *Farmacología general*. Editorial Ciencias Médicas.

- Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>
- Mussin, J. E., Roldán, M. V., Rojas, F., Sosa, M. de los Á., Pellegrini, N., & Giusiano, G. (2019). Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against *Malassezia furfur*. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0857-7>
- Navarrete-Vázquez, G. (2016). Aciertos, Errores y Secretos en el Diseño de Fármacos. In *ACS Webinars*. <https://www.acs.org/content/acs/en/acs-webinars/spanish/disenio-defarmacos.html>
- OMS. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OPS. (2021). *Enfermedad de Chagas*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- Oropeza-Jiménez, A. L. (2008). Disruptores endocrinos en el medio ambiente: caso del 17- $\alpha$ -etnil-estradiol. *Observatoriomedioambiental*, 11, 63–76.
- Ortiz, J. E. N. (2018). “Degradación fotocatalítica de 17 $\alpha$ -etnil estradiol y acetato de ciproterona en solución acuosa” [Universidad Veracruzana]. [https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2019/05/G06\\_JONATHAN-ELIEZER-NOGUERA-ORTIZ.pdf](https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2019/05/G06_JONATHAN-ELIEZER-NOGUERA-ORTIZ.pdf)
- Palma-Arellano, I. de J. (2017). El viaje de los fármacos por el cuerpo humano. *Cienciorama*, 1–12.
- Prasad, R., Devaux, F., Dhamgaye, S., & Banerjee, D. (2012). Response of pathogenic and non-pathogenic yeasts to steroids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.011>
- Rey, M. E. (2001). Bioequivalencia, biodisponibilidad y EFG. Algunas consideraciones. *Farmacia Profesional*, 15(10), 88–93.
- Rivas-Gonzales, A. M., & Cardona-Castro, N. (2009). Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con que opciones terapéuticas contamos? *CES Medicina*, 23(1), 61–76. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/1004/646>
- Santoyo, J., Montesinos, A., Barbosa, R., García, S., Rodríguez, D., Ramos, T., Ocharan, M., Toscano, J., & Beltrán, O. (2014). El Citocromo P-450. *Rev Hosp Jua Mex*, 81(4), 250–256. <https://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2014/ju144j.pdf>
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp. 631–648).
- SINGREM. (2017). *Acumulado de recolecciones al mes de diciembre 2017*. <https://www.singrem.org.mx/acumulado.pdf>
- Sonogashira, K., Tohda, Y., & Hagihara, N. (1975). A convenient synthesis of acetylenes: Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Letters*, 16(50), 4467–4470. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91094-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91094-3)
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., Pahua Díaz, D., Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahua Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 59(6), 8–22. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422016000600008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000600008)



- Stanley, S. L. (2010). Antiparasitic agents. In *Infectious Diseases: Third Edition* (3rd ed., Vol. 2, pp. 1490–1507). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00150-7>
- Stiitz, A. (1987). Allylamine Derivatives—a New Class of Active Substances in Antifungal Chemotherapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 26(4), 320–328. <https://doi.org/10.1002/anie.198703201>
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2021). *SwissADME*. Swiss Institute of Bioinformatics. <http://www.swissadme.ch/index.php>
- Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D., & Oprea, T. (1999). The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie - International Edition*, 38(24), 3743–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U)
- Torres-Rosas, R., Torres-Gómez, N., Moreno-Rodríguez, A., García-Contreras, R., & Argueta-Figueroa, L. (2020). Anti-Inflammatory and Antibacterial Activity of the Chitosan/Chlorhexidine Gel Commercial Preparation for Postexodontia Treatment: An in Vitro Study. *European Journal of Dentistry*, 14(3), 397–403. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714453>
- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). Antiviral Drugs. In *Synthesis of Best-Seller Drugs* (pp. 687–736). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411492-0.00034-1>.
- Vargas-Flores, T., & Villazante-Condori, L. G. (2014). Clasificación de los microorganismos. *Revista de Actualización Clínica*, 44, 2309–2313.
- Varnado, C. D., & Bielawski, C. W. (2012). Polymer Science: A Comprehensive Reference. In M. M. Krzysztof Matyjaszewski (Ed.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set* (Vol. 5, pp. 181–182). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00138-2>
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- Wang-Shick, R. (2017). Antiviral therapy. In *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 367–381). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00026-6>
- White, S., & Larsen, B. (1997). *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 744–749. <https://doi.org/10.1007/s000180050094>
- Zhang, X., Fang, Y., Jaiseng, W., Hu, L., Lu, Y., Ma, Y., & Furuyashiki, T. (2015). Characterization of tamoxifen as an antifungal agent using the yeast *Schizosaccharomyces pombe* model organism. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 61(2), E54–E63.

## Anexos

Anexo 1. Tabla de actividad antimicrobiana de los derivados del EE2 expresada como probabilidad obtenida del simulador PASSonline

Probabilidad de actividad antimicrobiana													
Molécula	Antifúngico	Antibacterial		Antiviral			Antiparasitarios						
		<i>Rickettsia</i>	<i>Treponema</i>	<i>Rhinovirus</i>	<i>Influenza</i>	<i>Trachoma</i>	Antiprotozoarios					Antihelmínticos	
		<i>Rickettsia</i>	<i>Treponema</i>	<i>Rhinovirus</i>	<i>Influenza</i>	<i>Trachoma</i>	<i>Amoeba</i>	<i>Histomonas</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Schistosoma</i>
1	0.179	0.187	0.120	0.361	0.280	0.000	0.235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.203	0.000
2	0.172	0.159	0.114	0.286	0.223	0.000	0.243	0.000	0.271	0.201	0.000	0.203	0.000
3	0.183	0.202	0.000	0.000	0.219	0.000	0.335	0.08	0.308	0.177	0.000	0.267	0.142
4	0.000	0.194	0.132	0.000	0.295	0.089	0.219	0.000	0.000	0.204	0.18	0.211	0.115
5	0.266	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.169	0.156	0.111	0.000	0.218	0.000	0.235	0.000	0.268	0.198	0.000	0.197	0.000
7	0.000	0.148	0.113	0.000	0.199	0.000	0.226	0.000	0.239	0.000	0.000	0.188	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.357	0.209	0.000	0.238	0.000	0.000	0.000	0.000	0.196	0.000

Anexo 2. Matriz de priorización de síntesis con base en la probabilidad de actividad antimicrobiana *in silico*

Para la realización de la siguiente matriz se asignó una puntuación del 1 al 6 a cada una de las moléculas propuestas, donde 1 era la puntuación para el compuesto de menor prioridad, es decir el que mostró la menor probabilidad de actividad, y 6 para el de mayor prioridad, con base en la mayor probabilidad de actividad antimicrobiana, en el caso de probabilidad cero, se asignó el valor de cero. Posteriormente, se realizó la sumatoria del puntaje adquirido por derivado; y de acuerdo con la sumatoria se ordenaron de forma descendente para establecer la prioridad de síntesis.

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2														
Molécula	Antifúngica	Antibacterial			Antiviral			Antiparasitaria						Sumatoria
		<i>Rickettsia</i>	<i>Treponema</i>	<i>Rhinovirus</i>	<i>Influenza</i>	<i>Trachoma</i>	<i>Amoeba</i>	<i>Histomonas</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Schistosoma</i>	
1	4	4	5	6	5	0	4	0	0	0	0	4	0	32
2	3	3	4	5	4	0	5	0	5	5	0	4	0	38
3	5	6	0	0	3	0	6	6	6	3	0	6	6	47
4	0	5	6	0	6	6	3	0	0	6	6	5	5	48
5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
6	2	2	3	0	2	0	4	0	4	4	0	3	0	24

Prioridad de síntesis 4 > 3 > 2 > 1 > 6 > 5

### Anexo 3. Matriz de priorización de síntesis con base en la predicción *in silico* de las propiedades fisicoquímicas y de farmacocinética

Para la realización de la siguiente matriz se asignó una puntuación del 1 al 6 a cada una de las moléculas propuestas, donde 1 era la puntuación para el compuesto de menor prioridad, con base en el cumplimiento de las reglas establecidas por las principales compañías farmacéuticas (Lipinski, Ghose, Egan, Muegge), así como, con base en el valor obtenido en las propiedades farmacocinéticas evaluadas. Posteriormente, se realizó la sumatoria de la puntuación adquirida para cada uno de los derivados; y de acuerdo con la puntuación total se ordenaron de forma descendente para establecer la prioridad de síntesis.

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2													
Molécula	Parámetro												
	Lipinski				Ghose				Veber		Egan		
	PM, g/mol ≤ 500	MLOGP ≤ 4.15	Aceptores de H ≤ 10	Donadores de H ≤ 5	PM, g/mol ≤ 480	-0.4 ≤ WLOGP ≤ 5.6	40 ≤ RM ≤ 130	20 ≤ No. de átomos ≤ 70	No. de enlaces rotatorios ≤ 10	TPSA, Å <sup>2</sup> ≤ 140	WLOGP ≤ 5.88	TPSA, Å <sup>2</sup> ≤ 131.6	
1	2	3	4	5	2	5	2	3	5	5	5	5	
2	4	4	5	5	4	4	5	6	6	3	4	3	
3	1	6	4	6	1	2	1	4	5	6	2	6	
4	5	4	6	5	5	6	4	4	6	4	6	4	
5	3	5	5	6	3	3	3	5	5	2	3	2	
6	6	2	6	6	6	1	6	6	6	1	1	1	

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2										
Molécula	Parámetro									
	Muegge									
	200 ≤ PM, g/mol ≤ 600	-2 ≤ XLOGP3 ≤ 5	TPSA, Å <sup>2</sup> ≤ 150	# Anillos ≤ 7	# de átomos de C > 4	# de heteroátomos > 1	No. de enlaces rotatorios ≤ 15	Aceptores de H ≤ 10	Donadores de H ≤ 5	
1	2	4	5	6	6	5	6	4	5	
2	4	3	3	6	5	4	5	5	5	
3	1	2	6	6	5	6	6	4	6	
4	5	6	4	6	5	4	5	6	5	
5	3	5	2	6	6	4	6	5	6	
6	6	1	1	6	5	3	5	6	6	

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2												
Molécula	Parámetro											
	Violaciones a las reglas					Solubilidad			Farmacocinética			
	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Solubilidad <sup>1</sup> , Log S	Solubilidad <sup>2</sup> , (mg/ml)	Solubilidad cualitativa <sup>3</sup>	ABS	HIA	BBB	PGP +
1	5	6	6	6	6	3	4	6	6	6	5	6
2	5	6	6	6	5	5	3	6	5	6	3	6
3	6	6	6	6	5	1	2	6	5	6	6	6
4	5	6	6	6	6	6	6	6	5	6	4	6
5	5	6	6	6	6	4	5	6	5	6	2	6
6	5	6	6	6	5	2	1	5	5	6	1	6

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2										
Molécula	Parámetro									
	Farmacocinética									
	Inhibidor de CYP1A2	Inhibidor de CYP2C19	Inhibidor de CYP2C9	Inhibidor de CYP2D6	Inhibidor de CYP3A4	PAINS	No. de alertas de Brenk	Violaciones de semejanza farmacéutica	Accesibilidad sintética	Sumatoria
1	6	6	6	5	6	6	6	6	5	206
2	6	6	6	5	6	6	6	6	6	208
3	5	6	6	5	6	6	4	6	6	197
4	5	6	5	5	6	6	5	6	2	219
5	6	6	6	5	6	6	5	6	4	201
6	5	6	6	6	6	6	6	6	3	191

Prioridad de síntesis 4 > 2 > 1 > 5 > 3 > 6

#### Anexo 4. Matriz de priorización de síntesis con base en la probabilidad de ecotoxicidad *in silico*

Para la realización de la siguiente matriz se asignó una puntuación del 1 al 6 a cada una de las moléculas propuestas, donde 6 era la puntuación para el compuesto menos ecotóxico y 1 para el más ecotóxico. Posteriormente, se realizó una sumatoria del puntaje adquirido por derivado; y de acuerdo con la sumatoria se ordenaron de forma descendente para establecer la prioridad de síntesis.

Puntuación adquirida por molécula derivada del EE2						
Molécula	Biodegradación	Toxicidad en abejas	Toxicidad acuática para crustáceos	Toxicidad acuática para peces	<i>Tetrahymena pyriformis</i> , pIGC50 (µg/L)	Sumatoria
1	4	1	6	1	1	13
2	3	3	3	4	4	17
3	4	5	6	3	6	24
4	6	6	2	6	2	22
5	3	4	5	2	5	19
6	5	2	4	5	3	19

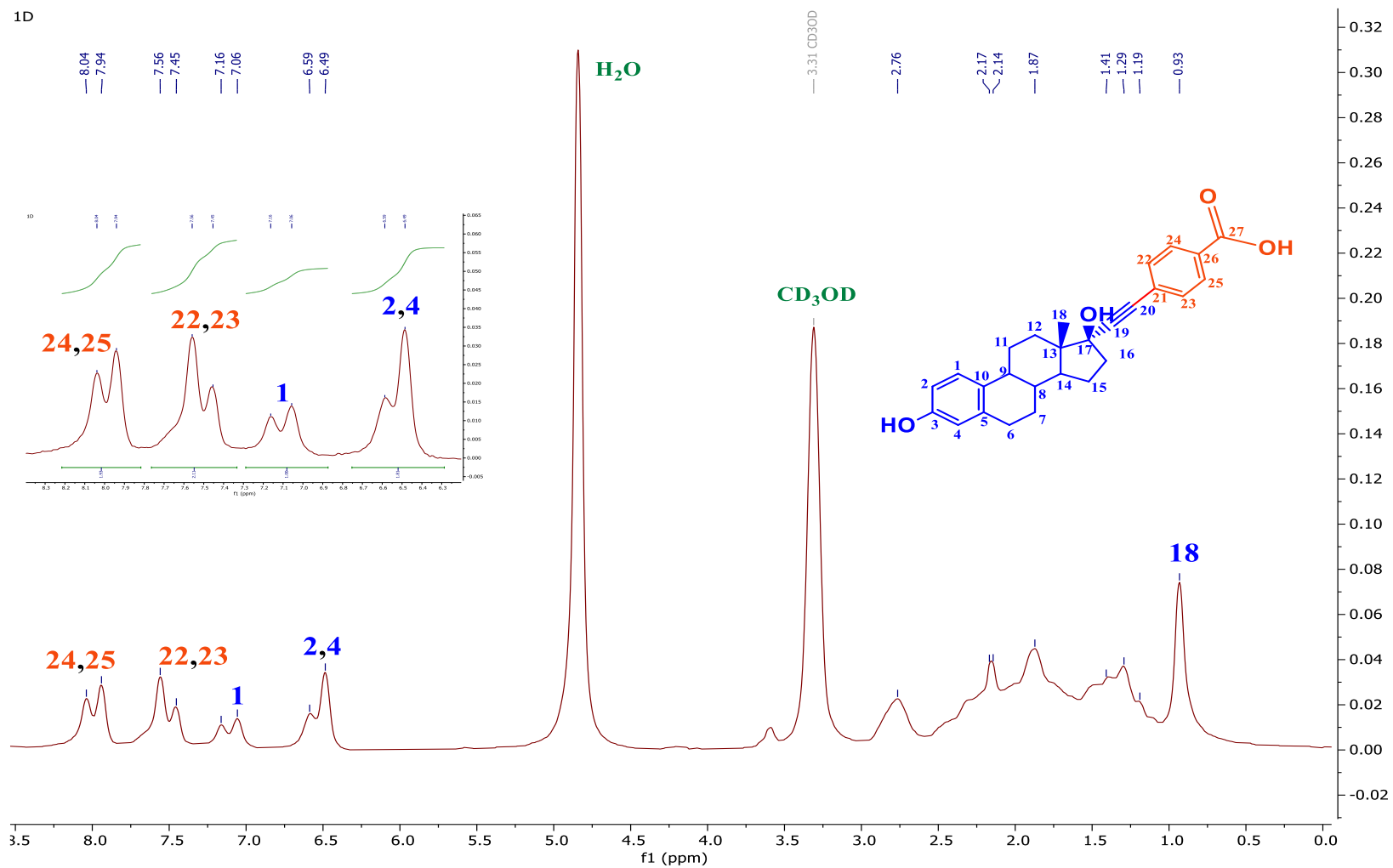
**Prioridad de síntesis 3 > 4 > 5 = 6 > 2 > 1**

## Anexo 5. Priorización de síntesis de los derivados del EE2 final

Para determinar la priorización final de síntesis, fue necesario tomar en consideración las sumatorias de las matrices de priorización de los anexos 2, 3 y 4. Posteriormente, se realizó la sumatoria total del puntaje adquirido para cada uno de los derivados; y con base en la sumatoria se ordenaron de mayor a menor para establecer la prioridad de síntesis final.

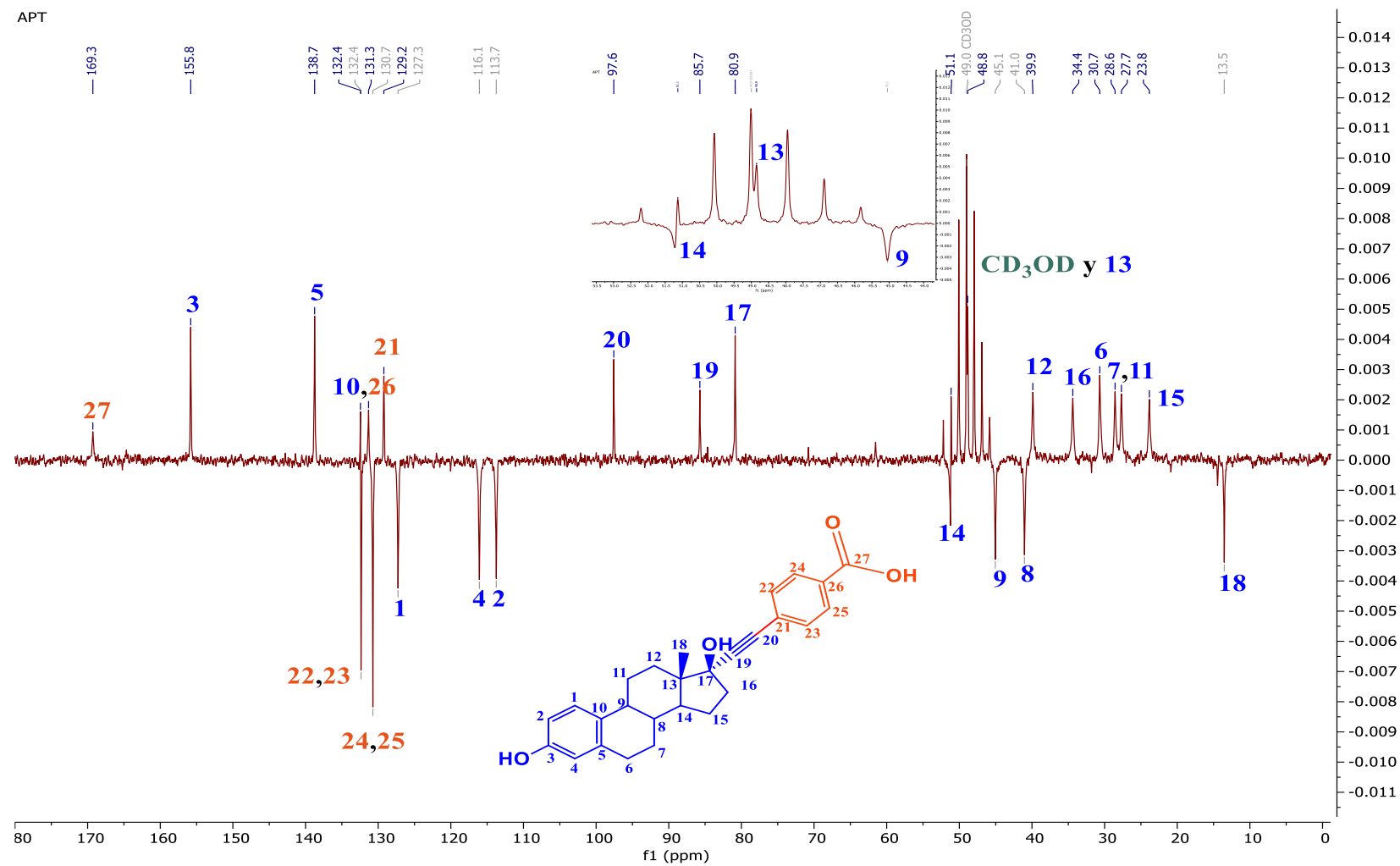
<b>Sumatoria final de puntajes adquiridos en matrices de priorización de los derivados del EE2</b>							
Parámetro	Derivado						Prioridad de síntesis
	1	2	3	4	5	6	
Probabilidad de actividad antimicrobiana	32	38	47	48	6	24	4 > 3 > 2 > 1 > 6 > 5
Propiedades fisicoquímicas y de farmacocinética	206	208	197	219	201	191	4 > 2 > 1 > 5 > 3 > 6
Probabilidad de ecotoxicidad	13	17	24	22	19	19	3 > 4 > 5 = 6 > 2 > 1
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>263</b>	<b>268</b>	<b>289</b>	<b>226</b>	<b>234</b>	<b>4 &gt; 3 &gt; 2 &gt; 1 &gt; 6 &gt; 5</b>

Anexo 6. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado **1**

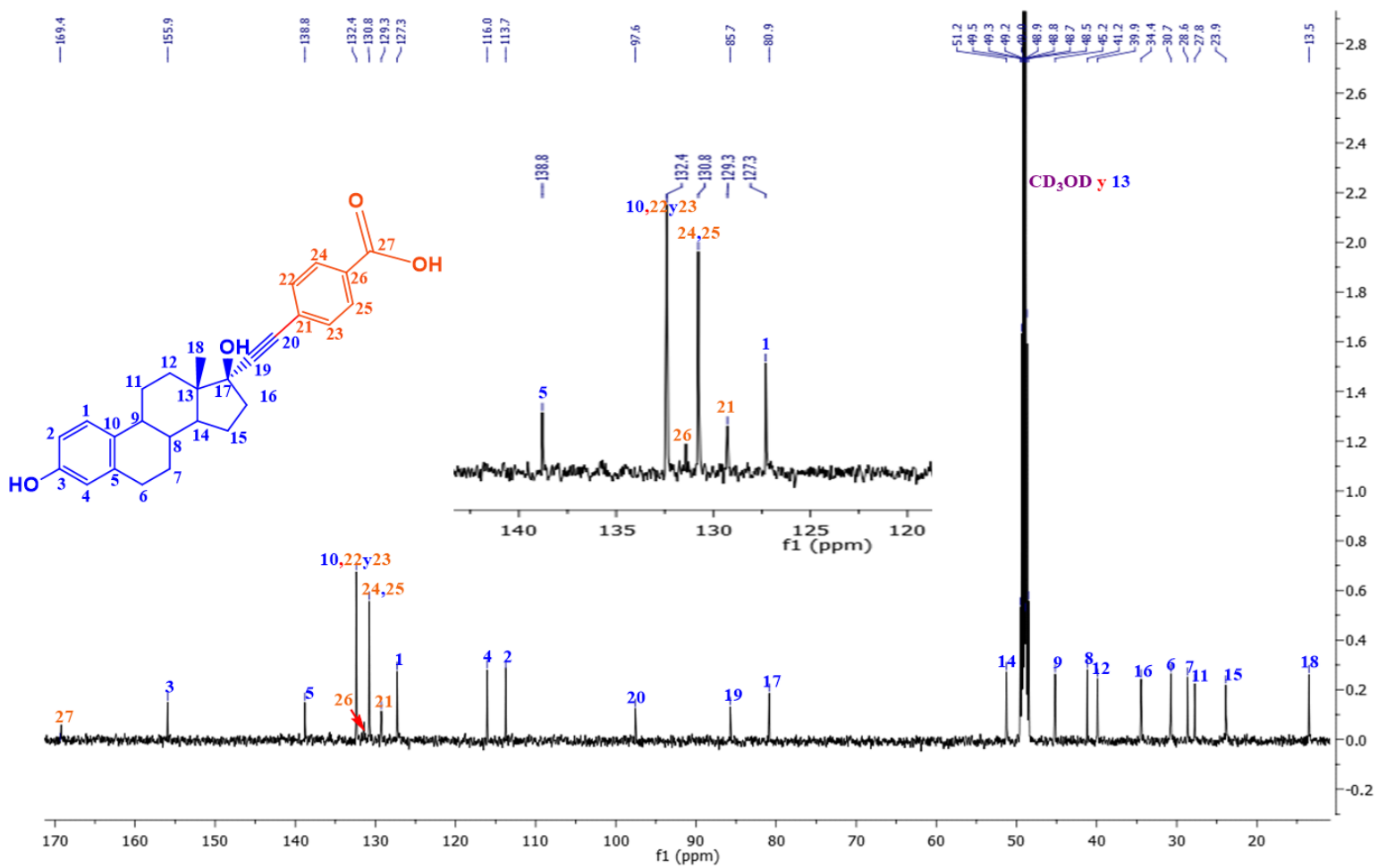




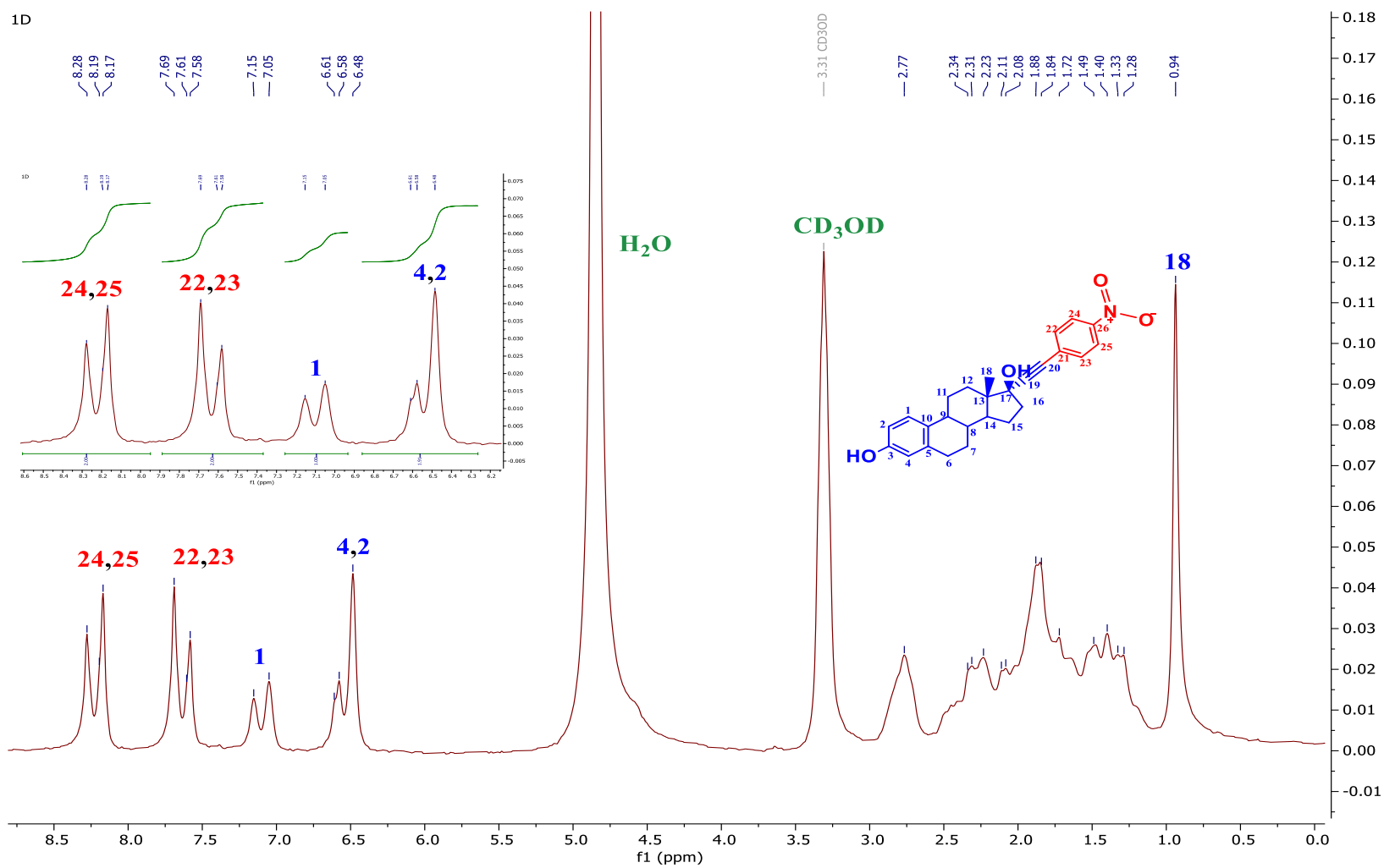
Anexo 7. Espectro ATP-<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del derivado 1



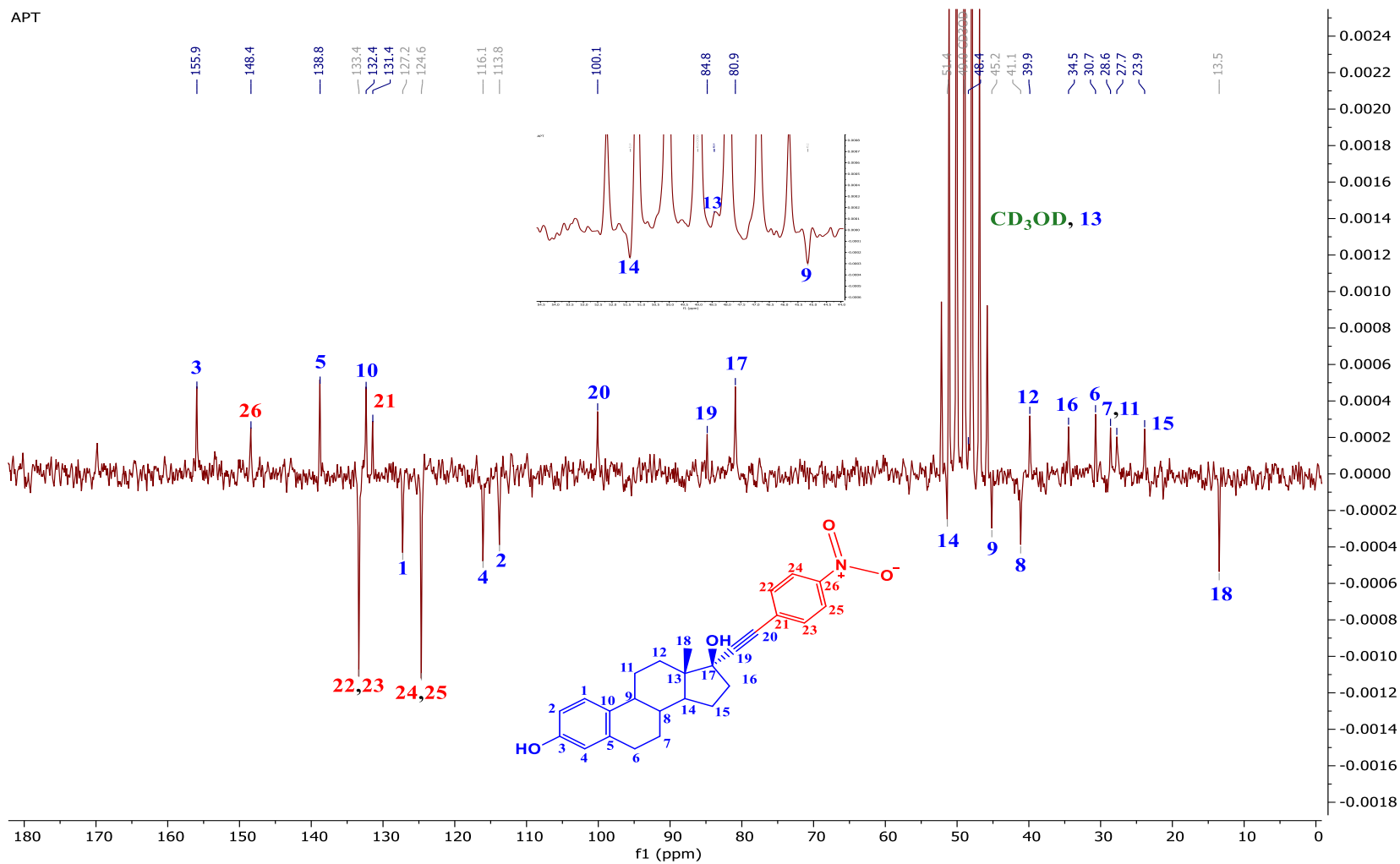
Anexo 8. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado **1**



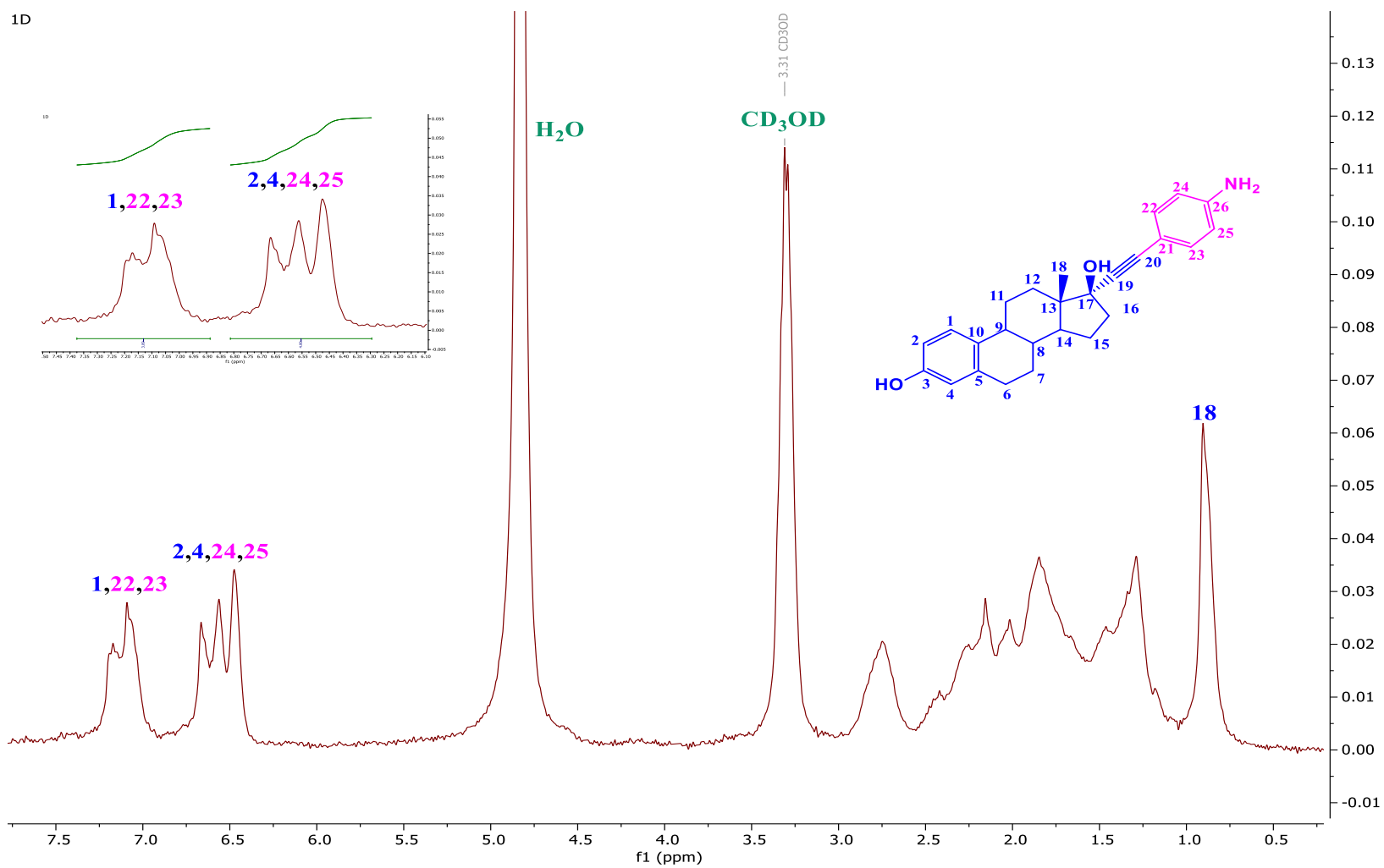
Anexo 9. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado 3



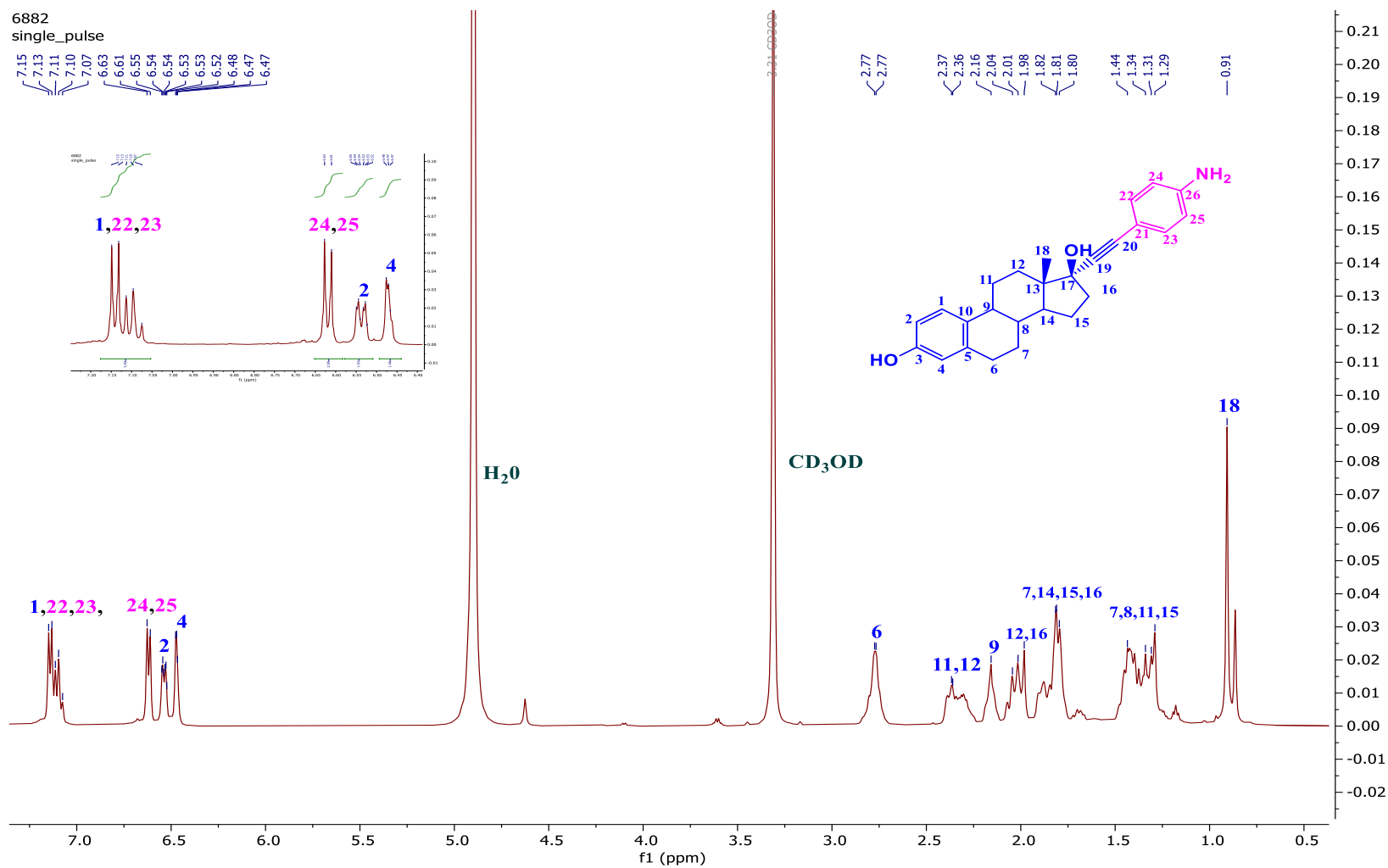
Anexo 10. Espectro ATP-<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del derivado **3**



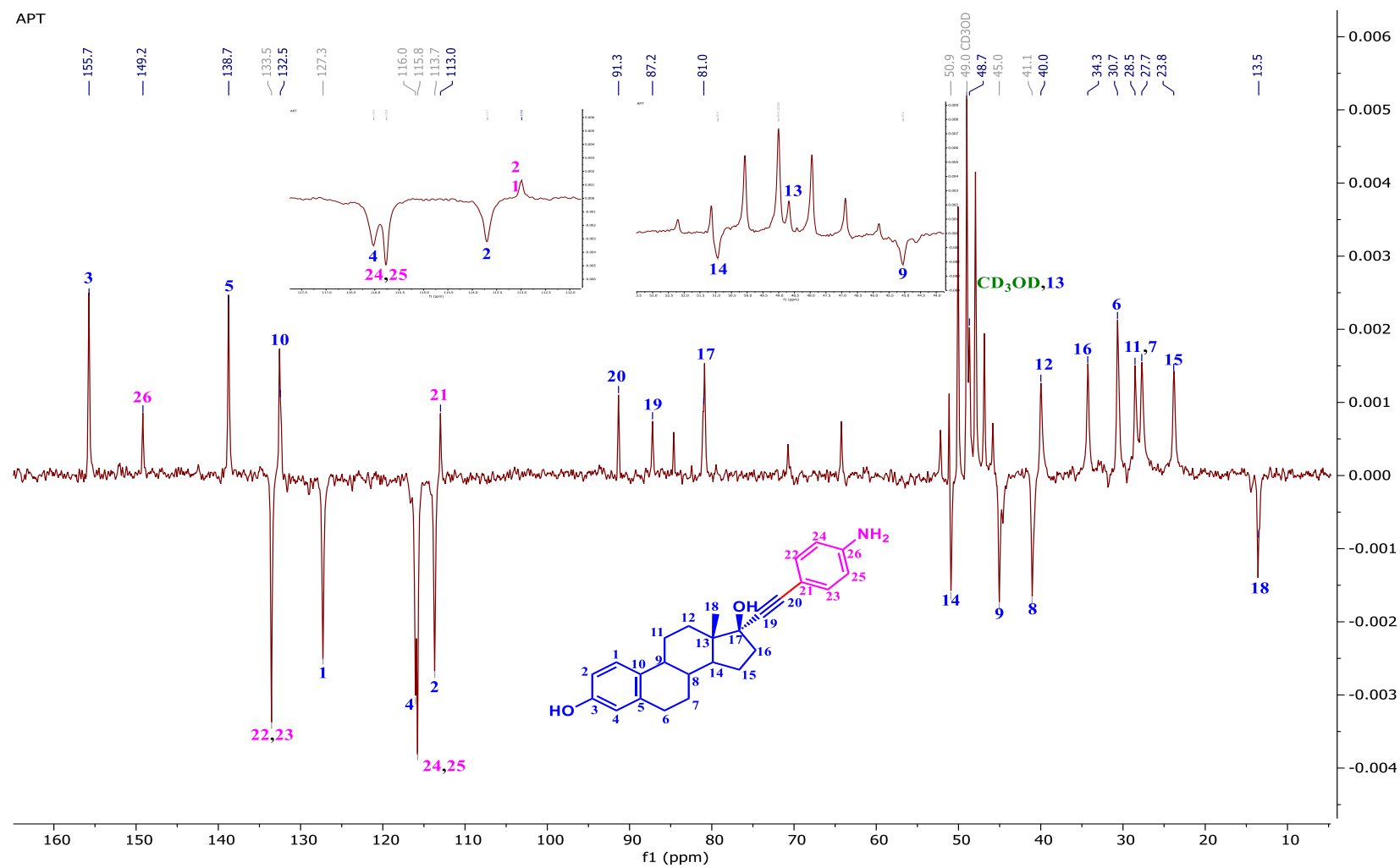
Anexo 11. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (80 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado 4



Anexo 12. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado 4



Anexo 13. Espectro ATP-<sup>13</sup>C-RMN (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del derivado 4



Anexo 14. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del derivado 4

