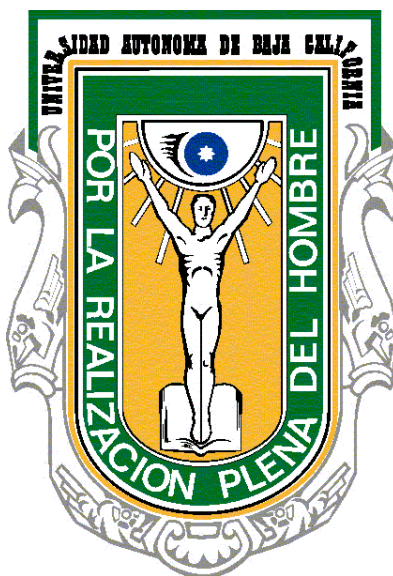


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



"Síntesis y evaluación *in silico* e *in vitro* de análogos de
vitamina K"

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

Q.F.B. Arturo Estolano Cobián

Tijuana, B.C.

Abril del 2018

Índice General

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	ii
Índice de Esquemas	iii
Índice de Anexos	iv
Abreviaturas y Acrónimos	vi
Introducción	1
Hipótesis	8
Objetivo general y particulares	9
Capítulo 1. Síntesis de compuestos	
Generalidades	10
Metodología	24
Resultados y Discusión de resultados	41
Capítulo 2. Estudio quimioinformático y biológico	
Generalidades	52
Metodología	53
Resultados y Discusión de resultados	57
Conclusiones	68
Bibliografía	70
Apéndices	
Técnicas experimentales	74
Anexos	76

Índice de Figuras

- Figura 1.** Principios activos de fuentes naturales.
- Figura 2.** Estructura química del salvarsán.
- Figura 3.** Representación tridimensional de un fármaco y una enzima.
- Figura 4.** Estructura química de la vitamina K.
- Figura 5.** Diagrama del flujo sanguíneo en el cuerpo humano.
- Figura 6.** Cascada de la coagulación.
- Figura 7.** Relación de las vías extrínseca, intrínseca y común de la coagulación.
- Figura 8.** Ciclo de la vitamina K..
- Figura 9.** Topología propuesta para VKOR.
- Figura 10.** Mecanismo propuesto de reducción de la vitamina K epóxido por parte de VKOR.
- Figura x.** Selección de enlaces rotables del ligando (en verde).
- Figura x.** Similitudes estructurales entre vitamina K, warfarina y 1,4-naftoquinona.
- Figura x.** Placa preparativa de NQ-Pipe.
- Figura x.** Diferencias estructurales entre las aminas aromáticas empleadas.
- Figura x.** Representación visual de las cajas del Modelo 1 y Modelo 2.
- Figura x.** Representación gráfica de las 3 mejores poses de docking para NQ-Prop por dos métodos diferentes.
- Figura x.** Semejanzas estructurales entre warfarina y ligandos con menor score de docking.
- Figura x.** Semejanzas estructurales entre warfarina y ligandos con mejor score de docking.
- Figura x.** Estructuras de NQ-Prop y Vitamina K.
- Figura x.** Estructuras de los productos con mayor INR en prueba de TP.
- Figura x.** NQ-Apro en el sitio catalítico de homólogo bacteriano VKOR.

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores de coagulación.

Tabla 2. Condiciones de las dos cajas empleadas para el docking.

Tabla 3. Resultados de Docking para NQ-Prop con las cajas del Modelo 1 y Modelo 2.

Tabla 4. Resultados de Docking.

Tabla 5. Ley del desplazamiento del hidruro de Grimm.

Tabla 6. Resultados de la prueba de TP.

Índice de Esquemas

Esquema 1. Síntesis general de análogos de vitamina K.

Esquema 2. Síntesis general de análogos con fragmentos de anilinas.

Esquema x. Síntesis del compuesto (1) NQ-Prop.

Esquema x. Síntesis del compuesto (2) NQ-Buta.

Esquema x. Síntesis del compuesto (3) NQ-Pipe.

Esquema x. Síntesis del compuesto (4) NQ-Bnca.

Esquema x. Síntesis del compuesto (5) NQ-Apro.

Esquema x. Síntesis del compuesto (6) NQ-Tira.

Esquema x. Síntesis del compuesto (7) NQ-ClAn.

Esquema x. Síntesis del compuesto (8) NQ-NOAn.

Índice de Anexos

- Anexo 1.** Espectro de IR del compuesto NQ-Prop.
- Anexo 2.** Espectro de masas del compuesto NQ-Prop.
- Anexo 3.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Prop.
- Anexo 4.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Prop.
- Anexo 5.** Espectro de IR del compuesto NQ-Buta.
- Anexo 6.** Espectro de masas del compuesto NQ-Buta.
- Anexo 7.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Buta.
- Anexo 8.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Buta.
- Anexo 9.** Espectro de IR del compuesto NQ-Pipe.
- Anexo 10.** Espectro de masas del compuesto NQ-Pipe.
- Anexo 11.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Pipe.
- Anexo 12.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Pipe.
- Anexo 13.** Espectro de IR del compuesto NQ-Bnca.
- Anexo 14.** Espectro de masas del compuesto NQ-Bnca.
- Anexo 15.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Bnca.
- Anexo 16.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Bnca.
- Anexo 17.** Espectro de IR del compuesto NQ-Apro.
- Anexo 18.** Espectro de masas del compuesto NQ-Apro.
- Anexo 19.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Apro.
- Anexo 20.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Apro.
- Anexo 21.** Espectro de IR del compuesto NQ-Tira.
- Anexo 22.** Espectro de masas del compuesto NQ-Tira.
- Anexo 23.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-Tira.
- Anexo 24.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Tira.
- Anexo 25.** Espectro de IR del compuesto NQ-CIAn.
- Anexo 26.** Espectro de masas del compuesto NQ-CIAn.
- Anexo 27.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-CIAn.
- Anexo 28.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-CIAn.
- Anexo 29.** Espectro de IR del compuesto NQ-NOAn.

- Anexo 30.** Espectro de masas del compuesto NQ-NOAn.
- Anexo 31.** Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-NOAn.
- Anexo 32.** Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-NOAn.
- Anexo 33.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Prop.
- Anexo 34.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Buta.
- Anexo 35.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Pipe.
- Anexo 36.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Bnca.
- Anexo 37.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Apro.
- Anexo 38.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Tira.
- Anexo 39.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-CIAAn.
- Anexo 40.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-NOAn.
- Anexo 41.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de 1,4-Naftoquinona.
- Anexo 42.** Concentrado de scores de docking y puentes de H de Warfarina.

Abreviaturas y Acrónimos

1,4-NQ	1,4-Naftoquinona
Å	Ángstrom
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
bs	Singulete ancho
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG/EM	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
cm	Centímetros
δ	Desplazamiento
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometría de masas
F.M.	Fase móvil
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
INR	Índice Internacional Normalizado
J	Constante de acoplamiento
kDa	kilo Dalton
m (en RMN)	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
μL	Microlitro
m/z	Masa/carga
n-Hex	n-Hexano

nm	Nanómetros
PDB	Protein Data Bank
q	Cuarteto
quin	Quintuplete
%R	Porcentaje de rendimiento
R _f	Factor de retención
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
s (en RMN)	Singulete
t	Triplete
td	Triple de dobles
TLC	Cromatografía de Capa Fina (del inglés, Thin Layer Chromatography)
TMS	Tetrametilsilano
TP	Tiempo de Protrombina
Cu(CH ₃ COO) ₂	Acetato de cobre

Introducción

El cuidado de la salud ha sido un elemento constante que ha acompañado a la especie humana. Puede trazarse a lo largo de su historia la inclusión de diversos elementos, tanto físicos como espirituales, orientados al tratamiento o prevención de un estado de salud desfavorable para el paciente. Así como desde la prehistoria se ha buscado en la naturaleza alimentos y a prueba y error determinado lo que nos es adecuado, de la misma manera se fue experimentando con lo que las fuentes naturales nos podían proporcionar con el fin de combatir la enfermedad.

Lo que en un principio fueran diversas porciones de especies vegetales, pasando por la fuentes animales o minerales, se fueron tornando cada vez en soluciones más complejas. No hay que olvidar que muchos de los primeros remedios que buscó el hombre no estaban exentos de una connotación mágica o espiritual, sobre todo al no existir un conocimiento formal sobre las causas o características de diferentes enfermedades. Cada cultura fue creando con el paso del tiempo sus propios compendios de conocimiento médico. Podemos mencionar la medicina tradicional china como un ejemplo de este saber, que a pesar de remontarse milenios en la historia continúa viva hasta nuestros días.

A partir de fuentes naturales es que hemos obtenido diversos compuestos con actividad biológica que se han aprovechado farmacológicamente hablando. Ejemplos clásicos en este ámbito son el ácido salicílico obtenido de la salicina aislada de los sauces (género *Salix*), o la morfina de *Papaver somniferum*. La primera tiene propiedades como antiinflamatorio y analgésico al igual que su derivado acetilado (conocido como aspirina), mientras que la segunda presenta una mayor actividad analgésica (Figura 1).

De estas fuentes naturales sin embargo se fueron conociendo no sólo actividades biológicas en favor de la salud, también principios activos tóxicos. La atropina, alcaloide encontrado en plantas como *Atropa belladonna* o *Datura stramonium*, se usó antiguamente como un veneno, si bien hoy en día su capacidad para actuar como inhibidor competitivo del neurotransmisor acetilcolina ha sido aprovechada en ciertos casos para el uso clínico. Por su parte indígenas de la zona del Amazonas empleaban curare, que eran extractos de plantas que usaban para crear puntas de flechas envenenadas para la caza. Hoy se sabe que uno de los principios activos encontrados en el curare es la tubocurarina, que como

bloqueante neuromuscular también ha encontrado una oportunidad en la práctica clínica como asistente de anestésicos en la relajación del músculo esquelético (Figura 1).

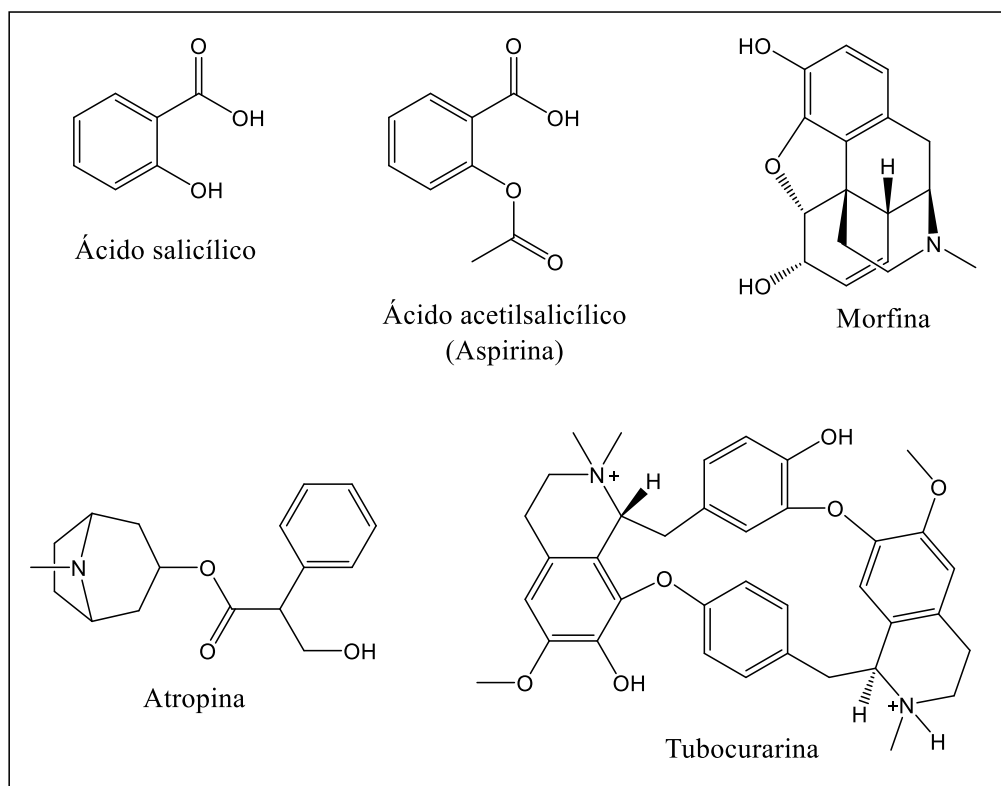


Figura 1. Principios activos de fuentes naturales.

A partir de estos ejemplos, podemos observar cómo históricamente hemos sido capaces de obtener de fuentes naturales diversos productos con actividad biológica diversa, los cuales con el conocimiento apropiado de sus estructuras químicas y efectos biológicos pueden ser aprovechados en el área farmacológica.

Es precisamente con el avance de la ciencia y tecnología que nuestro conocimiento de estas sustancias ha ido refinándose. Ya no solamente hablamos de un extracto natural, sino que podemos aislar compuestos puros y analizarlos. El siguiente paso que este conocimiento farmacológico dio fue la síntesis de estos compuestos y otros derivados para poder combatir enfermedades.

La primera vez que se logró la síntesis química de un producto orgánico fue en 1828 por parte de Friedrich Wöhler. A partir de cianato de potasio y cloruro de amonio, sales inorgánicas, fue capaz de sintetizar urea, compuesto que se encuentra en la orina. Este

hecho es considerado como la primera vez que un compuesto orgánico, antes sólo extraíble de una fuente natural, pudo sintetizarse en un laboratorio a partir de compuestos no naturales.

Podemos ver con esto que la química orgánica nos puede ayudar a sintetizar moléculas naturales. Si ya tenemos el antecedente de productos naturales con actividad biológica, entonces podemos sintetizarlos además de extraerlos de su fuente, o incluso crear moléculas que se les parezcan con el fin de modular las propiedades biológicas ya expresadas.

En este ámbito destaca Paul Erlich, que dentro de sus contribuciones a la ciencia, se encuentra la búsqueda de moléculas con propiedades biológicas, lo que conocemos como quimioterapia. A inicios del siglo XX, junto a su equipo de trabajo, evaluó sistemáticamente cientos de compuestos sintéticos buscando que trataran infecciones causadas por protozoarios. Uno de sus principales logros farmacológicos fue la identificación de la arsfenamina o salvarsán (Figura 2), compuesto derivado del arsénico que se utilizó como tratamiento de la sífilis.

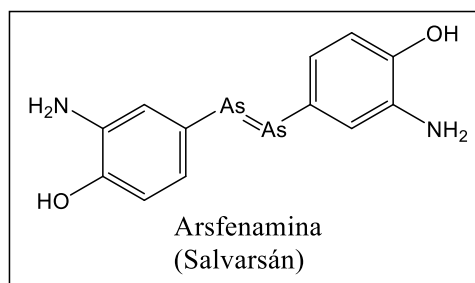


Figura 2. Estructura química del salvarsán.

Es en esta síntesis y búsqueda que se hizo de diversos compuestos relacionados que realizó Erlich, que se observa la aplicación de una idea novedosa en esos tiempos: que una estructura química podía correlacionarse con una actividad biológica.

Esta premisa es uno de los fundamentos de la Química Medicinal. Y no solo biológicamente, también las propiedades fisicoquímicas se pueden relacionar con la estructura de un compuesto. A partir de cambios en ella, se pueden entonces modificar las propiedades de la molécula. Mediante la Química Medicinal podemos estudiar la estructura de diversos fármacos o moléculas potencialmente farmacológicas, es decir también podemos llegar a un diseño racional de fármacos.

Para la obtención de nuevos fármacos mediante la Química Medicinal, destacan 3 etapas clave según Delgado, Minguillón y Joglar (2003): el descubrimiento de un principio activo o “cabeza de serie”, la optimización de su actividad farmacológica, y la optimización de sus propiedades farmacocinéticas y galénicas. Para lograr esto también es necesario estudiar las interacciones que un fármaco tenga con sus dianas biológicas.

El mismo fin de la Química Medicinal permite que sea una ciencia interdisciplinaria. Comenzando con la Farmacología, podemos incluir la Farmacognosia al buscar nuevos principios activos en los productos naturales, así como la Bioquímica y Biología Molecular en el estudio de los blancos terapéuticos de los fármacos. Existe un fuerte aporte de la Química Orgánica, necesaria para la modificación estructural y síntesis de los compuestos a evaluar.

Los mismos avances de la Química Orgánica impactan en la Química Medicinal, al hacer más versátil o rápida la manera de obtener nuevas moléculas. Técnicas nuevas de síntesis orgánica como lo son la síntesis en paralelo, síntesis combinatoria o la denominada “one-pot-synthesis”. De esta manera se pueden generar relativamente sencilla bibliotecas de compuestos para su evaluación biológica e identificación de “cabezas de serie” a partir de las cuales sintetizar nuevas familias de compuestos.

Sin embargo la síntesis de nuevas moléculas no es la única área con nuevos avances en favor de la Química Medicinal. La Química y Biología teóricas, analizada desde las ciencias de la Computación, han cambiado la manera de buscar nuevos fármacos en los últimos años.

La llamada Química Computacional permite analizar diversos aspectos de la química mediante el apoyo de las computadoras. Permite la realización de una amplia cantidad de cálculos simultáneos o de cálculos complejos, aprovechando la alta capacidad que tienen las computadoras para llevar a cabo este tipo de actividades. Por el hecho de realizarse con computadoras, son estudios llamados *in silico*.

La Química Computacional permite el estudio de la cinética y termodinámica de reacciones, incluso simulaciones de las mismas. Y es en la simulación de procesos donde se ha visto un auge en la relación de la Química Computacional y la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Mediante la Química Computacional se puede establecer modelos tridimensionales de moléculas sintetizadas y de dianas biológicas (Figura 3). Tras este modelado, el empleo de la técnica conocida como “docking” puede evaluar estas moléculas y la conformación que pueden adoptar con la cual unirse a la diana o receptor, así como el grado de interacción entre ambas.

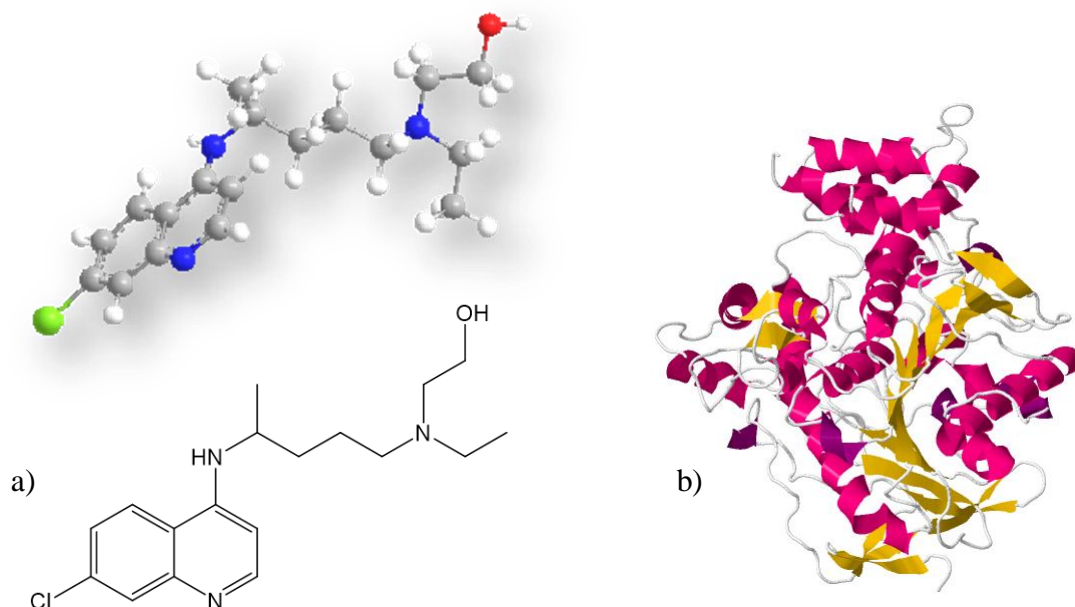


Figura 3. Representación tridimensional de un fármaco y una enzima. a) Hidroxicloroquina, fármaco antimalárico representado en 2 y 3 dimensiones. b) Representación tridimensional tipo listón de una unidad asimétrica de la enzima acetilcolinesterasa (PDB: 1EEA).

Esta técnica de forma predictiva ayuda en el análisis de moléculas ya existentes o de nueva síntesis para evaluar su afinidad con una diana biológica, relacionándose de esta manera con una actividad farmacológica. Puede incluso emplearse para llevar a un análisis *in vitro* solamente a los candidatos que mediante este análisis previo hayan demostrado potencial, ahorrando tiempo y recursos en la evaluación de nuevos fármacos.

La sangre es un tejido líquido que se encuentra en el sistema circulatorio y se encarga principalmente del transporte de oxígeno y nutrientes al organismo. Cuando se tiene una herida la cual daña un vaso sanguíneo de manera que se pueda perder sangre a

través de ella, se desencadena un proceso fisiológico conocido como coagulación. Gracias a este mecanismo se forma un coágulo, el cual bloquea la herida evitando la pérdida de sangre.

Dentro del mecanismo de coagulación intervienen numerosos factores proteicos los cuales desencadenan una serie de reacciones entre ellos, lo que habitualmente suele llamarse cascada de coagulación en relación a que se produce una “cascada” o efecto dominó entre la activación de uno y otro factor. Una parte importante de la cascada de coagulación de la sangre involucra a la vitamina K, durante el llamado ciclo de la vitamina K (Figura 4).

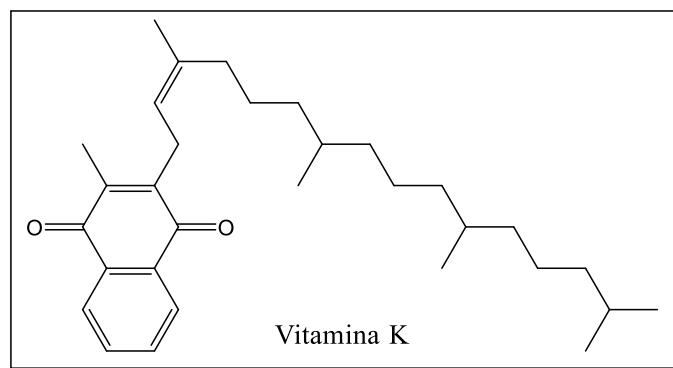


Figura 4. Estructura química de la vitamina K.

Esta vitamina en su versión hidroquinona es un cofactor para la actividad de enzimas carboxilasas, que se encargan de convertir residuos de ácido glutámico de ciertas proteínas en su forma γ -carboxilados. Estos residuos resultantes son capaces de unirse a Ca^{+2} , durante la cascada de la coagulación.

La vitamina K hidroquinona, al servir como cofactor de las carboxilasas se convierte en vitamina K 2,3-epóxido. La enzima Vitamina K 2,3-epóxido reductasa se encarga de reducir este metabolito en vitamina K, y en un segundo paso en vitamina K hidroquinona, permitiendo que se complete el ciclo de esta vitamina.

Terapéuticamente hablando, se dispone de fármacos anticoagulantes, los cuales pueden dividirse en anticoagulantes de acción directa o acción indirecta. Los primeros son los que pueden inhibir por sí solos la cascada de la coagulación, y los segundos los que alteran el funcionamiento de la cascada de coagulación mediante la interacción con otras proteínas o vías metabólicas (Trejo I., 2004).

Actualmente, se tiene una serie de fármacos anticoagulantes de tipo coumarínico, como la warfarina, que presentan esta actividad por disrupción del ciclo de la vitamina K vía interacción con la vitamina K epóxido reductasa, de manera que no se recicle la vitamina K y exista una falta de proteínas γ -carboxiladas.

A partir de los conceptos ya tratados en esta introducción, donde la Química Medicinal y los estudios quimioinformáticos cobran relevancia, es que se pretende continuar con la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicamente activos. La síntesis y evaluación, tanto *in silico* como *in vivo*, serán las técnicas para llegar a este fin.

En el presente trabajo se plantea la síntesis de moléculas análogas a la vitamina K, con el fin de que presenten una interacción con la enzima vitamina K epóxido reductasa y por ende una posible actividad anticoagulante.

Hipótesis

La síntesis de análogos de la vitamina K permite la generación de moléculas bioactivas, con actividad anticoagulante, evaluables mediante técnicas *in silico* e *in vitro*.

Objetivo general y particulares

Objetivo general:

Sintetizar una familia de análogos de vitamina K y evaluar *in silico* e *in vitro* su actividad anticoagulante.

Objetivos particulares:

- Sintetizar compuestos análogos a vitamina K.
- Caracterizar los productos sintetizados.
- Evaluar *in silico* la actividad anticoagulante de los productos sintetizados mediante un análisis de docking.
- Evaluar *in vitro* la actividad anticoagulante de los productos sintetizados.

Capítulo 1. Síntesis de compuestos Generalidades

1 Sangre

La sangre es un tejido líquido, que forma parte del sistema circulatorio y se distribuye en el organismo a través de una extensa red de vasos sanguíneos, constituida por arterias, venas y capilares. Se compone principalmente por una fracción líquida y una fracción celular.

Las arterias se encargan de llevar la sangre oxigenada desde el corazón hacia el resto del cuerpo, hasta los capilares. Por las venas retorna la sangre no oxigenada de los capilares de regreso al corazón.

Figura 5. Diagrama del flujo sanguíneo en el cuerpo humano.

La fracción líquida, denominada plasma, representa casi el 55% de la sangre. Está constituida principalmente por agua, la cual tiene iones disueltos, proteínas, hormonas, vitaminas y enzimas entre otros componentes. Es el medio de transporte que tienen los nutrientes celulares y metabolitos. La fracción celular está formada por los eritrocitos o glóbulos rojos, leucocitos o glóbulos blancos y por plaquetas.

Las principales funciones que tiene la sangre en el organismo es la del intercambio gaseoso, distribución de nutrientes, recolección de desechos celulares para su eliminación y la defensa del organismo mediada por la respuesta inmunitaria.

La fracción celular de la sangre participa en algunas de estas funciones. El intercambio de gases se da por parte de los eritrocitos, los cuales contienen a la proteína hemoglobina y llevan oxígeno a las células, recogiendo dióxido de carbono de ellas para su eliminación en el sistema respiratorio. Los leucocitos, que se pueden clasificar en diferentes subtipos, se encargan de la defensa mediante identificación de antígenos extraños, detección y ataque a agentes patógenos. Por su parte, las plaquetas participan en la hemostasia del organismo.

La Hematología es la ciencia encargada de estudiar a la sangre y sus componentes tanto celulares como moleculares. Cada uno de ellos suele encontrarse en un rango de concentraciones considerado normales, y una variación en ellos generalmente puede

asociarse a una patología o daño, por lo que su análisis se convierte en una herramienta de diagnóstico muy importante.

2 Hemostasia

La hemostasia es parte del sistema de coagulación, es decir, la formación de una barrera física (coágulo) con el fin de evitar una pérdida sanguínea en caso de una lesión. Como ya se mencionó anteriormente, la sangre circula por los vasos sanguíneos. En caso de lesión que comprometa la integridad física de estos vasos, la sangre podría salir de éstos poniendo en riesgo la salud o incluso la vida del organismo. El coágulo se encarga de sellar la lesión vascular evitando la pérdida de sangre.

La hemostasis se puede dividir en dos etapas o subsistemas: la hemostasia, que puede ser primaria o secundaria, y la fibrinólisis. La hemostasia se encarga de formar los coágulos, y la fibrinólisis de eliminarlos una vez se ha reparado el tejido vascular dañado. En principio opuestos, ambos sistemas se encuentran en equilibrio. La hemostasia primaria es resultado de una vasoconstricción en primer lugar y del funcionamiento de las plaquetas para formar el coágulo. En la hemostasia secundaria se forma una red de fibrina alrededor del coágulo formado, para darle mayor fortaleza. Éste se elimina durante la fibrinólisis gracias a enzimas y otros componentes moleculares. Si no se forma la red de fibrina, en ocasiones el coágulo se puede desprender antes de la reparación vascular y se continúa con la pérdida de sangre.

En caso de lesión, el sistema coagulante es activado rápidamente; sin embargo en condiciones normales el endotelio tiene características anticoagulantes que evitan que las plaquetas se adhieran prematuramente a él. Ejemplos de sustancias que tienen esta función son la protaciclina y el óxido nítrico o factor de relajación endotelial.

2.1 Hemostasia Primaria

Las plaquetas son células con forma discoide, que resultan de fragmentos citoplasmáticos que los megacariocitos, su célula precursora presente en la médula ósea, liberan a los vasos sanguíneos. Las plaquetas poseen glucoproteínas en su membrana exterior que pueden unirse a otras proteínas adhesivas, y en su citoplasma tienen actina y una red tubular que le permite a la plaqueta el cambiar de forma.

De manera regular se dice que las plaquetas se encuentran inactivadas. Sin embargo después de una lesión se producen cambios bioquímicos y morfológicos en las plaquetas, que se dice entonces pasan a estar activadas. Es en su estado activado que las plaquetas participan en la hemostasia. Para la formación del coágulo resultante, deben de ocurrir los pasos de adhesión, activación, agregación y secreción.

El proceso de adhesión ocurre cuando se da la ruptura del vaso sanguíneo. Las plaquetas se encuentran entonces con el tejido subendotelial, donde se encuentran diferentes proteínas adhesivas, siendo la más importante el colágeno. La unión de las plaquetas al colágeno se da mediante una glucoproteína Ib que se encuentra en su membrana, empleando como puente entre ambos un factor llamado de von Willenbrand (FvW).

Al unirse las plaquetas al colágeno a través del FvW cambian de forma, adoptando la de una esfera con pseudópodos. Este paso es el que se conoce como activación. Solamente las plaquetas activadas participan en los siguientes pasos de la coagulación.

Las plaquetas activadas comienzan a secretar sustancias activas que almacenan en gránulos que desencadenan varias vías de señalización celular: se estimula la unión entre plaquetas, la atracción de nuevas plaquetas y el crecimiento del coágulo. Todos estos cambios comienzan cuando el colágeno se une al receptor Ib de la membrana de la plaqueta. De manera general, la producción de segundos mensajeros y activación de diversas vías tienden a aumentar los niveles de iones calcio en el citoplasma, que durante su etapa inactiva tienen niveles bajos. Esto es importante, ya que muchos sistemas celulares de la coagulación solamente se activan cuando se eleva la presencia de estos iones calcio.

Durante la activación, otros cambios importantes que sufren las plaquetas ocurren a nivel de su membrana. Un receptor que se mantiene oculto durante su estado inactivo, aparece durante la activación. Es el receptor IIb/IIIa, formado por glucoproteínas y que es capaz de enlazarse con fibrinógeno en presencia de calcio. Por último, cambios en la membrana de la plaqueta permitirán que ésta pueda enlazarse con proteínas formadoras de fibrina.

El tercer paso, la agregación plaquetaria, consiste en la adhesión de nuevas plaquetas que llegan al sitio de lesión y se activan, con las plaquetas ya adheridas al

colágeno. Para el tercer paso, el de agregación plaquetaria, es necesario el receptor IIb/IIIa y el fibrinógeno, así como calcio extracelular.

El fibrinógeno es capaz de unir a diferentes plaquetas entre sí, uniéndose al receptor IIb/IIIa de cada una de ellas. El enlace de fibrinógeno es reversible en un inicio, pero tras la liberación por parte de las plaquetas de factores agonistas de la hemostasia como ADP o tromboxano A₂, las plaquetas nuevas que llegan al sitio de lesión expresan su receptor IIb/IIIa, necesario para más enlaces con el fibrinógeno. Se da entonces una agregación secundaria; se calcula que tras 10 a 30 minutos el enlace del fibrinógeno se vuelve irreversible.

El cuarto paso, la secreción, suele ocurrir realmente junto con la agregación. Aquí, la plaqueta secreta el contenido de gránulos encontrados en su citoplasma. Algunas de las sustancias liberadas de estos gránulos son agonistas para la misma secreción, de manera que ésta se sustenta a sí misma para lograr la degranulación de las plaquetas. Ejemplos de sustancias liberadas de los gránulos son ADP, ATP, serotonina y calcio. También se liberan proteínas como el factor 4 de plaquetas (PF4), β -tromboglobulina (β TG) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Muchas de las sustancias secretadas de los gránulos sirven como agonistas para el paso de agregación plaquetaria, reclutando nuevas plaquetas o causando que aparezca el receptor IIb/IIIa en la superficie de las mismas.

Tras estos pasos de adhesión, activación, agregación y secreción, se ha formado un tapón de plaquetas que sellan el sitio de lesión vascular. Éste se llama tapón hemostático primario. Sin embargo es relativamente inestable, por lo que se debe formar alrededor de él una red de fibrina que le dé soporte; esto se logra por medio de la hemostasia secundaria.

2.2 Hemostasia Secundaria

La hemostasia secundaria se da cuando factores de coagulación, que son proteínas plasmáticas solubles, interaccionan unas con otras en una especie de efecto dominó o cascada, para transformar a la proteína fibrinógeno en fibrina. Los factores de la coagulación en su forma inactiva se conocen como zimógenos, y actúan primero como un sustrato para posteriormente hacerlo como una enzima.

Los factores de la coagulación son denominados con números romanos, los cuales no siguen el orden en el cual son activados, sino en el cual fueron descubiertos. A su vez,

su notación viene acompañada de una letra “a” minúscula cuando pasan a su forma activa. De manera especial, se debe de considerar que los factores III, IV y VI no se manejan como tales. En ocasiones se menciona el Factor Tisular como Factor III (aunque se mantenga aparte del resto de factores), el calcio como Factor IV, y el considerado antes Factor VI se maneja como la versión activada del Factor V.

Dependiendo de cómo se llega a la activación de esta cascada, se puede dividir esta hemostasia secundaria (o fase fluida de la hemostasia) en dos vías: la vía extrínseca y la vía intrínseca, las cuales convergen en la denominada vía común. El fibrinógeno con el cual termina la cascada de coagulación se considera el Factor I, siendo la fibrina el factor activado. La cascada de coagulación se verá con mayor detalle en la sección 1.3 de las generalidades de este capítulo.

Una vez que se formó la red de fibrina y que se reparó el vaso sanguíneo dañado, se debe de retirar el tapón hemostásico, proceso cubierto por la fibrinólisis.

2.3 Fibrinólisis

La fibrinólisis se encuentra en equilibrio y estrecha relación con la hemostasia, para permitir la formación y degradación oportuna de la fibrina. La fibrinólisis también consiste en una serie de enzimas e inhibidores, cuyo principal actor es una enzima proteolítica llamada plasmina. Ésta tiene la capacidad de degradar tanto a la fibrina como al fibrinógeno. El precursor o zimógeno de la plasmina es el plasminógeno, el cual tiene activadores extrínsecos e intrínsecos.

Los factores intrínsecos de la fibrinólisis se encuentran en la sangre y se relacionan con los factores intrínsecos de la hemostasia secundaria. De hecho el factor XIIa de la cascada de coagulación interacciona con un proactivador del plasminógeno. Los factores extrínsecos se encuentran fuera de la sangre, en los tejidos y provienen principalmente del endotelio de los vasos. Algunos de estos factores son el activador tisular de plasminógeno (t-PA) y el activador de plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA).

Por otra parte, para regular la actividad proteolítica de la plasmina existen inhibidores específicos de la misma, como lo son la α 2-antiplasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La actividad fibrinolítica depende entonces de un balance entre activadores e inhibidores, un equilibrio t-PA/PAI-1.

Una vez que el plasminógeno es activado y convertido en plasmina, ésta se une entonces con la fibrina y la degrada, generando los llamados productos de degradación de fibrina (PDF), los cuales son depurados por el hígado.

3 Fase fluida de la hemostasia: Cascada de la Coagulación

Como ya se ha mencionado, el fin que persigue la llamada cascada de la coagulación es el de convertir al fibrinógeno, una proteína plasmática soluble, en fibrina, la cual es insoluble. Esto con el fin de que redes poliméricas de fibrina que den soporte y estabilidad al tapón hemostático o coágulo que evita pérdidas sanguíneas en el caso de una lesión vascular.

Las dos maneras por las cuales puede iniciarse la cascada de coagulación son las vías intrínseca y extrínseca, iniciadas cuando la sangre se pone en contacto con una superficie cargada negativamente o con el Factor Tisular, respectivamente. Ambas vías convergen en la activación del Factor X, punto a partir del cual se considera la cascada de coagulación entra en la denominada vía común.

Factor	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Factor tisular (FT)
IV	Iones calcio
V	Proacelerina
VII	Proconvertina
VIII	Factor antihemofílico
IX	Factor de Christmas
X	Factor de Stuart-Prower
XI	Antecedente tromboplastínico del plasma
XII	Factor de Hageman
XIII	Factor estabilizador de la fibrina

Tabla 1. Factores de coagulación.

En la Tabla 1 se enumeran los diferentes factores de la coagulación. De ellos, los Factores II, VII, IX y X son conocidos como factores K dependientes, ya que dependen de la vitamina K para la incorporación de un segundo grupo carboxilo en su estructura sintetizada inicialmente, grupo sin el cual no pueden funcionar dentro de la cascada de coagulación.

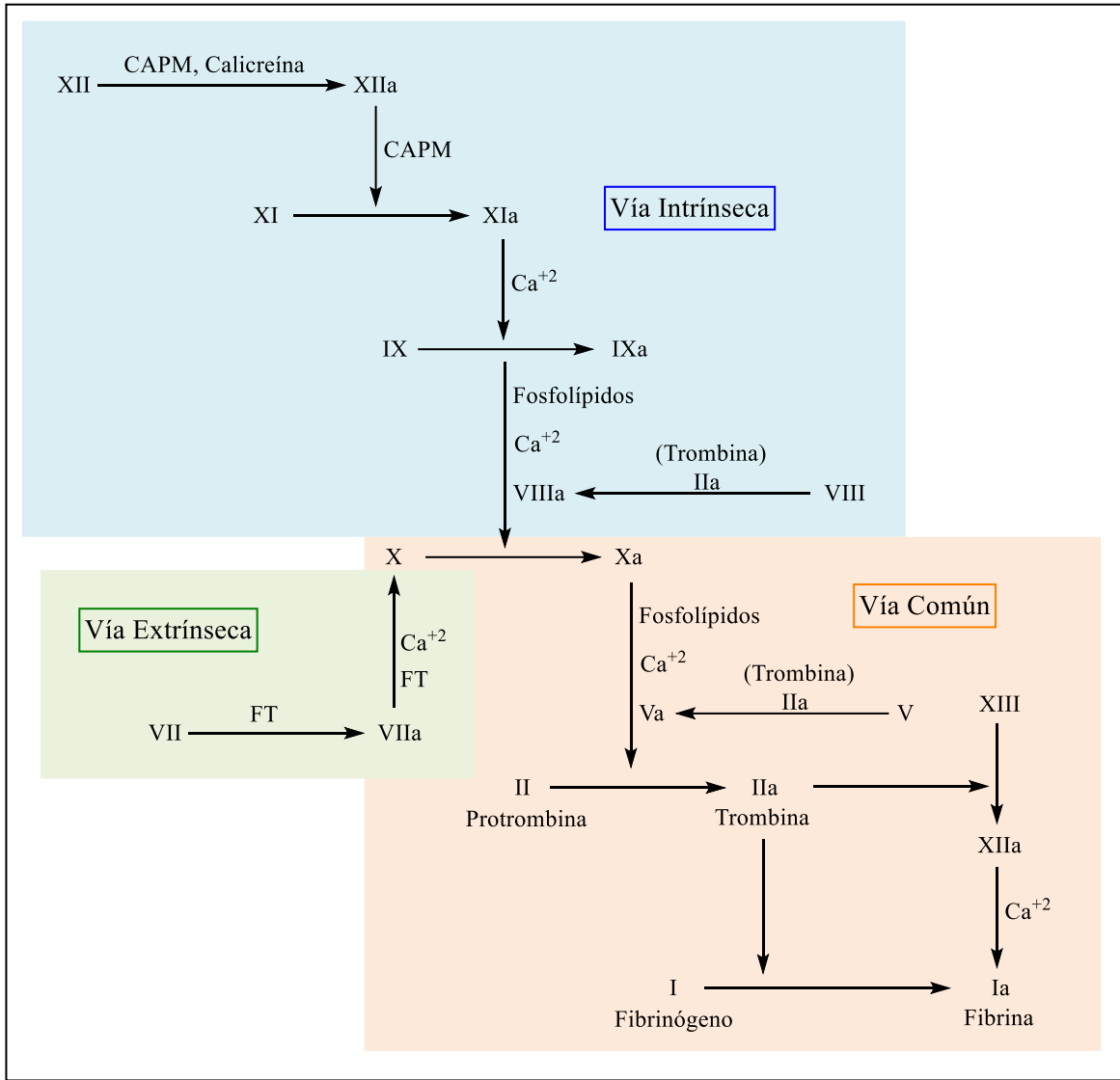


Figura 6. Cascada de la coagulación.

3.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca debe su nombre a que comienza con un factor que se encuentra fuera de la sangre, en el subendotelio: el Factor Tisular (FT). Cuando el FT entra en contacto con la sangre activa el Factor VII, y un complejo de Factor VIIa, iones Ca^{+2} y FT activan al Factor X que da inicio a la vía común. Este complejo puede alternativamente activar al Factor IX de la vía intrínseca, dando un punto adicional donde se encuentran ambas vías.

3.2 Vía intrínseca

Los componentes de la vía intrínseca se encuentran en la sangre, siendo los conocidos como factores de contacto los que inician esta vía. Estos son los factores XII, XI, precalicreína (su forma activa es calicreína) y el cininógeno de alto peso molecular (CAPM). Cuando se exponen a una superficie con carga negativa estos factores se enlazan a dicha superficie para iniciar la cascada de coagulación.

El primer factor involucrado es el Factor XII, que es activado mediante la calicreína y CAPM. El Factor XIIa resultante, junto con CAPM es el encargado de activar el Factor XI, que en presencia de iones calcio Ca^{+2} activa al Factor IX. Este paso es el primero de la vía intrínseca que necesita de calcio.

El Factor IXa forma un complejo con el Factor VIIIa (que fue activado por trombina), iones Ca^{+2} y fosfolípidos que se encuentran en la superficie de la plaqueta para activar el factor X, el cual da inicio a la vía común de la cascada.

3.3 Vía común

Cuando se activa el Factor X, tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca, debe de formarse un complejo entre los Factores Xa, Va, iones Ca^{+2} y fosfolípidos para transformar al Factor II (protrombina) en su forma activada (trombina). La trombina a su vez se encarga de la activación del Factor I o fibrinógeno, lo que resulta en escindir al fibrinógeno en fibrina (Factor Ia).

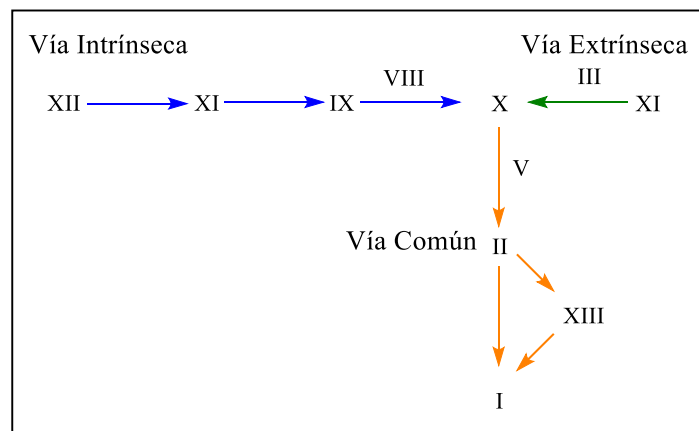


Figura 7. Relación de las vías extrínseca, intrínseca y común de la coagulación.

La trombina no sólo escinde al fibrinógeno. También activa al Factor VIII (de la vía intrínseca) y el Factor V (de la vía común), actuando de esta manera sobre pasos anteriores de la cascada; por otra parte la trombina activa al Factor XIII, el cual junto con iones Ca^{+2} se encarga de generar nuevos enlaces covalente en la red fibrina del coágulo para estabilizarla y aumentar su resistencia.

4 Ciclo de la vitamina K

Como ya se mencionó, los denominados factores dependientes de la vitamina K (II, VII, IX y X) tienen en su estructura residuos de ácido glutámico (Glu) que mediante una enzima (de tipo carboxilasa) se les adiciona un segundo grupo carboxilo en su posición γ . Estos residuos, ahora de tipo γ -carboxiglutámicos (Gla) son los que se unen a calcio en la cascada de coagulación. Sin el residuo tipo Gla, estos factores pierden su funcionalidad dentro de la coagulación.

La carboxilación ocurre entonces por la enzima gamma glutamil carboxilasa (GGCX), que ocupa como cosustratos CO_2 , O_2 y la vitamina K en su forma reducida hidroquinona (Stafford, 2005). La vitamina K hidroquinona, al servir como cofactor de la GGCX se convierte en vitamina K 2,3-epóxido. Después la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKOR) se encarga de reducir este metabolito en vitamina K, y en un segundo paso en vitamina K hidroquinona, permitiendo que esta vitamina se encuentre disponible de nuevo como cofactor para la GGCX, completando de esta manera el ciclo de esta vitamina (Figura 8).

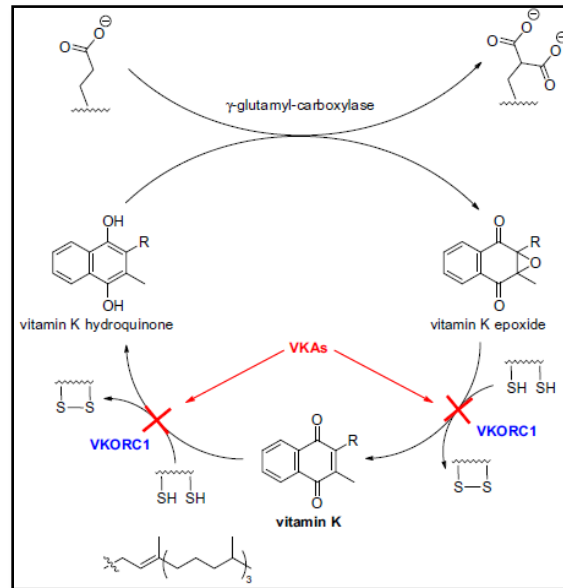


Figura 8. Ciclo de la vitamina K. (Tomado de Montagut-Romans).

La enzima GGCX es una proteína integral de membrana, de 758 aminoácidos y 5 regiones transmembranales, que posee un puente disulfuro entre sus residuos cisteínas 99 y 450. Stafford (2005) propone que la carboxilación ocurre cuando un sustrato se une a la carboxilasa principalmente por su propéptido, y todas las carboxilaciones que se puedan realizar sobre el sustrato, suceden de manera simultánea. La velocidad de la carboxilación por GGCX depende del nivel disponible de vitamina K (Stafford, 2005); mientras que en ciclo completo entre GGCX y VKOR se considera que VKOR es la enzima limitante del proceso (Wallin et al, 2003).

5 Vitamina K epóxido reductasa

La proteína clave dentro del ciclo de la vitamina K es la denominada vitamina K epóxido reductasa (VKOR o VKORC1). Esta proteína posee homología en diversos organismos, perteneciendo a una familia de enzimas que se pueden encontrar en diversos organismos como lo son vertebrados, artrópodos, plantas, bacterias y arqueas, tal y como mostraron Goodstadt y Pontig (2004) al analizar la secuencia de proteínas depositada en bases de datos.

Dos grupos de investigación (Stafford, 2005; Li et al, 2004, Rost et al, 2004) determinaron de forma independiente que el gen encargado de codificar para esta enzima se

encuentra en el cromosoma 16, en una región de aproximadamente 5 mil pares de bases. La región codifica para una enzima de 163 aminoácidos y un peso de aproximadamente 18 kDa. La enzima en cuestión consta de diversas regiones transmembranales, las cuales dependiendo de diferentes programas bioinformáticos predictivos para la topología de proteínas manejados en la literatura han sugerido entre 1 y 5 regiones transmembranales (Stafford, 2005; Rost et al, 2004; Goodstadt y Pontig, 2004; Oldengurg et al, 2006). Actualmente, la teoría más aceptada es que la enzima consta de 3 regiones transmembranales, con la porción N terminal dentro del lumen del retículo endoplasmático y la porción carboxi terminal en el citoplasma de la célula (Figura 9).

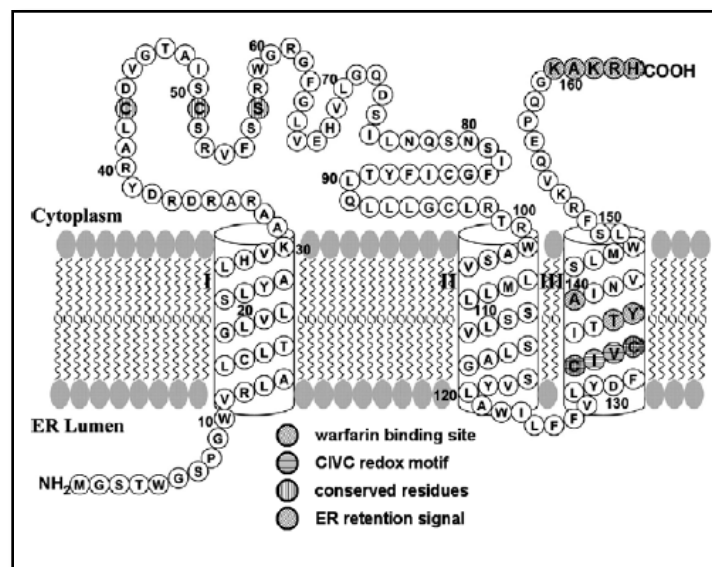


Figura 9. Topología propuesta para VKOR. (Tomado de Oldenburg et al, 2006)

Goodstadt y Pontig (2004) al revisar la secuencia de genes homólogos en otros organismos, notaron 5 residuos de aminoácidos altamente conservados: 4 cisteínas, en las posiciones 43 y 51, así como Cys132 Cys135 en una región transmembranal, y una serina o treonina en la posición 57. Debido a su alta conservación, se ha especulado la necesidad de estos residuos para la actividad de estas enzimas. Sobre todo, las Cys132 y Cys135 ya que al encontrarse integradas en la membrana se encuentran en un ambiente hidrofóbico, lo cual es consistente con la zona hidrofóbica de enzimas de tipo tio óxido reductor.

Precisamente se ha propuesto que la actividad de VKOR depende de agentes tipo tiol; dicha actividad empezaría con la reducción de un enlace disulfuro en dos grupos tiol

en el sitio catalítico. Se sugiere (Wallin et al, 2003; Goodstadt y Pontig 2004) que oxidoreductasas de tipo tioredoxina (Trx) comiencen con la cascada de reducción. Este tipo de enzimas contienen en su centro catalítico un motivo de aminoácidos CXXC; curiosamente VKOR tiene un motivo similar al del sitio catalítico de tioredoxinas en el par de cisteínas conservadas Cys132 y Cys135. Este motivo CXXC es manejado por Oldenburg et al (2006) como un motivo CIVC, es decir, cisteína-isoleucina-valina-cisteína, y podría funcionar de manera análoga al sitio catalítico de las enzimas Trx y ser quien reaccione con la vitamina K epóxido.

La propuesta de Goodstadt y Pontig (2004) de que los residuos conservados Cys132 y Cys135 del sitio catalítico se encuentran en el ambiente hidrofóbico del interior de la membrana se basó en el trabajo de Wallin et al (2003), donde se experimentaron con moléculas de diferente grado de polaridad para alcanzar el sitio catalítico de tipo tiol y confirmaron que sólo los reactivos hidrófobos que emplearon llegaron a este sitio catalítico.

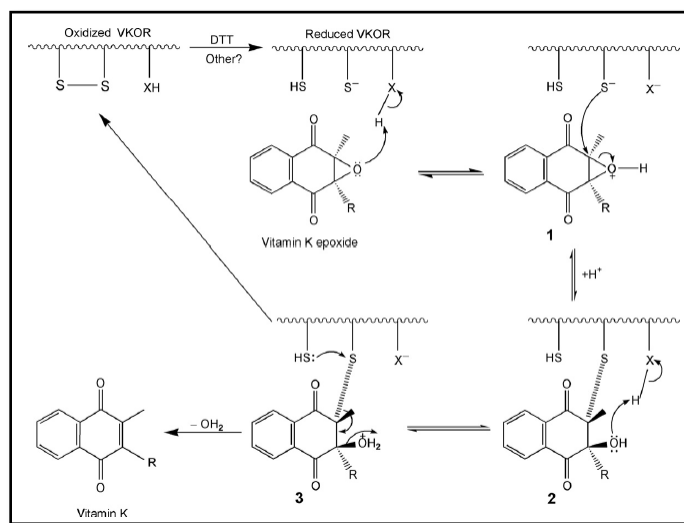


Figura 10. Mecanismo propuesto de reducción de la vitamina K epóxido por parte de VKOR. (Tomado de Tie y Stafford, 2008)

Debido al arreglo tipo CXXC tipo tioredoxina en que se encuentran Cys132 y Cys135 (así como al hecho que cambios de estos aminoácidos por otros provocan pérdida de la actividad) se consideran estos residuos como vitales para VKOR. Cambios en las otras cisteínas conservadas (Cys43 y Cys51) disminuyen la actividad enzimática pero ésta no se pierde, por lo que se consideran no de alta necesidad. Sin embargo, Rishavy et al

(2011) proponen que esto se debe a metodologías ambiguas con reactivos permeantes de membrana que pueden activar directamente a las Cys132 y Cys135. Este grupo midió la actividad de VKOR manteniéndola dentro de membranas intactas y observaron que Trx (que no penetran membranas) activan la enzima, pero al tener mutantes de Cys43 y Cys51 (localizados en el citoplasma) no había actividad. Esto sugiere que estas cisteínas plasmáticas también se necesitan para la actividad de VKOR. La hipótesis es que una proteína oxidoreductora reduce primero el puente disulfuro Cys43-Cys51, y éstos a su vez reducen el puente disulfuro Cys132-Cys135 que termina activando a VKOR. Esto requeriría un cambio en la topología propuesta de VKOR, de 3 regiones transmembranales que es lo más aceptado a 4, para que los 4 residuos de cisteína se encuentren más cercanos y puedan interactuar.

Como el análisis de ortólogos de VKOR en plantas, bacterias y cianobacterias muestran fusión de estas enzimas con dominios Trx, se cree que las tiorreductasas pueden acompañar a VKOR como agentes reductores. Debido a esto, y a las dificultades para la purificación de VKOR, en ocasiones se considera que la actividad podría deberse no sólo a esta proteína sino a un complejo, por lo cual se puede encontrar una variación en la nomenclatura y nombrar a esta enzima como VKORC1 (vitamina K óxido reductasa subunidad 1). Sin embargo, la expresión recombinante de VKORC1 en líneas celulares, o la expresión heteróloga de VKORC1 en otros organismos, demuestra que VKORC1 es indispensable, y casi suficiente, para la reducción de la vitamina K epóxido. Por lo tanto, no ha sido posible comprobar o negar totalmente la existencia de este hipotético complejo (Oldenburg et al, 2006).

Por otra parte, también las diferentes mutaciones que puede presentar VKOR han sido estudiadas. Mutagénesis in vitro de Cys132 y Cys135 han mostrado pérdida de actividad en VKOR, lo cual apoya la hipótesis de que las cisteínas del motivo CIVC tiene un papel importante en la reducción de la vitamina K (Oldenburg et al, 2006). Rost et al (2004) encontraron diversas mutaciones donde cambios de un aminoácido por otro, tanto en ratas como en humanos, están relacionados con enfermedades hereditarias: la deficiencia combinada de factores de coagulación dependientes de vitamina K tipo 2 (VKCFD2) y la resistencia a anticoagulantes de tipo cumarínico (resistencia a warfarina).

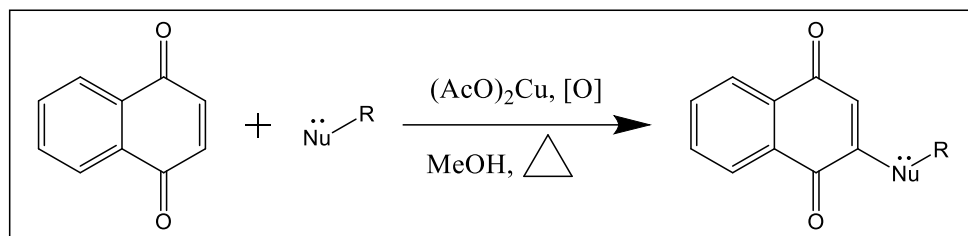
Es precisamente la warfarina un fármaco anticoagulante ampliamente usado en el área terapéutica. Su mecanismo de acción es mediante el bloqueo de la actividad de VKOR, inhibiendo la reducción de la vitamina K, lo cual se traduce en factores de coagulación que no pueden ser γ -carboxilados en el ciclo de la vitamina K, por lo cual no son completamente funcionales dentro de la cascada de la coagulación. Oldenburg et al (2006) manejan un motivo TYA (treonina-tirosina139-alanina) dentro de la misma región transmembranal del motivo CIVC como punto de anclaje de la warfarina. De esta manera se encuentran cerca de las cisteínas catalíticas y pueden bloquear la actividad de VKOR (ver Figura 9). El mecanismo de acción propuesto para warfarina es entonces mediante la unión a la forma oxidada de VKOR (con el puente disulfuro) y evita la reducción del sitio catalítico a su forma tiol (Tie y Stafford, 2008).

6 Naftoquinonas y derivados. Métodos sintéticos

7 Naftoquinonas y derivados. Actividades biológicas

Metodología

En el presente trabajo la metodología sintética propuesta para la obtención de una familia de compuestos análogos a la vitamina K es mediante la adición 1,4 de nucleófilos sobre compuestos carbonílicos α,β -insaturados. El esquema general propuesto es el siguiente:

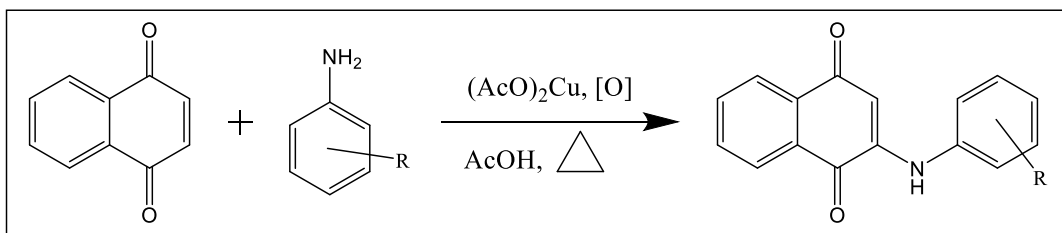


Esquema 1. Síntesis general de análogos de vitamina K.

Bajo este esquema se pretende la incorporación de aminas como agentes nucleófilos para la generación de 1,4-naftoquinonas con fragmentos N-sustituidos. Se emplea de 1,4-naftoquinona comercial como material de partida para todos los análogos de vitamina K propuestos.

Tras el estudio previo realizado por Noriega (2014), se fijó las condiciones de reacción con una estequiometría de 1 equivalente de la 1,4-naftoquinona y de acetato de cobre respectivamente, por 4 equivalentes de amina seleccionada para cada reacción. Más adelante se explica detalladamente las condiciones para cada síntesis realizada.

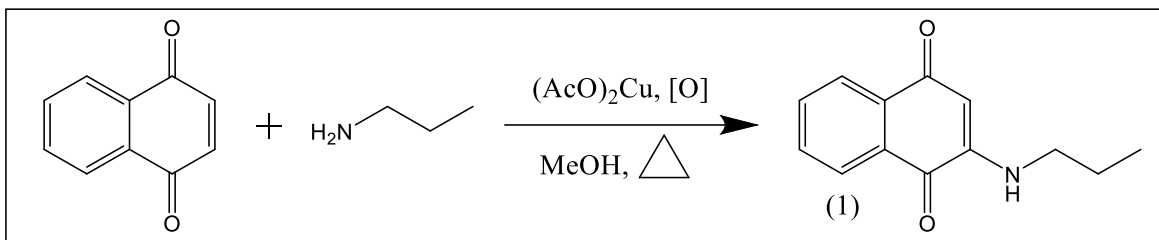
Por lo general las condiciones descritas favorecieron la obtención de los diferentes productos sintetizados; sin embargo para aminas con un menor poder nucleófilo como lo son las anilinas, las reacciones tendían a presentar una mínima formación de producto. En estos casos se modificaron las condiciones de reacción, basándonos en el trabajo publicado por Lisboa et al (2011). El cambio realizado consiste en el empleo de ácido acético como solvente en sustitución del metanol, tal y como puede observarse en el Esquema 2.



Esquema 2. Síntesis general de análogos con fragmentos de anilinas.

El cambio de solvente realizado permitió la obtención de los productos (7) y (8), cuyas metodologías detalladas se reportan con el resto de productos sintetizados.

Síntesis de compuesto (1): NQ-Prop



Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 0.3288 mL de propilamina (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y al crudo se le realizó un percolado en una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex/AcOEt 5%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recristalización con n-Hex y Acetona. Se obtuvieron 187.3 mg de **2-(propilamino)naftalen-1,4-diona** (1), nombrado NQ-Prop, con %R = 87%.

2-(propilamino)naftalen-1,4-diona

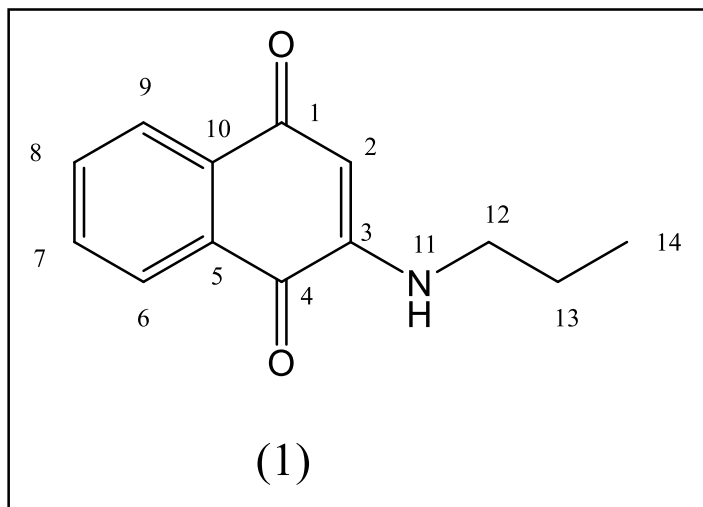
Fórmula Molecular: C₁₃H₁₃O₂N

Aspecto Físico: Sólido cristalino color rojo (cristales con forma de láminas).

IR (cm⁻¹): 3252.45

EM m/z (%): 215 [M⁺] (6), 186 (16), 158 (2), 146 (3), 131 (4), 104 (7), 101 (9), 76 (26), 29 (83), 27 (100)

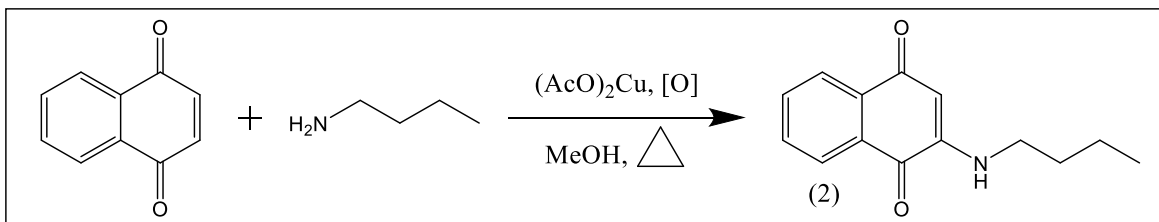
RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8.1 (dd, 1H, J_l =



8 Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.03 (dd, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-9), 7.72 (td, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-7), 7.6 (td, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-8), 5.92 (bs, 1H, NH), 5.73 (s, 1H, H-2), 3.15 (q, 2H, H-12), 1.73 (m, 2H, H-13), 1.02 (t, 3H, H-14)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 182.8 (C-4), 181.9 (C-1), 147.9 (C-3), 134.6 (C-6), 133.7 (C-5), 131.8 (C-9), 130.5 (C-10), 126.2 (C-7), 126.1 (C-8), 100.7 (C-2), 44.2 (C-12), 21.5 (C-13), 11.4 (C-14)

Síntesis de compuesto (2): NQ-Buta



Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 0.3969 mL de butilamina (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y al crudo se le realizó un percolado en una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex/AcOEt 10%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recrystalización con n-Hex y Acetona. Se obtuvieron 176.8 mg de **2-(butilamino)naftalen-1,4-diona (2)**, nombrado NQ-Buta, con %R = 77%.

2-(butilamino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:**C₁₄H₁₅O₂N**Aspecto Físico:** Sólido

cristalino color naranja

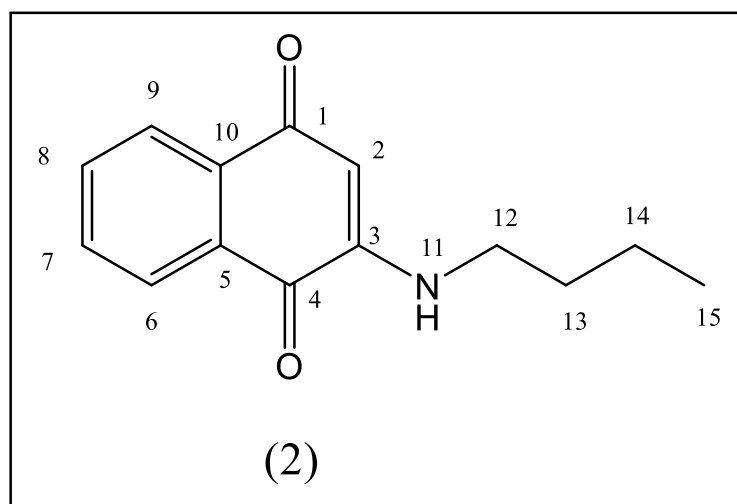
(cristales con forma de agujas).

IR (cm⁻¹): 3347.87**EM m/z (%):** 229 [M⁺] (3),

200 (1), 186 (12), 158 (4), 146

(7), 76 (12), 41 (100), 29 (86),

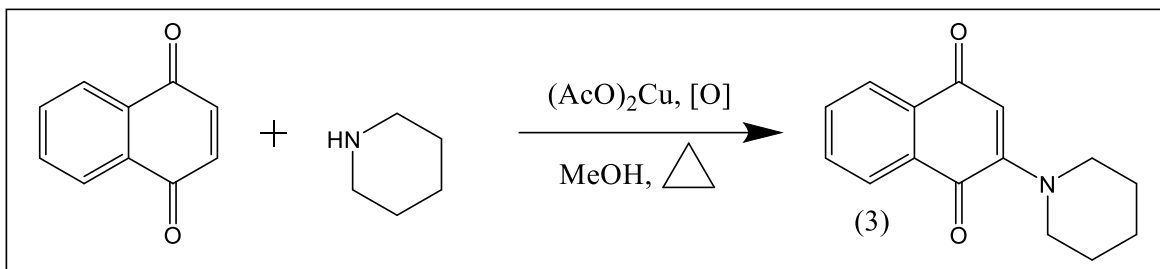
27 (99)



RMN ^1H (CDCl_3) δ : 8.10 (dd, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-6), 8.04 (dd, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-9), 7.72 (td, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-7), 7.60 (td, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-8), 5.89 (bs, 1H, NH), 5.73 (s, 1H, H-2), 3.18 (q, 2H, H-12), 1.68 (m, 2H, H-13), 1.44 (m, 2H, H-14), 0.97 (t, 3H, H-15)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 182.8 (C-4), 181.9 (C-1), 147.9 (C-3), 134.6 (C-6), 133.7 (C-5), 131.8 (C-9), 130.5 (C-10), 126.2 (C-7), 126.1 (C-8), 100.7 (C-2), 42.8 (C-12), 30.2 (C-13), 20.1 (C-14), 13.6 (C-15)

Síntesis de compuesto (3): NQ-Pipe



Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 0.3951 mL de piperidina (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y al crudo se le realizó un percolado en una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recrystalización con n-Hex y Acetona. Se obtuvo **2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona (3)**, nombrado NQ-Pipe con %R = 20%.

2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona

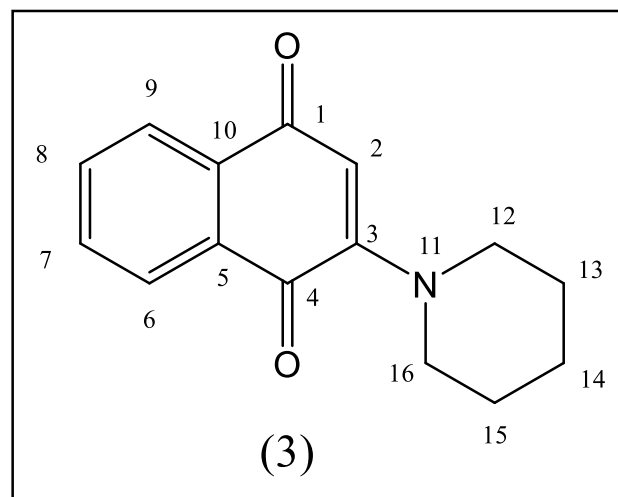
Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅O₂N

Aspecto Físico: Sólido cristalino color guinda.

IR (cm⁻¹): Sin señal característica.

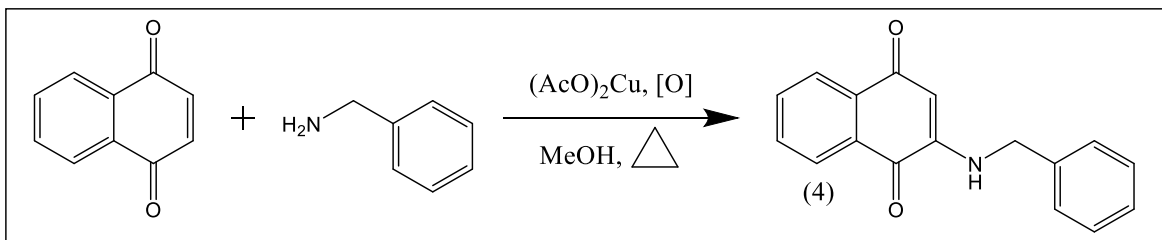
EM m/z (%): 241 [M⁺] (12), 212 (2), 184 (3), 158 (3), 102(42), 84 (46), 76 (81), 55 (47), 41 (100), 27 (30)

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8.03 (dd, 1H, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 2 Hz, H-6), 7.97 (dd, 1H, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 2 Hz, H-9), 7.67 (td, 1H, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 2 Hz, H-7), 7.61 (td, 1H, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 2 Hz, H-8), 6.02 (s, 1H, H-2), 3.49 (t, 4H, H-12, H-16), 1.72 (m, 6H, H-13, H-14, H-15)



RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 183.4 (C-4), 183.3 (C-1), 154.0 (C-3), 133.6 (C-6), 132.9 (C-5), 132.5 (C-10), 132.1 (C-9), 126.5 (C-7), 125.4 (C-8), 110.4 (C-2), 50.4 (C-12, C-16), 25.7 (C-13, C-15), 24.3 (C-14)

Síntesis de compuesto (4): NQ-Bnca



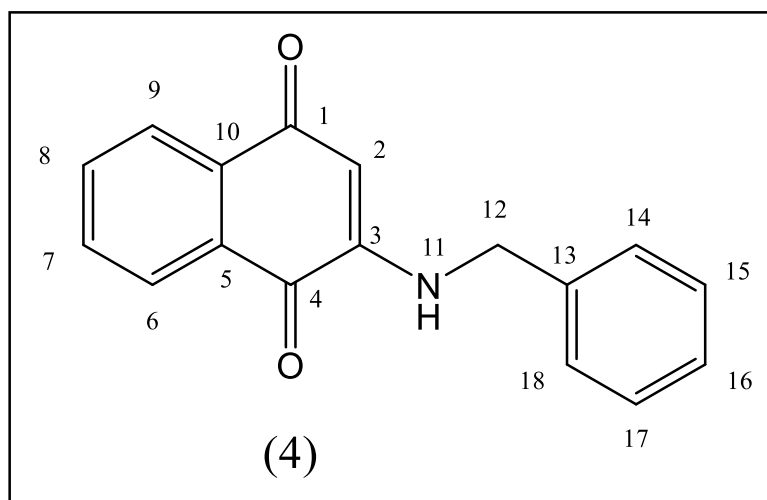
Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 0.437 mL de bencilamina (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y al crudo se le realizó un percolado en una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex/AcOEt 15%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recrystalización con n-Hex y Acetona. Se obtuvieron 241.9 mg de **2-(bencilamino)naftalen-1,4-diona** (4), nombrado NQ-Bnca, con $\%R = 92\%$.

2-(bencilamino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:** $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ **Aspecto Físico:** Sólido

crystalino color naranja-rojo
(cristales con forma de agujas y láminas)

IR (cm^{-1}): 3329.28

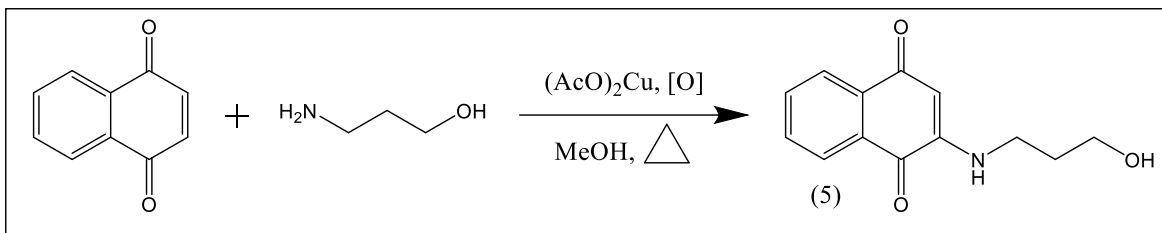
EM m/z (%): 263 [M^+] (3),
104 (13), 91 (100), 77 (33), 65
(61), 51 (31), 39 (27), 28 (6)



RMN ^1H (CDCl_3) δ : 8.01 (dd, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-6), 7.97 (dd, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-9), 7.64 (dt, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-7), 7.54 (dt, 1H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-8), 7.27 (m, 5H, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18), 6.14 (bs, 1H, NH), 5.71 (s, 1H, H-2), 4.30 (d, 2H, H-12)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 183 (C-4), 181.9 (C-1), 147.4 (C-3), 135.9 (C-13), 134.7 (C-6), 133.6 (C-5), 132 (C-9), 130.5 (C-10), 129 (C-14, C-18), 128.1 (C-16), 127.6 (C-15, C-17), 126.3 (C-7), 126.2 (C-8), 101.8 (C-2), 46.8 (C-12)

Síntesis de compuesto (5): NQ-Apro



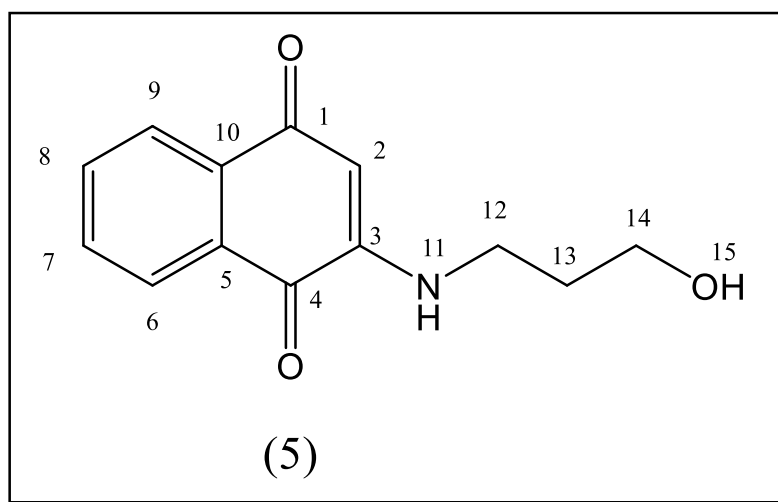
Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 0.3044 mL de 3-aminopropanol (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y al crudo se le realizó un percolado en una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex/AcOEt 75%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recristalización con n-Hex y Acetona. Se obtuvieron 194 mg de **2-((3-hidroxipropil)amino)naftalen-1,4-diona** (5), nombrado NQ-Apro, con %R = 84%.

2-((3-hidroxipropil)amino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:**C₁₃H₁₃O₃N

Aspecto Físico: Sólido cristalino color naranja (cristales con forma de agujas pequeñas)

IR (cm⁻¹): 3464.25, 3330.85

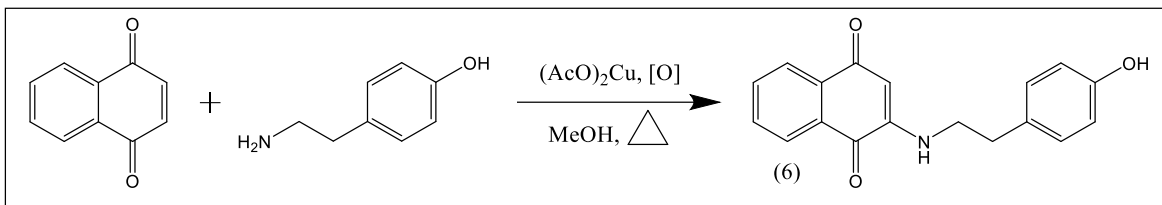
EM m/z (%): 231 [M⁺] (4), 213 (2), 186 (13), 104 (18), 76 (76), 50 (42), 41 (37), 31 (100), 28 (37)



RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7.96 (d, 1H, H-6), 7.93 (d, 1H, H-9), 7.81 (t, 1H, H-7), 7.71 (t, 1H, H-8), 7.52 (bs, 1H, NH), 5.68 (s, 1H, H-2), 4.63 (t, 1H, OH), 3.51 (q, 2H, H-14), 3.25 (q, 2H, H-12), 1.75 (quin, 2H, H-13)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 182 (C-4), 181.7 (C-1), 149 (C-3), 135.2 (C-6), 133.7 (C-5), 132.5 (C-9), 130.8 (C-10), 126.3 (C-7), 125.8 (C-8), 99.7 (C-2), 59.2 (C-14), 40.1 (C-12), 30.9 (C-13)

Síntesis de compuesto (6): NQ-Tira



Se disolvió 181.63 mg (1 mmol) de acetato de cobre en 20 mL de MeOH bajo agitación magnética a 60°C y mientras se bombeaba aire al matraz de reacción. Tras su completa disolución se adicionó lentamente 694.4 mg de tiramina (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante TLC. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y el crudo se purificó mediante una columna con sílica gel, usando como fase móvil DCM/AcOEt 30%, tras lo cual se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 221.8 mg de **2-((4-hidroxifenil)amino)naftalen-1,4-diona** (6), nombrado NQ-Tira, con %R = 76%.

2-((4-hidroxifenil)amino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:**C₁₈H₁₅O₃N

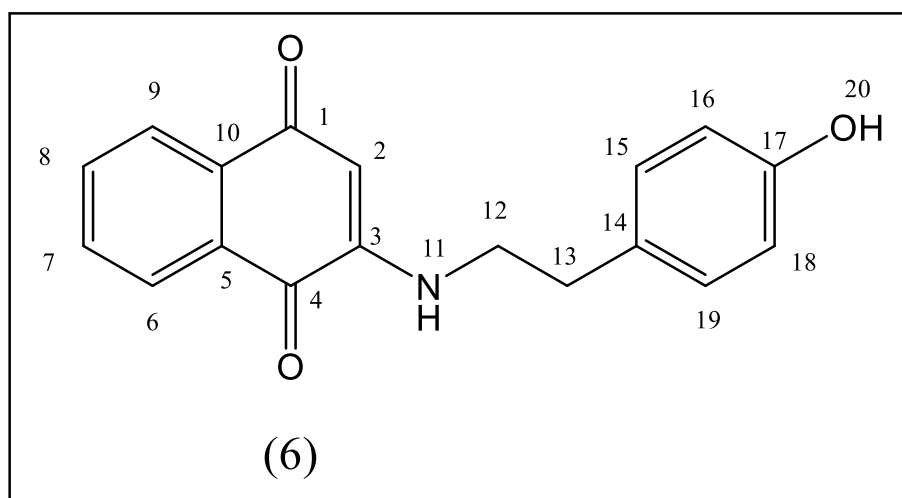
Aspecto Físico: Sólido cristalino color naranja (cristales con forma de agujas)

IR (cm⁻¹): 3349.81, 3323.97

EM m/z (%): 293

[M⁺] (1), 186 (14), 107

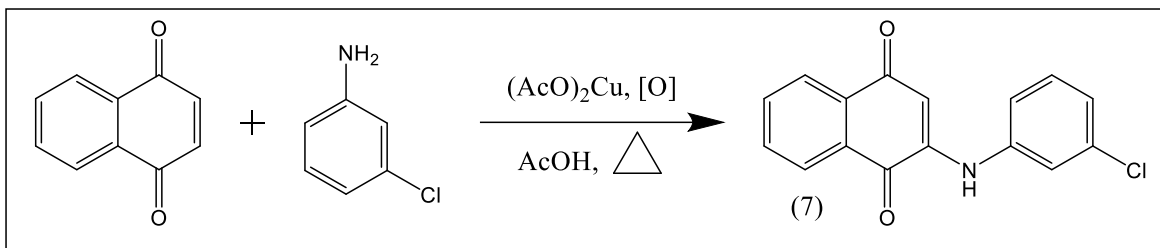
(100), 104 (8), 77 (91), 53 (23), 39 (19)



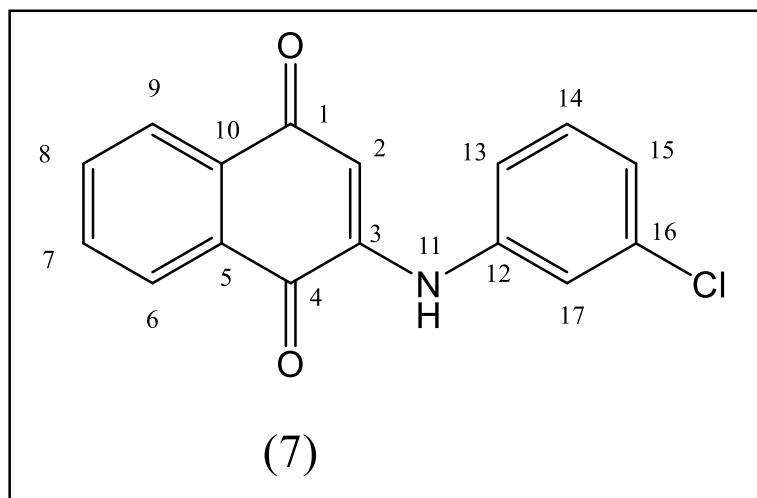
RMN ^1H (CDCl_3) δ : 9.18 (s, 1H, OH), 7.97 (d, 1H, H-6), 7.94 (d, 1H, H-9), 7.82 (t, 1H, H-7), 7.71 (t, 1H, H-8), 7.42 (t, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, H-16, H-18), 6.69 (d, 2H, H-15, H-19), 5.71 (s, 1H, H-2), 3.36 (q, 2H, H-12), 2.79 (t, 2H, H-13)

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 182 (C-4), 181.7 (C-1), 156.3 (C-17), 148.7 (C-3), 135.3 (C-6), 133.6 (C-5), 132.6 (C-9), 130.8 (C-10), 130.1 (C-16, C-18), 129.3 (C-14), 126.3 (C-7), 125.8 (C-8), 115.7 (C-15, C-19), 100 (C-2), 44.1 (C-12), 33 (C-13)

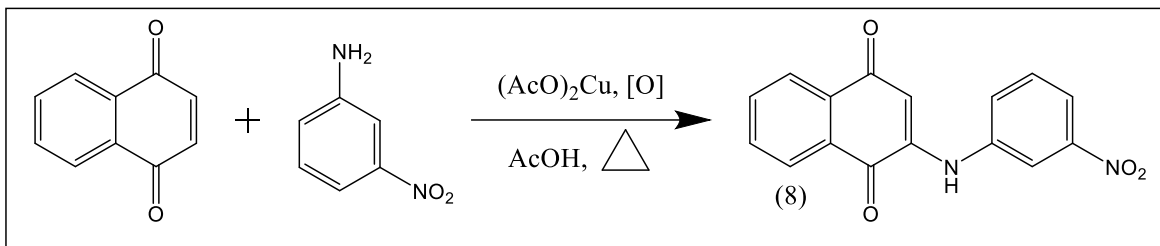
Síntesis de compuesto (7): NQ-ClAn



Se disolvió 19.97 mg (0.1 mmol) de acetato de cobre monohidrato y 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona en 2 mL de ácido acético bajo agitación magnética a 65°C en un matraz bola destapado. Enseguida se adicionó 0.1049 mL (1 mmol) de 3-cloroanilina y se dejó reaccionar por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó DCM al matraz y se analizó mediante TLC. Se realizaron lavados al crudo de reacción con una solución concentrada de carbonato de potasio y la fase orgánica se purificó mediante una columna con sílica gel, usando como fase móvil n-Hex/DCM 30%, tras lo cual se eliminó el disolvente. Se redisolvió y precipitó el producto a partir de una mezcla n-Hex/DCM y se filtró al vacío. Se obtuvieron 186.6 mg de **2-((3-clorofenil)amino)naftalen-1,4-diona (7)**, nombrado NQ-ClAn, con %R = 66%.

2-((3-clorofenil)amino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:**C₁₆H₁₀ClO₂N**Aspecto Físico:** Sólido color borgoña**IR (cm⁻¹):** 3184.14**EM m/z (%):** 283 [M⁺] (5), 111 (26), 104 (38), 89 (47), 76 (100), 63 (35), 50 (62)**RMN ¹H (CDCl₃) δ:****RMN ¹³C (CDCl₃) δ:**

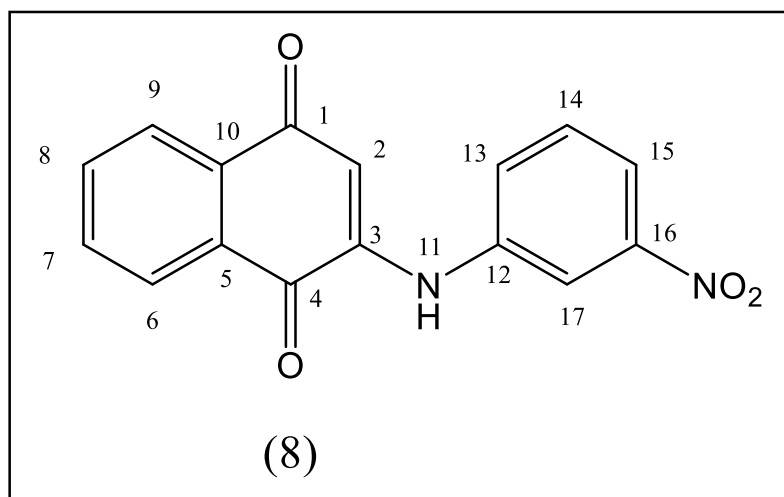
Síntesis de compuesto (8): NQ-NOAn



Se disolvió 19.97 mg (0.1 mmol) de acetato de cobre monohidrato y 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona en 2 mL de ácido acético bajo agitación magnética a 65°C en un matraz bola destapado. Enseguida se adicionó 138.13 mg (1 mmol) de 3-nitroanilina y se dejó reaccionar por 40 minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionó AcOEt frío al matraz. El precipitado formado se filtró al vacío, lavándolo con AcOEt frío. Se dejó secar el precipitado lavado, y se le realizó una TLC para revisar la pureza del producto. Se obtuvieron 184.5 mg de **2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona (8)**, nombrado NQ-ClAn, con %R = 63%.

2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona**Fórmula Molecular:**C₁₆H₁₀O₄N₂**Aspecto Físico:** Sólido

color naranja

IR (cm⁻¹): 3180.60**EM m/z (%):** 294 [M⁺] (6),
248 (1), 104 (15), 76 (100),
63 (43), 50 (56), 30 (36)**RMN ¹H (CDCl₃) δ:****RMN ¹³C (CDCl₃) δ:**

Resultados y Discusión de Resultados

Como se puede observar en la sección de Metodología, se eligió a la 1,4-naftoquinona como material de partida para la síntesis de análogos de vitamina K. Tras observar la estructura de la warfarina, como representante de los anticoagulantes coumarínicos antagonistas de las vitamina K, vemos que existe una similitud estructural en el esqueleto bicíclico insaturado con grupos funcionales oxigenados: un sistema quinónico en la vitamina K, y una lactona e hidroxilo en la warfarina. Tanto la quinona como la lactona poseen un carbonilo; si a esto añadimos que la teoría más aceptada sobre el mecanismo de acción de la warfarina sucede mediante una unión en el mismo sitio donde se une la vitamina K en condiciones normales (el sitio catalítico de VKOR) surge la hipótesis que la analogía de ambos esqueletos está relacionada con su interacción con esta diana.

La elección de la 1,4-naftoquinona se realiza entonces ya que el núcleo bicíclico es más similar al de la vitamina K que la misma warfarina (Figura x), por lo que una interacción con el sitio catalítico de VKOR suena factible. Pensando en evitar que los análogos sintetizados de vitamina K tengan una actividad coagulante como la misma vitamina, se propuso introducir variaciones en los grupos funcionales del esqueleto, buscando alejarnos de la similitud de vitamina K y ubiquinonas (cadenas laterales alifáticas con dobles enlaces) y manejar nuevos grupos funcionales que pudieran modular la actividad coagulante, hasta el punto de revertirse y obtener nuevos anticoagulantes antagonistas de la vitamina K.

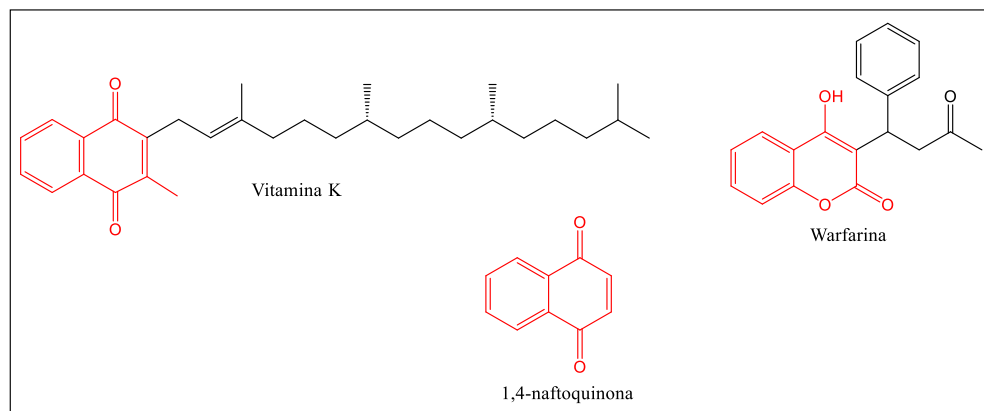
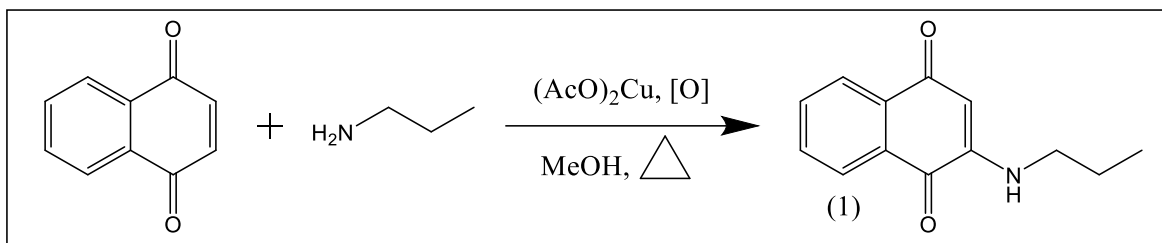


Figura x. Similitudes estructurales entre vitamina K, warfarina y 1,4-naftoquinona.

La propuesta sintética de este trabajo consiste en la introducción de nucleófilos sobre el núcleo de la 1,4-naftoquinona, con diferencias estructurales que nos permitan la obtención de una familia de compuestos con la cual hacer un estudio relación estructura – actividad anticoagulante preliminar. Los nucleófilos seleccionados fueron de tipo amina.

Se comenzó con la propilamina, como un agente nucleofílico con una función alquílica.



Esquema x. Síntesis del compuesto (1) NQ-Prop.

La primera evidencia de que se llevó a cabo la transformación del material de partida fue que la 1,4-naftoquinona es un sólido de color verde pardo, y el producto purificado de la reacción fue rojo, el cual se logró cristalizar en forma de láminas. Se analizó mediante espectroscopía de IR y se observó una banda a 3252.45 cm⁻¹, la cual se encuentra en el rango esperado para el estiramiento de enlaces N-H (3500-3100 cm⁻¹) en aminas primarias y secundarias. Debido a que el resto de señales en IR (C=C aromático, C-H, C=O) son iguales tanto para el material de partida como para el producto, la presencia de esta banda es sugerente del éxito de la reacción, ya que el producto (1) NQ-Prop tiene el grupo funcional amina secundaria mientras el material de partida no lo posee.

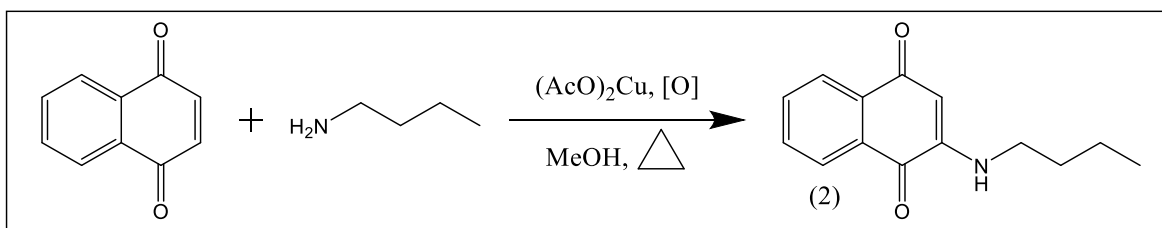
Por su parte, el análisis por espectrometría de masas mostró un ión molecular 215.19 m/z correspondiente a la fórmula C₁₃H₁₃O₂N. Fragmentos en el rango 27-29 m/z también concuerdan con el grupo amina presente en la estructura.

Mediante un análisis de RMN ¹H se observaron las señales de los protones aromáticos H-6 a 8.1 δ como un dd, J₁=8 Hz y J₂=2 Hz; H-9 a 8.03 δ como un dd, J₁=8 Hz y J₂=2 Hz; los protones H-7 a 7.72 δ como un td, J₁=8 Hz y J₂=2 Hz; y H-8 a 7.6 δ como otro td, J₁=8 Hz y J₂=2 Hz. A su vez se observa el protón alílico H-2 a 5.73 δ. Estas señales tenderán a mantenerse en el resto de compuestos sintetizados por pertenecer a la parte

común de su esqueleto. Las señales características de NQ-Prop son un singlete ancho a 5.92 δ correspondiente al protón de la amina, y a tres señales diferentes que representan la cadena lateral propil, con 3.15, 1.73 y 1.02 δ .

En RMN ^{13}C vemos 13 señales diferentes correspondientes al mismo número de carbonos encontrados en la estructura de este compuesto. Las señales más desprotegidas corresponden a los carbonos C-4 y C-1 con 182.8 y 181.9 δ respectivamente. El anillo aromático está constituido por las señales 134.6, 133.7, 131.8, 130.5, 126.2 y 126.1 δ para los carbonos C-6, C-5, C-9, C-10, C-7, C-8. De la porción del enlace α,β insaturado se observa a 147.9 δ el C-3 y a 100.7 δ el C-2. Todas estas señales también tienden a mantenerse similares en el resto de compuestos sintetizados como parte del esqueleto compartido entre ellos. Para NQ-Prop las señales características serían a 44.2, 21.5 y 11.4 δ para los 3 carbonos de su cadena propil lateral, C-12, C-13 y C-14.

Para el segundo producto, se mantuvo a una amina alifática como nucleófilo, en esta ocasión variando el tamaño de la cadena a un metileno extra.



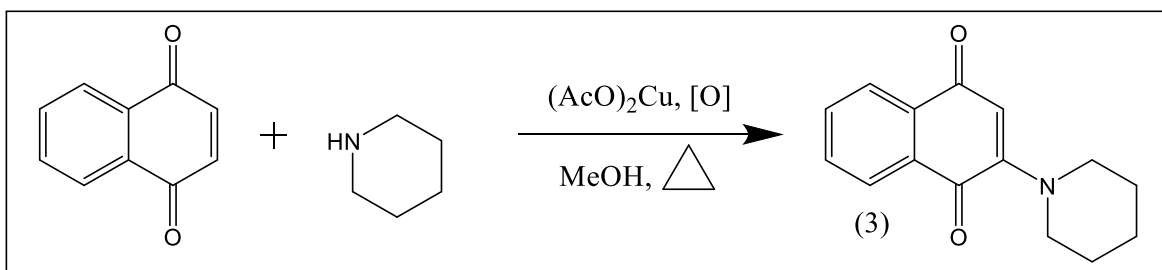
Esquema x. Síntesis del compuesto (2) NQ-Buta.

La amina empleada fue butilamina, y se purificó un producto color naranja que se logró cristalizar en forma de agujas. El espectro de IR mostró una banda a 3347.87 cm^{-1} que es consistente con la introducción del grupo amina secundaria sobre el esqueleto de la naftoquinona. Mediante espectrometría de masas se logró observar un ión molecular de 229.20 m/z correspondiente a una fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$, así como fragmentos 27-29 m/z que de nuevo sugieren la presencia de un grupo amino.

En RMN ^1H las señales propias de este compuesto corresponden a los 4 diferentes tipos de protón encontrados en la cadena butil del esqueleto: 3.18 δ para H-12 como un q, 1.68 δ para H-13 como un m, 1.44 δ para H-14 como un m también, y 0.97 δ para H-15 como un t. Se logró observar el protón de la amina como una señal ancha a 5.89 δ . El

análisis de RMN ^{13}C muestra a su vez a los 4 carbonos de la cadena alquílica lateral, 42.8 δ para C-12, 30.2 δ para C-13, 20.1 δ para C-14 y 13.6 para C-15, siendo éste el carbono más protegido de todos.

El siguiente producto sintetizado mantuvo una naturaleza alquílica en el sustituyente de la amina introducida, sin embargo hubo un cambio importante ya que este nuevo sustituyente, la piperidina, es de tipo cíclico mientras que los anteriores grupos eran lineales.



Esquema x. Síntesis del compuesto (3) NQ-Pipe.

El monitoreo por TLC de la reacción con piperidina mostró el consumo del material de partida 1,4-naftoquinona, y una intensidad de la mancha atribuida al producto (rojiza a simple vista como el resto de compuestos sintetizados) similar a los productos (1) y (2). Debido a esto se esperaba un rendimiento de reacción parecido a los compuestos anteriores. El producto se purificó por columna cromatográfica como se había hecho habitualmente, y se intentó recrystalizar lo cual no se pudo lograr. Analizando el compuesto por TLC se observaron impurezas, pese a la anterior purificación. Se llevó a cabo una placa de cromatografía preparativa para purificar a NQ-Pipe, sin embargo se observó en la placa la aparición de nuevas manchas que no se habían registrado desde la primera purificación por columna.

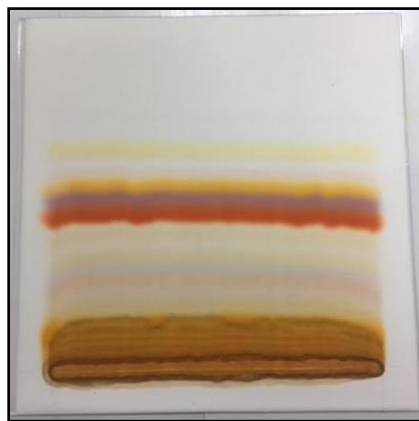


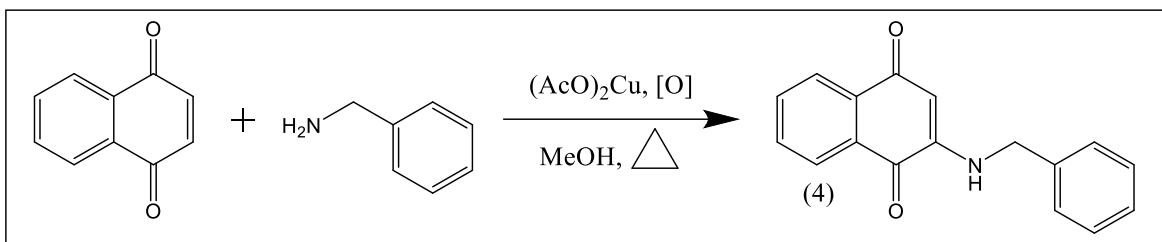
Figura x. Placa preparativa de NQ-Pipe.

La aparición de nuevas manchas en las TLC de monitoreo después de las purificaciones por columna y placa preparativa sugieren la descomposición del producto NQ-Pipe al estar en contacto con la sílica gel. De la placa se raspó la mancha roja a simple vista, identificada como el posible producto y se caracterizó. Debido a estas pérdidas en las purificaciones, el rendimiento reportado para este compuesto fue menor que el de los compuestos anteriores, si bien la TLC del crudo original de reacción sugería un porcentaje de conversión mayor al obtenido.

La caracterización de (3) NQ-Pipe por IR no mostró ninguna señal en el rango del estiramiento N-H ya que por su naturaleza cíclica se obtuvo una amina terciaria, la cual no se puede apreciar como las primarias o secundarias y lo diferencian de los primeros dos compuestos sintetizados. Por espectrometría de masas se observó el ión molecular del compuesto a 241.19 m/z, correspondiente a la fórmula molecular $C_{15}H_{15}O_2N$.

En RMN 1H se logró identificar las señales del anillo alifático, donde H-12 y H-16 se observaron en una misma señal como un t a 3.49 δ . El resto de protones del anillo, H-13, H-14 y H-15 se agruparon en otra señal a 1.72 δ como un m que integra para 6 protones. En RMN ^{13}C se observó la agrupación de C-12 y C-16 en una señal a 50.4 δ y de C-13 y C-15 a 25.7 δ , aunque el carbono C-14 se pudo apreciar por su cuenta a 24.3 δ .

Tras los primeros 3 compuestos sintetizados de tipo alifáticos, se comenzó con la síntesis integrando sustituyentes aromáticos en las aminas empleadas. La primera amina aromática usada fue la bencilamina, la cual fue destilada previo a su uso.

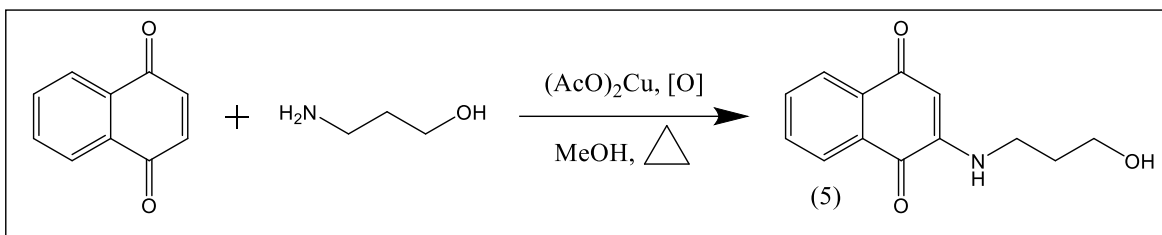


Esquema x. Síntesis del compuesto (4) NQ-Bnca.

Como fue tendencia con todos los productos de este trabajo, se purificó un producto color naranja-rojo el cual se cristalizó en forma de agujas y láminas. En el espectro de IR se detectó una banda a 3329.28 cm^{-1} que corresponde a la amina secundaria generada tras la incorporación de bencilamina. El espectro de masas mostró un ión molecular de 263.21 m/z , acorde a una fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$. También resalta que el pico base es de 91 m/z , que sugiere la presencia del denominado ión tropilio generado cuando se tiene un fragmento de tipo bencilo y que precisamente se encuentra en este producto.

En el espectro de RMN ^1H se puede observar el protón de la amina a $6.14\ \delta$ como una señal ancha, y el único protón alifático perteneciente a H-12 aparece a $4.30\ \delta$ como un d. La zona aromática en esta ocasión es la que presenta más señales, pues a las típicas del esqueleto de la naftoquinona se han sumado las del anillo aromático incorporado de la bencilamina. Para este anillo correspondiente las señales se han encimado y no permiten distinguirlas individualmente; se aprecia un multiplete a $7.27\ \delta$ que integra para 5 protones que corresponden a H-14, H-15, H-16, H-17 y H-18. Por su parte en RMN ^{13}C los carbonos del nuevo anillo aromático se muestran en 3 señales diferentes: $129\ \delta$ para C-14 y C-18, $128.1\ \delta$ para C-16 y $127.6\ \delta$ para los carbonos C-15 y C-17. Solamente se ve una señal en la región alifática, a $46.8\ \delta$ para que carbono C-12 que corresponde al carbono bencílico.

Los dos siguientes productos sintetizados incorporaron en su estructura grupos alcohol además del amino que se maneja en todos ellos. El primero es el producto de la naftoquinona con un amino alcohol alifático, el 3-aminopropanol.

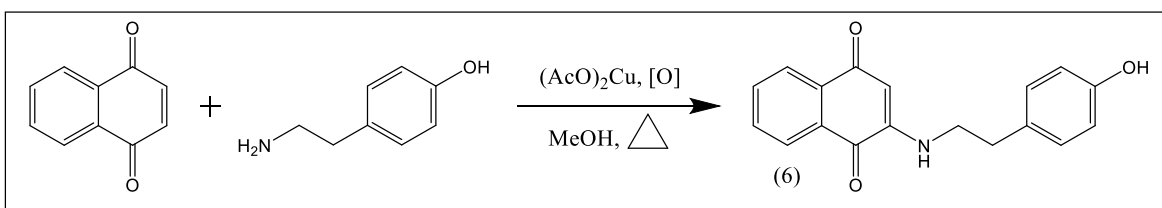


Esquema x. Síntesis del compuesto (5) NQ-Apro.

El producto purificado se observaba como pequeños cristales de tipo aguja color naranja. Tras su análisis por IR, se detectó una señal a 3330.85 cm^{-1} para la amina secundaria, así como una banda a 3464.25 cm^{-1} que en este caso se relacionó al enlace O-H del alcohol periférico. En espectrometría de masas se observó un ión molecular de 231.20 m/z para una fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$. Mediante esta técnica los alcoholes suelen perderse como agua, y se distinguió un fragmento M-18 a 213 m/z en el espectro, si bien con una baja abundancia relativa, que concuerda con la estructura propuesta.

En el espectro de RMN ^1H además de observarse la señal de la amina a $7.52\ \delta$ se puede distinguir una señal a $4.63\ \delta$ como triplete que se asignó al protón del alcohol. El resto de señales que ayudan a confirmar la estructura de este compuesto son las de la cadena alifática: el protón H-14 a $3.51\ \delta$, H-12 a $3.25\ \delta$ y H-13 a $1.75\ \delta$, siendo éste el metileno central y el más protegido. Esta misma porción alifática puede asignarse en RMN ^{13}C respectivamente en las señales a $59.2\ \delta$ para C-14, $40.1\ \delta$ para C-12 y $30.9\ \delta$ para C-13, siendo de nuevo esta posición la más protegida.

El segundo producto con incorporación de un fragmento tipo amino alcohol fue de naturaleza aromática, para aumentar las diferencias entre las aminas incorporadas y generar mayor variedad estructural. Tras el uso de tiramina, se sintetizó el siguiente producto:



Esquema x. Síntesis del compuesto (6) NQ-Tira.

El producto tras purificación en columna cromatográfica se observaba como cristales naranjas en forma de aguja. El análisis de su espectro de IR permite observar dos señales características importantes como en el producto anterior: una señal a 3323.97 cm^{-1} para el estiramiento N-H de la amina secundaria, y otra señal a 3349.81 cm^{-1} para el alcohol de la porción fenólica de la molécula. En espectrometría de masas se detecta con baja intensidad un ión molecular de 293.22 m/z , que corresponde a la fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$.

En RMN ^1H se observan como más protegidos los protones alifáticos H-12 y H-13 a 3.36 y $2.79\ \delta$ respectivamente. Se alcanza a detectar la señal del protón fenólico a $9.18\ \delta$, mientras que las señales del anillo aromático incorporado por la tiramina pueden verse a $7.07\ \delta$ para los protones H-16 y H-18, y a $6.69\ \delta$ para H-15 y H-19. En RMN ^{13}C los metilenos de la tiramina C-12 y C-13 pueden observarse a 44.1 y $33\ \delta$ respectivamente, mientras que los carbonos aromáticos incorporados se reparten en tres señales: $156.3\ \delta$ para C-17, $130.1\ \delta$ para C-16 y C-18, $129.3\ \delta$ para C-14 y $115.7\ \delta$ para C-15 y C-19.

En este punto se decidió comenzar a incorporar anilinas sobre el esqueleto de la naftoquinona. Con el producto (4) NQ-Bnca ya se incorporó un anillo aromático sobre las estructuras sintetizadas, asimismo con el producto (6) NQ-Tira. La diferencia que se quiso manejar con la incorporación de anilinas fue el número de carbonos como espaciadores entre la amina incorporada y el anillo bencénico. En el caso de NQ-Bnca se tiene un carbono espaciador, mientras que en NQ-Tira se cuenta con dos; los fragmentos anilina por otra parte presentan una unión directa entre la amina y el anillo aromático.

Por otra parte, se pretende generar diferencias en los sustituyentes respectivos de estos anillos. El derivado de bencilamina no presenta sustitución en el anillo aromático, mientras que la tiramina tiene un grupo electrodonador en su posición p. Se decidió entonces el uso de anilinas con grupos electroattractores, eligiendo la 3-cloroanilina y la 3-nitroanilina.

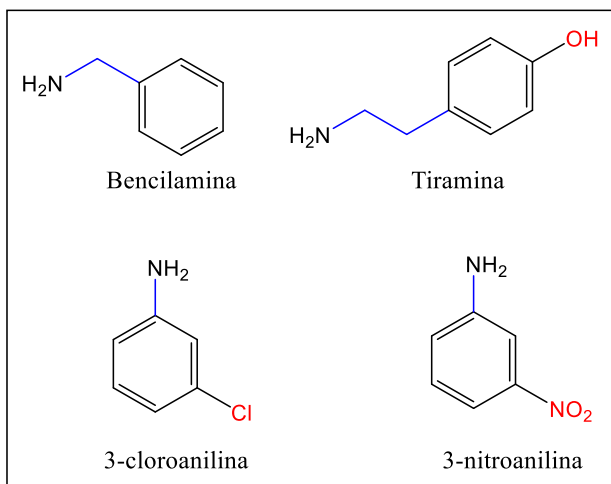
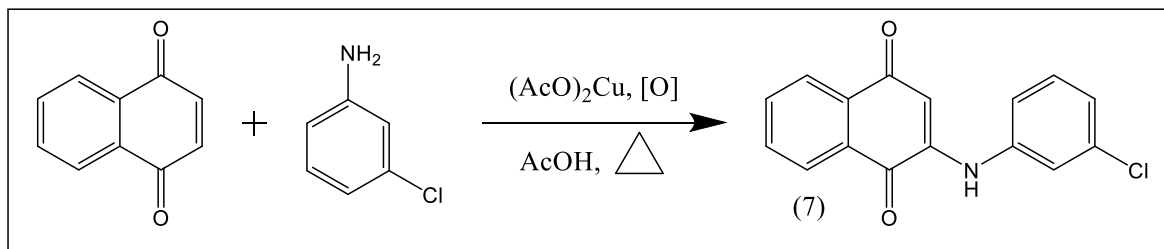


Figura x. Diferencias estructurales entre las aminas aromáticas empleadas.

La primera anilina en usarse fue la 3-cloroanilina. Se siguió la metodología sintética empleada anteriormente, sin embargo durante el monitoreo de la reacción mediante TLC se observó que no se consumía el material de partida (1,4-naftoquinona) como en el resto de reacciones. Tras dejar continuar la reacción por un tiempo mayor al habitual no se apreció cambios significativos en las TLC de monitoreo.

Se intentó de nuevo la reacción, alterando el orden de adición de los reactivos, aumentando el tiempo de reacción e incluso aumentando la temperatura del sistema, sin embargo no se logró un avance en la reacción al estarla monitoreando.

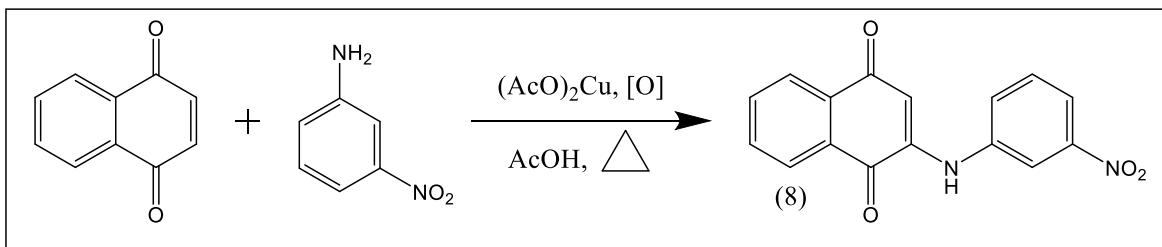
Se decidió entonces cambiar la metodología, con base en el trabajo de Lisboa et al (2011). Se continuó empleando acetato de cobre como catalizador y una atmósfera oxidante (mediante el uso del matraz destapado para que la reacción tuviera contacto con el aire). Sin embargo, en sustitución del metanol como solvente se empleó ácido acético concentrado. Bajo estas condiciones, la reacción con anilinas no procede hasta que se consuma el total de la naftoquinona, pero el monitoreo por TLC de las nuevas condiciones mostraba una mejoría en la reacción.



Esquema x. Síntesis del compuesto (7) NQ-ClAn.

El compuesto NQ-ClAn se purificó mediante columna cromatográfica, pero no se llevó a una forma cristalina. Tras eliminar el disolvente se obtuvo un sólido color borgoña. El espectro de IR muestra como señal característica una banda a 3184.14 cm^{-1} , correspondiente al enlace N-H de la amina secundaria generada. En el espectro de masas, se detectó un ión molecular de 283.14 m/z , que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClO}_2\text{N}$. Se detectó a su vez una señal M+2 a 285.21 m/z , cuya intensidad relativa se aproxima a una tercera parte del ión molecular M^+ . Esto concuerda con las señales observadas en espectrometría de masas cuando el analito presenta un átomo de cloro en su estructura, debido a la relación isotópica del cloro.

El siguiente producto se sintetizó a partir de la 3-nitroanilina. También se utilizó ácido acético como solvente, continuando con las condiciones revisadas en la síntesis del producto anterior.



Esquema x. Síntesis del compuesto (8) NQ-NOAn.

Al adicionar AcOEt en el matraz para llevar a cabo el work up de manera análoga al producto derivado de la 3-cloroanilina, se observó la precipitación de un sólido color naranja, que se consideró era el producto. Este hecho dificultó la realización de los lavados pertinentes al crudo de reacción, y la realización de una cabeza de columna para la purificación cromatográfica del producto. Debido a esto, se procedió a realizar de nuevo la reacción con cambios en el proceso de work up: se aprovechó la baja solubilidad del producto y su solubilización para purificarlo mediante un filtrado al vacío y lavados con AcOEt enfriando previamente. El hecho de usar el solvente a una baja temperatura se debía a disminuir la solubilidad del producto en el solvente de lavados y minimizar las pérdidas

del mismo. Un monitoreo del AcOEt empleado para los lavados mostró trazas del producto, sin embargo se consideró que esta purificación fue la más apropiada según las características de solubilidad del compuesto, su relativa rapidez y que el rendimiento no distó mucho del obtenido para el otro compuesto derivado de una anilina (NQ-ClAn) que se purificó por cromatografía de columna.

El producto de la reacción, un sólido color naranja, tras su análisis por IR mostró como señal más importante una banda a 3180.60 cm^{-1} , perteneciente a su fragmento amina secundaria. En su espectro de masas, se observó un ión molecular de 294.17 m/z , que corresponde a la fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_2$.

Capítulo 2. Estudio quimioinformático y biológico
Generalidades

1 Química Medicinal en la búsqueda de nuevos principios activos

2 Espacio químico y conceptos relacionados

3 Teoría ligando receptor

3.1 Modelo Llave-cerradura

3.2 Modelo de Koshland

4 Química computacional

4.1 Biología computacional

4.2 Status, ventajas y problemas actuales con la Química Computacional

5 Docking

6 Generalidades; evaluación biológica

Metodología

Considerando como continuación de la síntesis de compuestos la evaluación de los mismos como potenciales agentes farmacológicos, se plantea en este trabajo la evaluación *in silico* e *in vitro* de las moléculas descritas en el Capítulo 1. El estudio *in silico* consistió en llevar a cabo un proceso de docking entre los compuestos sintetizados y un receptor biológico de tipo vitamina K epóxido reductasa; mientras que *in vitro* se evaluó la capacidad anticoagulante de los mismos compuestos mediante una prueba de laboratorio, la prueba de Tiempo de Protrombina.

Estudio *in silico*: Docking

1.- Preparación de los ligandos: Cada una de las estructuras de los compuestos sintetizados se originó en el programa UCSF Chimera (Pettersen, 2004) en el formato digital PDB. La preparación de los ligandos antes de llevar a cabo el docking consiste en dos etapas: la selección de los enlaces rotables de la estructura para la generación de las diferentes conformaciones a evaluar, y en un minimizado de energía de la molécula.

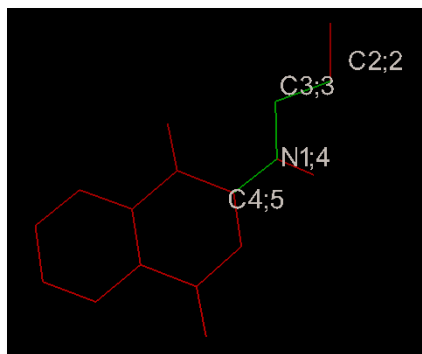


Figura x. Selección de enlaces rotables del ligando (en verde).

Para especificar los enlaces rotables del ligando se empleó el programa AutoDock Tools (Sanner, 1999). Posteriormente, el minimizado de energía se realizó en UCSF Chimera, empleando las condiciones estándar para este proceso:

Pasos descendentes más pronunciados: 100

Tamaño de pasos descendentes más pronunciados: 0.02 Å

Pasos de gradiente conjugados: 10

Tamaño de pasos de gradiente conjugados: 0.02 Å

Intervalo de actualización: 10

Átomos fijos: ninguno.

En ambos pasos el formato del ligando se mantuvo como PDB. La determinación de cargas se realizaron bajo el método Gasteiger y calculadas con el algoritmo ANTECHAMBER (Wang, 2006).

2.- Preparación del receptor: Se eligió como receptor para el docking un homólogo bacteriano de la vitamina K epóxido reductasa; el homólogo pertenece a la bacteria *Synechococcus sp.* y fue expresado en *Escherichia coli*. La estructura se descargó del Protein Data Bank (número identificador PDB: 3KP9).

Debido a que el receptor se encuentra en la base de datos del PDB cocrystalizado con un ligando endógeno, ubiquinona-10, y un par de iones de mercurio, se usó el programa Vega ZZ (Pedretti, 2004) para eliminar estas estructuras antes de comenzar los cálculos necesarios para el docking. Tras este paso, con el mismo programa se comenzó a preparar el receptor mediante: 1) la adición de hidrógenos faltantes en la estructura, 2) la remoción de moléculas de agua, 3) el cálculo de cargas y potencial. La determinación de cargas se realizó con el método Gasteiger, y el receptor se guardó con el formato mol2.

El receptor se abrió posteriormente con el programa UCSF Chimera, con el cual se procedió a calcular la superficie del receptor como paso previo al docking con la función “Dock Prep”. En caso de encontrar residuos incompletos en las cadenas, se seleccionó la opción de reemplazo mediante la librería de rotámeros Dunbrack (Dunbrack, 2002) y se determinaron las cargas con el método Gasteiger, manteniendo el formato mol2.

3.- Docking de ligando/receptor: En el programa UCSF Chimera se abrieron los archivos del receptor con los cálculos de superficie realizados y el ligando con los enlaces rotatables seleccionados y energía minimizada. Se realizó el proceso de docking mediante la aplicación de AutoDock Vina (Trott, 2009) integrada a UCSF Chimera.

Se emplearon dos modelos diferentes para la realización del docking: el Modelo 1 donde la caja del docking se centró en el sitio catalítico del receptor, y el Modelo 2 donde la caja empleada fue más grande con el fin de abarcar al receptor en su totalidad.

Modelo 1	Centro	38.0821	66.6703	21.0812
	Tamaño	19.7705	20.9395	27.8564
Modelo 2	Centro	43.1342	68.9091	23.5251
	Tamaño	81.0943	83.0487	56.4234

Tabla 2. Condiciones de las dos cajas empleadas para el docking.

Bajo el apartado de Opciones avanzadas de AutoDock Vina, se determinaron las siguientes condiciones:

Número de modos de unión: 9

Exhaustividad de la búsqueda: 8

Máxima diferencia de energía entre los modos de unión: 3 kcal/mol

Se llevó a cabo el análisis de docking, y tras la aparición de resultados, se llevó a cabo la búsqueda de enlaces por puentes de hidrógeno entre ligando/receptor de forma inter-modelo. Se realizó estos pasos para el docking por triplicado de las 8 moléculas sintetizadas, para el precursor 1,4-naftoquinona y para la warfarina como control de fármaco anticoagulante.

Estudio *in vitro*: Prueba de TP

1.- Obtención de pool de plasma pobre en plaquetas: Se empleó una población de 20 voluntarios aparentemente sanos, de ambos sexos y en un rango de edades de 18-24 años. Se obtuvo una muestra sanguínea mediante punción venosa, descartando los primeros 3 mL, y se recolectó la sangre en tubos azules con citrato de calcio como anticoagulante, llenando hasta la marca y agitando suavemente los tubos para mezclar y obtener una relación 9:1 entre la sangre y el citrato.

Los tubos se colocaron en una centrífuga, programando ésta 15 minutos a 4000 rpm. Trascurrido ese tiempo, se obtuvo un sedimento del paquete celular, y con una pipeta se transfirió con cuidado el plasma a un tubo Falcon donde se recolectó todo el plasma pobre en plaquetas obtenido.

2.- Preparación de las muestras: Los diferentes compuestos a analizar se solubilizaron en DMSO en una concentración de 1mg/mL. En un tubo de plástico para pruebas de TP en coagulómetro automático, se adicionaron con micropipeta 1980 μ L de plasma pobre en plaquetas y 20 μ L de la solución inicial correspondiente de cada molécula a analizar, para obtener 2 mL por tubo de compuesto a una concentración final de 0.01 mg/mL y DMSO a una concentración final del 1%. Se preparó un tubo para cada compuesto sintetizado, otro con el precursor 1,4-naftoquinona, uno con warfarina como control positivo de fármaco anticoagulante y uno con DMSO como control negativo.

Las muestras se enviaron a un laboratorio de referencia (Sonora Labs) para medición del Tiempo de Protrombina. Los resultados se reportaron como segundos, y como INR (Índice Internacional Normalizado).

Resultados y Discusión de Resultados

Estudio *in silico*: Docking

El proceso de docking entre una serie de ligandos por analizar y un receptor biológico requiere de establecer un área en el espacio tridimensional donde el programa informático buscará las diferentes conformaciones del ligando y las mejores poses con las cuales presenta interacción con el receptor, en términos de necesitar una energía menor para la interacción entre ambos (representado por una puntuación o score). Esta zona tridimensional donde se realizan los cálculos se conoce como caja (grid box), y se suele recomendar tamaños adecuados ya que el tamaño de ella está relacionado con los resultados obtenidos del docking (Feinstein y Brylinski, 2015); por lo general se recomienda que las cajas no sean demasiado grandes pero que permitan el cambio de diferentes poses para el ligando. El manual de uso de AutoDock Vina recomienda cajas no mayores de 30 x 30 x 30 Å de manera general, a menos que se aumente la exhaustividad de búsqueda de poses por el mismo programa.

Sin embargo, como puede observarse en la sección de Metodología, se manejaron dos modelos para cajas en este trabajo, siendo la caja del Modelo 1 más pequeña (19.7705 x 20.9395 x 27.8564 Å) y centrada en la zona donde se sabe está el sitio catalítico de la enzima. La caja de Modelo 2 (81.0943 x 83.0487 x 56.4234 Å) se trabajó con el fin de observar si existe alguna interacción de los compuestos sintetizados sobre la superficie del receptor, además del sitio catalítico. Para minimizar las diferencias que esto pudiera traer sobre los resultados, la exhaustividad de la búsqueda de poses por el programa se manejó lo más alto posible con un valor de 8.

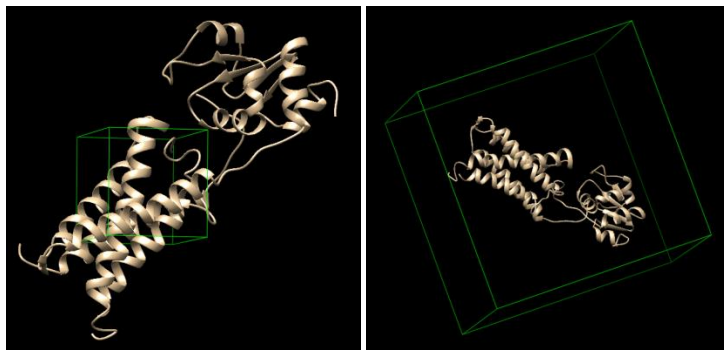


Figura x. Representación visual de las cajas del Modelo 1 y Modelo 2.

A cada ligando preparado se le llevó a cabo por triplicado el proceso de docking para cada uno de los modelos propuestos. Como puede observarse en la Tabla 3 que contiene el concentrado de resultados para el docking del compuesto (1) NQ-Prop, se obtuvieron mejores resultados para el Modelo 1. Además, los resultados generados en este modelo fueron más consistentes que los que se obtuvieron para el Modelo 2, donde se aprecia una mayor variación en el score de las poses generadas.

Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-6.6	-7.4	-7.7	-7.23
-7.5	-7.4	-7.5		-6.4	-7.1	-7.3	
-7.4	-7.4	-7.3		-6.3	-6.9	-6.4	
-7.3	-7.3	-7.3		-5.8	-6.4	-6.4	
-7.3	-7.3	-7.2		-5.5	-6.3	-6.3	
-7.3	-7.3	-7.2		-5.4	-6.3	-6.1	
-7.2	-7.2	-7.1		-5.4	-6.1	-6	
-7.2	-7.1	-7.1		-5.4	-6	-5.9	
-7.2	-7.1	-7.1		-5.2	-6	-5.8	

Tabla 3. Resultados de Docking para NQ-Prop con las cajas del Modelo 1 y Modelo 2.

Como puede observarse en la Figura x, las tres poses generadas para NQ-Prop por el Método 1 generaron conformeros del ligando muy similares, con el mismo score de -7.6. El tercer docking por el Método 2 muestra un score de -7.7, y a pesar de contar con una caja más grande el ligando se encuentra cerca de la zona catalítica de la enzima. El primer docking del Método 2 tiene como mejor score -6.6 y se puede apreciar que el ligando se encuentra en una zona más alejada del receptor. Esto que se observa con el primer ligando se repite con el resto de compuestos analizados: la caja del Método 2 en ocasiones presenta una pose similar a las del Método 1 en primer lugar, pero debido al alto volumen tridimensional que posee muestra diversas poses en regiones periféricas del receptor, con valores de score menos favorables.

De manera general, para un primer análisis de todo el conjunto de dockings llevados a cabo, se optó por promediar el triplicado de la mejor pose por método por ligando, para hacer una comparación más sencilla. El total de resultados obtenidos se encuentra en la sección de Anexos.

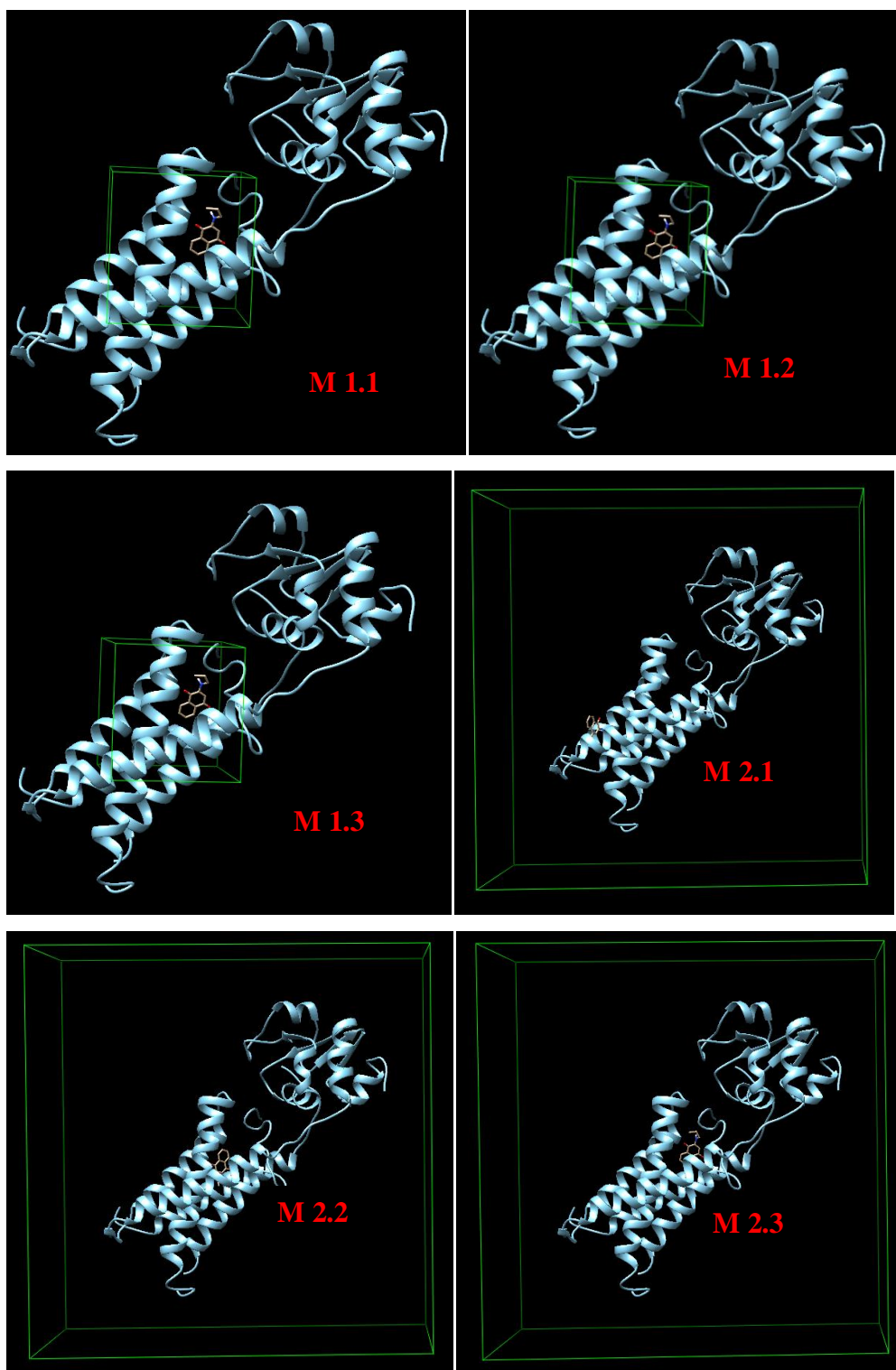


Figura x. Representación gráfica de las 3 mejores poses de docking para NQ-Prop por dos métodos diferentes. (Método 1: M 1.1 - 1.3. Método 2: M 2.1 - 2.3).

Se llevó a cabo el docking de los 8 compuestos sintetizados a partir de la 1,4-naftoquinona, además de uno con este material de partida para evaluar si la incorporación de los nucleófilos seleccionados mejora el perfil de este núcleo, y otro con warfarina como control de un fármaco anticoagulante disponible en el mercado, del cual se ha determinado un mecanismo de acción por interacción con la enzima VKOR. A continuación se muestran los resultados de estos procesos:

	M1	M2
NQ-Prop	-7.6	-7.23
NQ-Buta	-7.9	-7.9
NQ-Pipe	-8.5	-6.67
NQ-Bnca	-9.33	-7.53
NQ-Apro	-7.4	-6.87
NQ-Tira	-9.6	-8.3
NQ-ClAn	-9.7	-8.03
NQ-NOAn	-9.7	-7.93
1,4-NQ	-6.9	-6.9
Warfarina	-9.4	-7.1

Tabla 4. Resultados de Docking.

Como ya se había discutido, los resultados obtenidos para el Método 2 no muestran scores más aptos para la unión ligando-receptor. Solamente la 1,4-naftoquinona y el derivado con la porción de butilamina (NQ-Buta) manejan el mismo promedio de sus mejores scores para ambos métodos. La naftoquinona de partida obtuvo una alta consistencia en todas las poses generadas en los dos métodos, a pesar de que un análisis gráfico de las mismas mostraba poses tanto en el sitio catalítico como en la periferia del receptor. El compuesto NQ-Buta por su parte obtuvo scores similares por ambos métodos, pero tras revisar las poses correspondientes se observó que en el Método 2 la mayoría de ellas se encontraban precisamente cerca de la zona catalítica y no se mostraron tanto en la periferia como sucedió con otros de los productos evaluados.

Una primer observación interesante es que la 1,4-naftoquinona tuvo un score más bajo que los productos sintetizados a partir de ella. Eso implica que a pesar de ser el esqueleto de vitamina K, no depende por sí sola para tener una buena interacción con el receptor y la incorporación de los nucleófilos seleccionados mejora dicha interacción.

Por otra parte, 1,4-naftoquinona y los productos sintetizados casi no mostraron interacciones de puente de H con la diana biológica por el Método 1, y de manera general en el Método 2 se observó un aumento de estas interacciones. Según el análisis por UCSF Chimera, estos puentes de H se formarían mayormente cuando los ligandos se encontrarían en la periferia del receptor. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, que menciona existen pocos residuos polares en la zona catalítica de VKOR, siendo realmente una porción enzimática de naturaleza hidrofóbica (Wallin et al, 2003).

Enfocándonos en los resultados arrojados por el Método 1, observamos que los productos sintetizados no solamente mejoraron su score en comparación con el material de partida, sino que el software empleado predice una afinidad por el receptor incluso similar a la mostrada por warfarina. La warfarina obtuvo un score de -9.4, y el producto con el fragmento bencilamina NQ-Bnca se le acerca con un score de -9.33. Incluso se predice una afinidad ligando-receptor ligeramente mejor para los productos NQ-Tira, NQ-CIAn y NQ-NOAn.

Rápidamente salta a la vista la diferencia estructural entre los productos sintetizados con menor score que warfarina, de los que se le acercaron: el fragmento incorporado en el nucleófilo de tipo amina es alifático en el primer caso y aromático en el segundo.

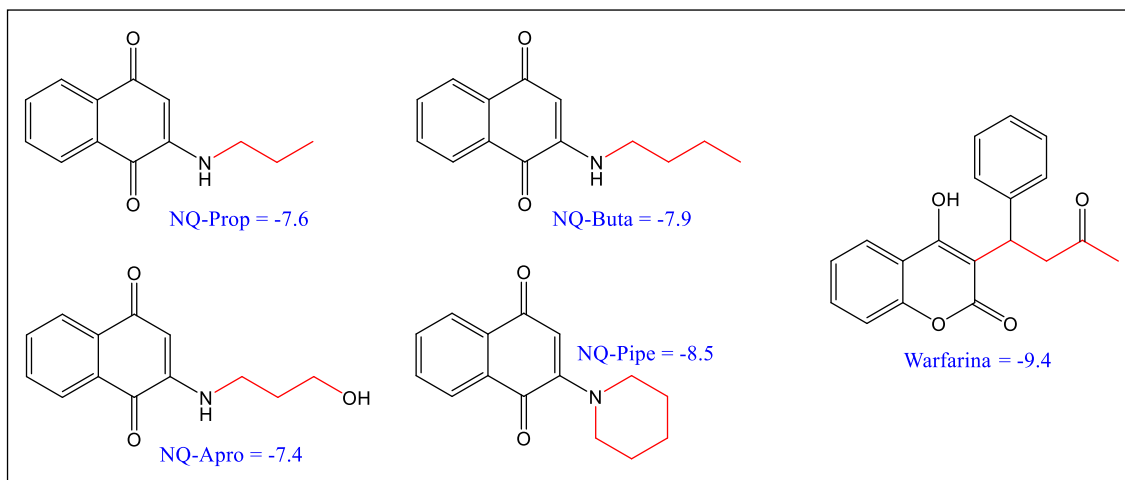


Figura x. Semejanzas estructurales entre warfarina y ligandos con menor score de docking.

Las estructuras de quienes manejaron menor score poseen cadenas alifáticas de 3 o 4 átomos de carbono. Si bien warfarina posee también un fragmento lineal, esta semejanza estructural parece no influir mucho en la interacción con el receptor. De los cuatro

compuestos alifáticos comparados, el que presentó mejor valor fue el derivado de piperidina, cuya diferencia radica en que su porción alifática es cíclica y no lineal. Quizá esta ciclo le dé mejor score por el hecho de ser un fragmento hidrofóbico que no posee mucha flexibilidad, de manera similar al anillo aromático de warfarina y en contraparte de las cadenas alifáticas de NQ-Prop, NQ-Buta y NQ-Apro que sí son flexibles.

Por su parte, los 4 compuestos sintetizados con scores de docking similares o mejores que warfarina se presentan en la Figura x.

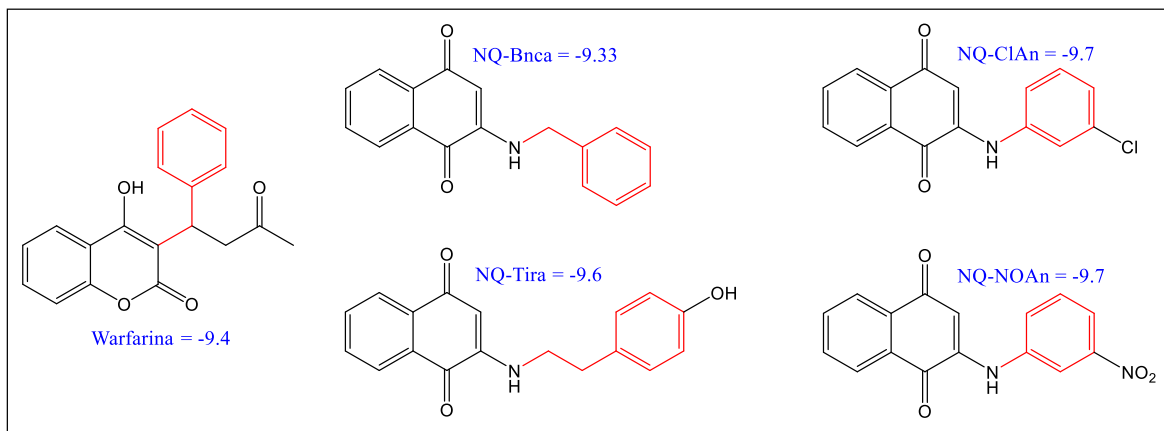


Figura x. Semejanzas estructurales entre warfarina y ligandos con mejor score de docking.

Tanto NQ-Bnca, NQ-Tira, NQ-ClAn y NQ-NOAn poseen en su fragmento incorporado al esqueleto naftoquinónico un anillo aromático. Esto muestra cierta similitud con warfarina, que posee un anillo bencénico cerca de su esqueleto coumarínico. De esta manera podemos notar que todas las moléculas sintetizadas guardan cierta semejanza con warfarina, pero podemos dividir las si esta semejanza es debido a su fragmento alifático lineal o a la presencia de un anillo aromático. Si bien todos estos fragmentos son de naturaleza hidrofóbica, podemos observar que la presencia del anillo aromático fue mejor para la interacción con el receptor.

Incluso a los dos mejores candidatos según el estudio de docking, NQ-ClAn y NQ-NOAn, se puede relacionar de otra manera con warfarina: el anillo bencénico de warfarina se encuentra a un átomo de distancia del su esqueleto coumarínico, solamente les separa un metino (CH). Los compuestos NQ-ClAn y NQ-NOAn poseen su anillo bencénico también a un átomo de distancia de su esqueleto naftoquinónico, lo cual podría sugerir que tridimensionalmente es favorable en la interacción ligando-receptor la presencia del anillo

aromático a esa distancia. La separación en este caso está dada por un heteroátomo, NH. Si consideramos la Ley de desplazamiento del hidruro de Grimm, que establece que por la adición de un átomo de hidrógeno a un átomo “n” le da propiedades similares a un átomo de número atómico “n+1” (Tabla 5), NH sería un grupo isótero de un CH₂. Los separadores de los anillos de los núcleos en warfarina y los compuestos sintetizados se podrían comportar casi como isóteros, lo cual podría explicar su similitud de resultados en el proceso de docking. De ser así, la repercusión más importante se daría por el hecho de que podríamos diseñar ligandos con mejores afinidades por nuestro receptor VKOR manteniendo este fragmento NH-benceno en nuestros núcleos de naftoquinona, e introducir variaciones sobre las sustituciones de este anillo para modular dichas afinidades.

C	N	O	F	Ne
	CH	NH	OH	FH
		CH ₂	NH ₂	OH ₂
			CH ₃	NH ₃
				CH ₄

Tabla 5. Ley del desplazamiento del hidruro de Grimm.

Estudio *in vitro*: Prueba de TP

Para la obtención de un pool de plasma pobre en plaquetas se contó con la participación de voluntarios aparentemente sanos, manteniendo un rango de edades delimitado para mantener relativamente homogénea la muestra de pacientes. La metodología consiste en centrifugación de las muestras sanguíneas tomadas (previo descarte de los primeros 3 mL de sangre) en tubos con citrato de calcio para evitar la coagulación de la muestra previo a su tratamiento.

La centrifugación para hacer que el paquete celular y las plaquetas se sedimenten debe hacerse por 10 minutos a 5647 rpm. Sin embargo, la centrífuga empleada no se observó que subiera de las 4000 rpm; para corregir esto se dejó más tiempo y poder sedimentar las plaquetas. El plasma resultante era color amarillento, sin rastros de tonos rojos por lo cual se consideró que la toma sanguínea y centrifugación se realizaron correctamente sin lisis de los eritrocitos.

Los compuestos por evaluar se disolvieron en DMSO en una concentración al 1% de éste solvente en sangre, la cual de acuerdo a la literatura revisada no presenta

alteraciones en las pruebas de coagulación como lo es el Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (aTPP) (Lauer et al, 2011). En la literatura revisada, la evaluación de actividad anticoagulante de analitos se ha realizado en concentraciones variadas, dependiendo del estudio realizado. En este trabajo, la concentración de los productos sintetizados se fijó en 0.01 mg/mL, ya que la alta hidrofobicidad de los mismos dificultaba la solución de los mismos a mayor concentración (basándonos en el compuesto con mayor problemas de solubilidad, NQ-ClAn).

Se evaluaron los mismos 10 compuestos a los que se realizó el estudio *in silico*, más un control negativo de DMSO. La prueba realizada, Tiempo de Protrombina, es la prueba clínica de elección para monitoreo de pacientes con tratamiento anticoagulante, por lo que se consideró adecuada dada la finalidad del trabajo y la inclusión de warfarina como control positivo. Las muestras fueron analizadas por un laboratorio de referencia mediante coagulómetro automatizado para garantizar la confiabilidad del resultado. En la Tabla 6 se muestran los valores obtenidos en la prueba de TP.

	TP	% de Actividad (TP)	INR
DMSO	11.8	91.8	0.98
1,4-NQ	11.9	90.8	0.99
Warfarina	11.8	91.8	0.98
NQ-Prop	11.5	94.5	0.96
NQ-Buta	12.0	89.9	1.00
NQ-Pipe	12.0	89.9	1.00
NQ-Bnca	11.6	93.6	0.96
NQ-Apro	12.1	89.0	1.01
NQ-Tira	11.9	90.8	0.99
NQ-ClAn	11.8	91.8	0.98
NQ-NOAn	11.8	91.8	0.98

Tabla 6. Resultados de la prueba de TP.

En primer lugar cabe resaltar que el solvente DMSO no alteró los resultados del tiempo de coagulación, lo cual nos permite continuar con el uso de este solvente y concentración en pruebas futuras, comparando con el laboratorio de referencia que marca un rango en el TP para valores dentro de lo considerado clínicamente normal entre 9.8 y 12.1 s. Por otra parte, los resultados en general parecen mostrar una baja concentración para

todos los compuestos analizados. Esto se puede apreciar en el análisis de la muestra de warfarina: cuando un paciente se encuentra bajo tratamiento con warfarina, clínicamente se procura mantener un tiempo de coagulación mayor, y el INR (Índice Internacional Normalizado) en un rango de 2.0-3.0 (Kuruvilla y Gurk-Turner, 2011). Entre el control negativo DMSO (INR = 0.98) y el control positivo warfarina (INR = 0.98) no se observó una diferencia significativa, por lo cual se puede asumir que no se alcanzó la concentración del fármaco necesaria para llevar a cabo su actividad. Sin embargo, como estudio preliminar, se puede llevar a cabo el análisis comparando los valores de INR (clínicamente relevantes) del control negativo DMSO con el resto de compuestos para hacer una primera aproximación a la actividad anticoagulante de los mismos.

Los compuestos NQ-Bnca y NQ-Prop registraron un INR más bajo que el control negativo, con 0.96. Esto sugiere una actividad ligeramente coagulante a la concentración evaluada. Revisando las estructuras de ambos productos, NQ-Prop tiene una alta semejanza con la vitamina K, con el esqueleto naftoquinona y la cadena lateral alquílica (si bien es más corta), lo cual pudiera explicar su ligera actividad coagulante. Por su parte en fragmento tipo bencílico de NQ-Bnca no es tan similar, y llama la atención que este producto en el docking mostraba un score similar al de warfarina, por lo que se esperaba cierta actividad anticoagulante para esta estructura.

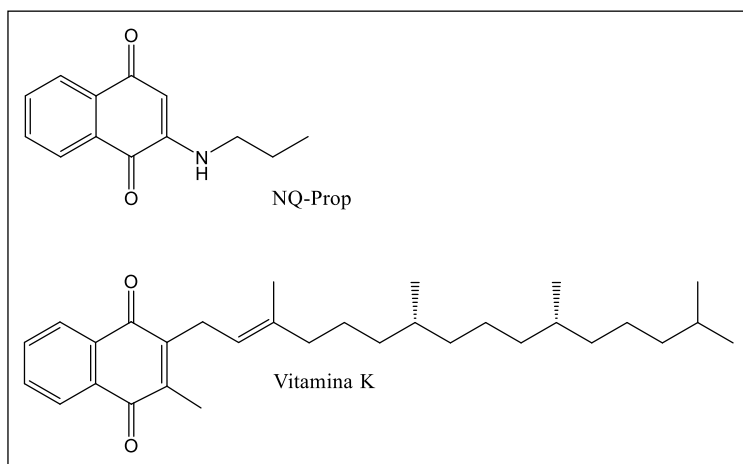


Figura x. Estructuras de NQ-Prop y Vitamina K.

Los productos con fragmento anilina NQ-ClAn y NQ-NOAn que mostraron mejor afinidad por el receptor en el docking, *in vitro* aparentemente no registraron actividad pues

muestran el mismo valor de INR que el control negativo DMSO. Otro de los mejores scores en docking, NQ-Tira, muestra un INR de 0.99, es decir una actividad ligeramente anticoagulante, apenas por encima de DMSO. Curiosamente con el mismo INR se encuentra el precursor 1,4-naftoquinona, cuya predicción de docking no mostraba una alta afinidad por el receptor.

Los productos sintetizados que presentaron en este estudio preliminar un mayor cambio en el tiempo de coagulación fueron tres: NQ-Buta y NQ-Pipe con un INR de 1.0, y con mayor efecto anticoagulante NQ-Apro con un INR de 1.01.

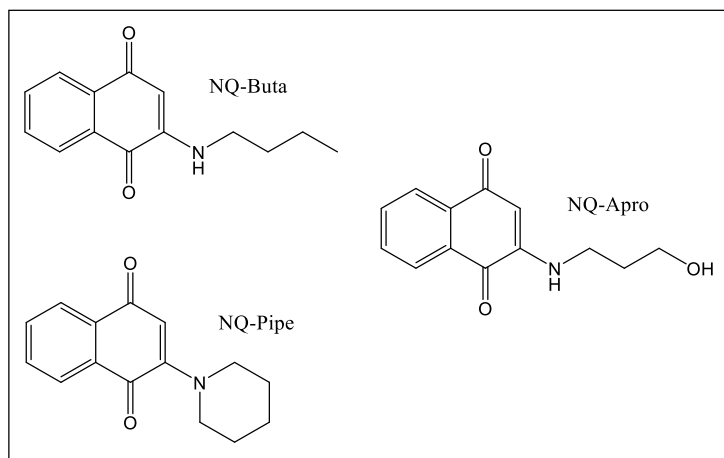


Figura x. Estructuras de los productos con mayor INR en prueba de TP.

Estos tres productos en su evaluación de docking no presentaron los resultados más favorecedores comparados con el resto de compuestos sintetizados, pues mostraban menores afinidades por el receptor de la warfarina. La característica que comparten estructuralmente estos productos es que el fragmento incorporado sobre el esqueleto naftoquinona es de tipo alifático. NQ-Buta y NQ-Pipe presentan un fragmento alifático lineal y cíclico respectivamente. Curiosamente a diferencia de NQ-Prop que también tiene una cadena alifática lineal y un INR menor al del control negativo, NQ-Buta con un metileno más mostró un resultado muy diferente.

NQ-Apro posee una porción lineal como NQ-Buta, sin embargo la diferencia de NQ-Apro con los otros dos productos es que presenta una función extra: un grupo alcohol. Revisando las 3 poses generadas para NQ-Apro con mejor score en el Método 1, 2 de ellas orientan el grupo hidroxilo hacia la zona del puente disulfuro catalítico (Figura x). Existe la

posibilidad que entonces la flexibilidad de la cadena lateral permita acercar al hidroxilo y que éste sea en parte responsable de la interacción con VKOR y de la actividad generada. El hidroxilo en la pose generada se encuentra a 3.8 y 5.8 Å de las cisteínas catalíticas.

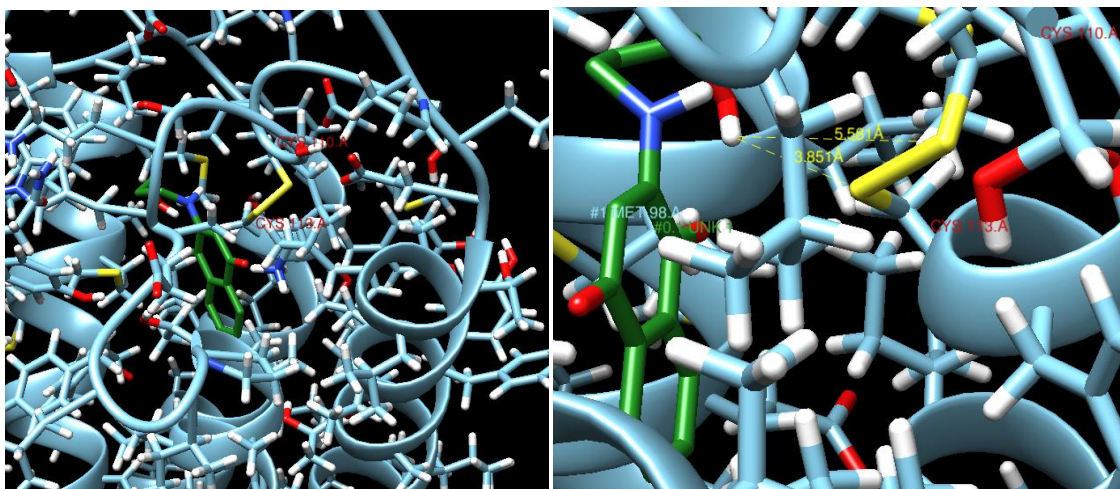


Figura x. NQ-Apro en el sitio catalítico de homólogo bacteriano VKOR. El ligando se muestra de verde, cerca de las cisteínas catalizadoras que se encuentran unidas por un puente disulfuro (enlace amarillo, etiquetas Cys110.A y Cys113.A).

Si bien el receptor del docking no es la enzima VKOR humana, sino un homólogo bacteriano (Li et al, 2010), la alta similitud en sus secuencias de aminoácidos y conservación de residuos en la zona catalítica de la enzima ha permitido que este modelo computacional pueda emplearse para estudios de docking de compuestos con actividad anticoagulante previamente, observando buenos resultados en la parte bioinformática (). Para una mejor relación entre los estudios *in silico* e *in vitro*, se podría hacer ajustes en la metodología *in vitro*, donde las concentraciones de los analitos aumenten hasta un nivel donde el control positivo warfarina muestre su actividad para observar si el efecto de la dosis en la prueba muestra una diferencia en los resultados anticoagulantes de los productos.

Conclusiones

De la ruta sintética propuesta se logró sintetizar los compuestos (1) **2-(propilamino)naftalen-1,4-diona**, (2) **2-(butilamino)naftalen-1,4-diona**, (3) **2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona**, (4) **2-(bencilamino)naftalen-1,4-diona**, (5) **2-((3-hidroxiopropil)amino)naftalen-1,4-diona**, (6) **2-((4-hidroxifenetil)amino)naftalen-1,4-diona**, (7) **2-((3-clorofenil)amino)naftalen-1,4-diona**, y (8) **2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona**.

Se caracterizó los compuestos sintetizados, confirmando sus estructuras mediante diversas técnicas: IR, CG-EM, RMN ¹H y RMN ¹³C.

Se llevó a cabo una evaluación *in silico* de los compuestos sintetizados, mediante docking con un receptor enzimático VKOR (PDB ID:3KP9). Los resultados mostraron una mejor afinidad ligando-receptor con los compuestos a los que se les introdujo un anillo aromático nuevo en el esqueleto de tipo naftoquinona, con respecto a los que se les introdujo una cadena alifática. El nivel de afinidad fue similar o mejor que el mostrado por warfarina, empleado como control anticoagulante.

Los mejores resultados del docking los presentaron los compuestos (7) **2-((3-clorofenil)amino)naftalen-1,4-diona**, clave NQ-ClAn y (8) **2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona**, clave NQ-NOAn.

Se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de los compuestos sintetizados, mediante la prueba de TP. Los resultados sugieren que la concentración a evaluar de los compuestos debe ser mayor. Se comprobó que la concentración del solvente DMSO al 1% no altera los valores de esta prueba.

De manera preliminar, se observó discrepancias entre los resultados *in vitro* e *in silico*, sugiriendo un ajuste en la metodología. Se encontró una ligera actividad coagulante de los compuestos (1) **2-(propilamino)naftalen-1,4-diona** y (4) **2-(bencilamino)naftalen-1,4-diona**. Los mejores resultados anticoagulantes los presentaron los compuestos (2) **2-**

(butilamino)naftalen-1,4-diona, (3) **2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona**, siendo el mejor (5) **2-((3-hidroxi)propil)amino)naftalen-1,4-diona**, clave NQ-Apro.

Trabajo futuro

Sintetizar una mayor cantidad de análogos de vitamina K a partir del núcleo 1,4-naftoquinona, con diversas funcionalidades para poder hacer un estudio de relación estructura-actividad anticoagulante. Asimismo, mejorar la metodología para la evaluación de la actividad anticoagulante de los productos sintetizados.

Bibliografía

Bosch, F., Rosich, L. (2008) "The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel prize" *Pharmacology* (82):171-179

Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C., Joglar Tamargo, J. (2003) *Introducción a la Química Terapéutica*, 2º edición, Barcelona: Díaz de Santos

Dunbrack, R. L. Jr. (2002) "Rotamer libraries in the 21st century" *Current Opinion in Structural Biology* (12):431-440

Feinstein, W. P., Brylinski, M. (2015) "Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets" *Journal of Cheminformatics* (7):18

Goodstadt, L., Pontig, C. P. (2004) "Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism" *Trends in Biochemical Sciences* (29):289-292

Kuruvilla, M., Gurk-Turner, C. (2001) "A review of warfarin dosing and monitoring" *Baylor University Medical Center Proceedings* (14):305-306

Kurzer, F., Sanderson, P. M. (1956) "Urea in the history of organic chemistry" *Journal of Chemical Education* (33):452-459

Lauer, A., Cianchetti, F. A., Van Cott, E. M., Schlunk, F., Schulz, E., Pfeilschifter, W., Steinmetz, H., Schaffer, C., Lo, E. H., Foerch, C. (2011) "Anticoagulation with the oral direct thrombin inhibitor dabigatran does not enlarge hematoma volume in experimental intracerebral hemorrhage" *Circulation* (124):1654-1662

Li, T., Chang, C. Y., Jin, D. Y., Lin, P., Khvorova, A., Stafford, D. W. (2004) "Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase" *Nature* (427):541-544

- Li, W., Schulman, S., Dutton, R. J., Boyd, D., Beckwith, J., Rapoport, T. A. (2010) "Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase" *Nature* (463):507-513
- Lisboa, C. da S., Santos, V. G., Vaz, B. G., de Lucas, N. C., Eberlin, M. N., Garden, S. J. (2011) "C-H functionalization of 1,4-naphthoquinone by oxidative coupling with anilines in the presence of a catalytic quantity of copper (II) acetate" *The Journal of Organic Chemistry* (76):5264-5273
- McKenzie, S. B. (2000) *Hematología clínica*, 2º edición, México: Editorial El Manual Moderno
- Meng, X., Zhang, H., Mezei, M., Cui, M. (2011) "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery" *Current Computer Aided-Drug Design* (7):146-157
- Montagut-Romans, A., Boulven, M., Jacolot, M., Moebs-Sanchez, S., Hascoët, C., Hamed, A., Bese, S., Lemaire, M., Benoit, E., Lattard, V., Popowycz, F. (2017) "Synthesis and biological evaluation of C-3 aliphatic coumarins as vitamin K antagonists" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (27):1598-1601
- Oldenburg, J., Bevans, C. G., Müller, C. R., Watzka, M. (2006) "Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): The key protein of the vitamin K cycle" *Antioxidants & Redox Signaling* (8):347-353
- Pedretti, A., Villa, L., Vistoli, G. (2004) "Vega – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming" *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (18):167-173
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) *Journal of Computational Chemistry* (25):1605-1612

- Ramberg, P. J. (2000) "The death of vitalism and the birth of organic chemistry: Wöhler's urea synthesis and the disciplinary identity of organic chemistry" *Ambix* (47):170-195
- Rishavy, M. A., Usubaliev, A., Hallgren, K. W., Berkner, K. L. (2011) "Novel insight into the mechanism of the Vitamin K oxidoreductase (VKOR) Electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation" *The Journal of Biological Chemistry* (286):7267-7278
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H. J., Lappégard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E. G. D., Müller, C. R., Strom, T. M., Oldenburg, J. (2004) "Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2" *Nature* (427):537-541
- Ruiz Argüelles, G. J. (2003) *Fundamentos de Hematología*, 3ª edición, México: Editorial Médica Panamericana
- Sanner, M. F., (1999) "Python: A programming language for software integration and development" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* (17):57-61
- Stafford, D. W. (2005) "The vitamin K cycle" *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (3):1873-1878
- Tie, J. K., Stafford, D. W. (2008) "Structure and function of vitamin K epoxide reductase". En *Vitamins and Hormones. Vitamin K* (pp. 103-130) Toluca Lake, California:Elsevier
- Trejo I., C. (2004) "Anticoagulantes: farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos" *Cuadernos de cirugía* (18):83-90
- Trott, O., Olson, A. J. (2009) "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading" *Journal of Computational Chemistry* (31):455-461

- Vishwanathan, B. I., Gurupadaya, B. M., Bharathkumar, I., Venkata, S. K., Gurubasavaraj, V. P. (2016) "Synthesis of 1,3,4-oxadiazoles as promising anticoagulant agents" *Royal Society of Chemistry Advances* (6):24797-24807
- Wallin, R., Sane, D. C., Hutson, S. M. (2003) "Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent γ -carboxylation system" *Thrombosis Research* (108):221-226
- Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., Case, D. A. (2006) "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* (25):247-260

Técnicas experimentales

Instrumentación

- Resonancia Magnética Nuclear

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro BRUKER de 400 MHz. Se utilizó CDCl_3 y DMSO como disolventes y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s=singulete; bs=singulete ancho; d=doblete; t=triplete; q=cuarteto; quin=quintuplete; dd=doble de doblete; td=triple de doblete; m=multiplete.

- Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet is5. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

- Espectrometría de Masas

Para la obtención de los espectros de masas se empleó la técnica de ionización por impacto electrónico, utilizando un cromatógrafo de Gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo sencillo Thermo Scientific modelo ISQ LT. La temperatura del horno fue de 120°C y la de la fuente de iones 240°C . La rampa de calentamiento de la columna comenzó a 120°C manteniendo esta temperatura 1 minuto, para subir a una velocidad de $40^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 280°C , y manteniendo esta temperatura 10 minutos.

Condiciones de reacción

Los rendimientos de las reacciones se establecieron una vez purificados los productos de cada reacción. Los reactivos y los disolventes empleados fueron comprados de la más alta calidad comercial, y usados sin purificaciones posteriores. Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina.

Técnicas cromatográficas

- Cromatografía de Capa Fina

Se emplearon placas FLUKA Analytical de 0.2 mm con indicador fluorescente de 254 nm. Se empleó como agente visualizador luz ultravioleta a 254 nm y ninhidrina como revelador químico.

- Cromatografía en Capa Fina Preparativa

Se utilizaron placas preparativas Analtech de 20×20 cm, con una fase estacionaria de sílica gel con un poro de 500 μm e indicador fluorescente de 254 nm. La detección de los productos en las placas se hizo mediante una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm.

- Cromatografía de columna

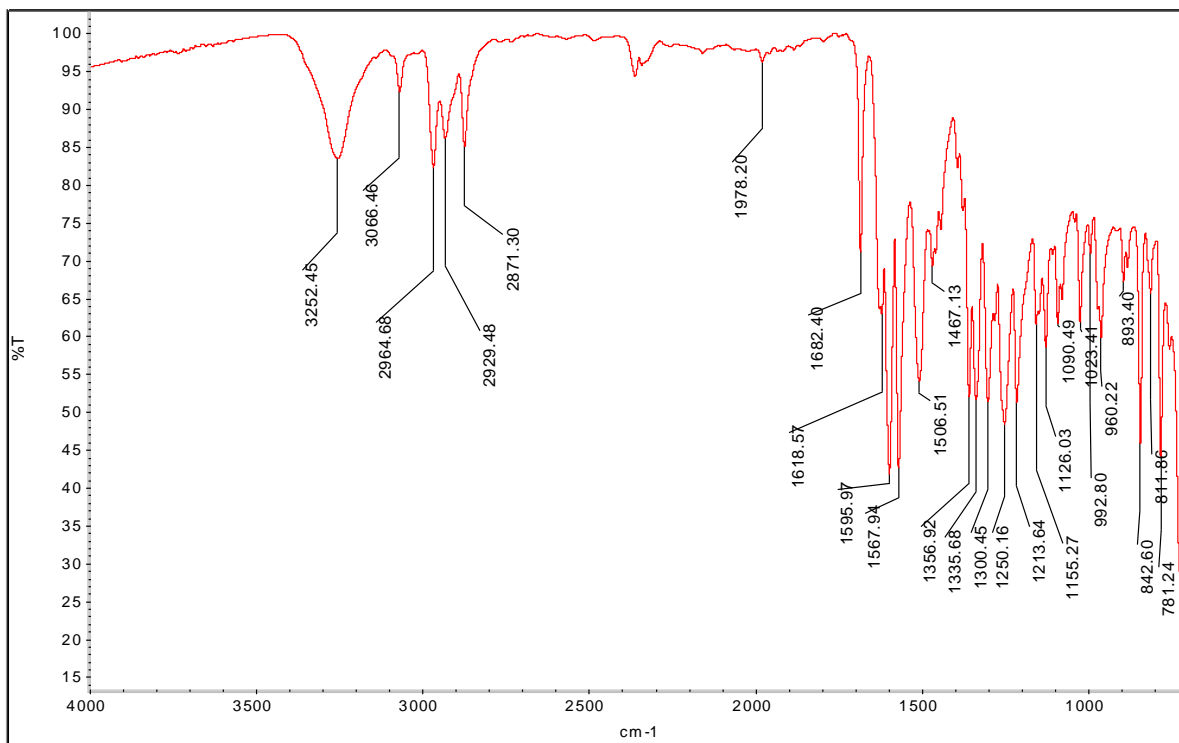
Se empleó sílica gel con tamaño de partícula de 0.063-0.037 mm de marca MERCK. La preparación de las columnas consistió en el empaquetado con una mezcla de sílica gel y n-Hex, a la que posteriormente se le adicionaba en la parte superior el crudo de reacción por purificar en forma de cabeza de columna. Los eluyentes habituales fueron mezclas de n-Hex/AcOEt en distintas proporciones.

Programas informáticos

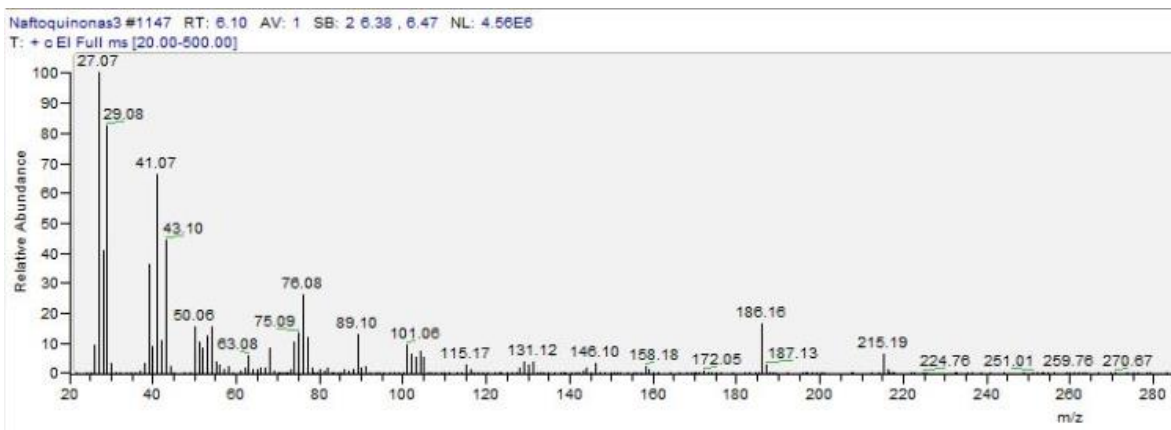
Se empleó el programa ChemDraw Professional 16.0 de Perkin Elmer para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados.

Para los experimentos de docking y la respectiva preparación de ligandos y receptor se emplearon los programas UCSF Chimera 1.11.2 de University of California, San Francisco; AutoDock Tools 1.5.6 de The Scripps Research Institute; y Vega ZZ 3.1.1.42.

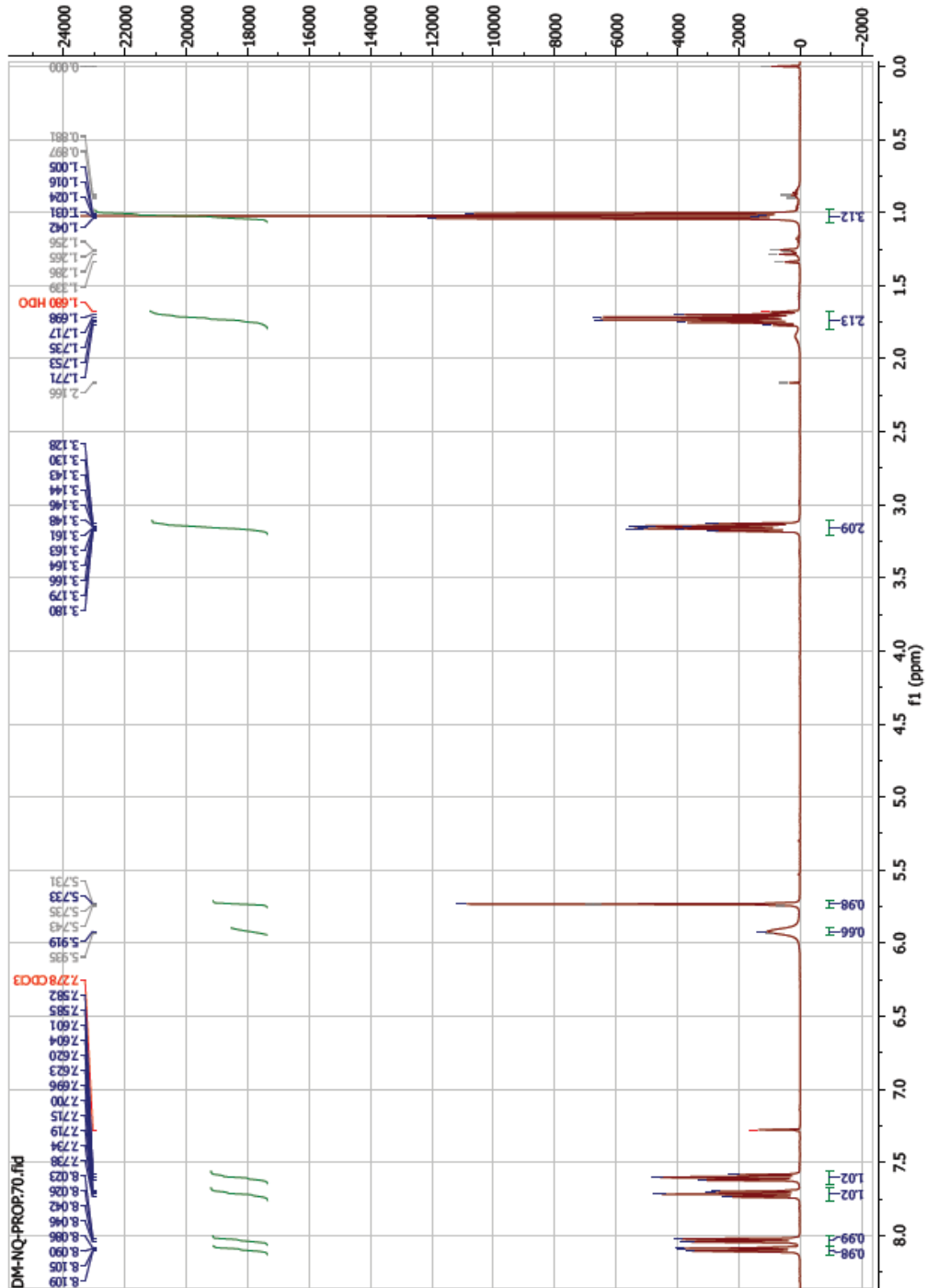
Anexos



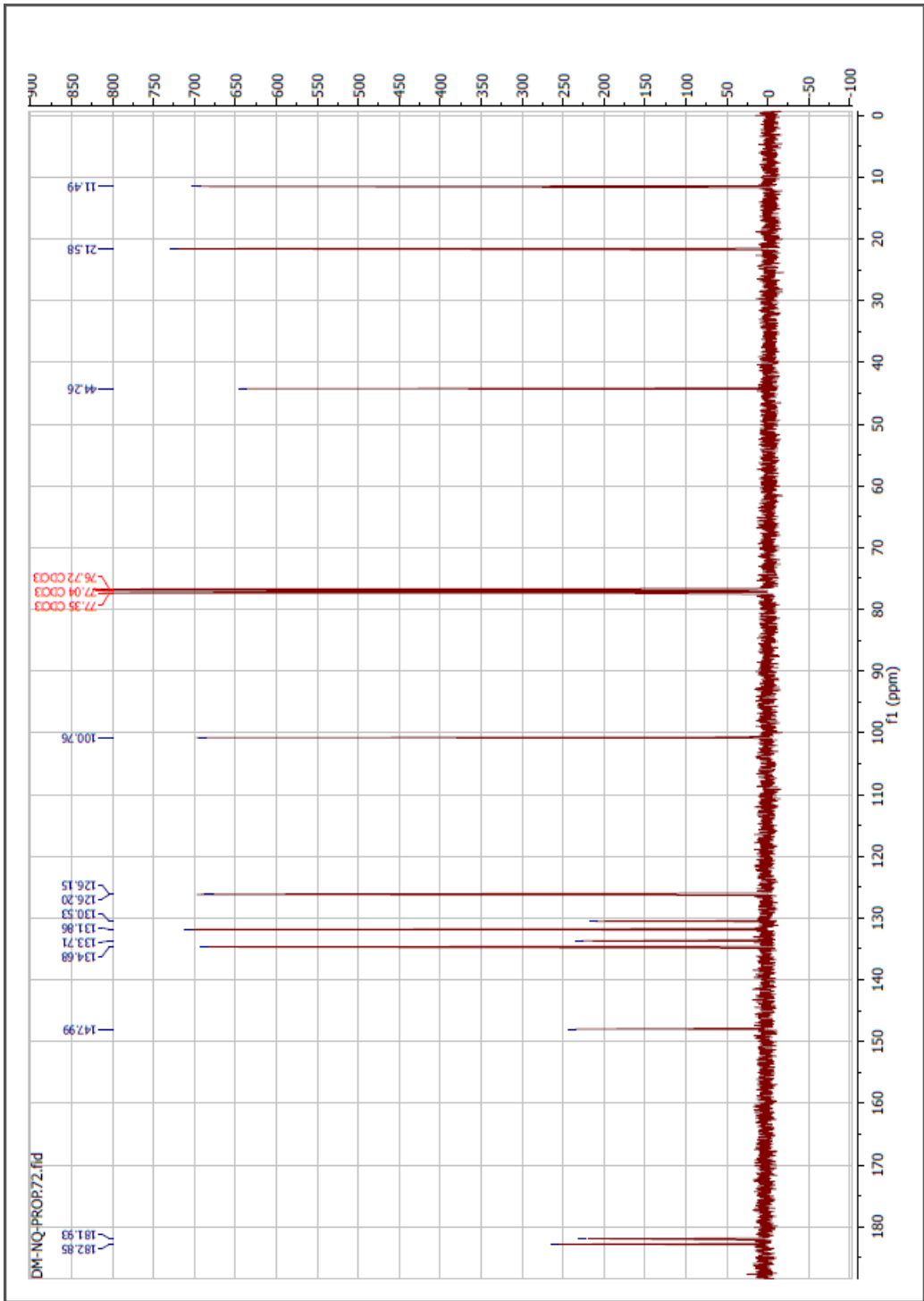
Anexo 1. Espectro de IR del compuesto NQ-Prop.



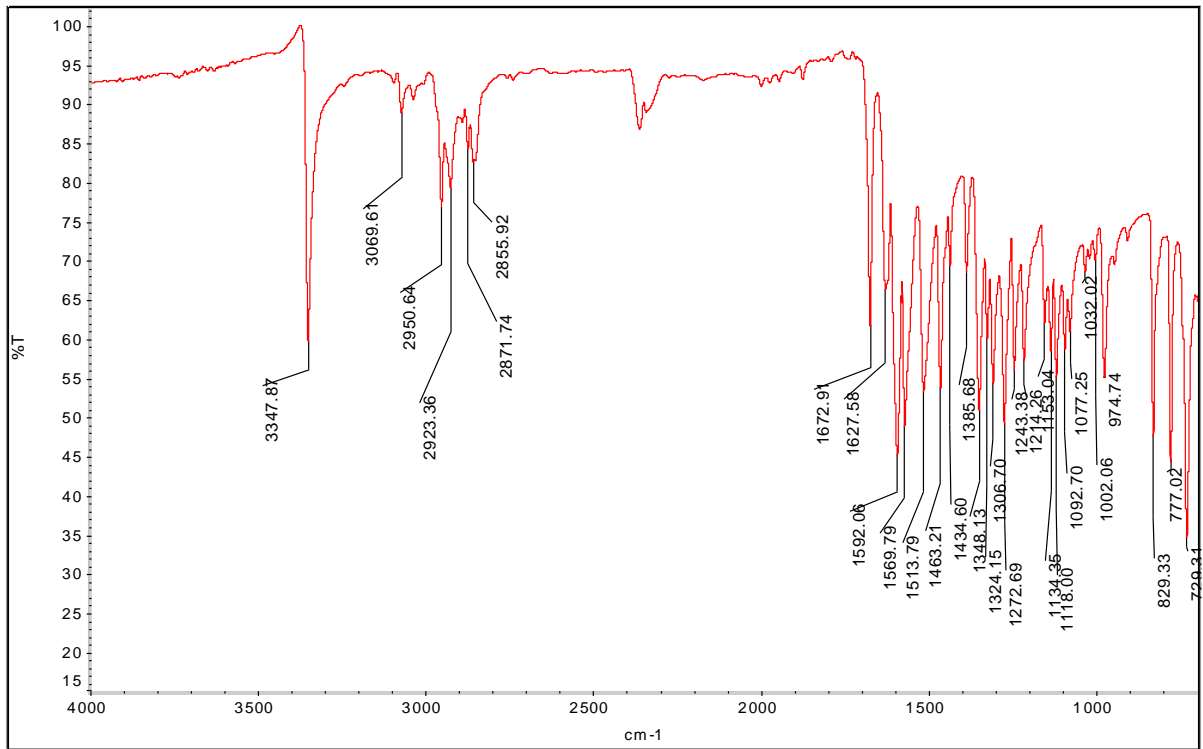
Anexo 2. Espectro de masas del compuesto NQ-Prop.



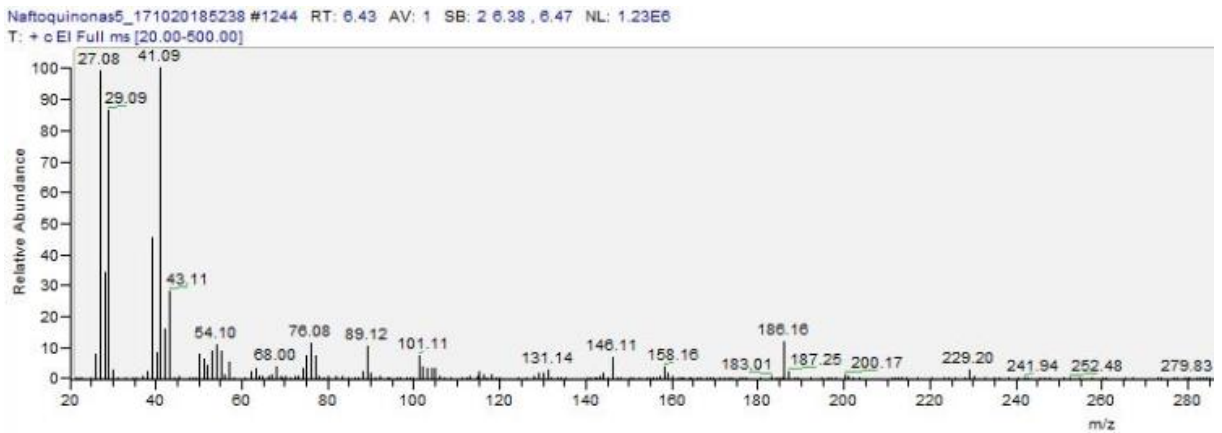
Anexo 3. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Prop.



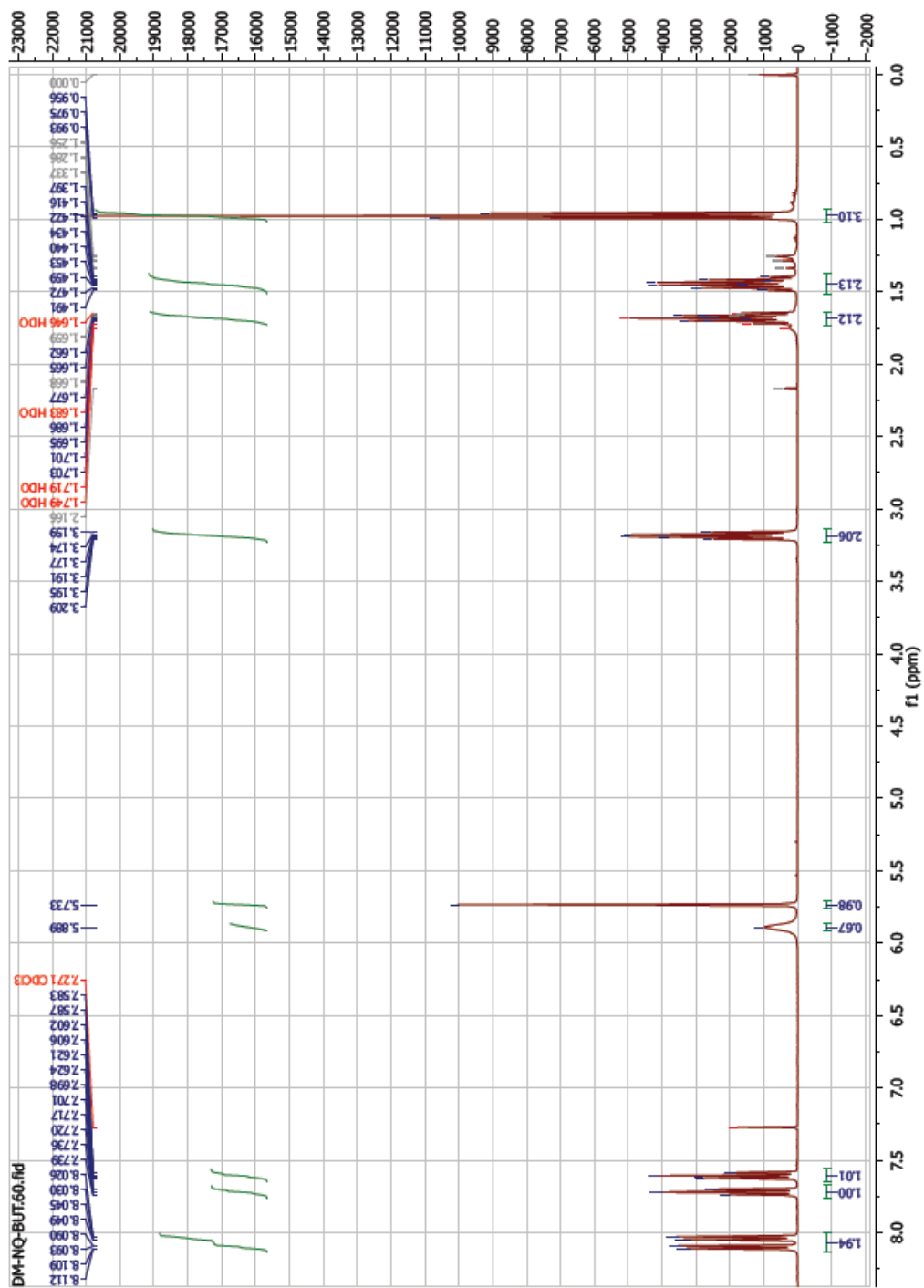
Anexo 4. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto NQ-Prop.



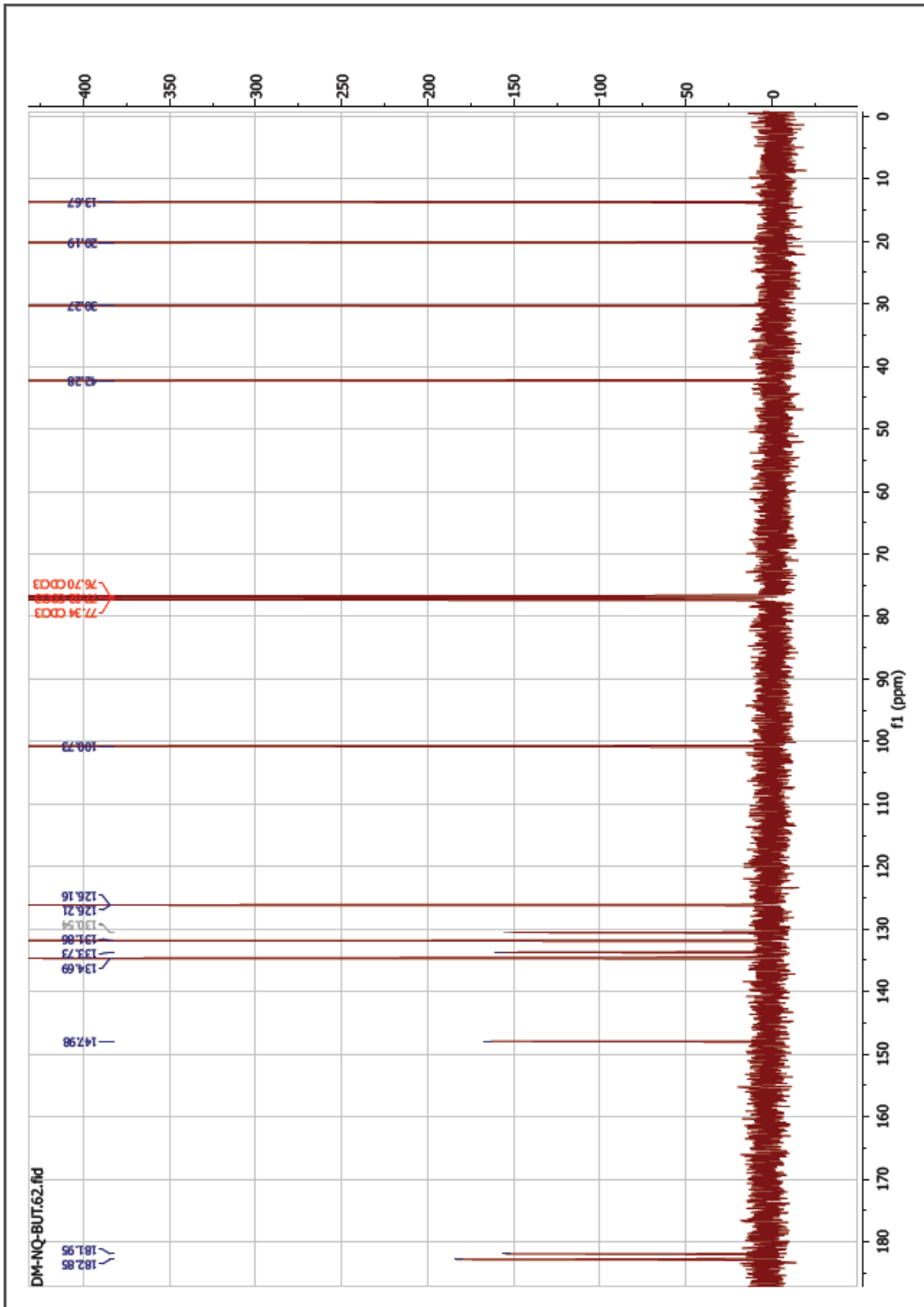
Anexo 5. Espectro de IR del compuesto NQ-Buta.



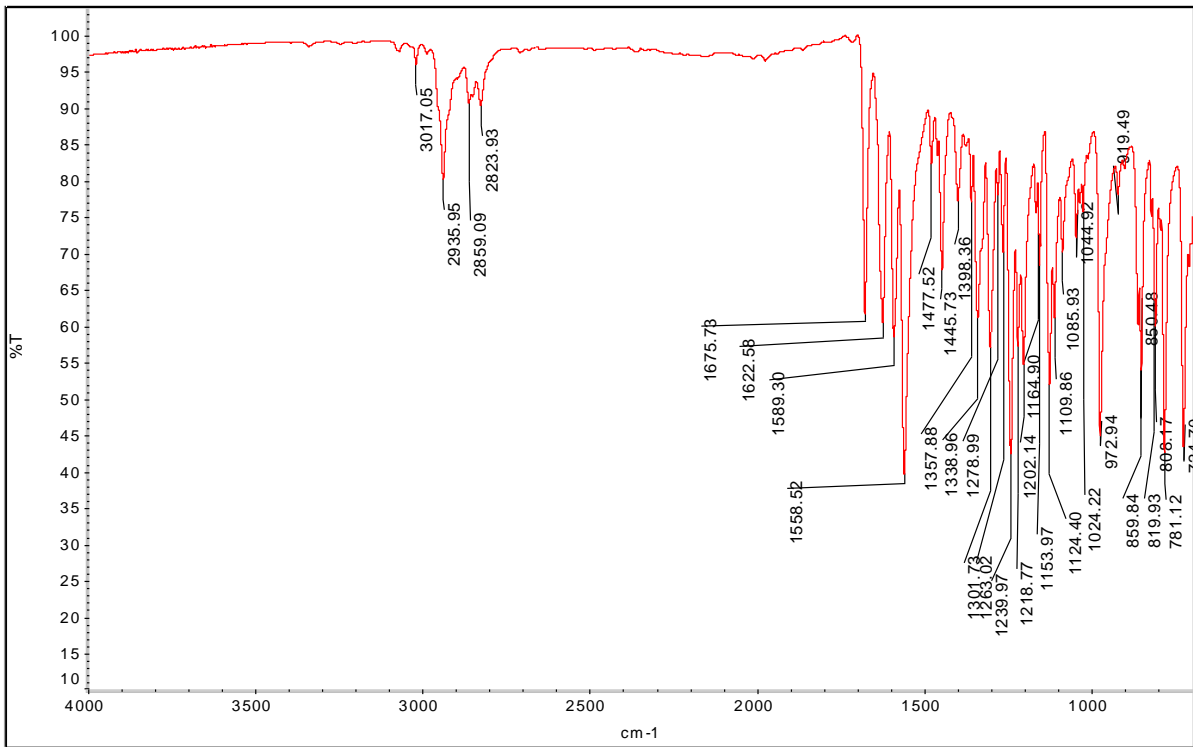
Anexo 6. Espectro de masas del compuesto NQ-Buta.



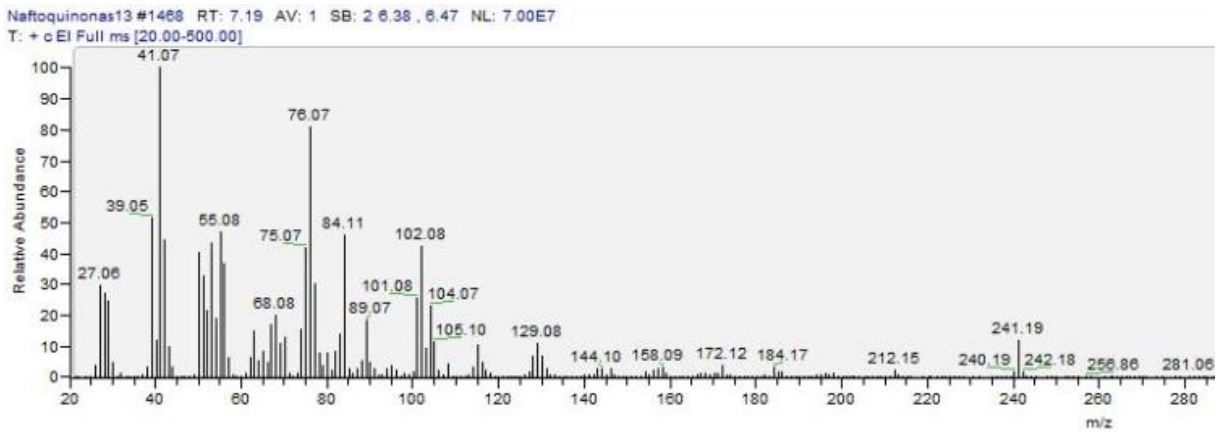
Anexo 7. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Buta.



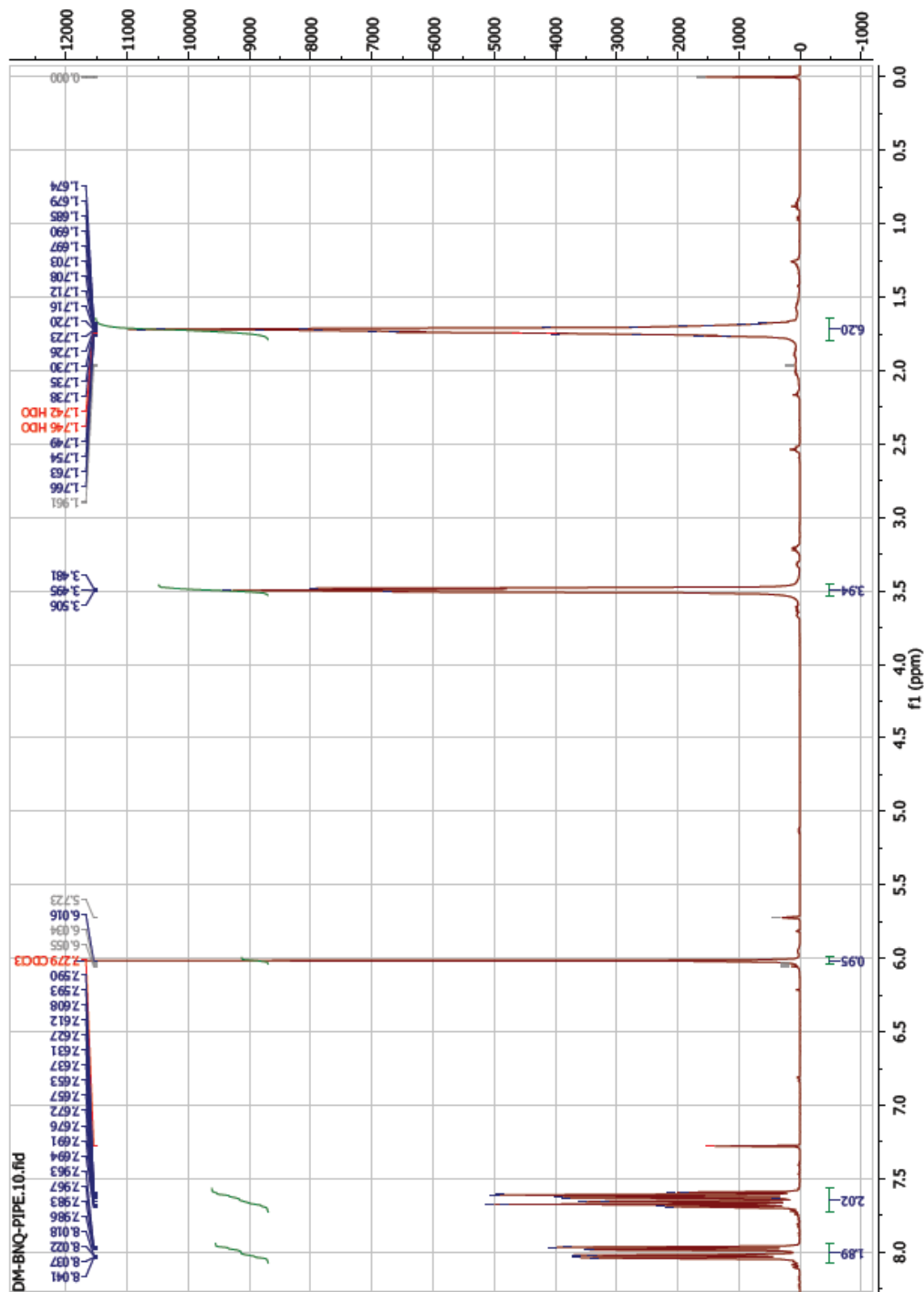
Anexo 8. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto NQ-Buta.



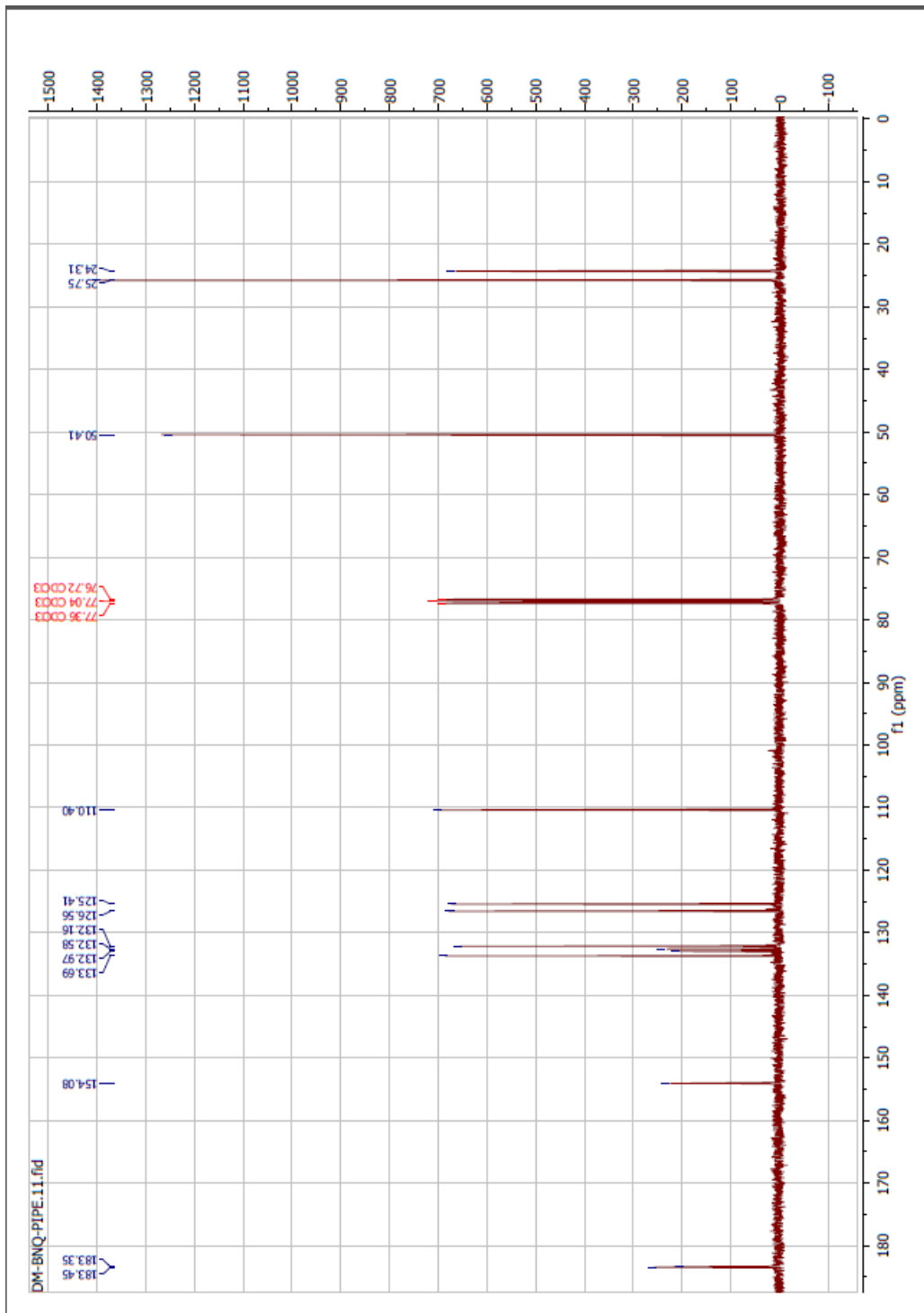
Anexo 9. Espectro de IR del compuesto NQ-Pipe.



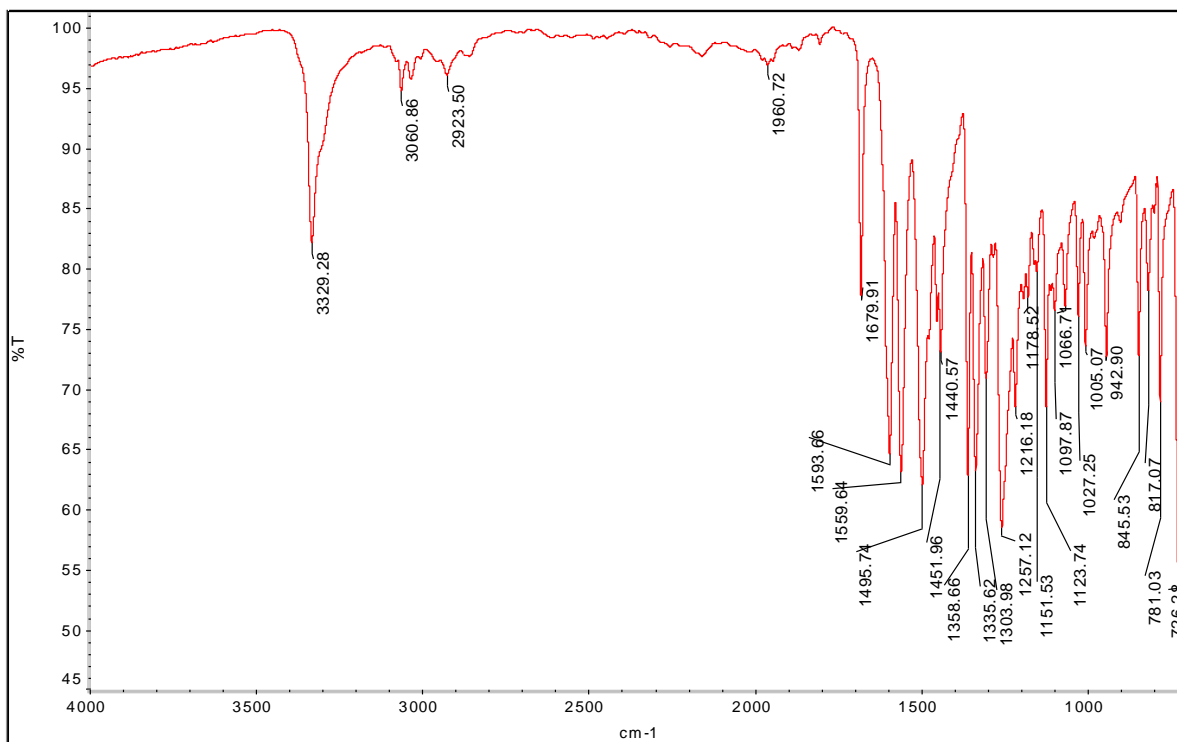
Anexo 10. Espectro de masas del compuesto NQ-Pipe.



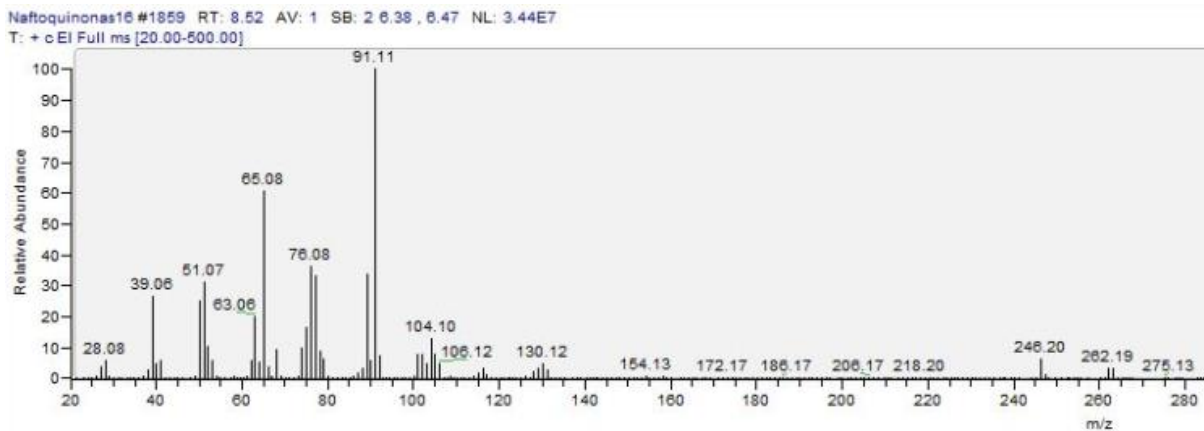
Anexo 11. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Pipe.



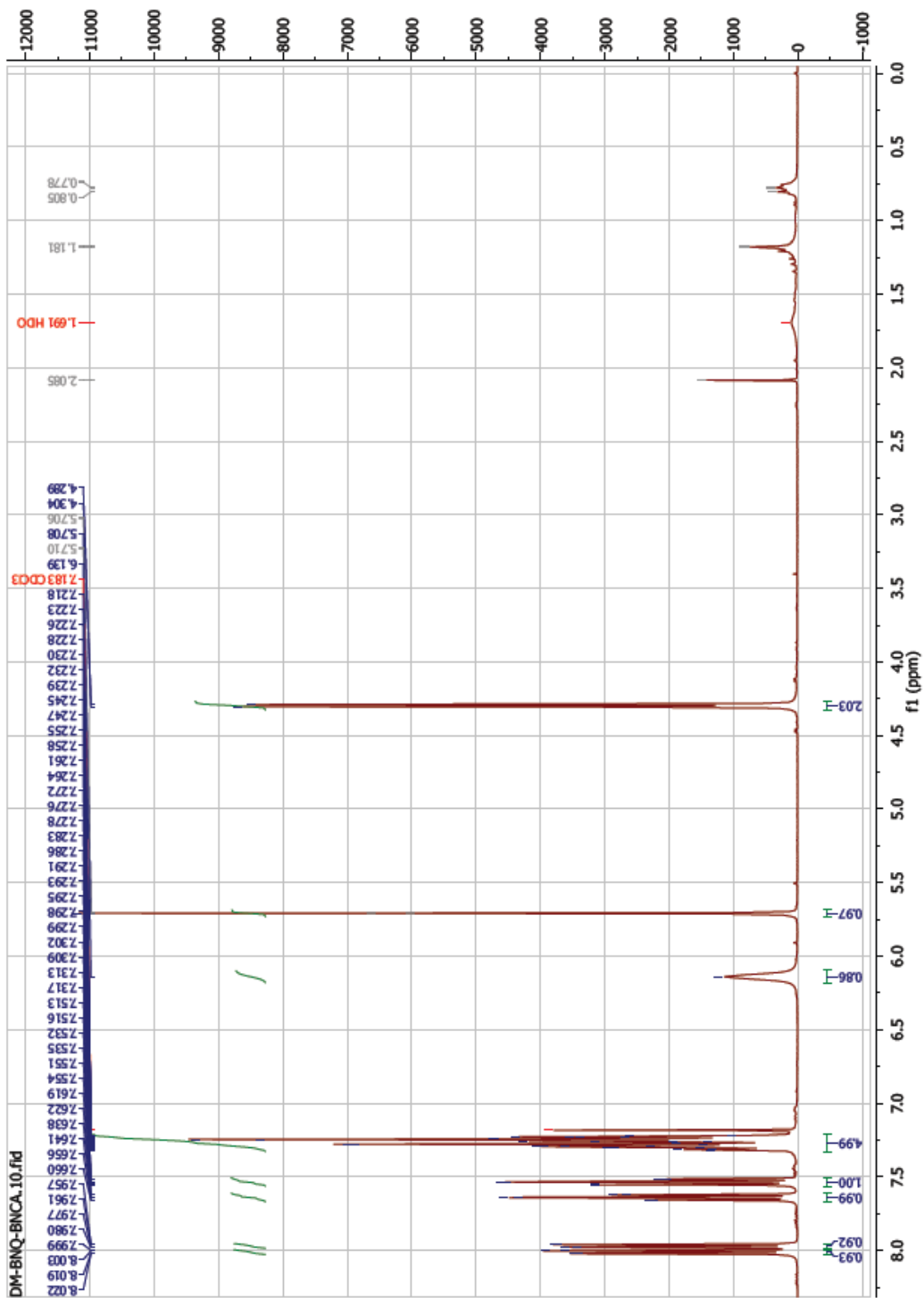
Anexo 12. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto NQ-Pipe.



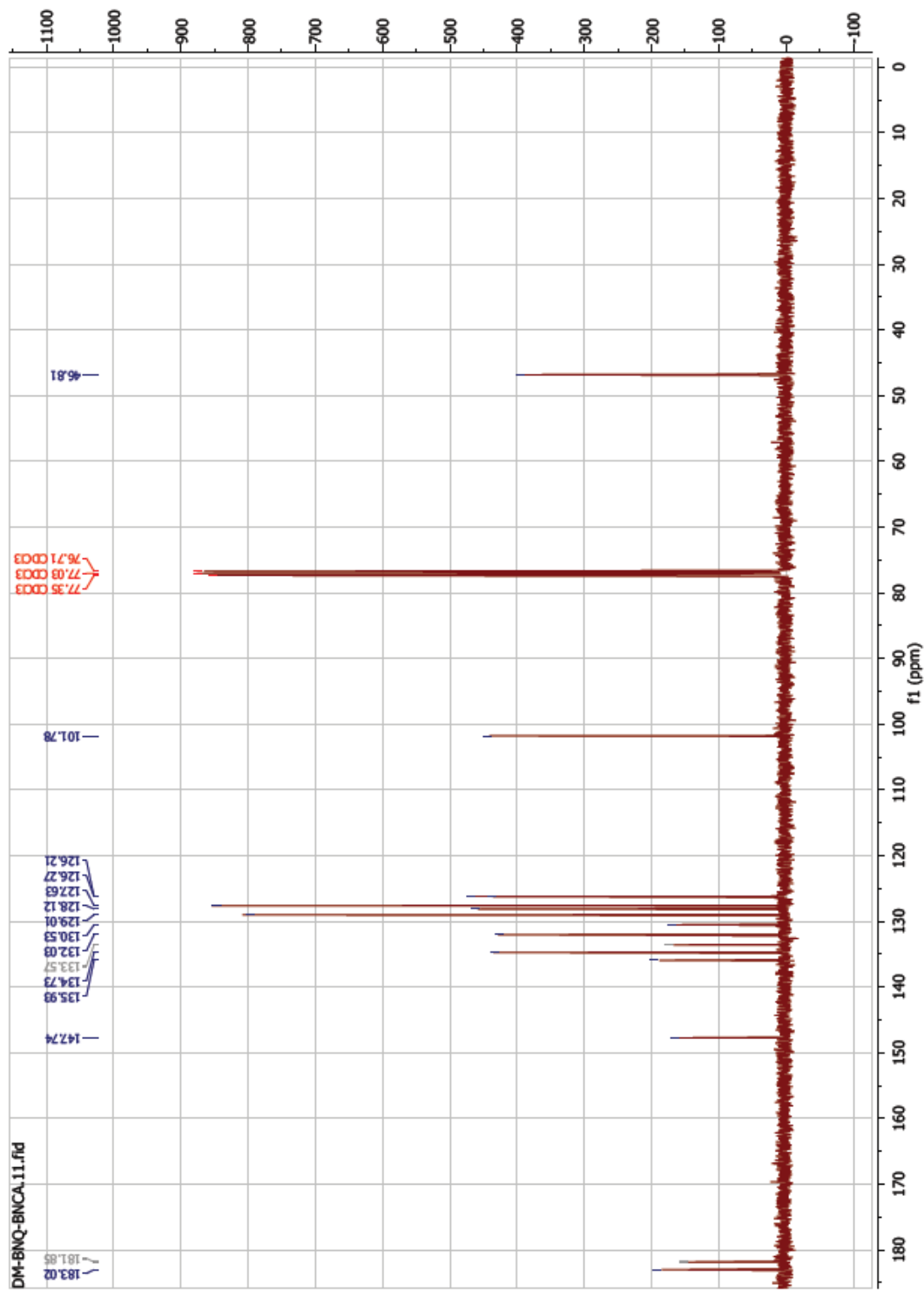
Anexo 13. Espectro de IR del compuesto NQ-Bnca.



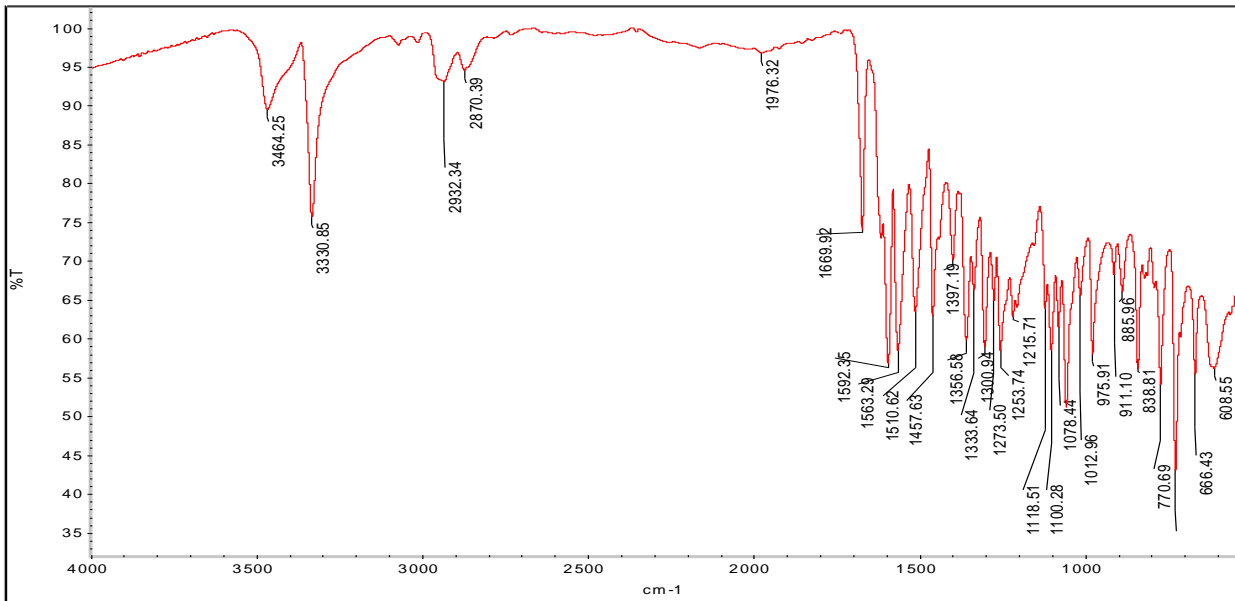
Anexo 14. Espectro de masas del compuesto NQ-Bnca.



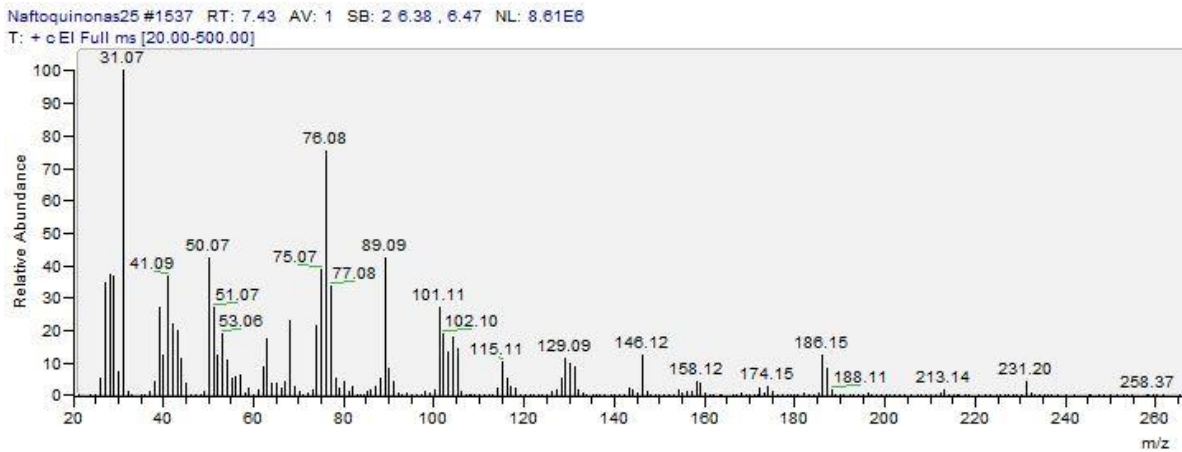
Anexo 15. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Bnca.



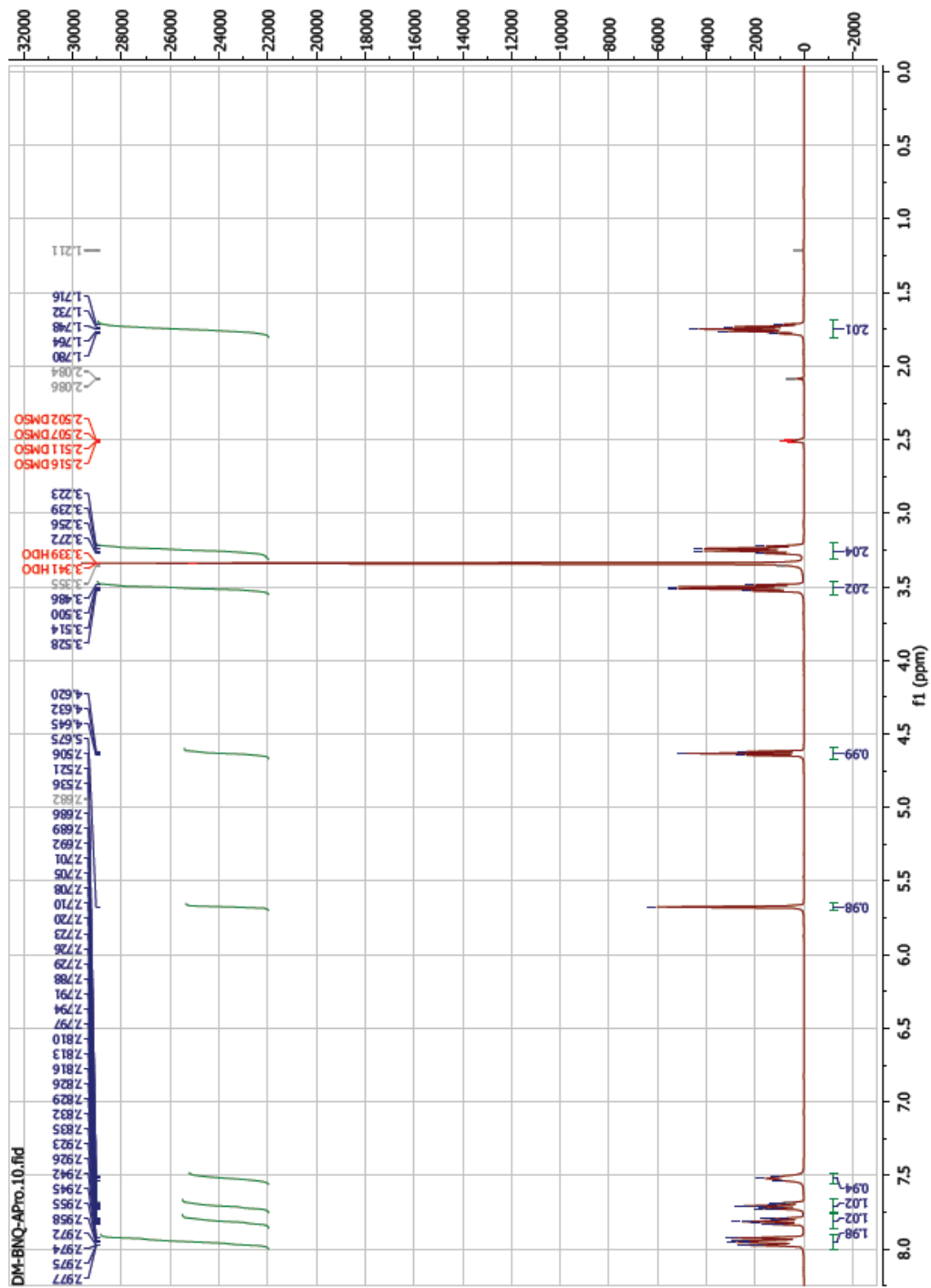
Anexo 16. Espectro de ¹³C-RMN del compuesto NQ-Bnca.



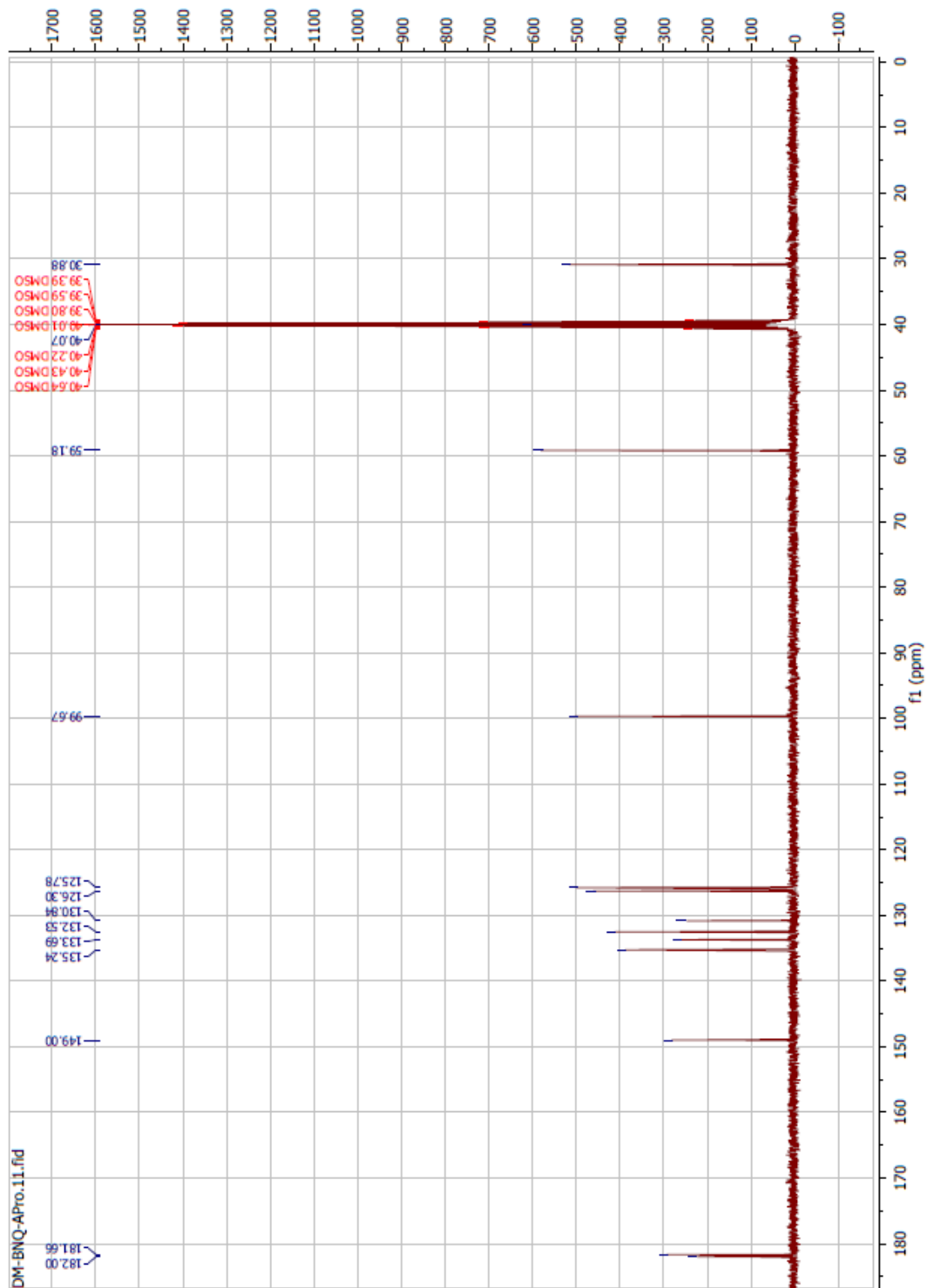
Anexo 17. Espectro de IR del compuesto NQ-Apro.



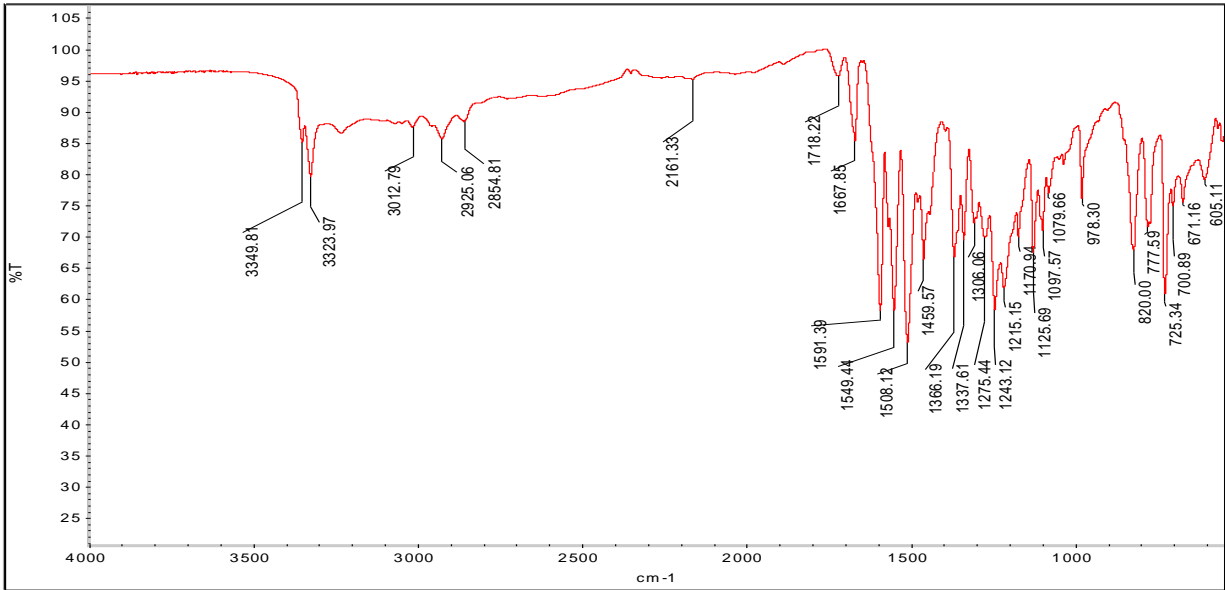
Anexo 18. Espectro de masas del compuesto NQ-Apro.



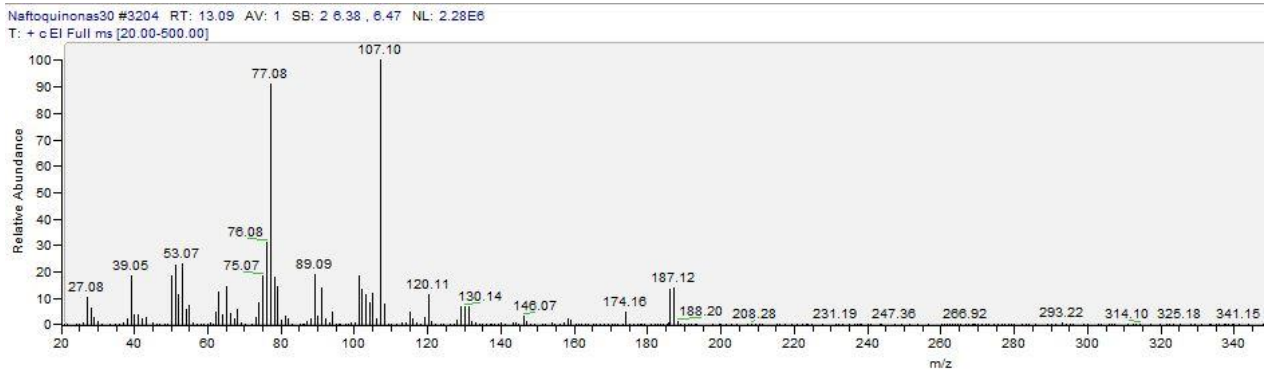
Anexo 19. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Apro.



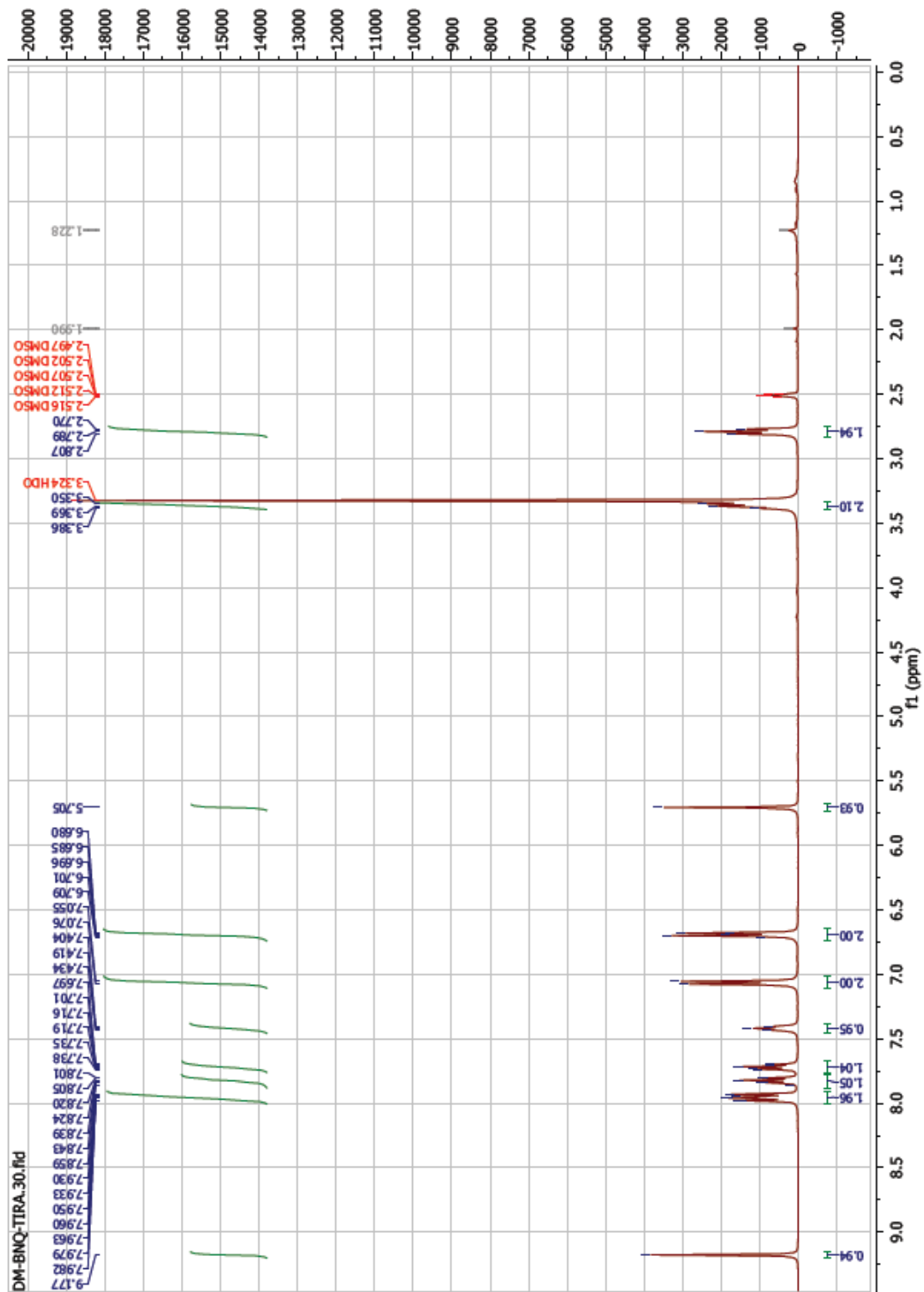
Anexo 20. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Apro.



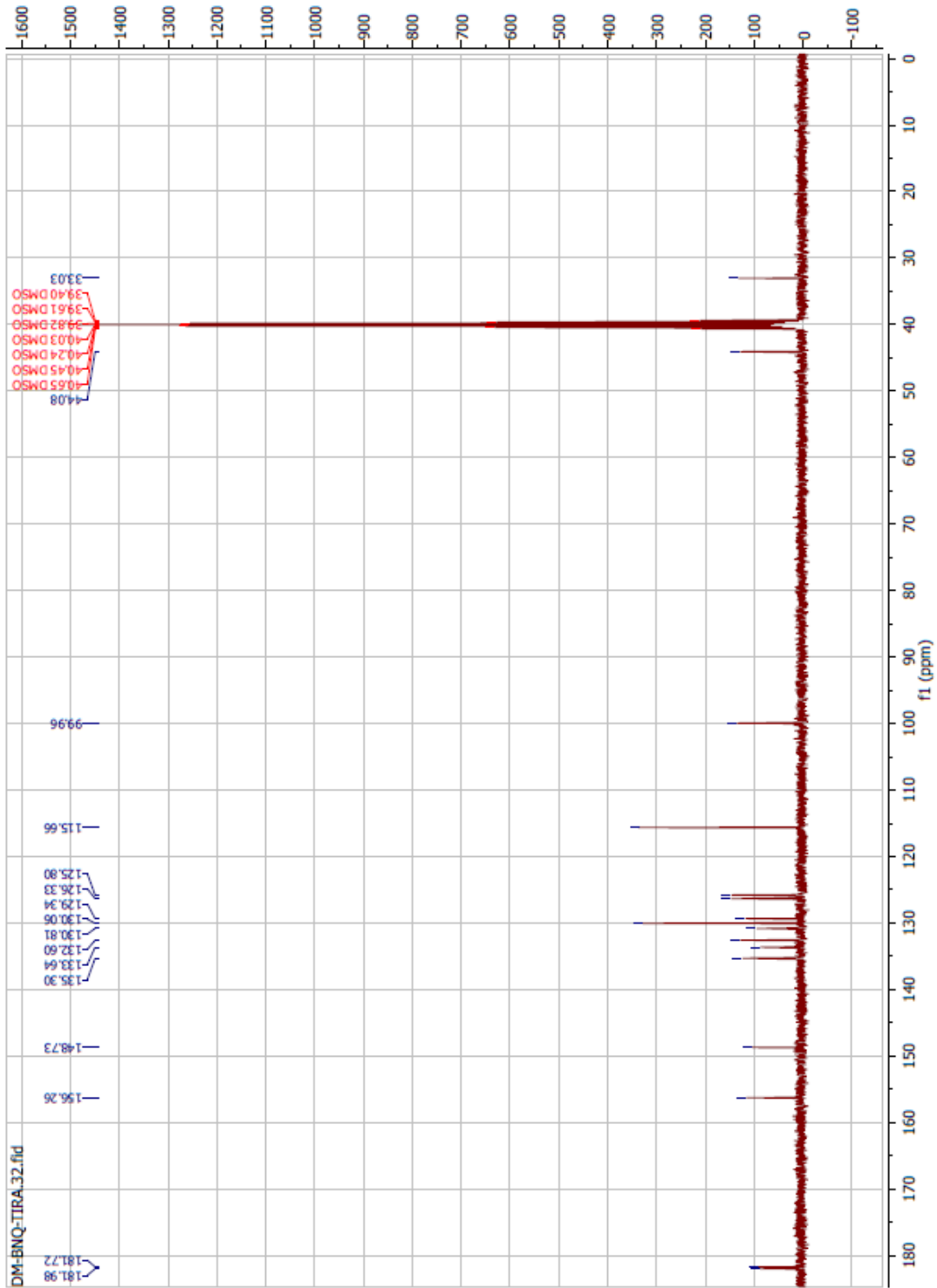
Anexo 21. Espectro de IR del compuesto NQ-Tira.



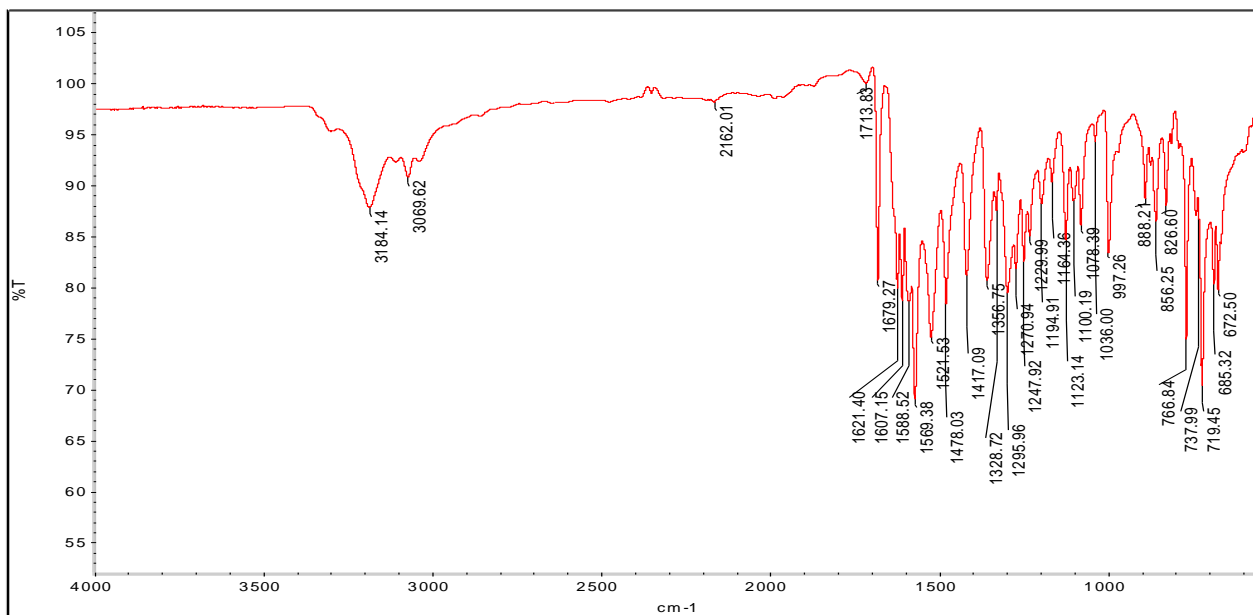
Anexo 22. Espectro de masas del compuesto NQ-Tira.



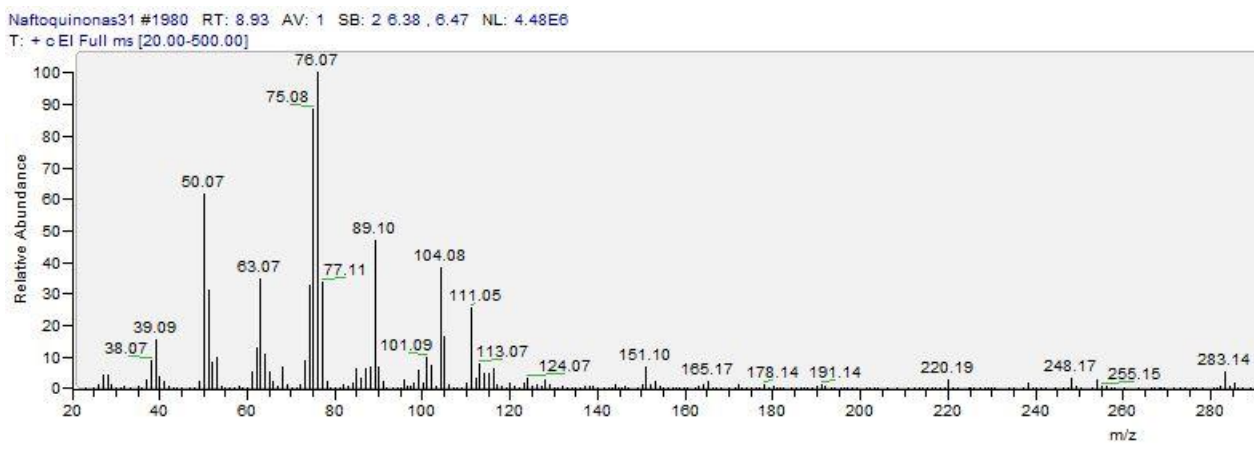
Anexo 23. Espectro de ¹H-RMN del compuesto NQ-Tira.



Anexo 24. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-Tira.



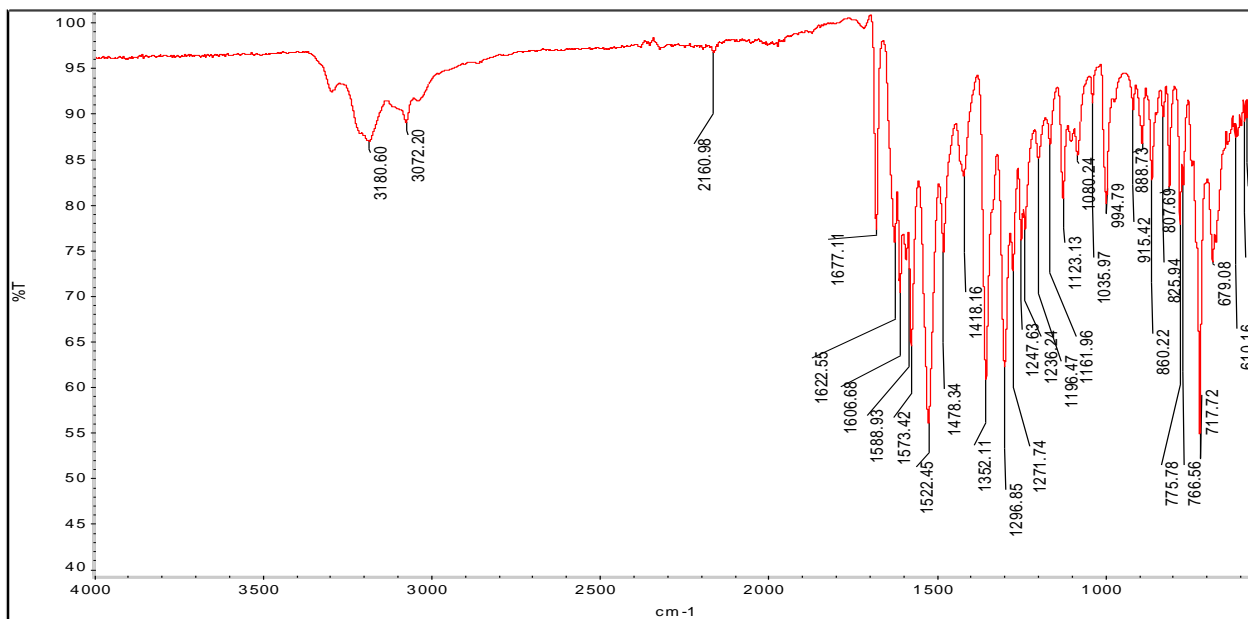
Anexo 25. Espectro de IR del compuesto NQ-ClAn.



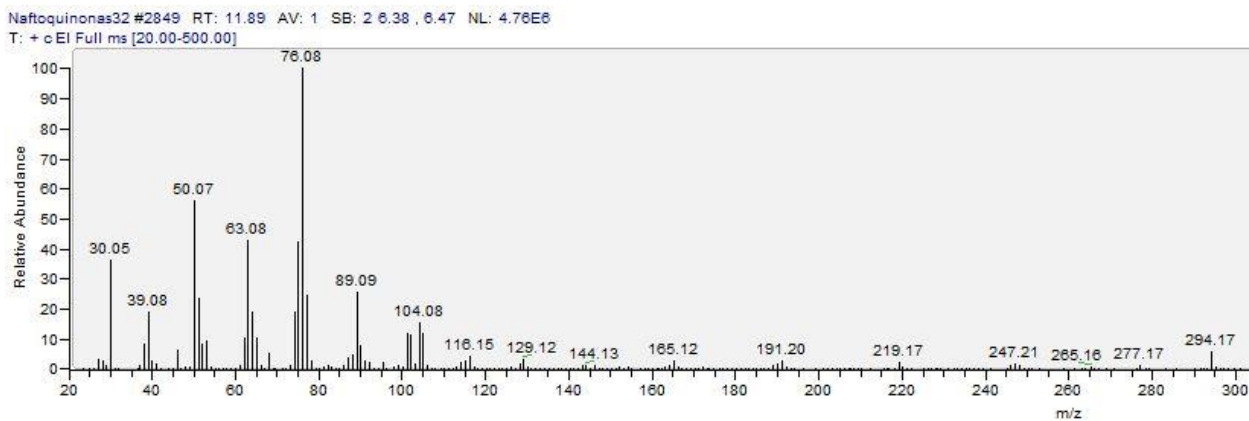
Anexo 26. Espectro de masas del compuesto NQ-ClAn.

Anexo 27. Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-ClAn.

Anexo 28. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-ClAn.



Anexo 29. Espectro de IR del compuesto NQ-NOAn.



Anexo 30. Espectro de masas del compuesto NQ-NOAn.

Anexo 31. Espectro de ^1H -RMN del compuesto NQ-NOAn.

Anexo 32. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto NQ-NOAn.

NQ-Prop

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-6.6	-7.4	-7.7	-7.23
2	-7.5	-7.4	-7.5		-6.4	-7.1	-7.3	
3	-7.4	-7.4	-7.3		-6.3	-6.9	-6.4	
4	-7.3	-7.3	-7.3		-5.8	-6.4	-6.4	
5	-7.3	-7.3	-7.2		-5.5	-6.3	-6.3	
6	-7.3	-7.3	-7.2		-5.4	-6.3	-6.1	
7	-7.2	-7.2	-7.1		-5.4	-6.1	-6	
8	-7.2	-7.1	-7.1		-5.4	-6	-5.9	
9	-7.2	-7.1	-7.1		-5.2	-6	-5.8	

NQ-Prop: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
						1
		1				
				3		
						1
						3

Anexo 33. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Prop.

NQ-Buta

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9
2	-7.6	-7.7	-7.5		-7.6	-7.3	-7.5	
3	-7.6	-7.6	-7.5		-7.4	-6.5	-7.5	
4	-7.5	-7.5	-7.5		-7.3	-6.4	-7.3	
5	-7.5	-7.5	-7.4		-7.2	-6.2	-7.1	
6	-7.4	-7.5	-7.4		-7.2	-6.1	-7.1	
7	-7.4	-7.5	-7.4		-7.1	-6.0	-6.9	
8	-7.4	-7.4	-7.4		-7.1	-6	-6.8	
9	-7.4	-7.4	-7.4		-6.9	-5.7	-6.5	

NQ-Buta: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1			
					1	

Anexo 34. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Buta.

NQ-Pipe

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-8.5	-8.5	-8.5	-8.5	-6.7	-6.6	-6.7	-6.67
2	-8.5	-8.5	-8.4		-6.5	-6.5	-6.5	
3	-8.4	-8.4	-8.4		-6.5	-6.4	-6.3	
4	-8.4	-8.4	-8.4		-6.3	-6.3	-6.2	
5	-8.4	-8.3	-8.4		-6.2	-5.9	-6	
6	-8.4	-8.3	-8.3		-6	-5.8	-5.9	
7	-8.3	-8.2	-8.1		-5.9	-5.8	-5.9	
8	-8.2	-8.2	-8.1		-5.8	-5.7	-5.7	
9	-8.2	-8.1	-8		-5.8	-5.6	-5.7	

NQ-Pipe: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
				3	3	3
					1	1
				1		
	1					
					1	
						1

Anexo 35. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Pipe.

NQ-Bnca

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-9.4	-9.3	-9.3	-9.33	-7.4	-7.5	-7.7	-7.53
2	-9.3	-9.3	-9.3		-7.3	-7.4	-7.5	
3	-9.3	-9.3	-9.3		7.2	-7.1	-7.1	
4	-9.3	-9.3	-9.2		-6.9	-6.9	-6.7	
5	-9.3	-9.2	-9.1		-6.8	-6.8	-6.7	
6	-9.1	-9.1	-9		-6.6	-6.7	-6.6	
7	-8.9	-9.1	-8.9		-6.6	-6.7	-6.6	
8	-8.7	-9	-8.8		-6.5	-6.5	-6.5	
9	-8.6	-9	-8.7		-6.1	-6.4	-6.4	

NQ-Bnca: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
				1		
						1
				1	1	
						1
				1		1

Anexo 36. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Bnca.

NQ-Apro

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-7.3	-7.5	-7.4	-7.4	-7.5	-6.6	-6.5	-6.87
2	-7.1	-7.3	-7.2		-7	-6.1	-6	
3	-7.1	-7.2	-7.1		-6.7	-5.9	-5.6	
4	-7	-7.1	-7		-6.6	-5.9	-5.5	
5	-6.9	-7	-7		-6.3	-5.8	-5.3	
6	-6.9	-6.9	-6.9		-5.2	-5.8	-5.2	
7	-6.9	-6.9	-6.9		-5	-5.7	-5.1	
8	-6.8	-6.9	-6.8		-5	-5.5	-4.9	
9	-6.7	-6.9	-6.6		-5	-5.4	-4.9	

NQ-Apro: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
					1	
					3	1
					2	3
				1	1	2
						1
					1	
		1		1		
				1	1	
					2	2

Anexo 37. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Apro.

NQ-Tira

	Caja 1			Promedio C1	Caja 2			Promedio C2
1	-9.7	-9.7	-9.4	-9.6	-7.7	-9.2	-8	-8.3
2	-9.5	-9.5	-9.4		-7.3	-8.8	-7.6	
3	-9.4	-9.5	-9.4		-7.3	-8.7	-6.9	
4	-9.4	-9.4	-9.4		-7	-7.4	-6.9	
5	-9.4	-9.4	-9.3		-7	-6.9	-6.6	
6	-9.4	-9.4	-9.1		-6.6	-6.9	-6.6	
7	-9.4	-9.3	-9		-6.4	-6.7	-6.5	
8	-9.3	-9.3	-8.9		-6.2	-6.7	-6.5	
9	-9.1	-9.2	-8.7		-6.1	-6.5	-6.5	

NQ-Tira: Puentes de H

	Caja 1			Caja 2		
				2		
					1	3
					1	
					1	1
	1					1
						3

Anexo 38. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-Tira.

NQ-CIAn								
	Caja 1			Promedio C1:	Caja 2			Promedio C2
1	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-9.1	-7.5	-7.5	-8.03
2	-9.6	-9.6	-9.5		-7.9	-7.3	-7.5	
3	-9.5	-9.5	-9.5		-7.6	-7.2	-7.2	
4	-9.4	-9.5	-9.5		-6.9	-7	-7.1	
5	-9.1	-9.4	-9.2		-6.9	-6.9	-6.9	
6	-9.1	-9.2	-9.1		-6.7	-6.9	-6.7	
7	-9.1	-9.1	-9.1		-6.4	-6.5	-6.6	
8	-9	-9.1	-9.1		-6.3	-6.4	-6.6	
9	-9	-9.1	-8.8		-6.2	-6.4	-6.4	

NQ-CIAn: Puentes de H				
	Caja 1		Caja 2	
			1	
				1
			1	3
				1
				1
			2	

Anexo 39. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-CIAn.

NQ-NOAn								
	Caja 1			Promedio C1:	Caja 2			Promedio C2
1	-9.7	-9.7	-9.7	-9.7	-7.0	-7.3	-9.5	-7.93
2	-9.6	-9.6	-9.6		-6.8	-7.1	-7.3	
3	-9.6	-9.6	-9.6		-6.3	-7.0	-6.8	
4	-9.6	-9.6	-9.6		-6.3	-7	-6.7	
5	-9.5	-9.5	-9.5		-6.3	-6.6	-6.6	
6	-9.5	-9.5	-9.5		-6.3	-6.6	-	
7	-9.5	-9.4	-9.4		-6.2	-6.4	-	
8	-9.4	-9.4	-9.4		-6.2	-6.4	-	
9	-9.4	-9.3	-9.2		-6.2	-6.4	-	

NQ-NOAn: Puentes de H				
	Caja 1		Caja 2	
			1	
				1
			1	3
			2	
			2	
				2

Anexo 40. Concentrado de scores de docking y puentes de H de NQ-NOAn.

1,4-NQ								
	Caja 1			Promedio C1:	Caja 2			Promedio C2
1	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9
2	-6.9	-6.9	-6.9		-6.8	-6.7	-6.7	
3	-6.9	-6.9	-6.9		-6.6	-6.2	-6.7	
4	-6.9	-6.9	-6.9		-6.5	-6	-6.5	
5	-6.9	-6.9	-6.9		-6.5	-6	-6.4	
6	-6.8	-6.8	-6.9		-6	-6.0	-6.3	
7	-6.7	-6.7	-6.7		-6	-5.8	-6	
8	-6.5	-6.7	-6.6		-6	-5.6	-6	
9	-6.5	-6.5	-6.5		-5.9	-5.6	-5.8	

1,4-NQ: Puentes de H				
	Caja 1		Caja 2	
			1	3
				1
				3
			2	1

Anexo 41. Concentrado de scores de docking y puentes de H de 1,4-Naftoquinona.

Warfarina

	Caja 1			Promedio C1:	Caja 2			Promedio C2
1	-9.4	-9.4	-9.4	-9.4	-7.1	-7.1	-7.1	-7.1
2	-8.7	-8.7	-8.8		-6.9	-6.9	-6.9	
3	-8.7	-8.7	-8.7		-6.7	-6.8	-6.9	
4	-8.6	-8.7	-8.7		-6.7	-6.6	-6.9	
5	-8.6	-8.7	-8.6		-6.6	-6.6	-6.7	
6	-8.4	-8.4	-8.4		-6.6	-6.5	-6.6	
7	-8.4	-8.4	-8.4		-6.5	-6.5	-6.5	
8	-8.1	-8.1	-8.2		-6.5	-6.4	-6.5	
9	-8.1	-7.6	-8.1		-6.4	-6.3	-6.5	

Warfarina: Puentes de H

Caja 1			Caja 2		
				2	2
1			3		1
1	1	1	1	3	2
1					
	1				
				1	
			1	2	1

Anexo 42. Concentrado de scores de docking y puentes de H de Warfarina.