

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



"Análisis *in silico* y evaluación biológica *in vitro* de derivados sintéticos de naftoquinona"

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

M.C. Arturo Estolano Cobián

Tijuana, B.C.

Junio del 2022

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

Folio No.327  
Tijuana, B.C., a 24 de Mayo del 2022

**C. Arturo Estolano Cobián**  
Pasante de: **Doctorado en Ciencias**  
Presente

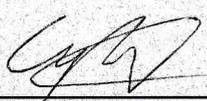
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS.

Es propuesto, por el C. Dr. Iván Córdova Guerrero.

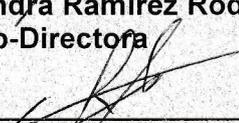
Quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al  
tema “Análisis in silico y evaluación biológica in vitro de derivados sintéticos de  
naftoquinona”.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. Introducción
- II. -Hipótesis
- III.- Objetivo general y particulares
- IV.- Generalidades
- V.- Metodología
- VI.- Resultados y discusión de resultados
- VII.- Conclusiones
- VIII.- Bibliografía
- IX.- Apéndices

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez**  
Sub-Directora

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Iván Córdova Guerrero**  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez**  
Director Provisional

## *Agradecimientos*

A Dios y mi familia. A mis padres y mi hermano que siempre han estado ahí para mí y me apoyan en todo lo que hago.

Al Dr. Iván Córdova Guerrero, por permitirme ingresar a su laboratorio y trabajar ahí a lo largo de estos años, así como su apoyo y orientación en la investigación.

A todos mis maestros de posgrado, en especial a mis sinodales, Dr. José Manuel Cornejo Bravo, Dra. Mirna del Carmen Brito Perea, Dr. Daniel Chávez Velasco y Dr. Juan Ramón Castro Rodríguez, por su apoyo y guía en la realización de este trabajo.

A mis amigos, que siempre están ahí para alentarme y compartir buenos momentos.

Al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, por su cariño, amistad y apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A la Universidad de Leiden y al Centro Académico de Leiden para la Investigación de Fármacos LACDR, en especial al Dr. Gerard J. P. van Westen por abrirme las puertas de su laboratorio para una estancia académica, así como al grupo de Diseño Computacional de Fármacos CDD por su apoyo y amistad.

A la Universidad Autónoma de Baja California, y en especial a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, que han sido mi segunda casa por tantos años.

## Resumen

En el presente trabajo se discute la síntesis de compuestos derivados de 1,4-naftoquinona que, bajo las premisas de la Química Medicinal, se plantean evaluar de manera *in vitro* e *in silico* como posibles compuestos terapéuticos.

En la **Introducción** se presentan las ideas básicas y la línea argumental que conduce el desarrollo de esta tesis, desde la síntesis de los compuestos hasta su evaluación mediante diversas técnicas tanto químicas como computacionales.

En el **Capítulo 1** se plantea la síntesis de los diferentes compuestos derivados de 1,4-naftoquinona, así como los procesos de caracterización estructural que permiten la correcta identificación de dichas moléculas.

En el **Capítulo 2** se presentan las evaluaciones de bioactividades de los compuestos previamente sintetizados. Estos compuestos son evaluados en sus propiedades antioxidantes, así como en un ensayo *in vitro* sobre su capacidad de inhibición enzimática contra acetilcolinesterasa.

En el **Capítulo 3** se muestra un análisis computacional, un acoplamiento molecular automatizado o *docking*, para examinar *in silico* las interacciones de los compuestos sintetizados con la enzima acetilcolinesterasa que fueron exploradas *in vitro* en el capítulo anterior.

En el **Capítulo 4** se profundiza en el estudio computacional de la enzima presentada en capítulos previos. Mediante la creación de modelos predictivos proteoquimiométricos se pretende apoyar a la búsqueda de mejores inhibidores de acetilcolinesterasa.

Para finalizar, en las **Conclusiones** se lleva a cabo una síntesis de los resultados obtenidos en la tesis, siguiendo los lineamientos de los objetivos de la misma.

## Abstract

In this work the synthesis of compounds derived from 1,4-naphthoquinone is discussed and, under the principles of Medicinal Chemistry, are proposed to evaluate by *in vitro* and *in silico* means as potential therapeutic compounds.

In the **Introduction** are presented the basic ideas and the reasoning that conducts the development of this thesis, from the compound synthesis until their evaluation through different chemical and computational techniques.

In **Chapter 1** is planned the synthesis of the different compounds derived from 1,4-naphthoquinone, along with the process of structural characterization that allow the correct identification of such products.

In **Chapter 2** are presented the bioactivity evaluations of the previously synthesized compounds. These are evaluated in their antioxidant properties, and with an *in vitro* essay to determine their enzymatic inhibition against acetylcholinesterase.

In **Chapter 3** is shown a computational analysis, a docking, to determine *in silico* the interactions that the synthesized compounds might have with the acetylcholinesterase enzyme, to continue the *in vitro* analysis of the previous chapter.

In **Chapter 4** is deepen the computational study of the enzyme mentioned in previous chapters. Through the creation of predictive proteochemometric models, is intended to give support in the search of better acetylcholinesterase inhibitors.

Finally in the **Conclusions**, following the thesis' objectives guidelines, a summary of the results is done.

**Índice General**

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| Índice de Figuras .....                                                | i   |
| Índice de Tablas .....                                                 | iii |
| Índice de Esquemas .....                                               | iv  |
| Índice de Anexos .....                                                 | v   |
| Abreviaturas y Acrónimos .....                                         | vii |
| <br>                                                                   |     |
| Introducción .....                                                     | 1   |
| Hipótesis .....                                                        | 5   |
| Objetivo general y particulares .....                                  | 6   |
| Capítulo 1. Síntesis y caracterización de compuestos                   |     |
| Generalidades .....                                                    | 7   |
| Metodología .....                                                      | 15  |
| Discusión de resultados .....                                          | 33  |
| Capítulo 2. Estudios <i>in vitro</i>                                   |     |
| Generalidades .....                                                    | 48  |
| Metodología .....                                                      | 53  |
| Discusión de resultados .....                                          | 56  |
| Capítulo 3. Química Computacional: Acoplamiento molecular automatizado |     |
| Generalidades .....                                                    | 65  |
| Metodología .....                                                      | 71  |
| Discusión de resultados .....                                          | 74  |
| Capítulo 4. Química Computacional: Modelado Proteoquimiométrico        |     |
| Generalidades .....                                                    | 81  |
| Metodología .....                                                      | 88  |
| Discusión de resultados .....                                          | 92  |
| Conclusiones .....                                                     | 110 |
| Bibliografía .....                                                     | 113 |
| Apéndices                                                              |     |
| Técnicas experimentales .....                                          | 126 |
| Anexos .....                                                           | 129 |

## Índice de Figuras

|                    |                                                                                                                                                                                             |     |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 0.1</b>  | Modelo molecular de la acetilcolinesterasa de <i>Tetronarce californica</i> (PDB: 1EVE).                                                                                                    | 3   |
| <b>Figura 1.1</b>  | Estructura química de la vitamina K, remarcando en rojo el núcleo naftoquinona.                                                                                                             | 7   |
| <b>Figura 1.2</b>  | Ejemplos de estructuras naftoquinónicas con capacidades anticancerígenas.                                                                                                                   | 8   |
| <b>Figura 1.3</b>  | Ejemplos de compuestos antimaláricos con fragmentos de naftoquinona.                                                                                                                        | 9   |
| <b>Figura 1.4</b>  | Quinonas sintetizadas por Kamauchi <i>et al.</i> (2020) inhibitoras de MAO-B.                                                                                                               | 12  |
| <b>Figura 1.5</b>  | Núcleo común de los productos sintetizados.                                                                                                                                                 | 33  |
| <b>Figura 1.6</b>  | Acoplamientos para los dd y ddd, tomando H-5 (flechas azules) y H-7 (flechas rojas) como ejemplos.                                                                                          | 34  |
| <b>Figura 1.7</b>  | Ampliación del espectro COSY del compuesto <b>10</b> NQ-2aet.                                                                                                                               | 36  |
| <b>Figura 1.8</b>  | Experimento HSQC del compuesto <b>10</b> NQ-2aet. En rojo se observan las señales negativas (CH <sub>2</sub> ) y en negro las positivas (en este caso, CH).                                 | 36  |
| <b>Figura 1.9</b>  | Ampliaciones del espectro HMBC del compuesto <b>10</b> NQ-2aet. Como ejemplos de acoplamientos se muestran a H-6 (flechas rojas) y H-8 (flechas azules).                                    | 37  |
| <b>Figura 2.1</b>  | Hidrólisis de acetilcolina por parte de AChE.                                                                                                                                               | 49  |
| <b>Figura 2.2</b>  | Estructuras de inhibidores de acetilcolinesterasa.                                                                                                                                          | 51  |
| <b>Figura 3.1</b>  | Representación y modelado molecular de la estructura de aspirina. (a) Estructura química en dos dimensiones (b) Modelo molecular de esferas y barras (c) Modelo molecular de espacio lleno. | 65  |
| <b>Figura 3.2</b>  | Representación de una enzima y ligando que son sometidos a un acoplamiento molecular automatizado.                                                                                          | 68  |
| <b>Figura 3.3</b>  | Modelo de llave-cerradura y de ajuste inducido.                                                                                                                                             | 69  |
| <b>Figura 3.4</b>  | Validación del <i>docking</i> de AChE con RMSD = 1.141. (Donepezilo original, color gris; donepezilo calculado, verde).                                                                     | 74  |
| <b>Figura 3.5</b>  | Cavidad catalítica de la enzima AChE. (Tríada catalítica, rojo; CAS, azul claro; PAS, morado).                                                                                              | 75  |
| <b>Figura 3.6</b>  | Resultados del quintuplicado para algunos ligandos, con menor a mayor discrepancia. (Izquierda, <b>5a</b> NQ-3apr-Ac; centro, <b>9a</b> NQ-2abu-Ac; derecha, <b>6</b> NQ-Tira).             | 76  |
| <b>Figura 3.7</b>  | Principales residuos de interacción en la cavidad de AChE con las naftoquinonas sintetizadas.                                                                                               | 78  |
| <b>Figura 3.8</b>  | Ligandos con interacción $\pi$ - $\pi$ con Phe330 de AChE y enlaces de H en color amarillo.                                                                                                 | 79  |
| <b>Figura 3.9</b>  | Ligandos con interacción $\pi$ - $\pi$ con Trp84 de AChE y enlaces de H en color amarillo.                                                                                                  | 80  |
| <b>Figura 4.1</b>  | Estructura de un árbol de decisión.                                                                                                                                                         | 84  |
| <b>Figura 4.2</b>  | Esquema de los modelos <i>QSAR</i> y <i>PCM</i> .                                                                                                                                           | 87  |
| <b>Figura 4.3</b>  | Protocolo de Pipeline Pilot para la revisión de secuencias del BLAST de AChE y posterior análisis.                                                                                          | 92  |
| <b>Figura 4.4</b>  | Fragmento de la alineación de secuencias seleccionadas tras la delimitación por especies.                                                                                                   | 93  |
| <b>Figura 4.5</b>  | Mapa de calor de 500 compuestos del conjunto de datos, empleando valores de coeficiente de Tanimoto.                                                                                        | 96  |
| <b>Figura 4.6</b>  | t-SNE aproximado (a) y exacto (b) de los compuestos incluidos en el conjunto de datos.                                                                                                      | 97  |
| <b>Figura 4.7</b>  | Curvas de aprendizaje mostrando el efecto de los descriptores proteicos.                                                                                                                    | 99  |
| <b>Figura 4.8</b>  | Curvas de aprendizaje mostrando el efecto de los sets de datos iniciales.                                                                                                                   | 99  |
| <b>Figura 4.9</b>  | Desempeño de los modelos proteoquimiométricos (conjunto de entrenamiento al 70%).                                                                                                           | 100 |
| <b>Figura 4.10</b> | Curvas de aprendizaje del mejor modelo usando la secuencia de las proteínas completas, en comparación con la selección del sitio de unión (SU) de las mismas.                               | 101 |
| <b>Figura 4.11</b> | Desempeño del mejor modelo usando la secuencia de las proteínas completas, en comparación con la selección del sitio de unión (SU) de las mismas (conjunto de entrenamiento al 70%).        | 102 |

---

|                    |                                                                                                                                                      |     |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 4.12</b> | Gráfica de t-SNE aproximada con los centros de <i>cluster</i> generados para el cribado virtual.                                                     | 105 |
| <b>Figura 4.13</b> | Estructuras de compuestos seleccionados obtenidos en el cribado virtual. En rojo se remarcan los fragmentos benzamida y en azul los benzoxazepinona. | 108 |

**Índice de Tablas**

|                  |                                                                                                                                              |     |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.1</b> | Desplazamiento de los hidrógenos y carbonos del núcleo común de las naftoquinonas.                                                           | 35  |
| <b>Tabla 2.1</b> | Porcentajes de actividad antioxidante DPPH.                                                                                                  | 58  |
| <b>Tabla 2.2</b> | Porcentajes de actividad antioxidante ABTS.                                                                                                  | 59  |
| <b>Tabla 2.3</b> | Concentrado de porcentajes de actividad antioxidante.                                                                                        | 60  |
| <b>Tabla 2.4</b> | Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.                                                                                                | 63  |
| <b>Tabla 2.5</b> | Propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de los compuestos sintetizados.                                                                | 64  |
| <b>Tabla 3.1</b> | Condiciones de minimizado de energía mediante UCSF Chimera.                                                                                  | 72  |
| <b>Tabla 3.2</b> | Puntajes del <i>docking</i> con AChE.                                                                                                        | 77  |
| <b>Tabla 3.3</b> | Principales interacciones entre AChE y los ligandos naftoquinónicos.                                                                         | 80  |
| <b>Tabla 4.1</b> | Enzimas retribuidas de ChEMBL con datos de bioactividad.                                                                                     | 94  |
| <b>Tabla 4.2</b> | Formación de subconjuntos de datos (Códigos Uniprot).                                                                                        | 95  |
| <b>Tabla 4.3</b> | Sets finales para el modelado proteoquimiométrico, según su diferencia en el descriptor de la proteína y set inicial del cual se calcularon. | 97  |
| <b>Tabla 4.4</b> | Aminoácidos seleccionados de la secuencia de AChE de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tetranychus urticae</i> para el cribado virtual.               | 104 |
| <b>Tabla 4.5</b> | Frecuencia de aparición de cada <i>cluster</i> por secuencia de AChE en los 50 mejores resultados del cribado final.                         | 107 |
| <b>Tabla 4.6</b> | Primeros 50 resultados del cribado virtual por secuencia analizada.                                                                          | 109 |

**Índice de Esquemas**

|                     |                                                                     |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1.1</b>  | Síntesis de núcleos de tipo quinona.                                | 11 |
| <b>Esquema 1.2</b>  | Síntesis de quinonas con fragmentos de amino azúcares.              | 13 |
| <b>Esquema 1.3</b>  | Síntesis de análogos bromados de plastoquinona.                     | 14 |
| <b>Esquema 1.4</b>  | Síntesis de aminoquinonas con amonio acuoso.                        | 14 |
| <b>Esquema 1.5</b>  | Síntesis general de derivados de 1,4-naftoquinona.                  | 15 |
| <b>Esquema 1.6</b>  | Síntesis general empleando anilinas como agentes nucleófilos.       | 15 |
| <b>Esquema 1.7</b>  | Síntesis general de acetilación de derivados de tipo amino alcohol. | 16 |
| <b>Esquema 1.8</b>  | Síntesis del compuesto <b>(1)</b> NQ-Prop.                          | 17 |
| <b>Esquema 1.9</b>  | Síntesis del compuesto <b>(2)</b> NQ-Buta.                          | 18 |
| <b>Esquema 1.10</b> | Síntesis del compuesto <b>(3)</b> NQ-Pipe.                          | 19 |
| <b>Esquema 1.11</b> | Síntesis del compuesto <b>(4)</b> NQ-Bnca.                          | 20 |
| <b>Esquema 1.12</b> | Síntesis del compuesto <b>(5)</b> NQ-3apr.                          | 21 |
| <b>Esquema 1.13</b> | Síntesis del compuesto <b>(5a)</b> NQ-3apr-Ac.                      | 22 |
| <b>Esquema 1.14</b> | Síntesis del compuesto <b>(6)</b> NQ-Tira.                          | 23 |
| <b>Esquema 1.15</b> | Síntesis del compuesto <b>(7)</b> NQ-ClAn.                          | 24 |
| <b>Esquema 1.16</b> | Síntesis del compuesto <b>(8)</b> NQ-NOAn.                          | 25 |
| <b>Esquema 1.17</b> | Síntesis del compuesto <b>(9)</b> NQ-2abu.                          | 26 |
| <b>Esquema 1.18</b> | Síntesis del compuesto <b>(9a)</b> NQ-2abu-Ac.                      | 27 |
| <b>Esquema 1.19</b> | Síntesis del compuesto <b>(10)</b> NQ-2aet.                         | 28 |
| <b>Esquema 1.20</b> | Síntesis del compuesto <b>(10a)</b> NQ-2aet-Ac.                     | 29 |
| <b>Esquema 1.21</b> | Síntesis del compuesto <b>(11)</b> NQ-1a2p.                         | 30 |
| <b>Esquema 1.22</b> | Síntesis del compuesto <b>(11a)</b> NQ-1a2p-Ac.                     | 31 |
| <b>Esquema 1.23</b> | Síntesis del compuesto <b>(12)</b> NQ-Feam.                         | 32 |

## Índice de Anexos

|                 |                                                                 |     |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Anexo 1</b>  | Espectro de IR del compuesto NQ-Prop (1).                       | 129 |
| <b>Anexo 2</b>  | Espectro de masas del compuesto NQ-Prop (1).                    | 129 |
| <b>Anexo 3</b>  | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Prop (1).      | 130 |
| <b>Anexo 4</b>  | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Prop (1).     | 130 |
| <b>Anexo 5</b>  | Espectro de IR del compuesto NQ-Buta (2).                       | 131 |
| <b>Anexo 6</b>  | Espectro de masas del compuesto NQ-Buta (2).                    | 131 |
| <b>Anexo 7</b>  | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Buta (2).      | 132 |
| <b>Anexo 8</b>  | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Buta (2).     | 132 |
| <b>Anexo 9</b>  | Espectro de IR del compuesto NQ-Pipe (3).                       | 133 |
| <b>Anexo 10</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-Pipe (3).                    | 133 |
| <b>Anexo 11</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Pipe (3).      | 134 |
| <b>Anexo 12</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Pipe (3).     | 134 |
| <b>Anexo 13</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-Bnca (4).                       | 135 |
| <b>Anexo 14</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-Bnca (4).                    | 135 |
| <b>Anexo 15</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Bnca (4).      | 136 |
| <b>Anexo 16</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Bnca (4).     | 136 |
| <b>Anexo 17</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-3apr (5).                       | 137 |
| <b>Anexo 18</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-3apr (5).                    | 137 |
| <b>Anexo 19</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-3apr (5).      | 138 |
| <b>Anexo 20</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-3apr (5).     | 138 |
| <b>Anexo 21</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).                   | 139 |
| <b>Anexo 22</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).                | 139 |
| <b>Anexo 23</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).  | 140 |
| <b>Anexo 24</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-3apr-Ac (5a). | 140 |
| <b>Anexo 25</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-Tira (6).                       | 141 |
| <b>Anexo 26</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-Tira (6).                    | 141 |
| <b>Anexo 27</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Tira (6).      | 142 |
| <b>Anexo 28</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Tira (6).     | 142 |
| <b>Anexo 29</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-CIAn (7).                       | 143 |
| <b>Anexo 30</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-CIAn (7).                    | 143 |
| <b>Anexo 31</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-CIAn (7).      | 144 |
| <b>Anexo 32</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-CIAn (7).     | 144 |
| <b>Anexo 33</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-NOAn (8).                       | 145 |
| <b>Anexo 34</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-NOAn (8).                    | 145 |
| <b>Anexo 35</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-NOAn (8).      | 146 |
| <b>Anexo 36</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-NOAn (8).     | 146 |
| <b>Anexo 37</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-2abu (9).                       | 147 |
| <b>Anexo 38</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-2abu (9).                    | 147 |

|                 |                                                                                                                                                     |     |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Anexo 39</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-2abu (9).                                                                                          | 148 |
| <b>Anexo 40</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-2abu (9).                                                                                         | 148 |
| <b>Anexo 41</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).                                                                                                       | 149 |
| <b>Anexo 42</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).                                                                                                    | 149 |
| <b>Anexo 43</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).                                                                                      | 150 |
| <b>Anexo 44</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).                                                                                     | 150 |
| <b>Anexo 45</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-2aet (10).                                                                                                          | 151 |
| <b>Anexo 46</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-2aet (10).                                                                                                       | 151 |
| <b>Anexo 47</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-2aet (10).                                                                                         | 152 |
| <b>Anexo 48</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-2aet (10).                                                                                        | 152 |
| <b>Anexo 49</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).                                                                                                      | 153 |
| <b>Anexo 50</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).                                                                                                   | 153 |
| <b>Anexo 51</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).                                                                                     | 154 |
| <b>Anexo 52</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).                                                                                    | 154 |
| <b>Anexo 53</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-1a2p (11).                                                                                                          | 155 |
| <b>Anexo 54</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-1a2p (11).                                                                                                       | 155 |
| <b>Anexo 55</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-1a2p (11).                                                                                         | 156 |
| <b>Anexo 56</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-1a2p (11).                                                                                        | 156 |
| <b>Anexo 57</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).                                                                                                      | 157 |
| <b>Anexo 58</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).                                                                                                   | 157 |
| <b>Anexo 59</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).                                                                                     | 158 |
| <b>Anexo 60</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).                                                                                    | 158 |
| <b>Anexo 61</b> | Espectro de IR del compuesto NQ-Feam (12).                                                                                                          | 159 |
| <b>Anexo 62</b> | Espectro de masas del compuesto NQ-Feam (12).                                                                                                       | 159 |
| <b>Anexo 63</b> | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto NQ-Feam (12).                                                                                         | 160 |
| <b>Anexo 64</b> | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto NQ-Feam (12).                                                                                        | 160 |
| <b>Anexo 65</b> | Valores de R <sup>2</sup> para los diferentes modelados proteoquimiométricos.                                                                       | 161 |
| <b>Anexo 66</b> | Valores de RMSE para los diferentes modelados proteoquimiométricos.                                                                                 | 161 |
| <b>Anexo 67</b> | Valores de R <sup>2</sup> comparando un modelo con descripción total de la secuencia de aminoácidos, contra la delimitación al sitio de unión (SU). | 162 |
| <b>Anexo 68</b> | Valores de RMSE comparando un modelo con descripción total de la secuencia de aminoácidos, contra la delimitación al sitio de unión (SU).           | 162 |
| <b>Anexo 69</b> | Lista de propiedades con sus valores de importancia para el modelo proteoquimiométrico.<br>*Suma Residual de Cuadrados.                             | 163 |
| <b>Anexo 70</b> | Primeros 100 <i>clusters</i> con mejor resultados por secuencia de AChE.                                                                            | 166 |
| <b>Anexo 71</b> | Estructuras de los mejores resultados del cribado.                                                                                                  | 167 |

**Abreviaturas y Acrónimos**

|                                      |                                                                                                             |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1,4-NQ                               | 1,4-Naftoquinona                                                                                            |
| Å                                    | Ángstrom                                                                                                    |
| ABTS                                 | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico                                                       |
| AcCl                                 | Cloruro de acetilo                                                                                          |
| AChE                                 | Acetilcolinesterasa                                                                                         |
| AcOEt                                | Acetato de etilo                                                                                            |
| AcOH                                 | Ácido acético                                                                                               |
| ASCII                                | Código estándar estadounidense para el intercambio de información                                           |
| BLAST                                | Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ) |
| °C                                   | Grados Celsius                                                                                              |
| CADD                                 | Diseño de fármacos asistido por ordenador (del inglés <i>Computer Aided Drug Design</i> )                   |
| CCF                                  | Cromatografía de Capa Fina                                                                                  |
| CDCl <sub>3</sub>                    | Cloroformo deuterado                                                                                        |
| ChE                                  | Colinesterasa                                                                                               |
| CG                                   | Cromatografía de gases                                                                                      |
| CI <sub>50</sub>                     | Concentración inhibitoria 50                                                                                |
| cm                                   | Centímetro                                                                                                  |
| COSY                                 | Espectroscopía de correlación                                                                               |
| Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> | Acetato de cobre                                                                                            |
| δ                                    | Desplazamiento (en ppm)                                                                                     |
| DCM                                  | Diclorometano                                                                                               |
| D.E.                                 | Desviación estándar                                                                                         |
| DMSO                                 | Dimetilsulfóxido                                                                                            |
| DPPH                                 | 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo                                                                               |
| ECFP                                 | Huella dactilar de conectividad extendida                                                                   |
| EM                                   | Espectrometría de masas                                                                                     |
| eq                                   | Equivalentes                                                                                                |
| h                                    | Hora                                                                                                        |
| HMBC                                 | Espectroscopía de correlación heteronuclear de enlace múltiple                                              |
| HSQC                                 | Espectroscopía de coherencia cuántica simple heteronuclear                                                  |
| Hz                                   | Hercio                                                                                                      |
| IA                                   | Inteligencia Artificial                                                                                     |
| IR                                   | Infrarrojo                                                                                                  |

|                     |                                                                                                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>J</i>            | Constante de acoplamiento (en Hz)                                                                               |
| MeOH                | Metanol                                                                                                         |
| mg                  | Miligramo                                                                                                       |
| µg                  | Microgramo                                                                                                      |
| MHz                 | Mega Hercio                                                                                                     |
| min                 | Minuto                                                                                                          |
| ML                  | Aprendizaje automático (del inglés <i>Machine Learning</i> )                                                    |
| mL                  | Mililitro                                                                                                       |
| µL                  | Microlitro                                                                                                      |
| mM                  | Milimolar                                                                                                       |
| mmol                | Milimol                                                                                                         |
| <i>m/e</i>          | Relación masa/carga                                                                                             |
| <i>n</i> -Hex       | <i>n</i> -Hexano                                                                                                |
| nm                  | Nanómetro                                                                                                       |
| PP                  | Pipeline Pilot                                                                                                  |
| PCM                 | Modelado Proteoquimiométrico (del inglés <i>Proteochemometric</i> )                                             |
| QSAR                | Estudios de relación-actividad cuantitativos (del inglés <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> ) |
| %R                  | Porcentaje de rendimiento                                                                                       |
| RMN <sup>1</sup> H  | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno                                                                       |
| RMN <sup>13</sup> C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13                                                                      |
| RMSD                | Raíz de la desviación cuadrática media (del inglés, <i>Root-mean-square deviation</i> )                         |
| RMSE                | Raíz del error cuadrático medio (del inglés, <i>Root-mean-square error</i> )                                    |
| s                   | Segundo                                                                                                         |
| SMILES              | Especificación de introducción lineal molecular simplificada                                                    |
| TMS                 | Tetrametilsilano                                                                                                |
| t-SNE               | Incrustación estocástica de vecinos distribuidos en t                                                           |

## Introducción

Las quinonas se pueden encontrar presentes en diversas moléculas de origen sintético y natural. El núcleo consiste en un anillo aromático de tipo diona, cuyas cetonas pueden encontrarse en posición 1,2 o 1,4 del anillo. Pueden además existir núcleos donde se tengan de uno a tres anillos aromáticos. Ampliamente distribuidas en la naturaleza, el primer uso de este tipo de compuestos fue el de pigmentos; sin embargo, se han identificado diversas actividades biológicas en estas moléculas por lo que su uso se ha ido diversificando. Algunas de las propiedades estudiadas incluyen la antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y anticancerígenas (López L., Leyva y García de la Cruz, 2011; Da Silva y Ferreira, 2016; Macías López *et al.*, 2013), siendo muchas de las actividades biológicas presentadas atribuidas a sus propiedades de transferencia electrónica y de óxido-reducción.

Otra actividad biológica de las naftoquinonas consiste en la inhibición enzimática. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) tiene un papel importante en la neurotransmisión, ya que se encarga de hidrolizar a la acetilcolina. Se tiene antecedentes de naftoquinonas de origen natural, que poseen actividad inhibitoria de AChE (Boonyaketguson *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2018). Dado que AChE se encuentra ampliamente distribuida en animales vertebrados e invertebrados, se ha evaluado a los inhibidores de esta enzima como tratamientos en la enfermedad de Alzheimer (actuando en la AChE de humanos) o como controladores de plagas (actuando sobre la AChE de insectos).

Como se mencionó anteriormente, el carácter electrófilo de las quinonas y su unión covalente con nucleófilos biológicos, así como la transferencia electrónica que poseen, y sus diferentes estados de oxidación-reducción que pueden sufrir mediante diversas enzimas que equilibran su estado quinona-hidroquinona, son características que suelen atribuirse como responsables de muchas de sus propiedades biológicas. Particularmente el equilibrio oxidación-reducción que poseen, se relaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martínez Cifuentes, 2013). Esto tiene implicaciones con el estrés oxidativo, y las quinonas por lo tanto pueden actuar como antioxidantes (Da Silva y Ferreira, 2016). Existen diferentes ensayos que pueden emplearse para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto, como lo es la decoloración del radical catiónico ABTS (Re

*et al.*, 1999), actividad frente a radical DPPH (Salazar-Aranda *et al.*, 2015), y la decoloración oxidativa de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Burda y Oleszek, 2001).

Partiendo de esta información previa que ejemplifican propiedades biológicas de las naftoquinonas, es que en este trabajo se propone en el Capítulo 1 la síntesis de estos compuestos. Comenzando con la 1,4-naftoquinona, se plantean una serie de reacciones químicas que permitan la obtención de compuestos derivados.

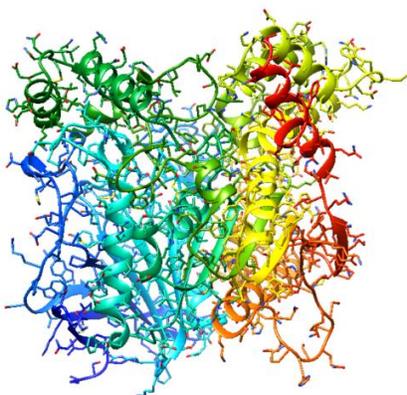
La Química Medicinal se encarga del estudio químico de los fármacos, de tal manera que se puedan relacionar las estructuras químicas de los mismos con sus propiedades biológicas y terapéuticas, lo cual pueda llevar al diseño y síntesis de fármacos nuevos (Delgado, Minguillón y Joglar, 2003). Tradicionalmente hay un conjunto de reacciones sintéticas con las que los químicos han generado nuevas moléculas terapéuticas, sin embargo, se estima que la síntesis de compuestos químicos bioactivos todavía tiene una amplia zona que explorarse (Boström *et al.*, 2018). En esta búsqueda de moléculas activas es que se propone en el presente trabajo se incluyan a los derivados de naftoquinonas sintetizados en lo que se conoce como cribado o *screening* de bioactividades. De esta manera se puede llevar a cabo una batería de ensayos biológicos sobre un grupo de moléculas para determinar el perfil terapéutico que pueden presentar. En el Capítulo 2 del presente trabajo se comienza con un cribado de los compuestos sintetizados y caracterizados previamente. A partir de las propiedades ya mencionadas de las quinonas, se comienza con una exploración de las propiedades antioxidantes de estos compuestos, así como estudios *in vitro* de inhibición enzimática, proponiendo a acetilcolinesterasa como el punto de partida para la búsqueda de estas inhibiciones.

Una de las características del campo de la Química Medicinal es su interdisciplinariedad, y cada vez resulta más importante la inclusión de técnicas computacionales. Este empleo de computadoras para el diseño racional de fármacos se encuentra cada vez más extendido, y recibe el nombre de Diseño de fármacos asistido por computadora o *CADD* (del inglés *Computer Aided Drug Design*).

Uno de los aspectos donde el uso de computadoras puede apoyar es en la consideración de moléculas (tanto fármacos como sus receptores biológicos) de manera

tridimensional, es decir, llevando a cabo un modelado molecular. Bajo estos modelos se pueden realizar el análisis de interacciones ligando-receptor o incluso el cribado virtual a través de la superposición ligando-receptor. Este análisis de interacciones, conocido como acoplamiento molecular automatizado o *docking*, permite examinar los diferentes estados conformacionales del ligando y se calcula su energía de interacción con el receptor en términos estéricos y electrostáticos (Meng *et al.*, 2011).

Ya que se propone en esta tesis la evaluación de los compuestos sintetizados de manera *in vitro* como inhibidores de acetilcolinesterasa, enzima de la cual se conoce su estructura tridimensional, se plantea a su vez un análisis de acoplamiento molecular automatizado para explorar a mayor detalle las interacciones que se puedan estar dando entre estos compuestos con dicha enzima, detallándose esto en el Capítulo 3.



**Figura 0.1.** Modelo molecular de la acetilcolinesterasa de *Tetronarce californica* (PDB: 1EVE).

Más allá de esto, la inclusión de técnicas computacionales en el área de la química y de muchas otras ciencias ha ido cobrando mayor fuerza con el paso de los años. En las ciencias computacionales, la Inteligencia Artificial (IA) tiene como meta entender la inteligencia y construir sistemas inteligentes. Una de sus ramas, el aprendizaje automático o *machine learning*, busca permitir que las máquinas aprendan sin ser expresamente programadas, ya que se les enseña a convertir ejemplos de información proporcionada en conocimiento (Kubat, 2017). Esta área de la computación no se ha limitado a sí misma, ya que su utilidad ha sido aplicada en diversos campos del conocimiento; uno de estos y de relevancia en este trabajo es en la química, y en especial en la búsqueda y diseño de nuevos

fármacos. El Diseño de fármacos asistido por computadora como se había manejado tradicionalmente, ahora se puede reforzar por lo tanto por técnicas más modernas y complejas.

El estudio de la acetilcolinesterasa que se inició con un acoplamiento molecular automatizado, puede verse profundizado con herramientas computacionales más potentes para poder comprender mejor a este receptor biológico en términos de propiedades fisicoquímicas propias y en conjunto con moléculas orgánicas pequeñas que puedan actuar como ligandos con ella. Una de estas herramientas es la formación de modelos proteoquimiométricos, detallados en el Capítulo 4, con los cuales se explora precisamente las propiedades de diversas variantes de acetilcolinesterasa, así como información de diversas moléculas con diversos grados de inhibición de esta enzima. Esta exploración, puede darnos información útil y proponer nuevas direcciones en la búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa.

---

## Hipótesis

La síntesis de derivados de naftoquinona permitirá la obtención de moléculas bioactivas, que contribuirán en la búsqueda de compuestos líder en el desarrollo de nuevos inhibidores enzimáticos y antioxidantes.

## Objetivo general y particulares

### Objetivo general:

Obtener mediante técnicas sintéticas una serie de derivados de naftoquinona y evaluarles diferentes perfiles biológicos.

### Objetivos particulares:

- Sintetizar compuestos derivados de naftoquinona.
- Caracterizar estructuralmente todos los productos e intermedios de las rutas sintéticas propuestas.
- Determinar la capacidad de inhibición enzimática de los compuestos generados, específicamente la inhibición de acetilcolinesterasa.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los productos generados.
- Emplear herramientas quimioinformáticas para analizar la interacción ligando-receptor de las actividades biológicas evaluadas.

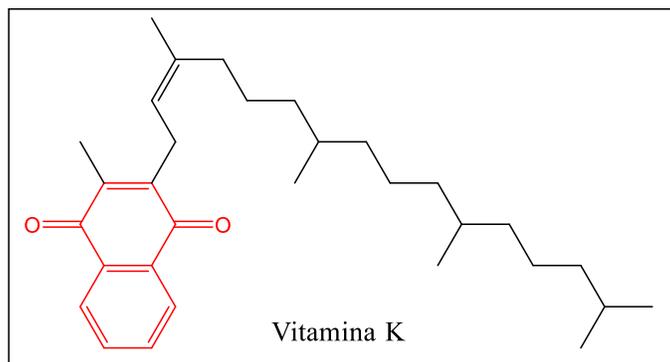
## Capítulo 1. Síntesis y caracterización de compuestos

### Generalidades

#### 1. Propiedades biológicas de las naftoquinonas

Las naftoquinonas se encuentran presentes en plantas, líquenes, hongos, bacterias e insectos (Da Silva y Ferreira, 2016). Si bien algunas quinonas funcionan como pigmentos, estos compuestos presentan diferentes propiedades biológicas, y muchos compuestos de origen natural que contienen fragmentos de tipo naftoquinónico han sido estudiados por esta amplia variedad de efectos biológicos.

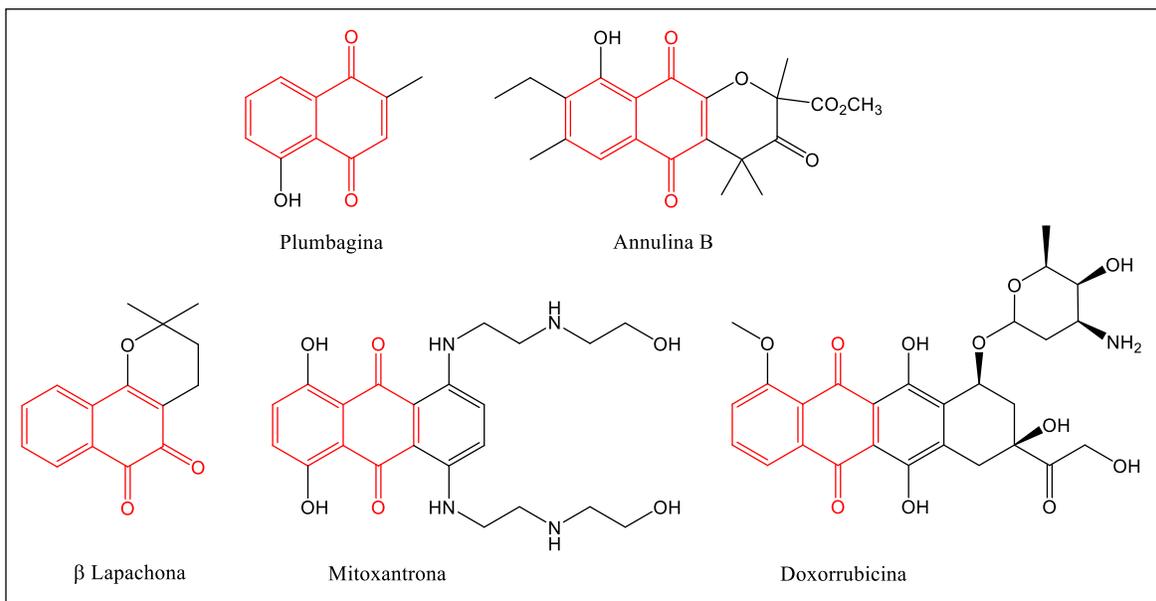
Un ejemplo de compuesto naftoquinónico relacionado con la vida cotidiana es la vitamina K. La vitamina K es una vitamina liposoluble que posee un núcleo de tipo quinona. Está involucrada en la cascada de la coagulación, ya que algunos factores de la cascada de la coagulación (II, VII, IX y X) dependen de ella para una modificación en su estructura: la enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilasa (GGCX) empleando como cofactores a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y a la vitamina K en su forma reducida hidroquinona (Stafford, 2005) introduce un grupo carboxilo en residuos de ácido glutámico de los factores ya mencionados. Sin esta modificación, estos factores no son capaces de poseer funcionalidad dentro de la cascada de coagulación.



**Figura 1.1.** Estructura química de la vitamina K, remarcando en rojo el núcleo naftoquinona.

Una actividad comúnmente reportada para compuestos con núcleo naftoquinona es la citotóxica (López L., Leyva y García de la Cruz, 2011). Esta propiedad se puede encontrar desde moléculas de origen natural con esta estructura, como es el caso de plumbagina, que posee este efecto antiproliferativo contra diferentes tipos de tumores,

mediante inhibición de la formación de microtúbulos (Acharya, Bhattacharyya y Chakrabarti, 2008), así como en moléculas sintéticas. Menadiona ha presentado potencial anticancerígeno, así como otros derivados sintéticos con el fragmento naftoquinona en sus estructuras (Kumar *et al.*, 2008).



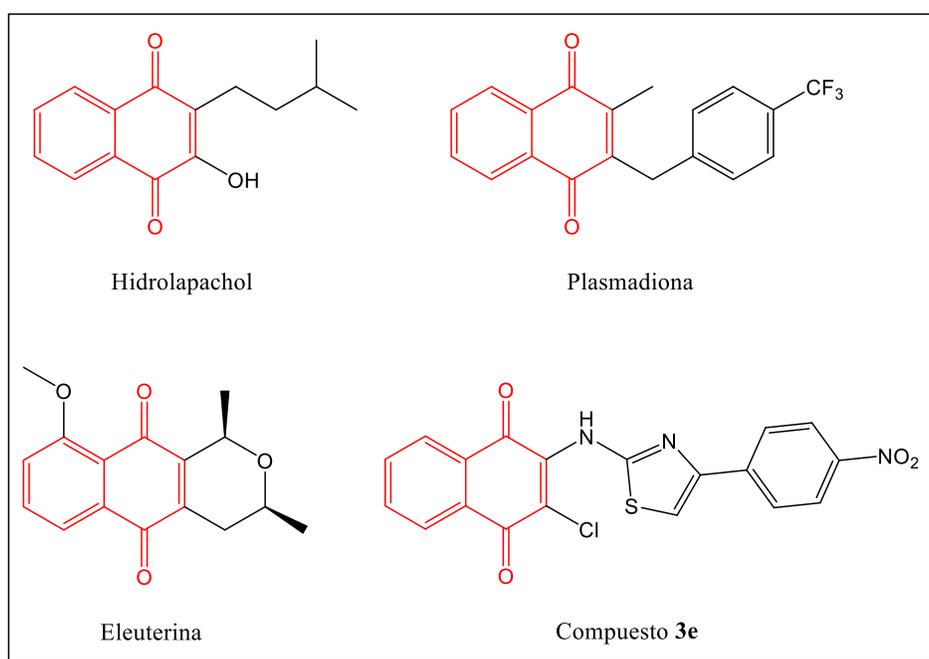
**Figura 1.2.** Ejemplos de estructuras naftoquinónicas con capacidades anticancerígenas.

En este caso, Qiu *et al.* (2018) mencionan que los mecanismos bajo los cuales compuestos naftoquinónicos suelen presentar su capacidad anticancerígena pueden agruparse en dos categorías generales: induciendo estrés oxidativo y generando ROS (especies reactivas de oxígeno), o mediante la interacción con dianas terapéuticas por medios no oxidativos, como pueden ser la inhibición de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) o de ADN topoisomerasa. Otros ejemplos de mecanismos por los cuales naftoquinonas sintéticas y naturales pueden ejercer propiedades anticancerígenas es mediante la inhibición de MALT1 (proteína 1 de traslocación del linfoma de tejido linfoide asociada a la mucosa), represión de la actividad de telomerasa, regulación del factor supresor de tumores p53, entre otros (Pereyra, *et al.*, 2019).

Otra propiedad de las naftoquinonas ampliamente estudiada es su capacidad antiparasitaria, donde las propiedades antimaláricas se destacan. La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium*, siendo las especies *Plasmodium falciparum*, y

*Plasmodium vivax* las especies más fatales y prevalente en regiones como África, América Latina y la India (Patel, Beteck y Legoabe, 2021), y desde que se encontró que el compuesto natural hidrolapachol resultó activo contra *Plasmodium lophurae*, las naftoquinonas han tenido un papel importante en la búsqueda de compuestos antimaláricos.

Relacionado al anteriormente mencionado compuesto, otro ejemplo de producto quinónicos de origen natural con propiedades antimaláricas se encuentra el largamente estudiado lapachol, e incluso de manera reciente se siguen encontrando compuestos naturales activos como eleuterina, isoeleuterina, aislados de la planta *Eleutherine plicata* (Vale *et al.*, 2020).



**Figura 1.3.** Ejemplos de compuestos antimaláricos con fragmentos de naftoquinona.

En cuanto a ejemplos de productos quinónicos sintéticos antimaláricos, Olawode *et al.* (2019) generaron tiazol amino 1,4-naftoquinonas con diversas sustituciones y encontraron que, dentro de sus productos sintetizados, los que presentaron *para*-sustituciones electronegativas en el anillo aromático presentaron mejor actividad antimalárica comparados con el compuesto del que se derivaron (siendo el más activo su compuesto **3e**, Figura 1.3). No solamente eso, todos los productos sintetizados en ese estudio fueron evaluados además en su citotoxicidad y capacidad antimicrobiana contra

*Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*, donde en cada evaluación *in vitro* encontraron compuestos activos, demostrando la versatilidad de este tipo de compuestos.

### 1.1 Propiedades de óxido reducción

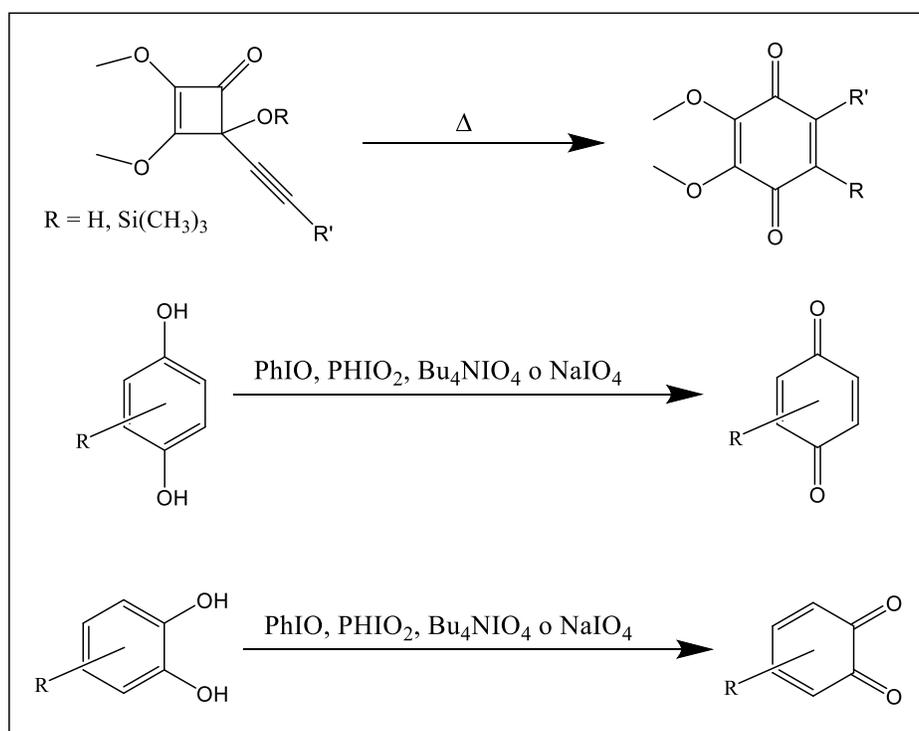
Las quinonas por su estructura presentan la capacidad de oxidarse y reducirse a partir de procesos de reducción y oxidación mediadas por un electrón, donde la forma quinona (oxidada) e hidroquinona (reducida) son fácilmente interconvertibles entre sí (Patel, Beteck y Legoabe, 2021). Esta capacidad de ciclarse en forma redox les ayuda a ser mediadoras en muchos procesos biológicos, como la vitamina K que constantemente es reducida y oxidada en su papel dentro de la coagulación, así como les otorga varias de sus propiedades biológicas. Como se mencionó previamente (Qiu *et al.*, 2017), la producción de ROS por parte de algunas quinonas es uno de los mecanismos por el cual pueden ejercer sus propiedades citotóxicas. Por ejemplo, se ha encontrado que esta generación de ROS por parte de naftoquinonas puede llevar a la apoptosis celular mediante la activación de la vía p38/MAPK (Liu *et al.*, 2018).

La generación de ROS por parte de naftoquinonas también se ha relacionado con sus propiedades contra diferentes patógenos; por ejemplo, plumbagina contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mone *et al.*, 2021), o diferentes naftoquinonas contra el parásito *Trypanosoma evansi* (Rani *et al.*, 2021).

Si bien algunas quinonas generan ROS y por lo tanto un ambiente oxidante durante sus funciones biológicas, también encontramos ejemplos donde muestran capacidad antioxidante que resulta de utilidad terapéutica. Un ejemplo se encuentra con el compuesto equinocromo A, que pertenece a una familia de productos quinónicos aislados de erizos de mar. La sal de sodio de equinocromo A se encuentra registrada en la Federación Rusa como agente antioxidante, y por lo mismo está recomendado su uso como cardioprotector y medicina antiarrítmica y oftálmica, y se sigue investigando más usos terapéuticos para este producto (Hou *et al.*, 2018). Por otra parte, también se ha investigado el uso de geles con naftoquinonas incorporadas para servir como parches antioxidantes de aplicación tópica, para proteger la piel de daño por estrés oxidativo (Khelifi *et al.*, 2020).

## 2. Síntesis de naftoquinonas

Debido al reconocimiento que diferentes quinonas pueden encontrarse de manera natural, presentando muchas veces propiedades biológicas, su síntesis se ha llevado a cabo por varias décadas. Si bien se suele partir de núcleos aromáticos formados previamente, se puede partir a su vez de cetenas insaturadas (Karlsson et al., 1985; Liebeskind y Riesinger, 1993), como puede observarse en el Esquema 1.1. En este ejemplo, puede obtenerse una serie de benzoquinonas sustituidas a partir de la termólisis de 4-alquil-4-hidroxi-ciclobutenonas.

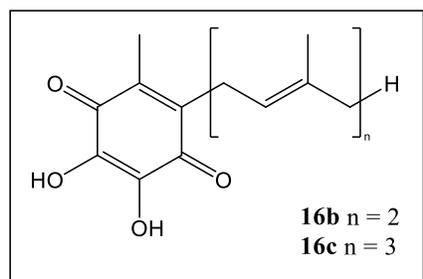


**Esquema 1.1.** Síntesis de núcleos de tipo quinona. (Adaptado de Karlsson *et al.*, 1985; Liebeskind y Riesinger, 1993; Takata, Tajima y Ando, 1983).

Sin embargo, una manera más directa puede lograrse a partir de la oxidación de compuestos dihidroxi aromáticos, donde los anillos del núcleo ya se encuentran formados. Dependiendo del material de partida empleado, la síntesis de las quinonas puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes agentes oxidantes, por ejemplo PhIO, PhIO<sub>2</sub>, Bu<sub>4</sub>NIO<sub>4</sub> o NaIO<sub>4</sub> como se puede observar en el Esquema 1.1 (Takata, Tajima y Ando, 1983).

La síntesis de quinonas a partir de la oxidación de compuestos aromáticos dihidroxilados se sigue dando de forma más reciente, si bien se han propuesto algunos cambios durante el proceso. Abu-Elfotouh *et al.* (2013) mencionan que el oxígeno molecular o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) pueden ser mejores opciones de agentes oxidantes en estas síntesis desde un punto de vista económico y ambiental, como parte de sistemas catalíticos con sales de cobre, complejos de cobalto, entre otros. Este equipo reporta un catalizador de Ru(II) que puede ser incorporado en un polímero macroporoso, el cual promueve la oxidación con  $H_2O_2$  y permite la síntesis de benzo y nafto quinonas con excelentes rendimientos (1,4-naftoquinona bajo este esquema fue sintetizada con 99% de rendimiento).

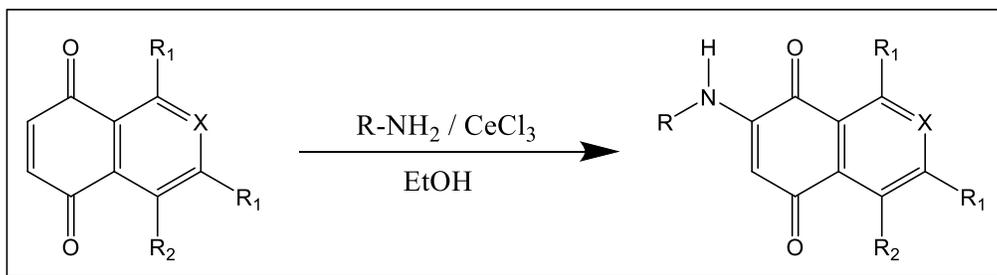
En otro ejemplo reciente, la síntesis de quinonas se produjo a partir de la alquilación de un compuesto polialcoxilado, si bien no era el producto esperado por los autores. En el trabajo de Kamauchi *et al.* (2020), se sintetizaron quinonas similares a productos naturales, las cuales incluso mostraron una actividad de inhibición de MAO-B (monoamino oxidasa B) con valores de  $IC_{50}$  de 1.4 y 1.3  $\mu M$  en los compuestos **16b** y **16c**, respectivamente (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Quinonas sintetizadas por Kamauchi *et al.* (2020) inhibidoras de MAO-B.

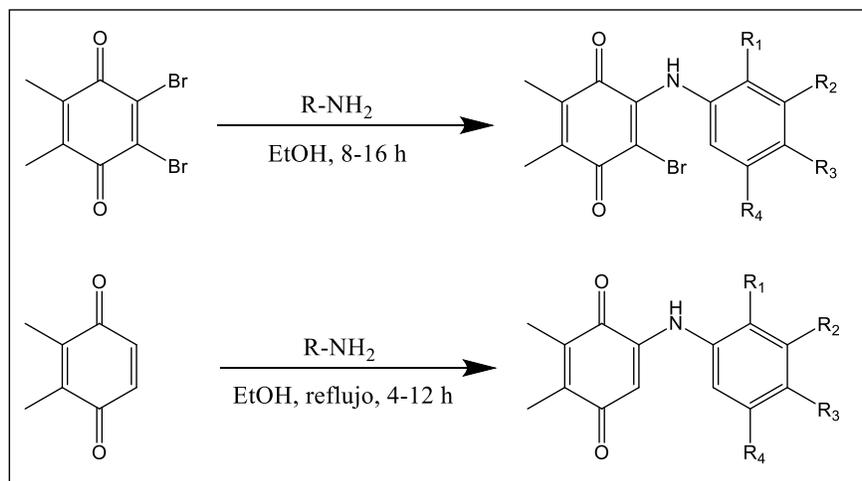
En el presente trabajo, se han sintetizado derivados quinónicos a partir de la 1,4-naftoquinona, siendo estos compuestos de tipo aminoquinona. Este tipo de compuestos pueden sintetizarse por metodologías que pueden generalmente clasificarse de dos maneras: una adición tipo 1,4 directamente de la amina sobre el anillo de la quinona, o el desplazamiento nucleofílico de un sustituyente, que comúnmente son sustituyente de tipo halógeno (Couladouros, Plyta y Papageorgiou, 1996).

Algunos ejemplos recientes de este tipo de síntesis es la adición 1,4 (tipo adición de Michael) de amino azúcares sobre quinonas (Esquema 1.2) por parte de Dias *et al.* (2018). Esta síntesis fue catalizada con cloruro de cerio y llevada a cabo con ultrasonido. Las naftoquinonas con fragmentos amino azúcar fueron evaluadas *in vitro*, donde algunos de estos compuestos mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas.



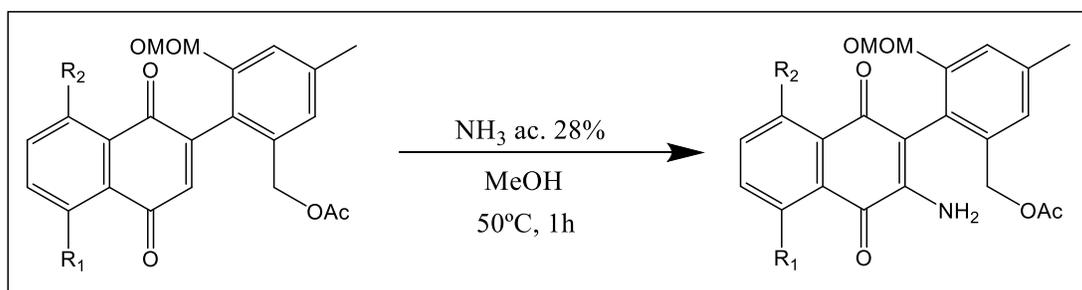
**Esquema 1.2.** Síntesis de quinonas con fragmentos de amino azúcares (Adaptado de Dias *et al.*, 2018).

Otra serie de aminoquinonas que también fue sintetizada y evaluada como agente antibacterial es una serie de análogos bromados de plastoquinonas, que son una serie de moléculas que funcionan como acarreadoras de electrones en la fotosíntesis, así como en varios procesos metabólicos en las plantas (Havaux, 2020). Estos análogos fueron sintetizados por las dos vías, por un desplazamiento de un átomo de bromo en el esqueleto quinónico por parte de una amina aromática correspondiente en etanol sin aplicación de calor (Esquema 1.3), así como por incorporación directa de la amina sobre la quinona no sustituida, en reflujo con etanol (Bayrak *et al.*, 2020).



**Esquema 1.3.** Síntesis de análogos bromados de plastoquinona (Adaptado de Bayrak *et al.*, 2020).

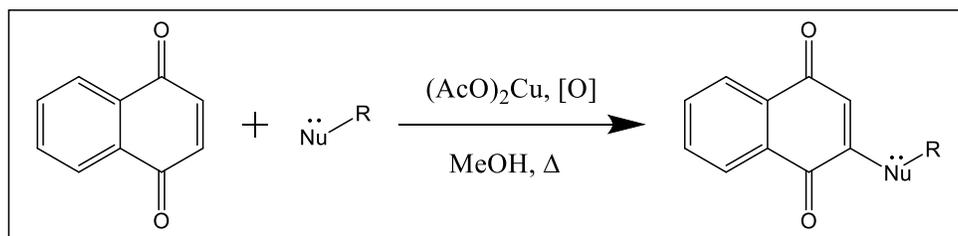
La síntesis de aminoquinonas no requiere necesariamente que se hagan reaccionar aminas alifáticas o aromáticas con las respectivas quinonas, también se ha logrado emplear directamente amonio como fuente de nitrógeno (Akagi, Harasawa y Komatsu, 2021). Si bien los rendimientos de este grupo para la obtención de las aminoquinonas por este medio no fueron muy elevados (42% para  $R_1 = \text{OH}$  y  $R_2 = \text{H}$ ; 22% para  $R_1 = \text{H}$  y  $R_2 = \text{OH}$ ) solamente fue necesaria una hora de reacción con una solución de amonio acuosa para lograr la síntesis (Esquema 1.4).



**Esquema 1.4.** Síntesis de aminoquinonas con amonio acuoso (Adaptado de Akagi, Harasawa y Komatsu, 2021).

## Metodología

Se propuso una metodología sintética consistente en la adición 1,4 de nucleófilos sobre compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados. El esquema general propuesto se muestra en el siguiente esquema:

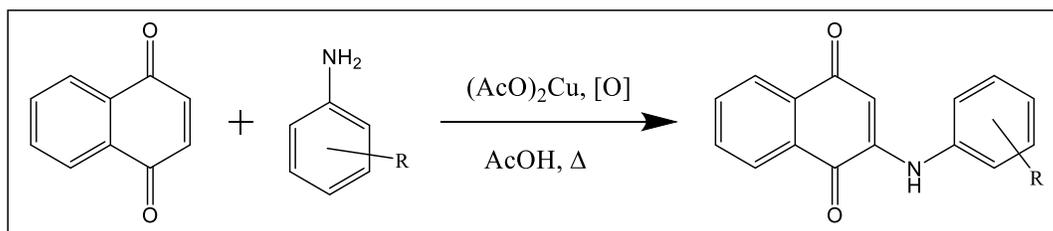


**Esquema 1.5.** Síntesis general de derivados de 1,4-naftoquinona.

De manera general se seleccionaron aminas como los nucleófilos de esta reacción, para la obtención de 1,4-naftoquinonas con fragmentos *N*-sustituidos.

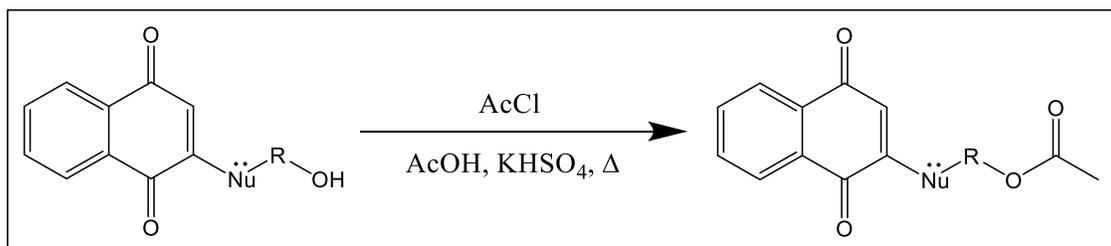
Tras revisión de literatura (Marcos Llorente, 1995; Martínez Cifuentes, 2013) y trabajo previo en nuestro grupo de investigación, las condiciones de reacción ideales se determinaron con una estequiometría de 1 eq de 1,4-naftoquinona y de acetato de cobre respectivamente, por 4 eq de la amina seleccionada.

De manera general dichas condiciones permitieron la obtención de los productos propuestos, si bien con el uso de aminas con bajo poder nucleofílico (anilinas) las reacciones procedían con un rendimiento mínimo. Para estos casos fue necesaria una modificación de las condiciones de reacción, para lo cual se basó en lo reportado por Lisboa *et al* (2011). Dicho cambio fue mediante el empleo de ácido acético como solvente y catalizador de la reacción, según se observa en el siguiente esquema:



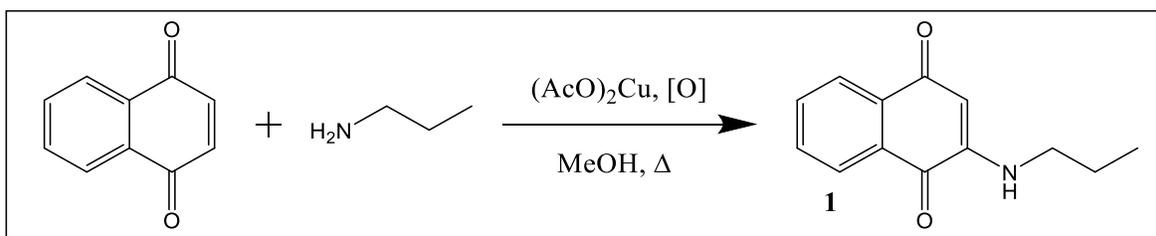
**Esquema 1.6.** Síntesis general empleando anilinas como agentes nucleófilos.

Por otra parte, al emplear aminoalcoholes como los nucleófilos incorporados sobre el esqueleto de 1,4-naftoquinona, se generaron derivados de los cuales se aprovechó la presencia de grupos hidroxilo terminales sobre cadenas alquílicas para una posterior derivatización. Dichos hidroxilos se sometieron a una reacción de acetilación, permitiendo la obtención de una segunda generación de productos.



**Esquema 1.7.** Síntesis general de acetilación de derivados de tipo amino alcohol.

## Síntesis de compuesto (1): NQ-Prop



Esquema 1.8. Síntesis del compuesto (1) NQ-Prop.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil *n*-hex/AcOEt 5%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recrystalización 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 (**1**)

**Fórmula Molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N

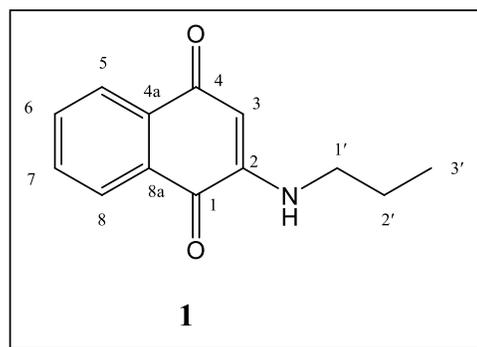
**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color rojo (cristales con forma de láminas).

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3252, 1682, 1596

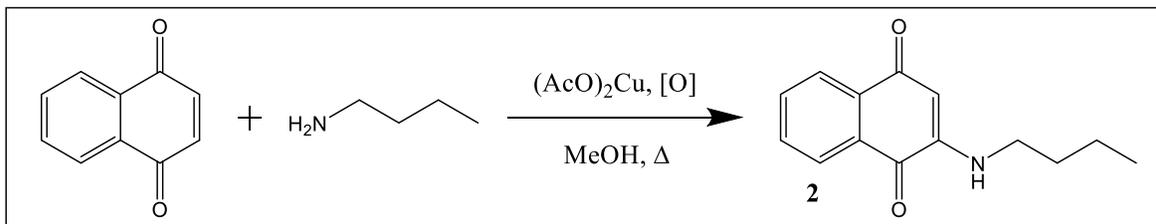
**EM *m/e* (%):** 215 [M<sup>+</sup>] (6), 186 (16), 158 (2), 146 (3), 131 (4), 104 (7), 101 (9), 76 (26), 29 (83), 27 (100)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.10 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-8), 8.03 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-5), 7.72 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.60 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 5.92 (sa, 1H, NH), 5.73 (s, 1H, H-3), 3.15 (c, 2H, *J* = 6.7 Hz, 1'), 1.73 (m, 2H, H-2'), 1.02 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, H-3')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.0 (C-1), 182.1 (C-4), 148.1 (C-2), 134.8 (C-6), 133.8 (C-4a), 132.0 (C-7), 130.7 (C-8a), 126.3 (C-8), 126.3 (C-5), 100.9 (C-3), 44.4 (C-1'), 21.7 (C-2'), 11.6 (C-3')



## Síntesis de compuesto (2): NQ-Buta



Esquema 1.9. Síntesis del compuesto (2) NQ-Buta.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil *n*-hex/AcOEt 10%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recristalización 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 (**2**)

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N

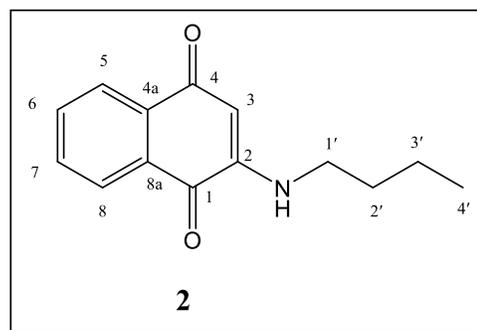
**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color naranja (cristales con forma de agujas).

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3348, 1673, 1592

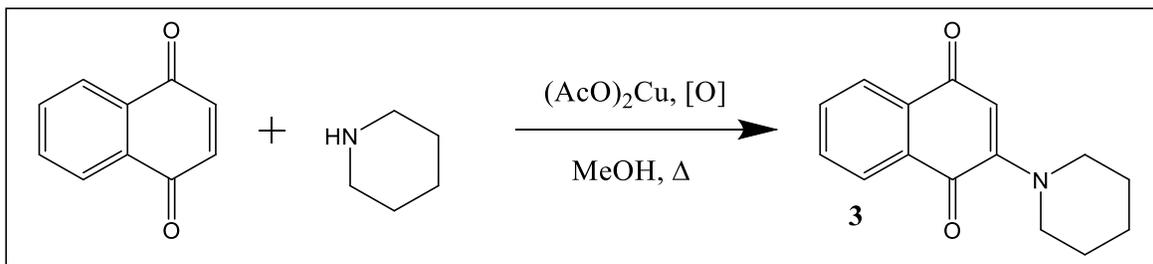
**EM m/e (%):** 229 [M<sup>+</sup>] (3), 200 (1), 186 (12), 158 (4), 146 (7), 76 (12), 41 (100), 29 (86), 27 (99)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.10 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-8), 8.04 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-5), 7.72 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.60 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 5.89 (sa, 1H, NH), 5.73 (s, 1H, H-3), 3.18 (c, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-1'), 1.68 (m, 2H, H-2'), 1.44 (m, 2H, H-3'), 0.97 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, H-4')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.0 (C-1), 182.1 (C-4), 148.1 (C-2), 134.8 (C-6), 133.9 (C-4a), 132.0 (C-7), 130.7 (C-8a), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 100.9 (C-3), 42.4 (C-1'), 30.4 (C-2'), 20.3 (C-3'), 13.8 (C-4')



## Síntesis de compuesto (3): NQ-Pipe



Esquema 1.10. Síntesis del compuesto (3) NQ-Pipe.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, 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 obtuvieron 48.3 mg de 2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona (3), nombrado NQ-Pipe con %R = 20%.

## 2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona (3)

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color guinda.

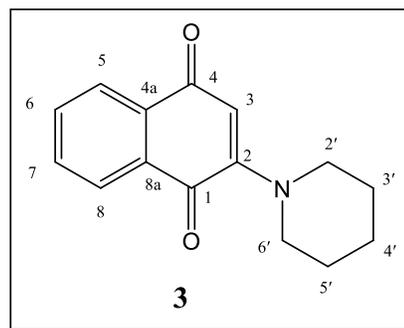
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 1676, 1589

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

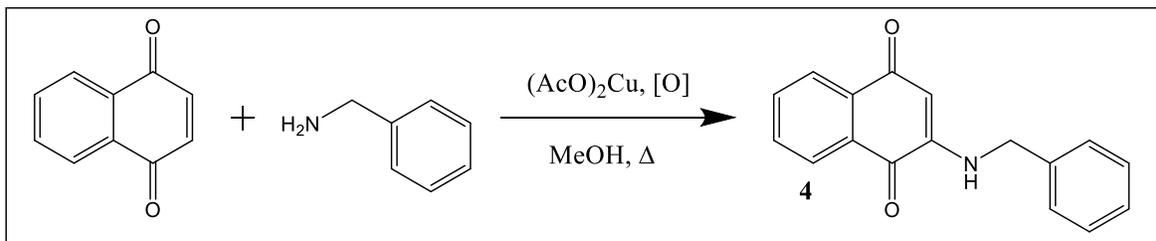
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.03 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.1 Hz, H-8), 7.97 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-5), 7.67 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.4 Hz, H-6), 7.61 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz,

*J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.5 Hz, H-7), 6.02 (s, 1H, H-3), 3.49 (m, 4H, H-2', H-6'), 1.73 (m, 6H, H-3', H-4', H-5')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.6 (C-1), 183.5 (C-4), 154.2 (C-2), 133.8 (C-6), 133.1 (C-4a), 132.7 (C-8a), 132.3 (C-7), 126.7 (C-8), 125.5 (C-5), 110.5 (C-3), 50.5 (C-2', C-6'), 25.9 (C-3', C-5'), 24.4 (C-4')



## Síntesis de compuesto (4): NQ-Bnca



Esquema 1.11. Síntesis del compuesto (4) NQ-Bnca.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil *n*-hex/AcOEt 15%. A la fracción orgánica recuperada se le eliminó el disolvente y se procedió a hacer una recristalización 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 (4)

**Fórmula Molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color naranja-rojo

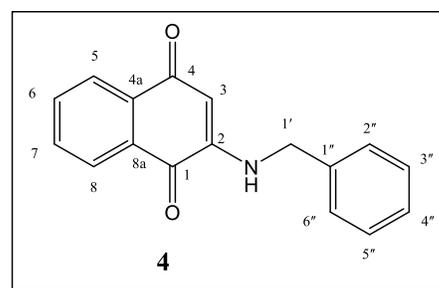
(cristales con forma de agujas y láminas)

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3329, 1680, 1594

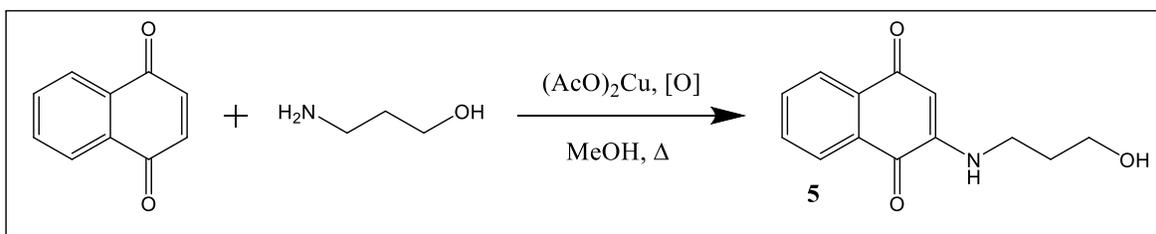
**EM m/e (%):** 263 [M<sup>+</sup>] (3), 104 (13), 91 (100), 77 (33), 65 (61), 51 (31), 39 (27), 28 (6)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-8), 7.97 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-5), 7.64 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.53 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 7.27 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 6.14 (sa, 1H, NH), 5.71 (s, 1H, H-3), 4.30 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, H-1')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.2 (C-1), 182.0 (C-4), 147.9 (C-2), 136.1 (C-1''), 134.9 (C-6), 133.7 (C-4a), 132.2 (C-7), 130.7 (C-8a), 129.1 (C-3'', C-5''), 128.2 (C-4''), 127.8 (C-2'', C-6''), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 101.9 (C-3), 46.9 (C-1')



## Síntesis de compuesto (5): NQ-3apr



Esquema 1.12. Síntesis del compuesto (5) NQ-3apr.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, 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-3apr, con %R = 84%.

## 2-((3-hidroxipropil)amino)naftalen-1,4-diona (5)

**Fórmula Molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N

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

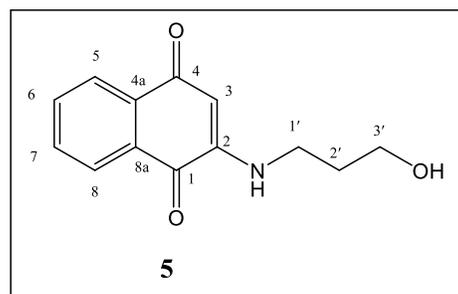
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3464, 3331, 1670, 1592

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

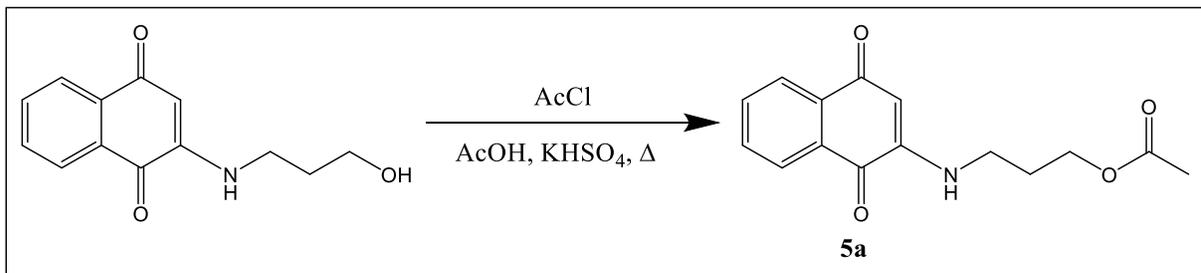
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.96 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.93

(d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.81 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, H-6), 7.70 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, H-7), 7.51 (ta, 1H, *J* = 5.3 Hz, NH), 5.67 (s, 1H, H-3), 4.63 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, OH), 3.50 (c, 2H, *J* = 5.7 Hz, H-3'), 3.24 (c, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-1'), 1.74 (quin, 2H, *J* = 6.3 Hz, H-2')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 181.5 (C-1), 181.2 (C-4), 148.5 (C-2), 134.8 (C-6), 133.2 (C-4a), 132.0 (C-7), 130.3 (C-8a), 125.8 (C-8), 125.3 (C-5), 99.2 (C-3), 58.7 (C-3'), 39.6 (C-1'), 30.4 (C-2')



## Síntesis de compuesto (5a): NQ-3apr-Ac



Esquema 1.13. Síntesis del compuesto (5a) NQ-3apr-Ac.

Se disolvió 231 mg (1 mmol) de NQ-3apr en 10 mL de ácido acético, 0.11 mL (1.5 mmol) de cloruro de acetilo y 136.16 mg (1mmol) de KHSO<sub>4</sub> bajo agitación magnética y se sometió a reflujo. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 256.6 mg de acetato de 3-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) propilo (5a), nombrado NQ-3apr-Ac, con %R = 94%.

Acetato de 3-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) propilo (5a)

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color anaranjado.

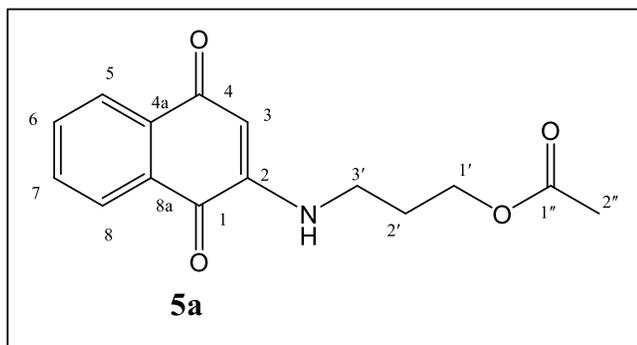
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3308, 1710, 1657, 1610

**EM *m/e* (%):** 273 [M<sup>+</sup>] (1), 213 (4), 186 (7), 158 (3), 101 (15), 89 (21), 76 (30), 50 (13), 43 (100)

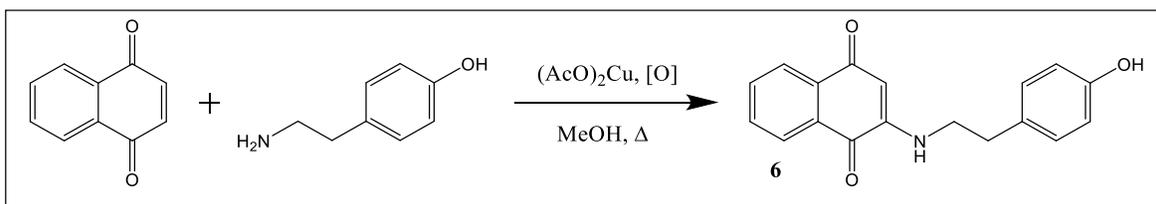
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.09 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-8), 8.03 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6

Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-5), 7.72 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.4 Hz, H-6), 7.61 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 6.10 (sa, 1H, NH), 5.74 (s, 1H, H-3), 4.20 (t, 2H, *J* = 5.9 Hz, H-1'), 3.31 (c, 2H, *J* = 6.4 Hz, H-3'), 2.11 (s, 3H, H-2''), 2.03 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-2')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.1 (C-1), 181.9 (C-4), 171.0 (C-1''), 148.0 (C-2), 134.9 (C-6), 133.7 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.7 (C-8a), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 101.1 (C-3), 62.2 (C-1'), 40.1 (C-3'), 27.4 (C-2'), 21.0 (C-2'')



## Síntesis de compuesto (6): NQ-Tira



Esquema 1.14. Síntesis del compuesto (6) NQ-Tira.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 hidrocloreto (4 mmol) y 1.5 mL de NaOH 10%. Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante CCF. Tras observar la completa transformación del material de partida se eliminó el disolvente y el crudo se purificó mediante una columna con gel de sílice, usando como fase móvil DCM/AcOEt 30%, tras lo cual se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 221.8 mg de 2-((4-hidroxifenetil)amino)naftalen-1,4-diona (6), nombrado NQ-Tira, con %R = 76%.

## 2-((4-hidroxifenetil)amino)naftalen-1,4-diona (6)

**Fórmula Molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N

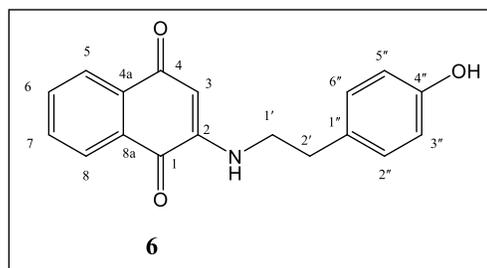
**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color naranja (cristales con forma de agujas)

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3350, 3324, 1668, 1591

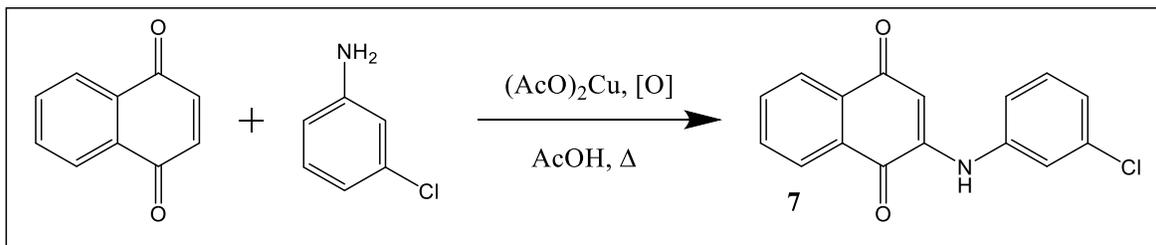
**EM m/e (%):** 293 [M<sup>+</sup>] (1), 186 (14), 107 (100), 104 (8), 77 (91), 53 (23), 39 (19)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 9.17 (s, 1H, OH), 7.96 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.93 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.81 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.3 Hz, H-6), 7.71 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, H-7), 7.41 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, NH), 7.06 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2'', H-6''), 6.68 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-3'', H-5''), 5.70 (s, 1H, H-3), 3.35 (c, 2H, *J* = 6.7 Hz, H-1'), 2.78 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H-2')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 181.5 (C-1), 181.2 (C-4), 155.8 (C-4''), 148.2 (C-2), 134.8 (C-6), 133.1 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.3 (C-8a), 129.6 (C-2'', C-6''), 128.8 (C-1''), 125.8 (C-8), 125.3 (C-5), 115.2 (C-3'', C-5''), 99.5 (C-3), 43.6 (C-1'), 32.5 (C-2')



## Síntesis de compuesto (7): NQ-ClAn



Esquema 1.15. Síntesis del compuesto (7) NQ-ClAn.

Se disolvió 19.97 mg (0.1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF. 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 gel de sílice, 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 (7)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClO<sub>2</sub>N

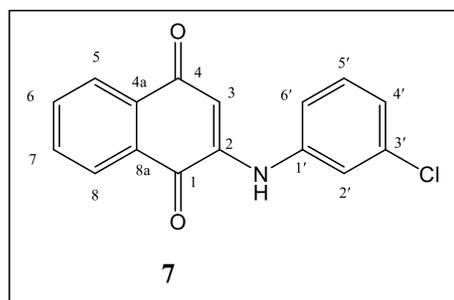
**Aspecto Físico:** Sólido color borgoña

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3184, 1679, 1607

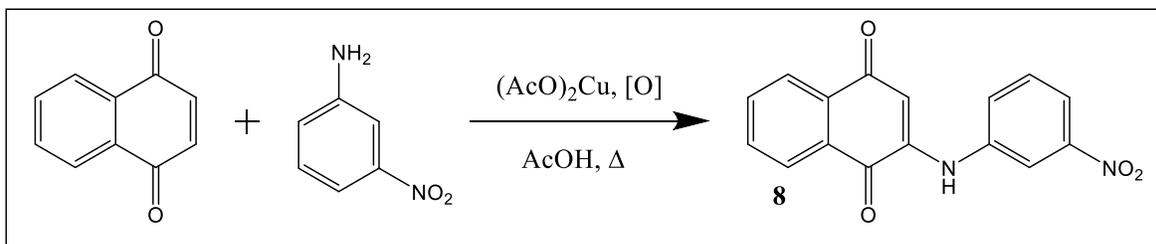
**EM *m/e* (%):** 283 [M<sup>+</sup>] (5), 285 [M<sup>+</sup> + 2] (2), 111 (26), 104 (38), 89 (47), 76 (100), 63 (35), 50 (62)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 9.26 (s, 1H, NH), 8.06 (d, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, H-8), 7.96 (d, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, H-5), 7.86 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, H-6), 7.79 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.3 Hz, H-7), 7.45 (m, 2H, H-2', H-5'), 7.39 (d, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.9 Hz, H-4'), 7.26 (d, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, H-6'), 6.16 (s, 1H, H-3)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 182.8 (C-1), 181.3 (C-4), 145.7 (C-2), 139.9 (C-1'), 134.9 (C-3'), 133.5 (C-2'), 132.8 (C-6), 132.4 (C-4a), 130.9 (C-7), 130.4 (C-8a), 126.1 (C-4'), 125.3 (C-8), 124.8 (C-5), 123.1 (C-5'), 121.8 (C-6'), 103.1 (C-3)



## Síntesis de compuesto (8): NQ-NOAn



Esquema 1.16. Síntesis del compuesto (8) NQ-NOAn.

Se disolvió 19.97 mg (0.1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 CCF para revisar la pureza del producto. Se obtuvieron 184.5 mg de 2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona (8), nombrado NQ-NOAn, con %R = 63%.

## 2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona (8)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

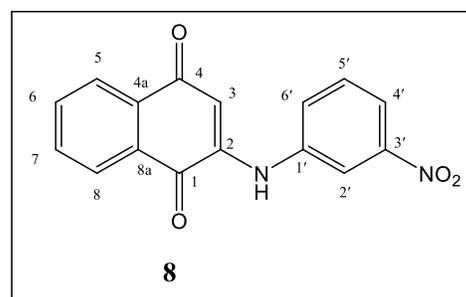
**Aspecto Físico:** Sólido color naranja

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3181, 1677, 1607

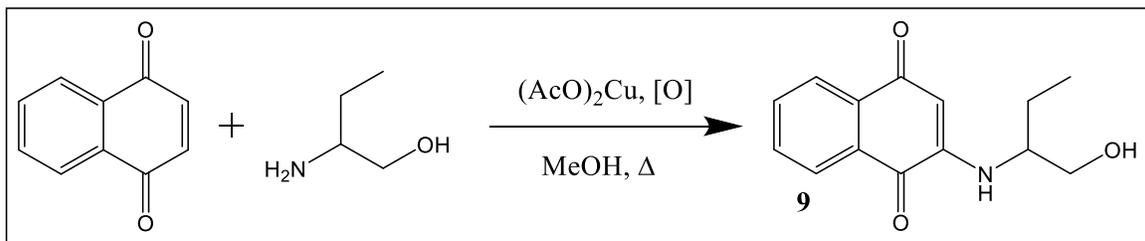
**EM m/e (%):** 294 [M<sup>+</sup>] (6), 248 (1), 104 (15), 76 (100), 63 (43), 50 (56), 30 (36)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 10.01 (s, 1H, NH), 8.42 (t, 1H, *J*<sub>1</sub> = 2.7 Hz, H-2'), 8.28 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.4 Hz, H-8), 8.18 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.4 Hz, H-5), 8.04 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 10.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz, H-4'), 7.82 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 10 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.8 Hz, H-6'), 7.71 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.3 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.5 Hz, H-6), 7.62 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.5 Hz, H-7), 7.52 (t, 1H, H-5'), 6.62 (s, 1H, H-3)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.7 (C-1), 182.0 (C-4), 146.2 (C-2), 140.5 (C-1'), 134.9 (C-6), 133.5 (C-4a), 132.8 (C-7), 131.3 (C-8a), 130.8 (C-4'), 129.4 (C-2'), 126.6 (C-8), 126.1 (C-5), 119.8 (C-5'), 118.7 (C-6'), 104.6 (C-3)



## Síntesis de compuesto (9): NQ-2abu



Esquema 1.17. Síntesis del compuesto (9) NQ-2abu.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 0.27 mL de (2*S*)-2-amino butanol (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 228 mg de 2-((1-hidroxiбутан-2-il)amino)naftalen-1,4-diona (9), nombrado NQ-2abu, con %R = 93%.

## 2-((1-hidroxiбутан-2-il)amino)naftalen-1,4-diona (9)

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido color rojo anaranjado.

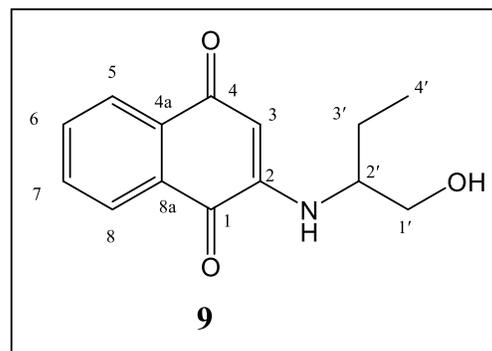
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3388, 3246, 1672, 1601

**EM *m/e* (%):** 245 [M<sup>+</sup>] (4), 186 (7), 158 (4), 115 (18), 102 (45), 89 (44), 76 (100), 50 (52), 41 (99), 31 (71)

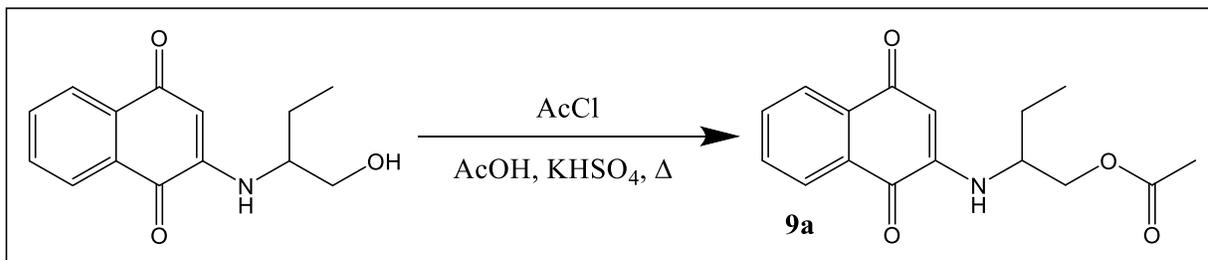
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.97 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-8), 7.91 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-5), 7.62 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-6), 7.50 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-7), 5.95 (d, 1H, NH), 5.72 (s, 1H, H-3), 3.70 (m, 2H,

H-1'), 3.36 (m, 1H, H-2'), 2.33 (sa, 1H, OH), 1.65 (m, 2H, H-3'), 0.92 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, H-4')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.3 (C-1), 181.9 (C-4), 148.0 (C-2), 134.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.6 (C-8a), 126.4 (C-8), 126.2 (C-5), 101.1 (C-3), 63.2 (C-1'), 55.8 (C-2'), 24.0 (C-3'), 10.6 (C-4')



## Síntesis de compuesto (9a): NQ-2abu-Ac



Esquema 1.18. Síntesis del compuesto (9a) NQ-2abu-Ac.

Se disolvió 245 mg (1 mmol) de NQ-2abu en 10 mL de ácido acético, 0.11 mL (1.5 mmol) de cloruro de acetilo y 136.16 mg (1mmol) de KHSO<sub>4</sub> bajo agitación magnética y se sometió a reflujo. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 273 mg de acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) butilo (9a), nombrado NQ-2abu-Ac, con %R = 95%.

Acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) butilo (9a)

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N

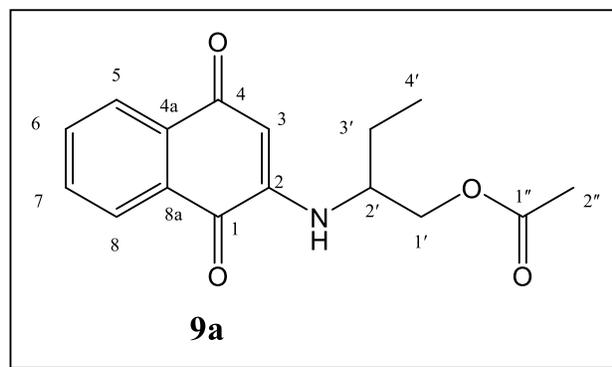
**Aspecto Físico:** Sólido color anaranjado.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3332, 1713, 1666, 1610

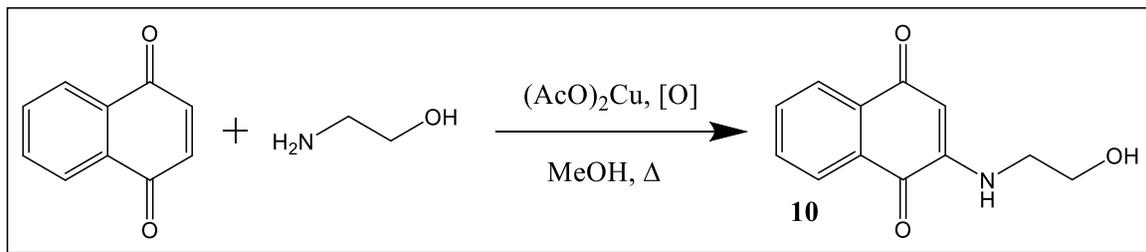
**EM *m/e* (%):** 287 [M<sup>+</sup>] (1), 214 (12), 158 (2), 129 (5), 115 (5), 102 (14), 89 (11), 76 (22), 50 (9), 43 (100), 28 (11)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.1 Hz, H-8), 7.98 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-5), 7.66 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-6), 7.55 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-7), 5.83 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, NH), 5.73 (s, 1H, H-3), 4.12 (m, 2H, H-1'), 3.50 (m, 1H, H-2'), 2.00 (s, 3H, H-2''), 1.63 (m, 2H, H-3'), 0.93 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, H-4')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.2 (C-1), 181.9 (C-4), 170.9 (C-1''), 147.6 (C-2), 134.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 132.2 (C-7), 130.6 (C-8a), 126.5 (C-8), 126.3 (C-5), 101.5 (C-3), 64.7 (C-1'), 53.1 (C-2'), 24.4 (C-3'), 20.9 (C-2''), 10.4 (C-4')



## Síntesis de compuesto (10): NQ-2aet



Esquema 1.19. Síntesis del compuesto (10) NQ-2aet.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 0.24 mL de 2-amino etanol (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 209.5 mg de 2-((2-hidroxietil)amino)naftalen-1,4-diona (10), nombrado NQ-2aet, con %R = 96%.

## 2-((2-hidroxietil)amino)naftalen-1,4-diona (10)

**Fórmula Molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color rojo

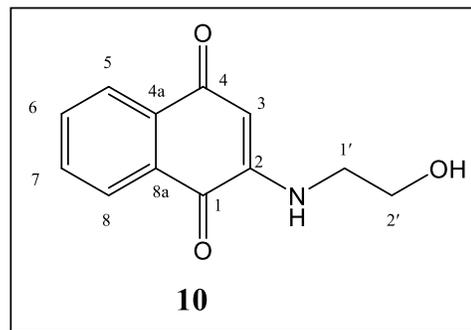
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3305, 1657, 1577

**EM *m/e* (%):** 217 [M<sup>+</sup>] (8), 199(7), 186 (33), 158 (10), 129 (23), 115 (16), 101 (52), 89 (46), 76 (100), 50 (84), 39 (23), 31 (71)

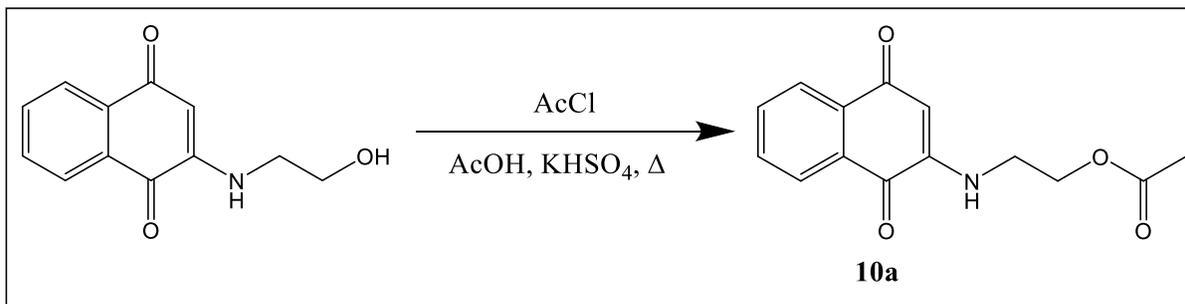
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.99 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-8), 7.95 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-5), 7.83 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.1 Hz, H-6), 7.72 (ddd, 1H,

*J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.0 Hz, H-7), 7.28 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH), 5.74 (s, 1H, H-3), 4.88 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz, OH), 3.62 (c, 2H, *J* = 5.6 Hz, H-2'), 3.26 (c, 2H, *J* = 5.8 Hz, H-1')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 181.5 (C-1), 181.3 (C-4), 148.7 (C-2), 134.8 (C-6), 133.1 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.3 (C-8a), 125.8 (C-8), 125.3 (C-5), 99.6 (C-3), 58.4 (C-2'), 45.6 (C-1')



## Síntesis de compuesto (10a): NQ-2aet-Ac



Esquema 1.20. Síntesis del compuesto (10a) NQ-2aet-Ac.

Se disolvió 217 mg (1 mmol) de NQ-2aet en 10 mL de ácido acético, 0.11 mL (1.5 mmol) de cloruro de acetilo y 136.16 mg (1mmol) de KHSO<sub>4</sub> bajo agitación magnética y se sometió a reflujo. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 248 mg de acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) etilo (10a), nombrado NQ-2aet-Ac, con %R = 96%.

Acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) etilo (10a)

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color anaranjado oscuro.

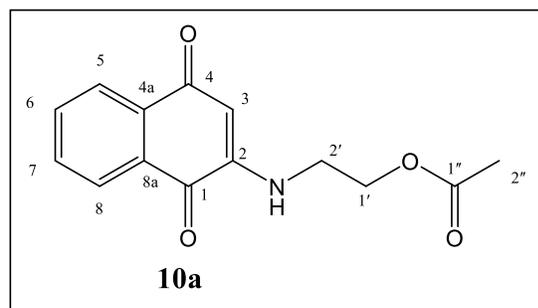
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3261, 1713, 1663, 1589

**EM *m/e* (%):** 259 [M<sup>+</sup>] (1), 199 (8), 186 (9), 158 (3), 129 (6), 115 (6), 101 (17), 89 (14), 76 (31), 50 (16), 43 (100), 28 (13)

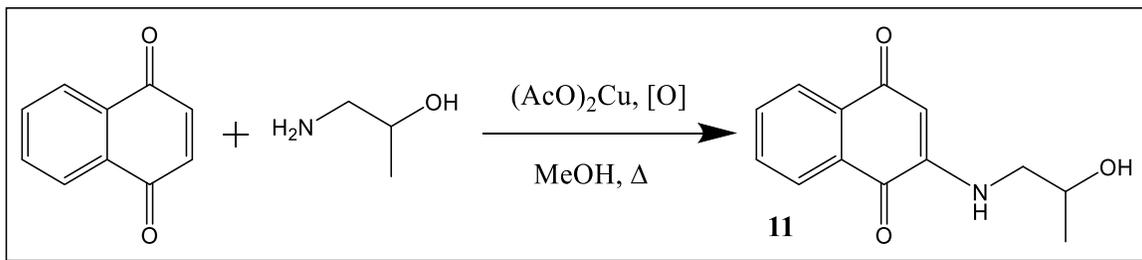
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> =

0.9 Hz, H-8), 7.98 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-5), 7.66 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.55 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 6.06 (sa, 1H, NH), 5.70 (s, 1H, H-3), 4.26 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, H-1'), 3.40 (c, 2H, *J* = 5.6 Hz, H-2'), 2.03 (s, 3H, H-2'')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.1 (C-1), 181.8 (C-4), 171.1 (C-1''), 148.0 (C-2), 134.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 132.2 (C-7), 130.6 (C-8a), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 101.5 (C-3), 61.7 (C-1'), 41.8 (C-2'), 20.9 (C2'')



## Síntesis de compuesto (11): NQ-1a2p



Esquema 1.21. Síntesis del compuesto (11) NQ-1a2p.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 0.27 mL de 1-amino-2-propanol racémico (4 mmol). Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 231 mg de 2-((2-hidroxietil)amino)naftalen-1,4-diona (**11**), nombrado NQ-1a2p, con %R = 97%.

2-((2-hidroxipropil)amino)naftalen-1,4-diona (**11**)

**Fórmula Molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N

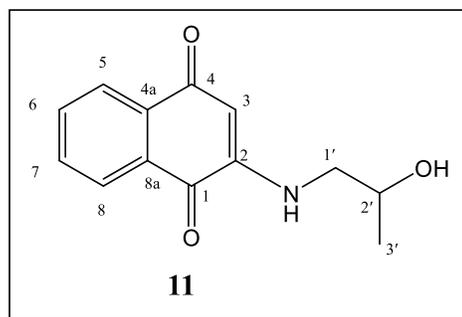
**Aspecto Físico:** Sólido color anaranjado.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3355, 3270, 1669, 1592

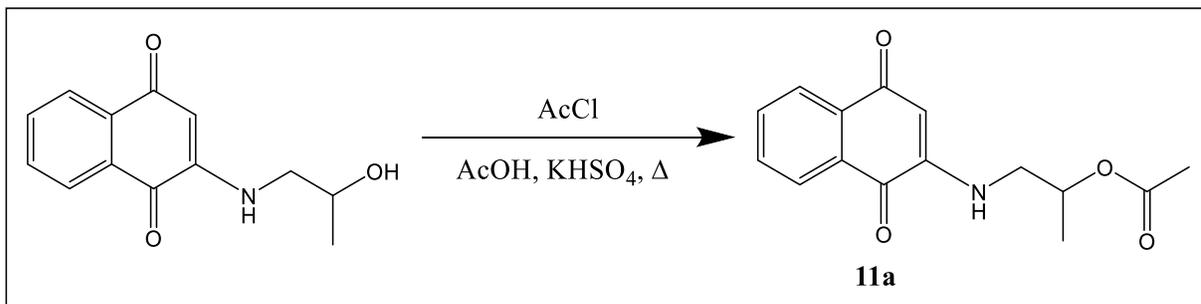
**EM *m/e* (%):** 231 [M<sup>+</sup>] (7), 186 (33), 158 (13), 146 (19), 131 (31), 115 (18), 101 (70), 89 (48), 76 (100), 50 (60), 45 (64), 28 (39)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.99 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-8), 7.95 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.0 Hz, H-5), 7.83 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.72 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 7.22 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH), 5.75 (s, 1H, H-3), 4.94 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz, OH), 3.91 (m, 1H, H-2'), 3.17 (m, 1H, H-1'), 3.07 (m, 1H, H-1'), 1.12 (d, 3H, *J* = 6.2 Hz, H-3')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 181.5 (C-1), 181.3 (C-4), 148.6 (C-2), 134.8 (C-6), 133.1 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.3 (C-8a), 125.8 (C-8), 125.3 (C-5), 99.7 (C-3), 64.0 (C-2'), 49.5 (C-1'), 21.1 (C-3')



Síntesis de compuesto (11a): NQ-1a2p-Ac



Esquema 1.22. Síntesis del compuesto (11a) NQ-1a2p-Ac.

Se disolvió 231 mg (1 mmol) de NQ-1a2p en 10 mL de ácido acético, 0.11 mL (1.5 mmol) de cloruro de acetilo y 136.16 mg (1mmol) de KHSO<sub>4</sub> bajo agitación magnética y se sometió a reflujo. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 254 mg de acetato de 1-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)2-propilo (11a), nombrado NQ-1a2p-Ac, con %R = 93%.

Acetato de 1-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)2-propilo (11a)

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido color anaranjado.

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3302, 1716, 1660, 1610

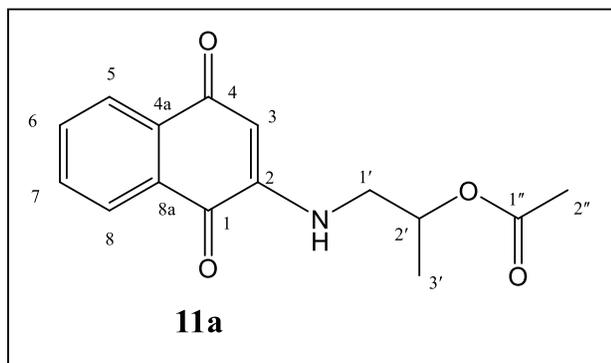
**EM m/e (%):** 273 [M<sup>+</sup>] (<1), 213 (9), 186 (13), 158 (4), 146 (5), 131 (7), 101 (18), 89 (13), 76 (22), 51 (11), 43 (100), 28 (7)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:**

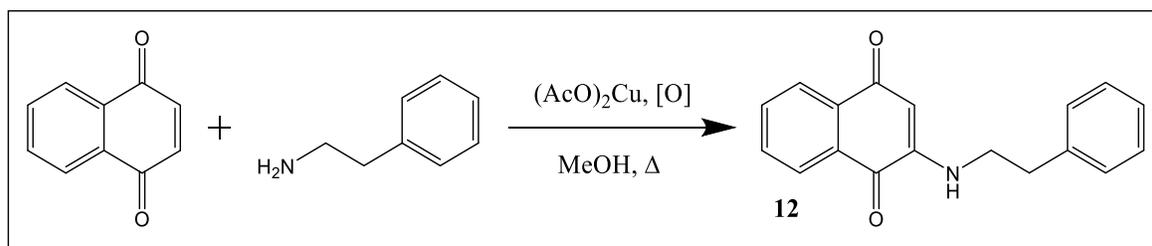
8.01 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-8),

7.97 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 0.9 Hz, H-5), 7.65 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-6), 7.54 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.3 Hz, H-7), 6.07 (sa, 1H, NH), 5.70 (s, 1H, H-3), 5.11 (m, 1H, H-2'), 3.25 (m, 2H, H-1'), 2.00 (s, 3H, H-2''), 1.26 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, H-3')

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.2 (C-1), 181.8 (C-4), 170.8 (C-1''), 148.1 (C-2), 134.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 132.2 (C-7), 130.6 (C-8a), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 101.5 (C-3), 68.7 (C-2'), 47.2 (C-1'), 21.3 (C-3'), 18.0 (C-2'')



## Síntesis de compuesto (12): NQ-Feam



Esquema 1.23. Síntesis del compuesto (12) NQ-Feam.

Se disolvió 199.65 mg (1 mmol) de acetato de cobre monohidratado 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 630.7 mg de feniletamina hidrocloreto (4 mmol) y 1.5 mL de NaOH 10%. Posteriormente se adicionó 158.16 mg (1 mmol) de 1,4-naftoquinona. La reacción se monitoreó mediante CCF. 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 gel de sílice, usando como fase móvil gradientes de *n*-hex/AcOEt. Se obtuvieron 273 mg de 2-(fenetilamino)naftalen-1,4-diona (**12**), nombrado NQ-Feam, con %R = 98%.

2-(fenetilamino)naftalen-1,4-diona (**12**)

**Fórmula Molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido cristalino color rojo anaranjado.

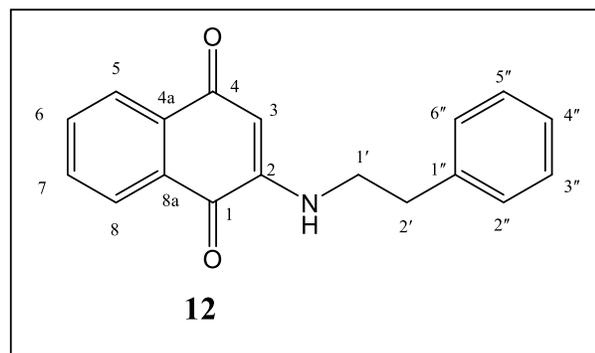
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3308, 1660, 1583

**EM *m/e* (%):** 277 [M<sup>+</sup>] (10), 186 (69), 158 (10),

129 (24), 115 (16), 101 (60), 91 (79), 77 (100), 65 (76), 51 (74), 28 (29)

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.02 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-8), 7.93 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, H-5), 7.63 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-6), 7.52 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.2 Hz, H-7), 7.20 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 5.87 (sa, 1H, NH), 5.70 (s, 1H, H-3), 3.38 (c, 2H, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, H-2')

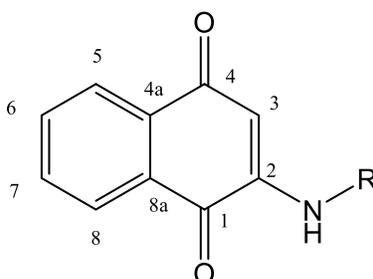
**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 183.1 (C-1), 181.9 (C-4), 147.6 (C-2), 138.0 (C-1''), 134.8 (C-6), 133.8 (C-4a), 132.1 (C-7), 130.6 (C-8a), 129.0 (C-3'', C-5''), 128.7 (C-2'', C-6''), 127.1 (C-4''), 126.4 (C-8), 126.3 (C-5), 101.2 (C-3), 43.8 (C-1'), 34.5 (C-2')



## Discusión de Resultados

La parte sintética del presente trabajo consistió en la derivatización de la 1,4-naftoquinona a partir de la incorporación de nucleófilos. Para ello se seleccionaron aminas con diferentes grupos R, con lo cual generar variaciones estructurales en los productos sintetizados que pudieran favorecer un estudio de relación estructura-actividad con las propiedades biológicas evaluadas en los otros capítulos del presente trabajo.

En la Figura 1.5 se puede observar el núcleo común de las naftoquinonas sintetizadas. Al caracterizar los productos mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) el estiramiento del enlace N-H de este núcleo se encontró en un intervalo de 3388 a 3181  $\text{cm}^{-1}$ , indicando la correcta síntesis de los productos, ya que esta banda se encuentra en el intervalo esperado para las aminas secundarias obtenidas (3500-3100  $\text{cm}^{-1}$ ). Por su parte los carbonilos quinónicos por ser  $\alpha,\beta$ -insaturados se desplazan y observan en el intervalo de 1682-1657  $\text{cm}^{-1}$ .

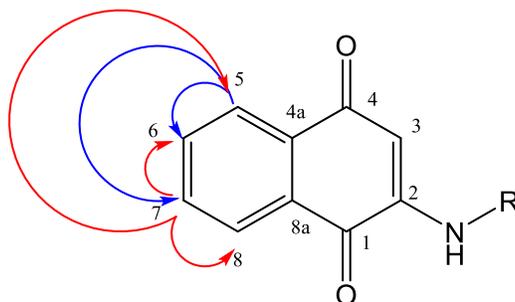


**Figura 1.5.** Núcleo común de los productos sintetizados.

La caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno y carbono-13 muestra similitudes entre los productos sintetizados. En la Tabla 1.1 se resumen los desplazamientos de las posiciones del núcleo común de las naftoquinonas.

En RMN  $^1\text{H}$  la posición más desprotegida es la 8, la cual normalmente se observa como un dd por acoplamiento con las posiciones 7 y 6, en un intervalo  $\delta$  8.10-7.96 y con constantes de acoplamiento en un intervalo de 7.6-7.7 Hz para  $J_1$  y de 0.9-1.2 Hz para  $J_2$ . A continuación se suele observar la posición 5, también como un dd a  $\delta$  8.04-7.91 y con un intervalo de  $J_1$  de 7.4-8.0 Hz, y de  $J_2$  de 0.9-1.2 Hz. A campo alto siguen en orden las posiciones 6 y 7, ambas mostrándose como ddd en la mayoría de los casos por

acoplamiento con sus dos hidrógenos vecinos (tres enlaces) y un acoplamiento *meta* con el cuarto hidrógeno del anillo aromático (Figura 1.6). Los hidrógenos de las aminas suelen encontrarse en un intervalo de  $\delta$  7.51-5.83, para encontrar a su lado a mayor protección el hidrógeno de la posición 3 en  $\delta$  6.02-5.67.



**Figura 1.6.** Acoplamientos para los dd y ddd, tomando H-5 (flechas azules) y H-7 (flechas rojas) como ejemplos.

En el espectro de COSY se identificaron las conectividades entre los hidrógenos aromáticos, donde un acercamiento a este experimento bidimensional en la región aromática muestra el acoplamiento de los hidrógenos en posición 5 con 6, e hidrógenos 7 con 8, respectivamente. (Figura 1.7).

En RMN  $^{13}\text{C}$  las señales comunes debido al núcleo de naftoquinona de los productos sintetizados comienzan con los carbonilos de la quinona, encontrándose a mayor desprotección la posición 1 ( $\delta = 183.6-181.5$ ) por encontrarse más cercano al nitrógeno, seguido de la posición 4 ( $\delta = 183.5-181.2$ ). A continuación, se suele observar el carbono de la posición 2 ( $\delta = 154.2-147.6$ ) por ser el que se encuentra adyacente al nitrógeno. Le siguen en desplazamiento un paquete de cuatro señales para los carbonos del anillo aromático, siguiendo el orden de C-6, C-4a, C-7 y C-8a en el rango de  $\delta = 134.9-130.3$ . Las posiciones 8 y 5 continúan como las siguientes en protección, normalmente encontrándose muy cercanas la una a la otra, en ocasiones con solamente 0.1 ppm de diferencia entre ellas ( $\delta = 126.7-125.8$  y  $\delta = 126.3-125.3$  respectivamente). Por último, la señal de carbono más protegido del núcleo naftoquinona es la posición 3, con  $\delta = 110.5-99.2$ .

El experimento bidimensional de HSQC (Figura 1.8) permitió hacer las asignaciones de las señales de carbono. Basándonos en el compuesto **10** NQ-2aet como ejemplo, en el anillo aromático del núcleo, C-6 y C-7 se asignaron a  $\delta$  134.8 y 132.1,

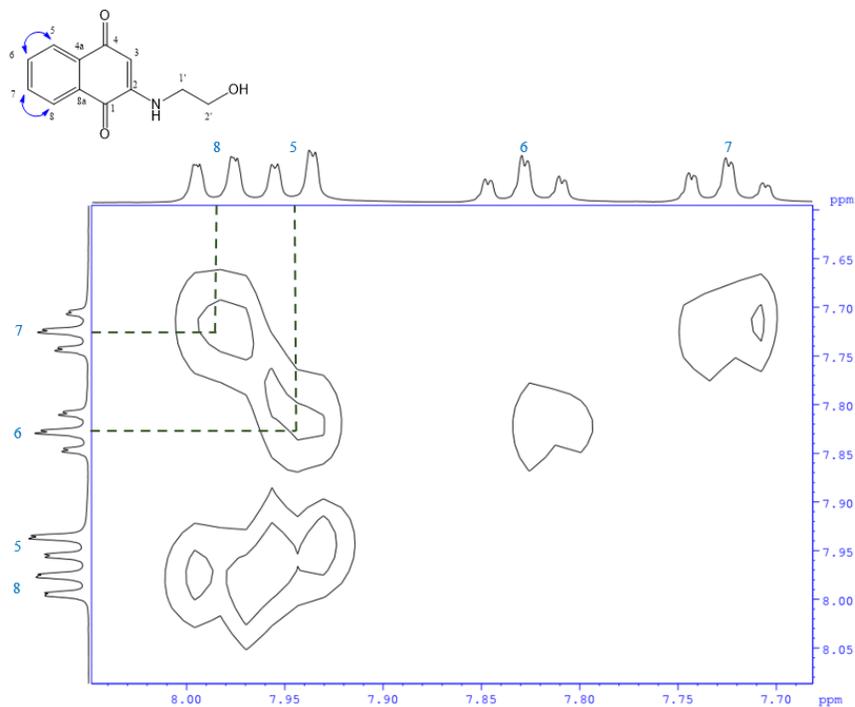
mientras que las señales a  $\delta$  125.8 y 125.3 se asignaron a C-8 y C-5. De esta manera, los carbonos cuaternarios C-4a y C-8a fueron asignados con las señales a  $\delta$  133.1 y 130.3.

En el caso de HMBC (Figura 1.9) las asignaciones realizadas en el anillo aromático pueden comprobarse con el acoplamiento observado entre H-3 con C-4a y C-1 a tres enlaces. También a tres enlaces, se observa el acoplamiento de H-7 con C-5 y C-8a, y de H-6 con C-8 y C-4a. Los hidrógenos del anillo aromático que se observan como ddd presentan a su vez acoplamientos a tres enlaces como H-5 con C-7, C-8a y C-4, mientras que H-8 se acopla con C-6, C-4a y C-1.

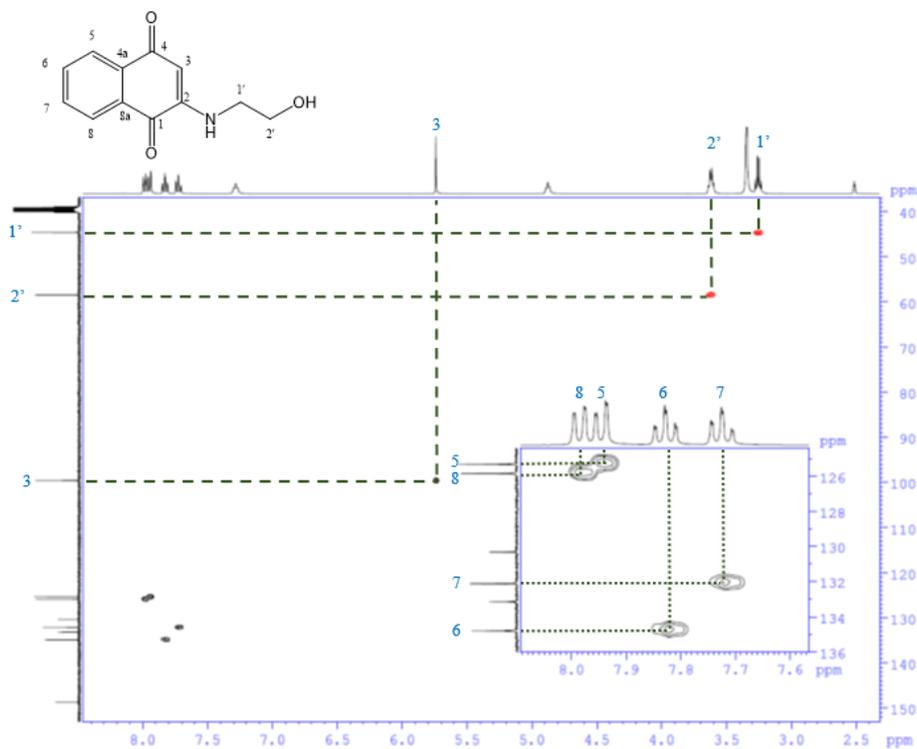
**Tabla 1.1.** Desplazamiento de los hidrógenos y carbonos del núcleo común de las naftoquinonas.

| Posición | $\delta_H^a$ | $\delta_C^a$ |
|----------|--------------|--------------|
| 1        | -            | 183.6-181.5  |
| 2        | -            | 154.2-147.6  |
| 3        | 6.02-5.67    | 110.5-99.2   |
| 4        | -            | 183.5-181.2  |
| 4a       | -            | 133.9-133.1  |
| 5        | 8.04-7.91    | 126.3-125.3  |
| 6        | 7.83-7.62    | 134.9-133.8  |
| 7        | 7.72-7.50    | 132.3-132.0  |
| 8        | 8.10-7.96    | 126.7-125.8  |
| 8a       | -            | 132.7-130.3  |
| NH       | 7.51-5.83    | -            |

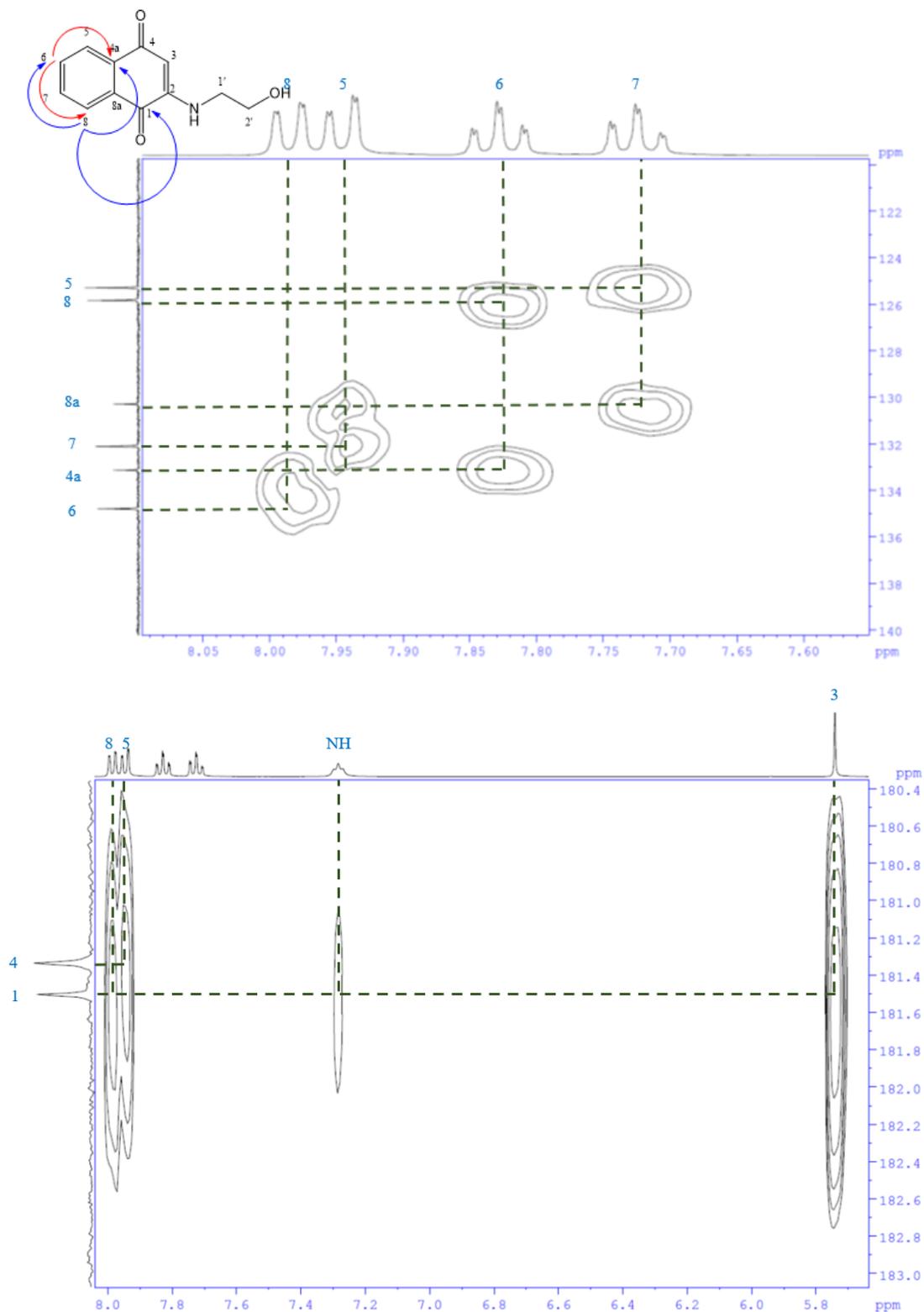
<sup>a</sup>.  $\delta$  en ppm.



**Figura 1.7.** Ampliación del espectro COSY del compuesto **10 NQ-2aet**.

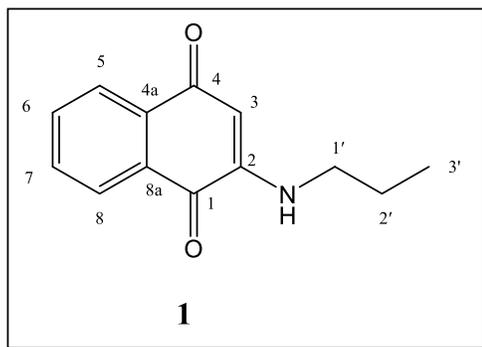


**Figura 1.8.** Experimento HSQC del compuesto **10 NQ-2aet**. En rojo se observan las señales negativas ( $\text{CH}_2$ ) y en negro las positivas (en este caso,  $\text{CH}$ ).



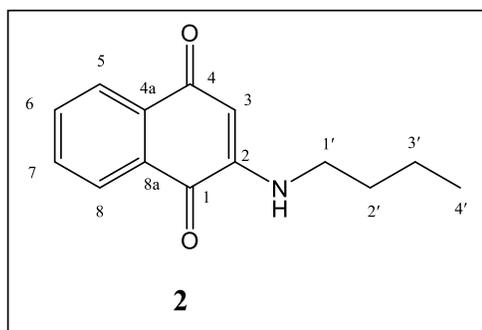
**Figura 1.9.** Ampliaciones del espectro HMBC del compuesto 10 NQ-2aet. Como ejemplos de acoplamientos se muestran a H-6 (flechas rojas) y H-8 (flechas azules).

Además de las características ya mencionadas de IR, RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  que son comunes a los compuestos sintetizados debido al núcleo compartido, se identificaron señales propias para cada uno de los productos.



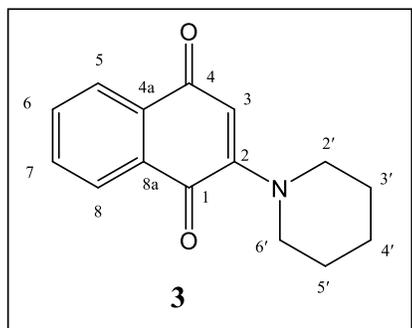
El primer producto sintetizado **1** NQ-Prop se logró cristalizar en forma de láminas de color rojo. El análisis por espectrometría de masas muestra un ion molecular de 215  $m/e$ . Una pérdida de  $m/e = 29$  que represente un radical etilo de la cadena introducida debido a una ruptura  $\beta$  al nitrógeno puede explicar la presencia de una señal a 186  $m/e$ .

Sus señales características en RMN  $^1\text{H}$  corresponden a las posiciones de la cadena alifática como 1', 2' y 3' a  $\delta$  3.15, 1.73 y 1.02 respectivamente. Estas mismas posiciones en RMN  $^{13}\text{C}$  aparecen a  $\delta$  44.4, 21.7 y 11.6 para C-1', C-2' y C-3'.



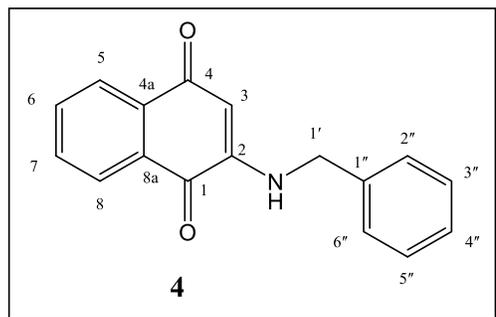
En el caso del producto sintetizado **2** NQ-Buta, en el espectro de masas se observa el ion molecular a 229  $m/e$ . En RMN  $^1\text{H}$  se observan las cuatro señales de sus hidrógenos alifáticos entre  $\delta$  3.18-0.97, siendo H-1' la señal más desprotegida y H-4' la más protegida. En el caso de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa similarmente las señales de los carbonos

correspondientes a este fragmento a  $\delta$  42.4, 30.4, 20.3 y 13.8 para C-1', C-2', C-3' y C-4' respectivamente.



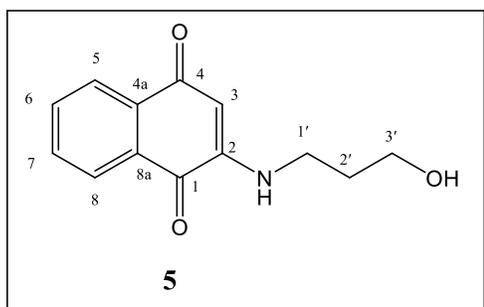
Para el compuesto **3** NQ-Pipe se presenta una amina terciaria en el núcleo, por lo que en IR la banda vista para todos los otros compuestos sintetizados desaparece. Por medio de EM se identifica como ion molecular una señal a 241 *m/e*.

En RMN  $^1\text{H}$  los hidrógenos en H-2' y H-6' por ser simétricos se observan en una señal a  $\delta$  3.49, como un multiplete que integra para los cuatro hidrógenos. Las posiciones H-3', H-4' y H-5' se agruparon en un multiplete a  $\delta$  1.73 con integración para seis hidrógenos. De manera análoga en RMN  $^{13}\text{C}$  los carbonos C-2' y C-6' se observan en una señal a  $\delta$  50.5 y los carbonos C-3' y C-5' en otra a  $\delta$  25.9, mientras que a  $\delta$  24.4 se encuentra C-4'.



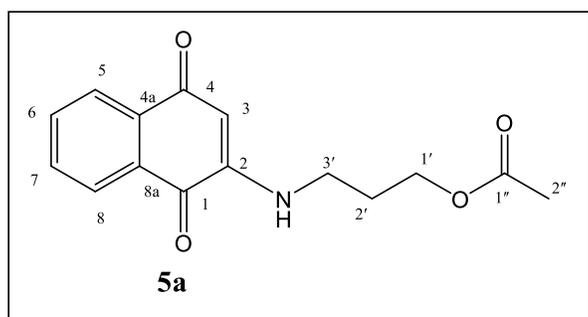
El compuesto **4** NQ-Bnca presenta en EM el ion molecular a 263 *m/e*. El pico base se observa a 91 *m/e*, el cual se atribuye al ion tropilio generado por el fragmento bencílico presente en el compuesto. En RMN  $^1\text{H}$  se encuentra un multiplete a  $\delta$  7.27 que integra para cinco hidrógenos, correspondiente al nuevo anillo aromático incorporado en la estructura.

La posición H-1' se encuentra a  $\delta$  4.30. En el caso de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan como señales características a  $\delta$  136.1 para C-1", a  $\delta$  129.1 una señal para C-3" y C-5", a  $\delta$  128.2 la señal de C-4" y a  $\delta$  127.8 una señal para C-2" y C-6". La posición C-1' se observa a  $\delta$  46.9.



El compuesto sintetizado **5** NQ-3apr al ser caracterizado mediante IR muestra una banda a  $3464\text{ cm}^{-1}$  que en este caso se asignó a la vibración del enlace O-H del alcohol primario en la cadena alifática. Mediante EM se observó un ion molecular de  $231\text{ m/e}$ . Los alcoholes en EM pueden perderse como agua, en cuyo caso se vería una señal de M-18, la cual correspondería con el fragmento observado a  $213\text{ m/e}$ , si bien su abundancia relativa es baja. Los alcoholes primarios a su vez pueden fragmentarse generando a  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}^+\text{H}$  con una  $m/e = 31$ , que en el espectro puede observarse como el pico base.

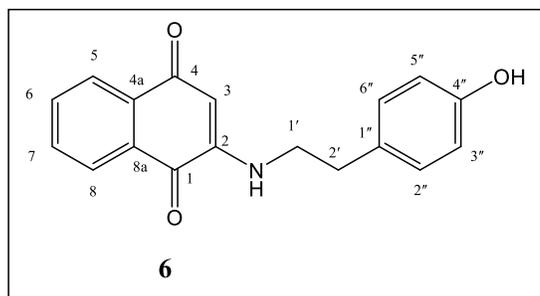
Al caracterizar por RMN  $^1\text{H}$  una señal característica para este compuesto sería el hidrógeno del alcohol, que se observa como un triplete a  $\delta$  4.63. De la cadena alifática la posición H-2' es la más protegida (un quinteto a  $\delta$  1.74) ya que H-1' y H-3' se encuentran adyacentes a los heteroátomos oxígeno y nitrógeno. En RMN  $^{13}\text{C}$  se encuentran los carbonos C-3' a  $\delta$  58.7 y C-1' a  $\delta$  39.6, mientras C-2' se observa a  $\delta$  30.4.



Tras acetilar el compuesto **5**, se generó a **5a** NQ-3apr-Ac, cuya caracterización en IR muestra una banda a  $1710\text{ cm}^{-1}$  que representaría el carbonilo C-1". En su espectro de

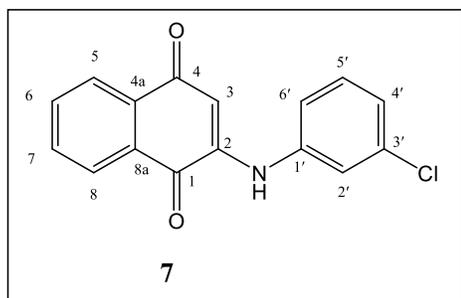
masas se observa el ion molecular 273 *m/e*. El fragmento a 43 *m/e* correspondería al ion acilio CH<sub>3</sub>-CO<sup>+</sup>, proveniente del acetilo incorporado.

En el caso de RMN <sup>1</sup>H, destaca la presencia de un singulete a δ 2.11 que integra para tres hidrógenos, asignado a la posición H-2". En RMN <sup>13</sup>C las señales de la acetilación corresponden a δ 171.0 y 21.0 para C-1" y C-2" respectivamente.



El compuesto sintetizado **6** NQ-Tira muestra en su caracterización por IR una banda a 3350 cm<sup>-1</sup> que se atribuye a la vibración del enlace O-H de la porción fenólica del compuesto. En el espectro de masas se observa un ion molecular de 293 *m/e*.

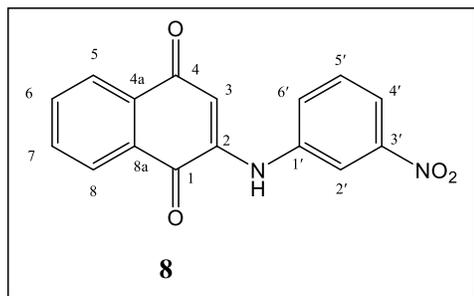
En RMN <sup>1</sup>H las posiciones H-1' y H-2' se observan a δ 3.3 y 2.78 respectivamente, mientras las señales de los hidrógenos del anillo aromático incorporado se encuentran a δ 7.06 (H-2'', H-6'') y 6.68 (H-3'', H-5''). Por su parte el hidrógeno del fenol se observa a δ 9.17. En RMN <sup>13</sup>C a δ 43.6 y δ 32.5 se encuentran C-1' y C-2' respectivamente, mientras que de los carbonos del anillo fenólico se encuentra C-4'' a δ 155.8 y entre δ 129.6-115.2 el resto de posiciones.



Para la síntesis del compuesto **7** NQ-ClAn, debido al uso de una anilina que tiene menor capacidad nucleofílica que una amina alifática, las condiciones usuales de síntesis no mostraban que la reacción procediera. En base al trabajo de Lisboa et al. (2011) se cambió

el solvente, empleando ácido acético en lugar de metanol, y aunque en el monitoreo por TLC no se consumiera totalmente la 1,4-naftoquinona, la reacción mostraba avance y la presencia del producto **7** NQ-ClAn.

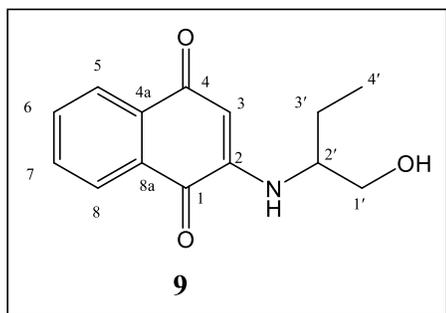
En su espectro de masas se puede observar el ion molecular a  $283\ m/e$ , así como una señal  $M^+ + 2$  en  $285\ m/e$ , con una abundancia relativa de aproximadamente una tercera parte del ion molecular, lo cual es característico de compuestos con un átomo de cloro en su estructura. En RMN  $^1H$  se observan las señales del anillo aromático incorporado, donde las posiciones más desprotegidas son H-2' y H-5' que se observan solapadas a  $\delta\ 7.45$ , donde el pico más prominente del multiplete en este desplazamiento puede deberse al singulete esperado para H-2'. La señal para H-4' puede observarse a  $\delta\ 7.39$  y la de H-6' a  $\delta\ 7.26$ . En RMN  $^{13}C$ , los carbonos más desprotegidos son C-1' a  $\delta\ 139.9$  y C-3' a  $\delta\ 134.9$  por su posición adyacente a los átomos de nitrógeno y cloro, respectivamente. Les sigue C-2' a  $\delta\ 133.5$ , mientras que el resto de carbonos se encuentran entre  $\delta\ 126.1$ - $121.8$ .



El compuesto **8** NQ-NOAn fue sintetizado de forma similar al compuesto **7** NQ-ClAn, con ácido acético como solvente. Durante su caracterización mediante EM se observa como ion molecular una señal a  $294\ m/e$ .

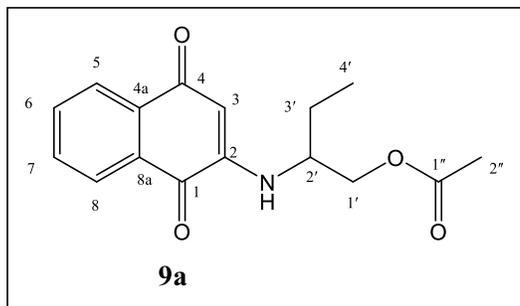
El análisis por RMN  $^1H$  muestra como señales características las introducidas en el nuevo anillo aromático. El hidrógeno H-2' se encuentra como la posición más desprotegida de este anillo, con un desplazamiento a  $\delta\ 8.42$ , y su multiplicidad de triplete se debería a un acoplamiento *meta* con las posiciones H-4' y H-6', que se observan a  $\delta\ 8.04$  y  $\delta\ 7.82$  respectivamente. La señal más protegida en cuanto a los hidrógenos en el anillo incorporado corresponde a  $\delta\ 7.52$  para la posición H-5'. En el caso de RMN  $^{13}C$ , debido a la baja solubilidad del producto se empleó piridina deuterada como solvente, con la consecuencia que las señales del solvente se encuentran en un desplazamiento cercano a la

zona donde se observan las señales de carbono del producto. De esta manera, falta observar una señal para el carbono C-3' que probablemente se encuentre solapada con una de las señales de piridina. La posición C-1' del anillo aromático incorporado es la más desprotegida a  $\delta$  140.5. Le siguen las señales de los carbonos C-4' a  $\delta$  130.8, C-2' a  $\delta$  129.4, C-5' a  $\delta$  119.8, y finalmente C-6' a  $\delta$  118.7.



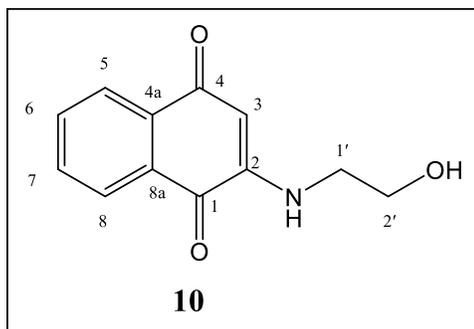
El producto sintetizado **9** NQ-2abu, al caracterizarlo por IR se observa una banda a  $3246\text{ cm}^{-1}$  asignada al estiramiento del enlace O-H. En el espectro de masas del compuesto se observa el ion molecular a  $245\text{ m/e}$ . Se encuentra una señal de  $m/e = 31$  para el fragmento  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}^+\text{H}$  debido a la presencia de un alcohol primario en la estructura, así como  $m/e = 214$  debido a la pérdida del mismo fragmento a partir del ion molecular.

En RMN  $^1\text{H}$  dentro las señales características de este compuesto estaría un singulete ancho a  $\delta$  2.33 para el hidrógeno del alcohol. De la porción alifática, cabe destacar las posiciones H-3' ( $\delta$  1.65) y H-1' ( $\delta$  3.70) como multipletes que comienza a separarse en dos paquetes de señales cada uno, por ser hidrógenos diastereotópicos. En RMN  $^{13}\text{C}$  los carbonos del fragmento alifático se encuentran a  $\delta$  63.2, 55.8, 24.0 y 10.6 para C-1', C-2', C-3' y C-4' respectivamente.



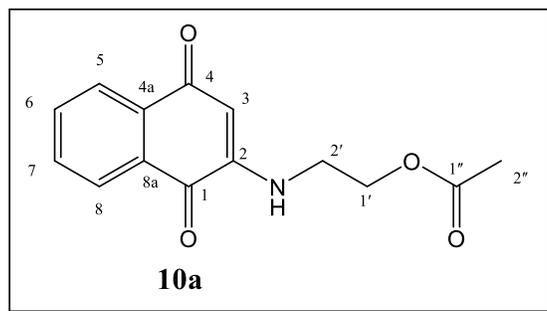
Tras acetilar el producto anterior, se sintetizó al compuesto **9a** NQ-2abu-Ac. En su espectro de IR aparece una banda a  $1713\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo incorporado. En el espectro de masas se detectó el ion molecular a  $287\text{ m/e}$ . El pico base es un fragmento de  $43\text{ m/e}$ , asignado al ion acilio  $\text{CH}_3\text{-CO}^+$ .

La caracterización mediante RMN  $^1\text{H}$  muestra señales similares a las de su material de partida. La señal característica de este compuesto es para H-2'' un singulete que integra para tres hidrógenos a  $\delta\ 2.00$ . Al caracterizar por RMN  $^{13}\text{C}$  se observan a  $\delta\ 170.9$  y  $20.9$  las señales de las posiciones C-1'' y C-2'' respectivamente.



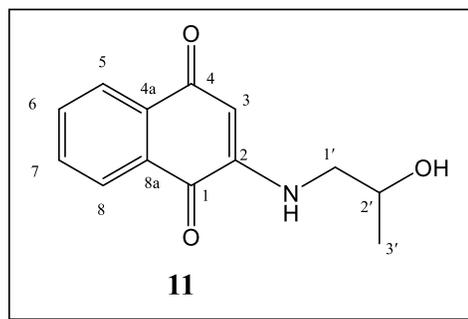
En el caso del compuesto **10** NQ-2aet se observa en el espectro de masas se observa la presencia del ion molecular a  $217\text{ m/e}$ . Una señal a  $199\text{ m/e}$  corresponde a la pérdida del hidroxilo como agua (M-18), así como una señal a  $31\text{ m/e}$  para la pérdida del grupo alcohol en forma del ion  $\text{H}_2\text{C=O}^+\text{H}$ .

La caracterización por RMN  $^1\text{H}$  mostró las señales de las posiciones H-1' y H-2' a  $\delta\ 3.26$  y  $3.62$  respectivamente. Para el hidrógeno del alcohol se observa un triplete a  $\delta\ 4.88$  por su acoplamiento con H-2'. El experimento de HSQC (Figura 1.4) permitió hacer las asignaciones de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  de la cadena alquílica en  $\delta\ 45.6$  y  $58.4$  con los carbonos C-1' y C-2'.



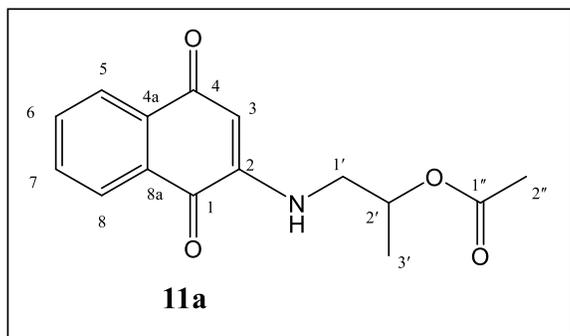
Tras la acetilación del producto anterior, se obtuvo el compuesto **10a** NQ-2aet-Ac. Su caracterización mediante IR muestra una banda a  $1713\text{ cm}^{-1}$  asignada al nuevo carbonilo del éster formado. En el espectro de masas se observó el ion molecular a  $259\text{ m/e}$  y un fragmento de  $43\text{ m/e}$  como pico base para el ion acilio  $\text{CH}_3\text{-CO}^+$ .

El análisis por RMN  $^1\text{H}$  muestra la acetilación realizada con un singulete que integra para tres hidrógenos a  $\delta\ 2.03$  para la posición H-2''. En RMN  $^{13}\text{C}$  por su parte se observan las posiciones C-1'' y C-2'' con señales a  $\delta\ 171.1$  y  $20.9$  respectivamente.



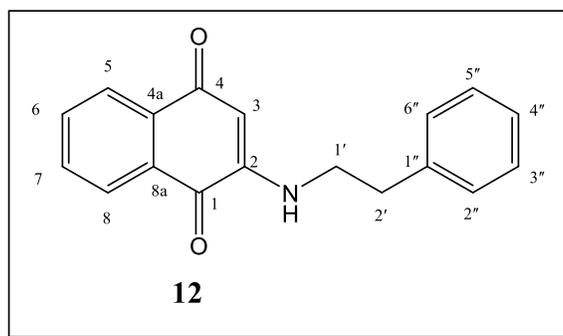
El producto sintetizado **11** NQ-1a2p muestra en su espectro de IR una banda a  $3270\text{ cm}^{-1}$  asignada al enlace O-H del alcohol alifático. Al caracterizar por EM, se observa un ion molecular a  $231\text{ m/e}$ . La deshidratación del alcohol genera una señal M-18, el fragmento  $213\text{ m/e}$ .

En RMN  $^1\text{H}$  las señales características de este producto serían el hidrógeno del alcohol que se observa a  $\delta\ 4.94$  como un doblete, mientras que de los hidrógenos alifáticos H-1' se observa como dos multipletes diferenciados a  $\delta\ 3.17$  y  $3.07$  por ser diasterotópicos. En RMN  $^{13}\text{C}$  la cadena alquílica se observa en los desplazamientos  $\delta\ 64.0$  (C-2'),  $49.5$  (C-1') y  $21.1$  (C-3').



El producto sintetizado **11a** NQ-1a2p-Ac en su caracterización mediante IR muestra una banda a  $1716\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo del éster generado. Mediante EM se observa un ion molecular a  $273\text{ m/e}$ , así como un fragmento de  $43\text{ m/e}$  para el ion acilio  $\text{CH}_3\text{-CO}^+$ , que también es el pico base.

La caracterización por RMN  $^1\text{H}$  muestra debido a la acetilación un singulete que integra para tres hidrógenos a  $\delta\ 2.00$ , correspondiente a la posición H-2". De manera análoga en RMN  $^{13}\text{C}$  las señales características se encuentran a  $\delta\ 170.8$  y  $18.0$  para C-1" y C-2" respectivamente.



El compuesto sintetizado **12** NQ-Feam en su espectro de masas muestra el ion molecular como una señal a  $277\text{ m/e}$ . El pico base a  $77\text{ m/e}$  se corresponde con la fragmentación del anillo de benceno, mientras que a  $91\text{ m/e}$  se observa la señal que se genera de un ion tropilio tras la fragmentación de la porción bencílica.

Al caracterizar por RMN  $^1\text{H}$  se observan las posiciones H-1' y H-2' a  $\delta\ 3.38$  y  $2.90$  respectivamente. Los hidrógenos del nuevo anillo aromático se observan como un multiplete que integra para los cinco hidrógenos a  $\delta\ 7.20$ . En la caracterización por RMN  $^{13}\text{C}$  se observa a  $\delta\ 43.8$  y  $34.5$  las posiciones C-1' y C-2'. En cuanto a los carbonos del

benceno, C-1" se encuentra a  $\delta$  138.0, mientras que entre  $\delta$  129.0-127.1 se encuentran el resto de señales para C-2", C-3", C-4", C-5" y C-6".

En total fueron sintetizados 16 compuestos derivados de 1,4-naftoquinona, donde se incorporaron fragmentos a partir de diferentes aminas. Se emplearon aminas alifáticas y aromáticas, donde las aminas alifáticas fueron lineales (con la excepción de **3** NQ-Pipe). De las aminas mencionadas, el fragmento incorporado fue mayoritariamente hidrocarbonado, con un alcohol como único grupo funcional adicional a la amina en el caso de los compuestos **5** NQ-3apr, **6** NQ-Tira, **9** NQ-2abu, **10** NQ-2aet y **11** NQ-1a2p, los cuales a su vez fueron en su mayoría acetilados. La mayor variación estructural se encuentra en los compuestos **7** NQ-ClAn y **8** NQ-NOAn, que emplearon anilinas como fragmento incorporado, con un cloro y grupo nitro en su anillo aromático respectivamente.

## Capítulo 2. Estudios *in vitro*

### Generalidades

#### 1. Estudios antioxidantes

Las radicales libres son moléculas que contienen un electrón desapareado en su orbital más externo, los cuales por lo tanto son moléculas muy reactivas que pueden oxidar, y en ocasiones reducir, otros átomos (Adwas *et al.*, 2019). Los más conocidos son las llamadas Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ); sin embargo, también existen las Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (MacDonald-Wicks, Wood y Garg, 2006; Pisoschi *et al.*, 2021).

Algunos ROS pueden ser producidos en el organismo durante diversos procesos fisiológicos como la homeostasis celular, transducción de señales, expresión de genes, activación de receptores, reconocimiento de patógenos, entre otros (Pisoschi *et al.*, 2021). Para evitar un desbalance de sus niveles y que estos radicales afecten a diferentes macromoléculas en el cuerpo, se mantienen sistemas de control como lo son compuestos antioxidantes así como sistemas enzimáticos. Ejemplos de los primeros son las vitaminas C y E, y el glutatión; de los segundos la enzima catalasa, la superóxido dismutasa y las peroxidasas (Adwas *et al.*, 2019).

En las ocasiones en las que existe un desequilibrio de estos sistemas y los niveles de ROS aumentan, se da el fenómeno conocido como estrés oxidativo. Este se ha relacionado con el desarrollo de muchas enfermedades o el agravamiento de las mismas, como la diabetes, enfermedades del corazón, aterosclerosis, enfermedades hepáticas, diversos tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructivo crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipertensión, e incluso con el proceso de envejecimiento (Adwas *et al.*, 2019; Forman y Zhang, 2021; Kudryavtseva *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha propuesto el uso de agentes antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo y por lo mismo controlar algunas de estas enfermedades.

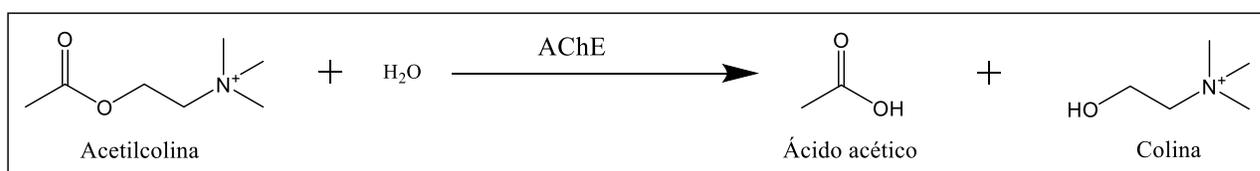
Los agentes antioxidantes pueden definirse de varias maneras. Una de ellas es que los antioxidantes son sustancias que a concentraciones bajas pueden retrasar o prevenir la

oxidación de un sustrato oxidable. No obstante, también se ha definido a un antioxidante como una molécula que puede retardar o prevenir la acción de un oxidante, lo cual ayudaría a incluir compuestos que inhiben enzimas oxidantes, que reaccionan directamente con compuestos oxidantes, o que secuestran iones metálicos, si bien se tiene el peligro de encontrar compuestos con acciones antioxidantes que realmente no poseen una actividad antioxidante como tal (MacDonald-Wicks, Wood y Garg, 2006).

Por esto es que al momento de buscar y evaluar posibles compuestos antioxidantes es que se han desarrollado diferentes técnicas que buscan medir esta actividad, y se puede por lo tanto hablar de medir *in vitro* la capacidad de secuestro de radicales como los diversos ROS y RNS, ensayos de transferencia de hidrógeno, ensayos de transferencia de electrones, así como ensayos *in vivo* donde se pueden llegar a medir la capacidad antioxidante de enzimas o la formación de marcadores oxidativos (MacDonald-Wicks, Wood y Garg, 2006; Alam, Bristi y Rafiquzzaman, 2013).

## 2. Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima importante del sistema nervioso con un papel importante en la transmisión colinérgica, encargándose de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. AChE se encuentra distribuida en diversos tejidos en animales vertebrados y puede expresarse de diversas formas: como subunidades catalíticas en forma de monómeros globulares (G<sub>1</sub>), dímeros (G<sub>2</sub>) y tetrámeros (G<sub>4</sub>), o como moléculas asimétricas con uno (A<sub>4</sub>), dos (A<sub>8</sub>) o tres (A<sub>12</sub>) tetrámeros unidos a una estructura enrollada de tres hebras (Fernandez, Moreno e Inestrosa, 2002). Se puede encontrar, por ejemplo, AChE en forma A<sub>1</sub> en las uniones neuromusculares para la hidrólisis de acetilcolina, y en su forma G<sub>4</sub> en los espacios sinápticos de las neuronas.



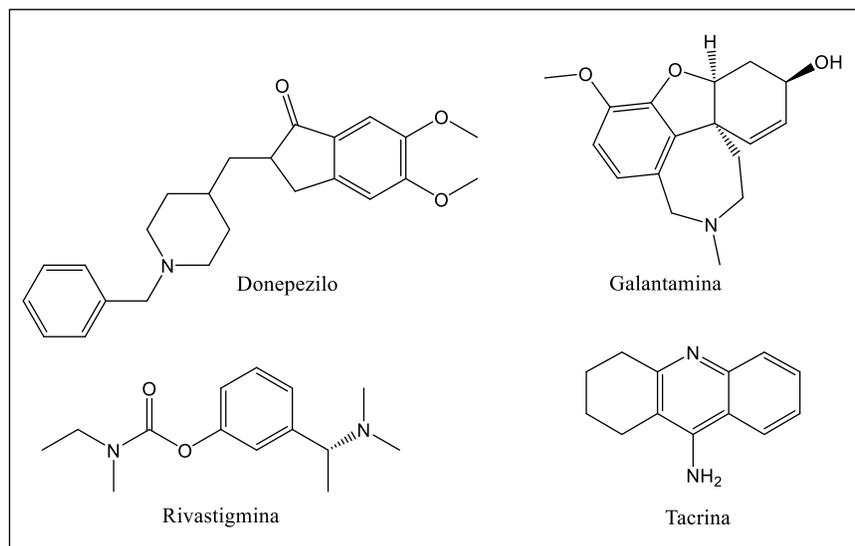
**Figura 2.1.** Hidrólisis de acetilcolina por parte de AChE.

La estructura de la AChE se ha podido determinar por diversos análisis de cristalografía de rayos X, donde se han podido establecer el sitio de unión al ligando, así como zonas con residuos de aminoácidos de importancia. Este sitio de unión a ligandos es una cavidad en la superficie de la enzima, que tiene una profundidad de aproximadamente 20 Å, encontrándose al fondo de la misma tres aminoácidos conocidos como la tríada catalítica de la enzima: Ser200, His440 y Glu327 (número de secuencia en la versión de AChE de *Tetronarce californica*, que es empleada en esta tesis para los análisis de acoplamiento molecular automatizado). Otros sitios de interacción importantes son el centro aniónico central (CAS) constituido por Trp84, Phe330, Glu199 y Gly441, así como el sitio aniónico periférico (PAS) constituido por Trp279, Tyr334, Tyr121 y Tyr70 (Díaz-Rubio *et al.*, 2019). Dentro de estos residuos, Trp84 es importante dentro del subsitio oxianiónico, ya que interactúa con el ligando natural de la enzima, acetilcolina, así como con otros compuestos, mediante interacciones de tipo  $\pi$ -catión, así como estacamientos  $\pi$ - $\pi$ , como con los inhibidores de AChE donepezilo, tacrina y galantamina (Harel *et al.*, 1993; Bartolucci *et al.*, 2001; Kryger *et al.*, 1999; Dvir *et al.*, 2010).

Debido a la función de AChE en el sistema nervioso, se ha podido relacionar la expresión y regulación de esta enzima con el desarrollo de diversas enfermedades neurológicas. Por ejemplo, en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica sus niveles de AChE plasmática es el doble de los niveles de control (Fernandez, Moreno e Inestrosa, 2002), y se ha encontrado una actividad exosomal de AChE disminuida en pacientes con enfermedad de Parkinson (Shim *et al.*, 2021).

Otro ejemplo de enfermedad en la que AChE cobra relevancia es en la enfermedad de Alzheimer, que es una enfermedad neurodegenerativa que a nivel global es la causa más común de demencia en adultos mayores (Tran *et al.*, 2016). Si bien es una enfermedad multifactorial, la vía colinérgica ha sido ampliamente relacionada con su desarrollo, y la pérdida del sistema colinérgico se correlaciona incluso con la severidad de la demencia en esta enfermedad (Hampel *et al.*, 2019). Se ha encontrado que deficiencias del neurotransmisor colina en el cerebro de pacientes con Alzheimer se debe tanto a la deficiencia en su producción como a una actividad aumentada de la AChE (Singh *et al.*, 2013); por estas razones es que actualmente se proponen y emplean inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) como farmacoterapia contra la enfermedad de Alzheimer

(Ferreira-Vierira *et al.*, 2016). De los inhibidores ya mencionados de AChE, actualmente se encuentran en mercado con este fin donepezilo, rivastigmina y galantamina, mientras que tacrina (Figura 2.2) se retiró como tratamiento de Alzheimer debido a que presentaba problemas de hepatotoxicidad (Marucci *et al.*, 2021).



**Figura 2.2.** Estructuras de inhibidores de acetilcolinesterasa.

A pesar de la función predominante de AChE en el sistema colinérgico, se han encontrado otras funciones para esta enzima. Recientemente se ha estudiado el rol de AChE en la diferenciación celular, así como en el proceso de apoptosis. Aunque se sigue investigando estas relaciones, estos estudios han dado pie a la sugerencia del uso de inhibidores de AChE que puedan funcionar como fármacos supresores de tumores y por lo tanto como tratamiento para algunos tipos de cáncer (Kocanci *et al.*, 2017; Lazarević-Pašti *et al.*, 2017)

### 2.1 Acetilcolinesterasa como diana en insectos

La acetilcolinesterasa se encuentra presente en muchos animales, por lo que su inhibición no solamente puede relacionarse a la búsqueda de nuevos fármacos para los humanos, y por lo tanto hay otras aplicaciones posibles para este efecto. Una aplicación que lleva años en uso es el de la inhibición de la acetilcolinesterasa en insectos para lograr un efecto insecticida. Por mucho tiempo empleados, los insecticidas de tipo organofosforados

y carbamatos tienen como diana a la AChE, siendo esta la diana de un tercio de los insecticidas vendidos a nivel mundial (Lang, Yan Zhu y Zhang, 2012). Estos insecticidas funcionan ya que al inhibir la AChE crean un sobreestímulo del sistema colinérgico de los insectos, lo que les termina por inducir parálisis y lleva finalmente a su muerte (Bhavya, Chandu y Devi, 2018).

Si bien se han identificado dos variantes de acetilcolinesterasa en insectos denominadas como AChE1 y AChE2, el hecho de encontrar ciertas diferencias en algunos aminoácidos puntuales y que se han caracterizado, así como que hay incluso mayor diferencia entre AChE de los insectos y mamíferos, o diferentes variantes de la enzima en taxones particulares de insectos, es que se puede pensar que esta característica puede ser explotada para diseñar y buscar insecticidas selectivos (Lang, Yan Zhu y Zhang, 2012; Kim y Lee, 2013). Esta búsqueda de nuevos insecticidas, y de preferencia selectivos, es especialmente importante ya que se han logrado detectar diversas mutaciones en diferentes insectos los cuales les confieren resistencia a insecticidas, incluyendo muchos organofosforados y carbamatos (Kim y Lee, 2013; Cheung *et al.*, 2018; Gorecki *et al.*, 2020; Yousafi *et al.*, 2021).

## Metodología

### Ensayos de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los compuestos sintetizados fue evaluada mediante dos técnicas, el secuestro de radicales de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y el secuestro de radicales del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS).

#### Evaluación antioxidante mediante prueba de DPPH

La actividad de secuestro del radical de DPPH fue realizada en base a la metodología reportada por Salazar-Aranda *et al.* (2015) con algunas modificaciones, incluyendo la corrección de color propuesta por Olalere *et al.* (2017).

Se prepararon soluciones metanólicas de los compuestos sintetizados por evaluar, a una concentración de 1 mg/mL. Por otra parte, se preparó una solución metanólica de DPPH (7.5 mg/250 mL). Se mezclaron 0.5 mL de cada una de las soluciones de los compuestos con 0.5 mL de la solución de DPPH y se dejaron incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min, incluyendo un control negativo (0.5 mL de solución de DPPH con 0.5 mL de metanol); cada una de estas mezclas se realizó por triplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, se leyeron las absorbancias de cada mezcla en un espectrofotómetro ( $\lambda=571$  nm) usando metanol como blanco.

El porcentaje de inhibición fue calculado empleando la fórmula:

$$DPPH(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

donde  $A_1$  es la mezcla del compuesto evaluado con DPPH y  $A_0$  es el control negativo. Como corrección de color fue empleado  $A_2$ , consistente en una mezcla de 0.5 mL de la solución del compuesto evaluado con 0.5 mL de metanol. Como control positivo del experimento, se evaluó la actividad antioxidante de vitamina C. El ensayo se realizó 3 veces diferentes.

### **Evaluación antioxidante mediante prueba de ABTS**

La actividad de secuestro del catión radical de ABTS fue realizada en base a las metodologías propuestas por Re *et al.* (1999) y Kuskoski *et al.* (2005), con pequeñas variaciones. Se preparó una solución acuosa 7 mM de ABTS, mientras que el catión radical de ABTS (ABTS<sup>+</sup>) se produjo haciendo reaccionar la solución preparada de ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM, conservando la mezcla a temperatura ambiente en oscuridad por 16-18 h antes de su uso. Se tomaron 150 µL de la solución de ABTS<sup>+</sup> para diluirse con metanol, con el fin de obtener una absorbancia en el espectrofotómetro de  $0.7 \pm 0.02$ , considerada como la absorbancia inicial ( $\lambda=754$  nm). Se mezclaron 980 µL de la solución de ABTS<sup>+</sup> con 20 µL de una solución de los compuestos sintetizados por evaluar (a una concentración de 1 mg/mL), realizándose esto por triplicado. Las mezclas resultantes se incubaron a temperatura ambiente por 7 min, para después ser leídas sus absorbancias en el espectrofotómetro, considerando esta la absorbancia final.

El porcentaje de inhibición fue calculado empleando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \times 100$$

donde  $A_1$  es la absorbancia inicial y  $A_2$  es la absorbancia final. Como control positivo del experimento, se evaluó la actividad antioxidante de vitamina C. El ensayo se realizó 3 veces diferentes.

### **Ensayo de actividad inhibitoria enzimática**

Dentro del perfil de inhibición enzimática, se determinó la capacidad de los compuestos sintetizados de unirse e inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

### **Evaluación de inhibición de AChE**

La inhibición de AChE fue determinada empleando la metodología reportada por Adewusi (2011) para dicha determinación. Esta se realiza sobre placas de 96 pocillos, a los cuales se les adiciona 75 µL de un buffer de Trizma-HCl, ajustado a pH = 8 y con una

concentración de 50 mM, a los cuales se adiciona 75  $\mu\text{L}$  de una solución del compuesto sintetizado por evaluar. Estas fueron preparadas como una serie de diluciones seriadas de dichos compuestos en buffer, de manera que su concentración final en los pocillos se encontrara entre 150 y 2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con una concentración máxima de 0.15% de DMSO. Posteriormente a cada pocillo le fue adicionado 25  $\mu\text{L}$  de una solución 15 mM de cloruro de acetiltiocolina (ATCl) y 125  $\mu\text{L}$  de una solución en buffer 3 mM del reactivo de Ellman (DTNB), de manera que ambos queden a una concentración final de 1.5 mM en el pocillo. Se hace una primera lectura de absorbancia tres veces consecutivas cada 45 s ( $\lambda=405$  nm).

Posteriormente se adiciona a cada pocillo 25  $\mu\text{L}$  de una solución en buffer 2 U/mL de la enzima acetilcolinesterasa, la cual se encuentra enriquecida con albúmina bovina sérica 0.1 mg/mL, quedando la AChE a una concentración final en el pocillo de 0.2 U/mL. Se lee entonces la absorbancia cinco veces consecutivas cada 45 s. Como un control del 100% de actividad enzimática, seis pocillos se preparan sin compuesto por evaluar, mientras que el incremento de la absorbancia causado por la hidrólisis espontánea del sustrato se corrige restando las absorbancias anteriores de las posteriores a la adición de la enzima. El porcentaje de inhibición se calcula empleando la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 1 - \left( \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

donde  $A_{\text{muestra}}$  es la diferencia de absorbancias entre los tiempos 0 y 225 s en presencia de los compuestos evaluados, y  $A_{\text{control}}$  es la diferencia de absorbancias entre los tiempos 0 y 225 s del control empleado del 100% de actividad enzimática. Tras graficar los porcentajes de inhibición contra las concentraciones empleadas, por interpolación se calculó la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de cada compuesto evaluado. Como control positivo se empleó galantamina. El ensayo se realizó 3 veces diferentes.

## Discusión de Resultados

### Ensayos de actividad antioxidante

#### Evaluación antioxidante mediante prueba de DPPH

La evaluación de actividad antioxidante mediante la prueba del secuestro del radical de DPPH fue planteada en un inicio como un análisis de concentraciones seriadas de los compuestos sintetizados, con el fin de extrapolar de una gráfica de concentración contra la actividad antioxidante el valor de la concentración efectiva 50 ( $EC_{50}$ ) para cada compuesto. Empleando los compuestos **9** NQ-2abu y **9a** NQ-2abu-Ac como modelos para el ajuste de condiciones, sus respectivas gráficas no mostraban un comportamiento lineal, además de mostrar resultados en su mayoría negativos. Dicho comportamiento en un principio fue atribuido a una posible interferencia por color de las naftoquinonas a la longitud de onda leída en esta técnica (a  $\lambda=571$  nm).

En literatura consultada, se encontró un ajuste para el caso de analitos coloridos (Olalere *et al.*, 2017) por lo que se aplicó dicho ajuste metodológico. Tras estos cambios se logró una respuesta lineal, con valores positivos de actividad antioxidante. Sin embargo, no se encontraban las concentraciones empleadas por encima del 50% de actividad, de manera que no fue posible determinar el  $EC_{50}$ . Se fueron aumentando las concentraciones evaluadas para encontrar dicho punto, si bien dicho aumento de concentración provocó problemas posteriores. El aumento de concentración implicó una coloración mayor de las soluciones preparadas, con el consiguiente aumento de absorbancia por parte del espectrofotómetro, hasta el punto de sobrepasar el rango de lectura del equipo antes de lograr sobrepasar el  $EC_{50}$ .

Se propuso entonces hacer evaluaciones de concentraciones fijas para los compuestos sintetizados, con el cambio de respuesta reportada al porcentaje de actividad a dicha concentración, que se determinó como 1 mg/mL. A dicha concentración, fueron obtenidos resultados desde 11.16% hasta 51.52% de inhibición para los compuestos sintetizados evaluados (Tabla 2.1). En dicho ensayo se incorporaron la 1,4-naftoquinona como control, ya que siendo el material de partida para la síntesis de todos los productos reportados se puede considerar la aportación de los fragmentos incorporados a dicho

esqueleto en la actividad antioxidante, junto con la vitamina C que es un conocido antioxidante. De los compuestos sintetizados, el compuesto **3** NQ-Pipe presentó problemas en la purificación posterior a su síntesis, donde se detectó su degradación a diferentes subproductos, por lo tanto, no fue incluido en la determinación de actividad antioxidante. Los compuestos **7** NQ-ClAn y **8** NQ-NOAn por su parte presentaron muy baja solubilidad frente a una serie de disolventes empleados en el laboratorio; en el caso de metanol (empleado en las pruebas antioxidantes) no se solubilizaron a la concentración de evaluación, por lo que su resultado tampoco pudo ser determinado.

El control positivo, vitamina C, fue el analito con mejor % de actividad antioxidante, con un 97%. Tanto la 1,4-naftoquinona como sus derivados tuvieron porcentajes menores, siendo los compuestos más activos **9a** NQ-2abu-Ac (51.52%), **5** NQ-3apr (46.33%) y 1,4-naftoquinona (44.73%). Los tres compuestos presentan diferencias estructurales entre ellos, siendo el mejor un derivado acetilado, seguido de un amino alcohol y el material de partida. El hecho de que el material de partida se encuentre entre los mejores resultados implica que la derivatización no implica siempre una mejora de actividad antioxidante, por lo que gran parte de la misma pudiera deberse al núcleo de naftoquinona y en menor medida a sus sustituciones.

Los derivados naftoquinónicos con incorporación de fragmentos alifáticos **1** NQ-Porp y **2** NQ-Buta se encuentran entre los compuestos con menor actividad antioxidante (Table 2.1) con 16.49% y 12.12% respectivamente, junto con **4** NQ-Bnca con 11.16% y cuyo fragmento es aromático. De los derivados con oxígeno en los fragmentos incorporados solamente **5a** NQ-3apr-Ac (15.91%) y **10** NQ-2aet (11.86%) los acompañan con un porcentaje de actividad antioxidante menor al 20%.

En la evaluación de las naftoquinonas con fragmentos de tipo amino alcohol se puede buscar inferir las relaciones estructura-actividad comparando con sus versiones acetiladas. Dado que uno de los productos posee el alcohol sobre un anillo aromático (**6** NQ-Tira) se evaluó a su vez la naftoquinona que posee el mismo anillo aromático sin el grupo alcohol con motivos de comparación (**12** NQ-Feam). A partir de los resultados de la Tabla 2.1, se puede observar que la acetilación de los grupos alcoholes no genera un cambio de actividad totalmente homogéneo, ya que en la mayoría de los casos la

acetilación aumenta la actividad antioxidante (**10a** NQ-2aet-Ac, **11a** NQ-1a2p-Ac, **9a** NQ-2abu-Ac) mientras que en esta disminuye en el caso de **5a** NQ-3apr-Ac.

**Tabla 2.1.** Porcentajes de actividad antioxidante DPPH.

| Compuesto <sup>a</sup> | % Actividad | D.E. |
|------------------------|-------------|------|
| <b>1</b> NQ-Prop       | 16.49       | 1.65 |
| <b>2</b> NQ-Buta       | 12.12       | 2.11 |
| <b>3</b> NQ-Pipe       | N.D.        | N.D. |
| <b>4</b> NQ-Bnca       | 11.16       | 1.21 |
| <b>5</b> NQ-3apr       | 46.33       | 0.54 |
| <b>5a</b> NQ-3apr-Ac   | 15.91       | 1.28 |
| <b>6</b> NQ-Tira       | 19.18       | 1.18 |
| <b>7</b> NQ-CIAn       | N.D.        | N.D. |
| <b>8</b> NQ-NOAn       | N.D.        | N.D. |
| <b>9</b> NQ-2abu       | 24.09       | 1.29 |
| <b>9a</b> NQ-2abu-Ac   | 51.52       | 0.62 |
| <b>10</b> NQ-2aet      | 11.86       | 0.80 |
| <b>10a</b> NQ-2aet-Ac  | 34.03       | 0.40 |
| <b>11</b> NQ-1a2p      | 28.52       | 1.13 |
| <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac  | 33.53       | 1.04 |
| <b>12</b> NQ-Feam      | 22.06       | 0.47 |
| 1,4-NQ                 | 44.73       | 0.88 |
| Vitamina C             | 97.00       | 0.08 |

<sup>a</sup>. Concentración 1 mg/mL. D.E.: Desviación estándar.

### Evaluación antioxidante mediante prueba de ABTS

En el ensayo del secuestro del catión radical de ABTS la absorbancia en el espectrofotómetro se lee a una longitud de onda diferente al DPPH, siendo en esta ocasión a  $\lambda=754$  nm. Debido a esto no se manejó una corrección de color; sin embargo, al igual que en el ensayo anterior se analizaron los compuestos a la misma concentración fija de 1 mg/mL, empleando los mismos controles usados en DPPH. No se pudo determinar el resultado de porcentaje de actividad antioxidante para los compuestos **3** NQ-Pipe, **7** NQ-CIAn y **8** NQ-NOAn por las mismas razones expuestas en el apartado de la técnica de DPPH.

Como se observa en la Tabla 2.2, en este ensayo nuevamente el control positivo (vitamina C) fue quien mostró un mejor resultado con una 99.85% de actividad

antioxidante. Del resto de compuestos analizados, solamente 1,4-naftoquinona pasó del 10% de actividad (10.27%) junto con **1** NQ-Prop (17.75%), **2** NQ-Buta (33.90%) y **6** NQ-Tira, con un 47.13%, siendo el mejor compuesto de tipo naftoquinona evaluado, con una diferencia notable entre estos dos últimos y el resto de compuestos sintetizados. La característica principal de **6** NQ-Tira es la presencia del grupo fenol, lo cual pudiera estar relacionado con su resultado, ya que normalmente los compuestos fenólicos suelen tener buenos resultados de actividad antioxidante en el ensayo de ABTS (Kuskoski, *et al.* 2005; Nenadis *et al.* 2004). Sin embargo, vemos que los siguientes mejores resultados **2** NQ-Buta y **1** NQ-Prop tienen en su fragmento incorporado un grupo de naturaleza muy diferente, siendo cadenas alifáticas lineales. De manera general, por medio de esta técnica no se observan actividades antioxidantes elevadas.

**Tabla 2.2.** Porcentajes de actividad antioxidante ABTS.

| Compuesto <sup>a</sup> | % Actividad | D.E. |
|------------------------|-------------|------|
| <b>1</b> NQ-Prop       | 17.75       | 0.29 |
| <b>2</b> NQ-Buta       | 33.90       | 0.93 |
| <b>3</b> NQ-Pipe       | N.D.        | N.D. |
| <b>4</b> NQ-Bnca       | 5.38        | 0.08 |
| <b>5</b> NQ-3apr       | 7.43        | 0.15 |
| <b>5a</b> NQ-3apr-Ac   | -0.89       | 0.61 |
| <b>6</b> NQ-Tira       | 47.13       | 0.73 |
| <b>7</b> NQ-ClAn       | N.D.        | N.D. |
| <b>8</b> NQ-NOAn       | N.D.        | N.D. |
| <b>9</b> NQ-2abu       | 0.91        | 0.11 |
| <b>9a</b> NQ-2abu-Ac   | 1.55        | 0.06 |
| <b>10</b> NQ-2aet      | 0.36        | 0.12 |
| <b>10a</b> NQ-2aet-Ac  | 4.50        | 0.30 |
| <b>11</b> NQ-1a2p      | 1.25        | 0.03 |
| <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac  | 1.71        | 0.25 |
| <b>12</b> NQ-Feam      | 1.40        | 0.10 |
| 1,4-NQ                 | 10.27       | 0.06 |
| Vitamina C             | 99.85       | 0.00 |

<sup>a</sup> Concentración 1 mg/mL. D.E.: Desviación estándar.

### Evaluación antioxidante

En la Tabla 2.3 se puede encontrar el concentrado de resultados de actividad antioxidante tanto por la técnica de DPPH como por ABTS. En la primera técnica se observaron mejores resultados, si bien en ambos casos no se logró igualar ni superar a la vitamina C. No coinciden los mejores resultados para cada prueba, siendo en DPPH **9<sup>a</sup>** NQ-2abu-Ac el mejor resultado (51.52%) mientras que en ABTS fue **6** NQ-Tira (47.13%).

Sin embargo, se puede observar un patrón en la comparación de los derivados de tipo amino alcohol con su respectivo derivado acetilado. Como se mencionó en DPPH, solamente la versión acetilada de **5** NQ-3apr disminuyó su actividad antioxidante comparado con el amino alcohol que le precede, siendo en las otras parejas de compuestos mejor el resultado de los compuestos acetilados. En ABTS se observa la misma tendencia de mejora de los productos acetilados, siendo **5** NQ-3apr de nuevo la excepción.

**Tabla 2.3.** Concentrado de porcentajes de actividad antioxidante.

| Compuesto <sup>a</sup> | % de Actividad |              |
|------------------------|----------------|--------------|
|                        | DPPH           | ABTS         |
| <b>1</b> NQ-Prop       | 16.49 ± 1.65   | 17.75 ± 0.29 |
| <b>2</b> NQ-Buta       | 12.12 ± 2.11   | 33.90 ± 0.93 |
| <b>3</b> NQ-Pipe       | N.D.           | N.D.         |
| <b>4</b> NQ-Bnca       | 11.16 ± 1.21   | 5.38 ± 0.08  |
| <b>5</b> NQ-3apr       | 46.33 ± 0.54   | 7.43 ± 0.15  |
| <b>5a</b> NQ-3apr-Ac   | 15.91 ± 1.28   | -0.89 ± 0.61 |
| <b>6</b> NQ-Tira       | 19.18 ± 1.18   | 47.13 ± 0.73 |
| <b>7</b> NQ-ClAn       | N.D.           | N.D.         |
| <b>8</b> NQ-NOAn       | N.D.           | N.D.         |
| <b>9</b> NQ-2abu       | 24.09 ± 1.29   | 0.91 ± 0.11  |
| <b>9a</b> NQ-2abu-Ac   | 51.52 ± 0.62   | 1.55 ± 0.06  |
| <b>10</b> NQ-2aet      | 11.86 ± 0.80   | 0.36 ± 0.12  |
| <b>10a</b> NQ-2aet-Ac  | 34.03 ± 0.40   | 4.50 ± 0.30  |
| <b>11</b> NQ-1a2p      | 28.52 ± 1.13   | 1.25 ± 0.03  |
| <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac  | 33.53 ± 1.04   | 1.71 ± 0.25  |
| <b>12</b> NQ-Feam      | 22.06 ± 0.47   | 1.40 ± 0.10  |
| 1,4-NQ                 | 44.73 ± 0.88   | 10.27 ± 0.06 |
| Vitamina C             | 97.00 ± 0.08   | 99.85 ± 0.00 |

<sup>a</sup> Concentración 1 mg/mL.

## Ensayo de actividad inhibitoria enzimática

### Evaluación de inhibición de AChE

El análisis de inhibición enzimática de acetilcolinesterasa se realizó con los mismos derivados a los cuales se les determinó su capacidad antioxidante mediante DPPH y ABTS. El compuesto **3** NQ-Pipe, por sus problemas de purificación y degradación no pudo ser incluido en esta evaluación, aunque sí se incorporó al análisis con la enzima de manera *in silico* para poder compararlo con el resto de compuestos sintetizados en el presente trabajo. Por otra parte, ya que las concentraciones empleadas en esta determinación son mucho menores a las trabajadas en las técnicas antioxidantes, sí se pudo analizar a los compuestos **7** NQ-CIAn y **8** NQ-NOAn. Como control positivo en esta evaluación se empleó galantamina, el cual es un fármaco usado en la práctica clínica en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

De todas las naftoquinonas evaluadas, ninguna obtuvo un valor de inhibición de AchE cercano al de galantamina, el cual fue el compuesto más activo con una  $CI_{50}$  de 0.313  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 2.4). En el caso de los derivados amino alcohol, todos fueron más activos que sus versiones acetiladas, las cuales no tuvieron una  $CI_{50}$  por debajo de la concentración máxima evaluada (187.5  $\mu\text{g/mL}$ ). La excepción a esto es la pareja de compuestos **9** NQ-2abu y **9<sup>a</sup>** NQ-2abu-Ac, ya que ninguno presenta una  $CI_{50}$  menor a esta concentración. De manera general se puede considerar entonces que la presencia del alcohol libre facilita la interacción con AchE.

Otra relación que parece detectarse al menos con los derivados con fragmentos amino alcohol es la relación entre su inhibición de AchE con su hidrofobicidad. Esta se calculó mediante el servidor de cálculo de propiedades farmacocinéticas y farmacológicas SwissADME (Daina, Michielin y Zoete, 2017), cuyos resultados pueden encontrarse parcialmente en la Tabla 2.5. El compuesto **10** NQ-2aet que tiene el fragmento amino alcohol en una cadena alquílica de dos carbonos posee un  $\text{Log } P$  de 0.95 y una  $CI_{50}$  de 19.6  $\mu\text{g/mL}$ ; los compuestos **5** NQ-3apr y **11** NQ-1<sup>a</sup>2p aumentan a tres carbonos la parte alquílica de su fragmento aminoalcohol y su  $\text{Log } P$  incrementa a 1.38 y 1.28 respectivamente, mientras que su inhibición disminuye ( $CI_{50}$  de 34.3 y 42.2  $\mu\text{g/mL}$ ). Por último, **9** NQ-2abu posee cuatro carbonos en su cadena alquílica y su  $\text{Log } P$  es mayor con 1.5, no mostrando actividad inhibitoria a la concentración evaluada.

En el caso de **12** NQ-Feam y **6** NQ-Tira, ambos presentan en su estructura un anillo aromático que las otras naftoquinonas no presentan. Ambos muestran inhibición a las concentraciones evaluadas, lo cual puede explicarse debido a la presencia de dicho anillo aromático, ya que pueden tener interacciones  $\pi$ - $\pi$  con AchE, siendo esta una de las principales interacciones con la enzima que suelen tener sus inhibidores (Zhao et al. 2017; Mughal et al. 2017; De la Torre et al. 2012). Sin embargo, **12** NQ-Feam fue de los compuestos menos activos de los cuales se pudo determinar la  $IC_{50}$ , con un resultado de 84.9  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, **6** NQ-Tira fue el mejor resultado de las naftoquinonas con una  $IC_{50}$  de 17.2  $\mu\text{g/mL}$ . La única diferencia entre ambos compuestos es la presencia del grupo hidroxilo, por lo que se puede asumir que dicho grupo es fundamental para darle a **6** NQ-Tira la interacción adecuada con la enzima.

En cuanto a los compuestos sintetizados que no presentan el fragmento amino alcohol, libre o acetilado, se observa una inhibición muy baja de la enzima. **1** NQ-Prop presenta de las menores actividades que se pudieron determinar debajo de la concentración máxima evaluada de 187.5  $\mu\text{g/mL}$ , con una  $CI_{50}$  de 122.7  $\mu\text{g/mL}$ . Ya que para **4** NQ-Bnca se calculó una  $CI_{50}$  muy cercana a esta concentración máxima de evaluación, se repitió su análisis con una concentración máxima de 375  $\mu\text{g/mL}$ , de esta manera se determinó su  $CI_{50}$  en 247.3  $\mu\text{g/mL}$ . Tanto este compuesto, como los derivados con fragmentos de anilina incorporados **7** NQ-ClAn y **8** NQ-NOAn, a pesar de poseer un anillo aromático en su estructura que pudiera contribuir con las interacciones con la enzima, no presentan actividad significativa, al contrario del caso de **12** NQ-Feam y **6** NQ-Tira.

Por último, como puede observarse en la Tabla 2.5, todos los compuestos sintetizados poseen propiedades fisicoquímicas adecuadas para considerarse potenciales fármacos, según la regla de Lipinski de la cual no presentan ninguna violación, además de que todos poseen a su vez una alta absorción gastrointestinal. Pensando en que la inhibición de AchE humana puede relacionarse al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, observamos que no todos los compuestos son capaces de atravesar la membrana hematoencefálica; sin embargo, ninguno de ellos es un potencial sustrato para la P-gp. Ya que esta glicoproteína se relaciona con el flujo de xenobióticos fuera de barreras como la hematoencefálica, los productos sintetizados y futuros derivados que la pueden atravesar no

serían bombeados fuera de ella, lo cual podría ayudar en su actividad inhibitoria de la AchE.

**Tabla 2.4.** Actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.

| Compuesto             | CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± D.E. | CI <sub>50</sub> (mM) |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <b>1</b> NQ-Prop      | 122.7 ± 9.06                    | 0.5700                |
| <b>2</b> NQ-Buta      | >187.5                          | -                     |
| <b>3</b> NQ-Pipe      | N.D.                            | N.D.                  |
| <b>4</b> NQ-Bnca      | 247.3 ± 31.42                   | 0.9392                |
| <b>5</b> NQ-3apr      | 34.3 ± 3.6                      | 0.1483                |
| <b>5a</b> NQ-3apr-Ac  | >187.5                          | -                     |
| <b>6</b> NQ-Tira      | 17.2 ± 3.6                      | 0.0586                |
| <b>7</b> NQ-ClAn      | >187.5                          | -                     |
| <b>8</b> NQ-NOAn      | > 375.0                         | -                     |
| <b>9</b> NQ-2abu      | >187.5                          | -                     |
| <b>9a</b> NQ-2abu-Ac  | >187.5                          | -                     |
| <b>10</b> NQ-2aet     | 19.6 ± 1.3                      | 0.0902                |
| <b>10a</b> NQ-2aet-Ac | >187.5                          | -                     |
| <b>11</b> NQ-1a2p     | 42.2 ± 2.3                      | 0.1825                |
| <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac | >187.5                          | -                     |
| <b>12</b> NQ-Feam     | 84.9 ± 8.3                      | 0.3061                |
| Galantamina           | 0.313 ± 0.014                   | 0.0011                |

D.E.: Desviación estándar.

**Tabla 2.5.** Propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de los compuestos sintetizados.

| Compuesto      | PM     | Dadores H | Aceptores H | TPSA  | Log P consensuado | Log S (Ali) | Clase (Ali) <sup>a</sup> | Abs. GI | Permea BHE | Sustrato Pgp | Lipinski |
|----------------|--------|-----------|-------------|-------|-------------------|-------------|--------------------------|---------|------------|--------------|----------|
| 1 NQ-Prop      | 215.25 | 1         | 2           | 46.17 | 2.08              | -3.37       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 2 NQ-Buta      | 229.27 | 1         | 2           | 46.17 | 2.41              | -3.75       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 3 NQ-Pipe      | 241.29 | 0         | 2           | 37.38 | 2.39              | -3.71       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 4 NQ-Bnca      | 263.29 | 1         | 2           | 46.17 | 2.66              | -3.87       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 5 NQ-3apr      | 231.25 | 2         | 3           | 66.4  | 1.38              | -3.1        | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 5a NQ-3apr-Ac  | 273.28 | 1         | 4           | 72.47 | 1.79              | -3.26       | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 6 NQ-Tira      | 293.32 | 2         | 3           | 66.4  | 2.56              | -4.59       | M. soluble               | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 7 NQ-ClAn      | 283.71 | 1         | 2           | 46.17 | 3                 | -4.12       | M. soluble               | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 8 NQ-NOAn      | 294.26 | 1         | 4           | 91.99 | 1.77              | -4.25       | M. soluble               | Alta    | No         | No           | 0        |
| 9 NQ-2abu      | 245.27 | 2         | 3           | 66.4  | 1.5               | -3.04       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 9a NQ-2abu-Ac  | 287.31 | 1         | 4           | 72.47 | 1.95              | -3.76       | Soluble                  | Alta    | Sí         | No           | 0        |
| 10 NQ-2aet     | 217.22 | 2         | 3           | 66.4  | 0.95              | -2.22       | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 10a NQ-2aet-Ac | 259.26 | 1         | 4           | 72.47 | 1.49              | -2.94       | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 11 NQ-1a2p     | 231.25 | 2         | 3           | 66.4  | 1.28              | -2.67       | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 11a NQ-1a2p-Ac | 273.28 | 1         | 4           | 72.47 | 1.73              | -3.4        | Soluble                  | Alta    | No         | No           | 0        |
| 12 NQ-Feam     | 277.32 | 1         | 2           | 46.17 | 3                 | -4.54       | M. soluble               | Alta    | Sí         | No           | 0        |

<sup>a</sup>: M. soluble: Moderadamente soluble.

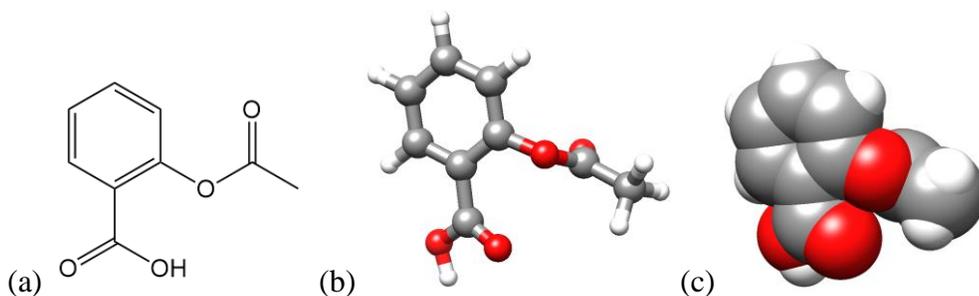
PM: Peso molecular; Dadores H: Número de dadores de enlace de hidrógeno; Aceptores H: Número de aceptores de enlace de hidrógeno; TPSA: área superficial polar topológica; Log P: logaritmo de coeficiente de partición; Log S (Ali): modelo de logaritmo de solubilidad molar en agua de Ali *et al.*, 2012a; Abs. GI: absorción gastrointestinal; BHE: barrera hematoencefálica; Pgp: glicoproteína de permeabilidad; Lipinski: número de violaciones a la regla de Lipinski.

## Capítulo 3. Química Computacional: Acoplamiento molecular automatizado

### Generalidades

#### 1. Modelado molecular en el Diseño de Fármacos asistido por computadora (CADD)

La incorporación cada vez más cotidiana de los diversos avances en el área de la computación en el diseño de fármacos ha permitido que esta área se haya consolidado por su cuenta propia, de tal manera que ahora se habla del diseño de fármacos asistido por computadora o CADD por sus siglas en inglés (*Computer Aided Drug Design*). Una parte inicial del uso de computadoras con este fin es poder realizar un modelado molecular, que comienza desde que nos apoyamos en computadoras para visualizar moléculas en tres dimensiones; sin embargo y con el paso del tiempo este modelado permite mucho más que una simple visualización, ya que puede incorporar una serie de cálculos que nos permiten conocer más a las moléculas representadas, analizarlas desde un nivel atómico hasta el de interacciones de moléculas diferentes (Foye, Lemke y Williams, 2008).



**Figura 3.1.** Representación y modelado molecular de la estructura de aspirina. (a) Estructura química en dos dimensiones (b) Modelo molecular de esferas y barras (c) Modelo molecular de espacio lleno.

El modelado molecular puede llevarse a cabo en diferentes niveles, los cuales representan a los átomos en el modelo de diferentes formas matemáticas para lograr su correcta representación. Básicamente puede comenzar representado a los átomos como una matriz de coordenadas en un sistema de coordenadas Cartesianas para tres dimensiones (Bharatam, 2021) (Figura 3.1). El análisis de las energías e interacciones de estos átomos en el modelado molecular puede llevarse por diferentes métodos en dos categorías: por mecánica cuántica y por mecánica molecular. Los métodos en estas categorías pueden contener diferentes niveles de teoría y precisión en sus cálculos, donde de manera general

los métodos más teóricos son más precisos pero requieren de mayor poder computacional y tiempo de cálculo, mientras que otros niveles pueden ir incluyendo diversas aproximaciones y ser menos teóricos y más prácticos, donde la precisión puede disminuir pero con ella el poder de cómputo necesario.

Dentro de los métodos de la mecánica cuántica, encontramos los *ab initio*, donde desde su nombre en latín se indica que los cálculos se hacen “desde el inicio” a partir de la teoría y fórmulas de la química cuántica para cada electrón, por lo que los cálculos son muy precisos pero requieren de un alto poder de cómputo, y por lo tanto son más útiles para moléculas pequeñas. Otro método en esta categoría es la Teoría del Funcional de la Densidad o *DFT* (del inglés *Density Functional Theory*), donde a diferencia de los métodos *ab initio* que calculan a los electrones en su función de onda, aquí se realizan los cálculos en función de la densidad electrónica de las moléculas. Un tercer método en esta categoría son los semiempíricos, que hacen algunas aproximaciones para ciertos términos en las fórmulas cuánticas, e incluso incluyen parámetros basados en información experimental.

En cuanto a los métodos de modelado molecular basados en la mecánica molecular, estos se basan en una descripción de las moléculas con física clásica, donde por ejemplo los átomos y enlaces pueden ser equiparados con esferas y resortes. La energía del sistema puede considerarse la suma de las fuerzas inter e intramoleculares, evaluando un par de átomos a la vez, e incluyendo las interacciones mediadas por enlaces o las que no están mediadas por enlaces (como fuerzas electrostáticas o de van der Waals). Las coordenadas internas e interacciones de no enlace se incluyen en los llamados campos de fuerza (*force fields*) para el cálculo de la energía potencial de un sistema de moléculas (Foye, Lemke y Williams, 2008).

Otros métodos de modelado molecular ampliamente usados son los protocolos de dinámica molecular. Estos incluyen en modelos la inclusión de parámetros temporales, para evaluar los sistemas y su evolución energética con el paso del tiempo, fluctuaciones estructurales y transiciones conformacionales. Es un método popular en la búsqueda de un conformero de baja energía al estudiar fármacos y proteínas en sus interacciones. Iniciando del modelo de las moléculas por estudiar, se aplican fuerzas sobre los átomos y se propaga el sistema en el tiempo según las ecuaciones de Newton sobre el movimiento; el conjunto de resultados de las velocidades de las partículas y sus coordenadas se conoce como

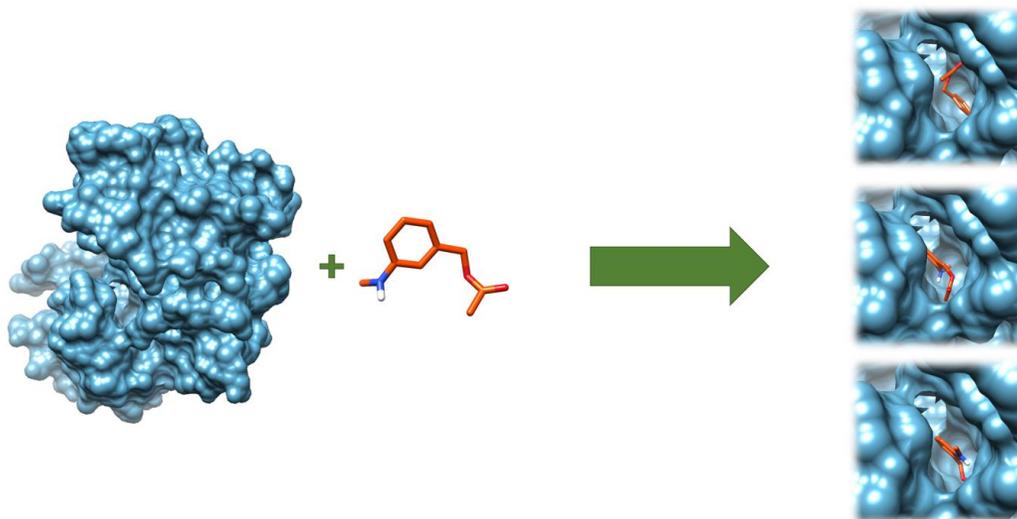
trayectorias (Foye, Lemke y Williams, 2008; Friedman, Boye y Flatmark, 2013). Por último, cabe mencionar las simulaciones de Monte Carlo, que empleado dentro del *CADD* también sirven para buscar conformaciones moleculares donde se pueden calcular energías y propiedades termodinámicas, donde a diferencia de la dinámica molecular que van alterando las conformaciones en pasos discretos, el método Monte Carlo por generar cierta aleatoriedad en sus análisis explora el espacio haciendo cambios bruscos en la estructura y promediando los resultados obtenidos (Foye, Lemke y Williams, 2008; Kroese *et al.*, 2014). Por otra parte, también pueden emplearse metodologías basadas en Monte Carlo para realizar estudios de relación-estructura actividad que guíen el diseño y cribado virtual de fármacos (Gaikwad *et al.*, 2018; Kumar, Kumar y Sindhu, 2019; Amin *et al.*, 2021).

## 2. Acoplamiento molecular automatizado, *docking*

Una herramienta dentro del modelado molecular que ha tenido amplia difusión es la de acoplamiento molecular automatizado, también conocida por su término en inglés *docking*. Esta técnica, que es parte del denominado diseño de fármacos basado en estructuras y que comenzó a emplearse en la década de los 1970's, parte de las estructuras tridimensionales de un ligando y un receptor para analizar las diferentes poses que puede adquirir el ligando durante su interacción, partiendo en un principio de las uniones ligando-receptor geométricas que embonan entre sí como piezas de un rompecabezas, hasta la inclusión de cálculos energéticos avanzados para estudiar dichas interacciones o complementando con modelizaciones de dinámica molecular (Figura 3.2) (Pinzi y Rastelli, 2019).

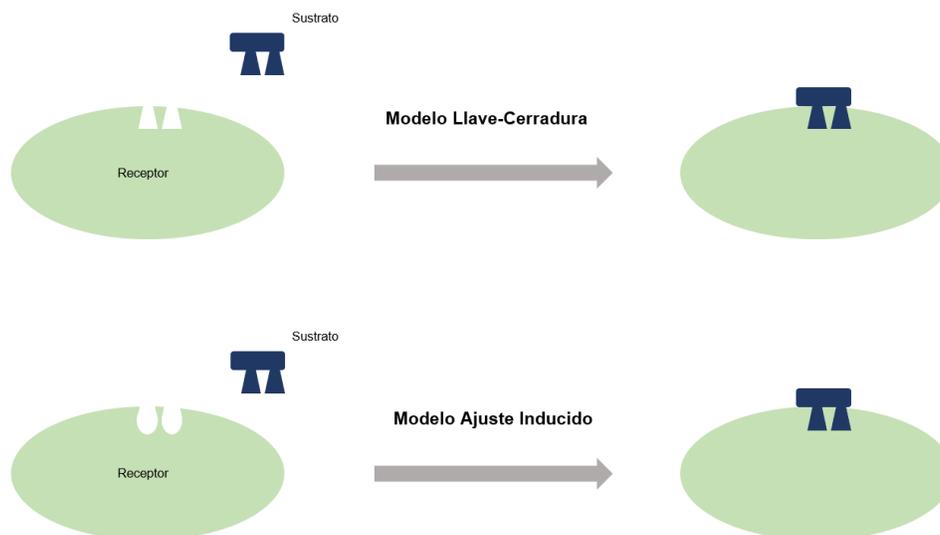
Las bases de esta complementariedad entre ligando y receptor pueden explicarse mediante dos modelos que se han desarrollado en el campo del estudio de las enzimas, que suelen ser dianas típicas para el desarrollo de fármacos: el modelo de llave-cerradura y el modelo de ajuste inducido. El modelo de llave-cerradura, propuesto por Emil Fischer, propone que un ligando actúa como una llave, que geoméricamente se complementa con un espacio en la enzima (la cerradura). Un estudio de *docking* buscaría precisamente la forma adoptada por un ligando que pueda funcionar como esta llave conceptual para poder ejercer su función contra una diana. Sin embargo, este modelo no alcanza a explicar todos los casos de inhibición enzimática, razón por la cual se desarrolló el modelo de ajuste

inducido: tanto las enzimas como los ligandos no son rígidos, sino que tanto el ligando puede adoptar diferentes poses como la enzima ajustar la disposición de sus aminoácidos en el sitio en el que interactúa con el ligando para ajustar la forma en que se complementan (Figura 3.3) (Koshland Jr., 1995; Fan, Fu y Zhang, 2019).



**Figura 3.2.** Representación de una enzima y ligando que son sometidos a un acoplamiento molecular automatizado.

Basándose en estos modelos, así como en el nivel de computación del cual se disponga, es que se pueden describir tres tipos de análisis de acoplamiento molecular automatizado, del que suele requerir mayor tiempo y recursos computacionales en orden del primero al último. El primero es el *docking* rígido, donde tanto el ligando como el receptor son precisamente rígidos y solamente se va cambiando la pose del ligando durante el estudio antes de analizar las diferentes interacciones que presenten. El segundo es el rígido-flexible, donde se le da flexibilidad al ligando mientras que el receptor se mantiene rígido. Es el tipo de *docking* más empleado, ya que está en un punto intermedio de eficacia contra el tiempo computacional requerido. Por último, se encuentra el *docking* flexible, que otorga esta característica tanto al ligando como al receptor. Aunque requiere de un alto poder computacional, es el que tiene mayor precisión; la flexibilidad se puede dar al receptor por completo, o solamente a algunas cadenas laterales de aminoácidos (Meng *et al.*, 2011; Fan, Fu y Zhang, 2019).



**Figura 3.3.** Modelo de llave-cerradura y de ajuste inducido.

Parte de este acoplamiento molecular automatizado requiere de algoritmos que puedan ir muestreando las diferentes poses de los ligandos. Estos algoritmos de muestreo pueden ser por ejemplo los algoritmos de pareo, basados en términos de forma o geométricos e información química, los algoritmos de construcción incremental, basados en el *docking* por fragmentos de los ligandos que se van agregando incrementalmente, o en algoritmos genéticos o de tipo Monte Carlo, que se basan en búsquedas estocásticas del espacio conformacional, entre otros (Meng *et al.*, 2011).

Una vez que se han explorado las diferentes conformaciones posibles de los ligandos contra el receptor, se debe dar un puntaje que permita discriminar entre dichas conformaciones para encontrar los mejores resultados. Para ellos se emplean funciones de puntaje, que pueden clasificarse de manera general en tres categorías: funciones basadas en conocimiento, funciones empíricas y funciones basadas en campos de fuerza. Como lo sugiere su nombre, las primeras se basan en interacciones determinadas en complejos proteína-ligando experimentales. Las funciones empíricas suman interacciones entálpicas y entrópicas a las que se les da un valor de relevancia según se ajusten a afinidades determinadas experimentalmente; mientras que las funciones basadas en campos de fuerza aunque también van sumando las contribuciones de diferentes interacciones, éstas se derivan de fenómenos fisicoquímicos y no de afinidades experimentales (Mohan *et al.*,

2005). Ya que la eficacia del *docking* depende en buena parte de estas funciones de puntaje, nuevas funciones continúan desarrollándose, y recientemente se han incorporado técnicas de aprendizaje automatizado (una rama de la inteligencia artificial) para crear funciones de puntaje que presentan mejoras al predecir afinidades de la unión ligando-receptor o al emplear el *docking* para realizar cribados virtuales (Shen *et al.*, 2020).

Si bien en un principio esta técnica se empleó para entender la interacción de compuestos con sus dianas moleculares, con el paso de los años las aplicaciones han ido en aumento. Por ejemplo, con los cribados virtuales ya mencionados, o prediciendo reacciones adversas al encontrar dianas diferentes a las que un compuesto se pueda unir sin ser este el caso deseado. También el empleo del acoplamiento molecular automatizado se ha dado para identificar compuestos que se puedan unir a un conjunto de dianas de interés, fomentando la polifarmacología de esta manera, o encontrando nuevas dianas terapéuticas para fármacos ya en mercado, lo que se conoce como reposicionamiento de fármacos (Luo *et al.*, 2018; Pinzi y Rastelli, 2019; Agarwal *et al.*, 2019; Ibezim *et al.*, 2021). Por último, también puede darse el caso de la pesca de blancos o dianas (*target fishing*) al aplicar un acoplamiento molecular automatizado reverso; esto es cuando para una molécula de interés no se conoce su diana terapéutica y por lo tanto se le realiza un *docking* contra numerosas dianas posibles para encontrar la cual pudiera ser responsable de su actividad biológica (Lapillo *et al.*, 2019; Stepanova *et al.*, 2021).

## Metodología

### Acoplamiento molecular automatizado de productos sintetizados con Acetilcolinesterasa

Los derivados de naftoquinona sintetizados fueron analizados *in silico* como posibles agentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Para ello, se empleó un modelo tridimensional de la enzima, caracterizada mediante espectroscopía de rayos X, que se encuentra disponible en Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) (Berman *et al.*, 2000), una base de datos de libre acceso con modelos tridimensionales de diferentes proteínas. Se generaron a su vez modelos moleculares de los productos sintetizados, y se empleó AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010) como algoritmo para llevar a cabo el acoplamiento molecular automatizado o *docking*.

Los pasos necesarios para realizar dicho experimento consisten en la preparación de los modelos de los ligandos seleccionados, así como la del modelo del receptor (acetilcolinesterasa) previamente a la programación del análisis de docking. Dichos pasos son detallados a continuación.

#### Preparación de los ligandos.

Para cada uno de los ligandos sintetizados se generó un modelo molecular mediante el software UCSF Chimera (Pettersen, 2004). Esto se realizó mediante el ingreso del código SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) de cada producto, el cual es una cadena corta de caracteres de código ASCII para la representación de estructuras químicas (Weininger, 1988). El código SMILES se obtuvo de la representación gráfica de los productos en ChemDraw (PerkinElmer Informatics).

Una vez generado el modelo del ligando en cuestión, se procedió a realizar un minimizado de energía como medio de corrección de la estructura mediante UCSF Chimera empleando sus condiciones por defecto (Tabla 3.1) que incluyen parámetros del programa de Amber, Antechamber.

Posteriormente se empleó AutoDock Tools 1.5.6 (Sanner, 1999) para establecer los enlaces rotables de la estructura química y realizar el cálculo de cargas atómicas mediante

el algoritmo Gasteiger, salvando el archivo final para cada ligando en formato .pdbqt para su posterior uso.

**Tabla 3.1.** Condiciones de minimizado de energía mediante UCSF Chimera.

|                                                    |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| Pasos del método de Descenso máximo                | 100     |
| Tamaño del paso, método de Descenso máximo (Å)     | 0.02    |
| Pasos del método de Gradiente conjugado            | 10      |
| Tamaño del paso, método de Gradiente conjugado (Å) | 0.02    |
| Intervalo de actualización                         | 10      |
| Átomos fijos                                       | Ninguno |

### Preparación del receptor.

El modelo molecular de acetilcolinesterasa se obtuvo mediante su descarga de Protein Data Bank, con el código identificador 1EVE (Kryger *et al.*, 1999). La preparación del receptor se realizó con AutoDock Tools. Se removió el ligando co-cristalizado con el receptor, el fármaco donepezilo, y moléculas de N-acetil-D-glucosamina que se encontraban en el mismo modelo descargado.

Posteriormente, se removieron las moléculas de agua presentes, y se hizo la adición de los hidrógenos faltantes en la estructura de la enzima. Con el mismo programa de AutoDock Tools se seleccionó una red sobre la enzima, con la cual se calculan las cargas Gasteiger sobre cada átomo, para después unir los hidrógenos no polares sobre el esqueleto de la enzima. Este receptor ya preparado se salva también en formato .pdbqt para su posterior uso.

### Docking del ligando-receptor.

Para llevar a cabo el *docking* se empleó desde AutoDock Tools el algoritmo AutoDock Vina. Las condiciones del análisis fueron la creación de una “caja” para el *docking* de tamaño  $30 \times 30 \times 30$  Å, con el centro de la caja en las siguientes coordenadas:

$$\text{Eje x} = 2.27731$$

$$\text{Eje y} = 63.7499$$

$$\text{Eje z} = 65.4998$$

Se generaron 10 poses por análisis, con un valor de exhaustividad de 8; para cada ligando se realizó el análisis por quintuplicado. Para revisar los resultados generados se empleó UCSF Chimera como programa visualizador.

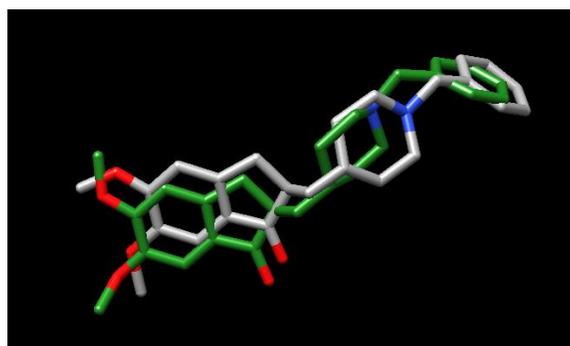
Previo al análisis de *docking* para cada ligando sintetizado, se realizó una validación del protocolo. Esto se hizo mediante un *docking* del donepezilo, el fármaco co-cristalizado en el modelo del receptor descargado originalmente, usando todas las condiciones con las que se pretende analizar los ligandos de este trabajo. La pose resultado del donepezilo tras su *docking* se comparó con el donepezilo co-cristalizado mediante un análisis de sus RMSD (Root-mean-square deviation, raíz de la desviación cuadrática media).

## Discusión de Resultados

### Acoplamiento molecular automatizado con Acetilcolinesterasa

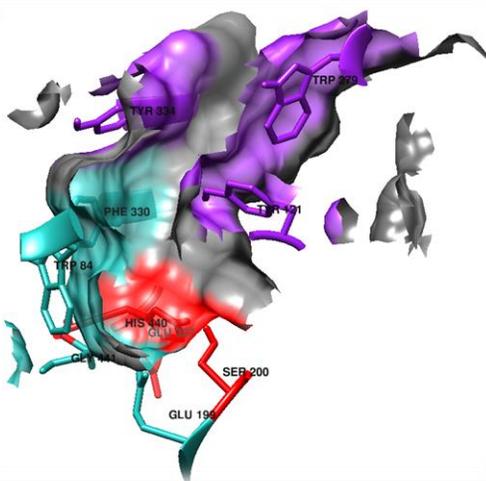
El modelo molecular de acetilcolinesterasa descargado desde Protein Data Bank (1EVE) representa a la AChE de la raya eléctrica del Pacífico, o torpedo del Pacífico (*Tetronarce californica* (*Torpedo californica*)). Su alta similitud con la AChE humana permite su empleo en estudios de acoplamiento molecular automatizado (Kryger *et al.*, 1999).

Para validar el protocolo de acoplamiento molecular automatizado (*docking*) se emplearon las mismas condiciones de análisis de los ligandos al donepezilo, que se encontraba co-cristalizado en el modelo de AChE descargado. La pose resultante se comparó mediante su valor de RMSD con el donepezilo original, lo cual nos permite superponer ambas estructuras y comparar las distancias entre cada par de átomos iguales, de esta manera un valor de RMSD menor nos permite identificar estructuras de modelos más parecidas entre sí que aquellas que tiene un valor de RMSD mayor. La literatura comenta que un valor de RMSD menor de 1.5-2 Å nos permite validar un protocolo de *docking* (Hevener *et al.*, 2009), es decir, que el método es adecuado para predecir las poses generadas para los ligandos analizados. Dado que el RMSD de los donepezilos, calculado y co-cristalizado, fue de 1.1 Å, se consideró válido el protocolo propuesto en este trabajo para el *docking* con AChE (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Validación del *docking* de AChE con RMSD = 1.141. (Donepezilo original, color gris; donepezilo calculado, verde).

Como puede observarse en la Figura 3.5, el sitio catalítico de la enzima AChE consiste en una cavidad de aproximadamente 20 Å de profundidad. Los aminoácidos encargados de la actividad catalítica (conocidos como la tríada catalítica) son los residuos Ser200, His440 y Glu327. Otras dos regiones identificadas en esta cavidad, y que son sitios importantes de reconocimiento e interacción con ligandos de la enzima, son el CAS o sitio central aniónico (color azul claro en la Figura 3.5) y el PAS o sitio periférico aniónico (color morado en la Figura 3.5). Residuos de aminoácidos importantes en estas zonas son el Trp84, Glu199, Phe330 y Gly441 en el CAS, y Tyr70, Tyr121, Trp279 y Tyr334 en el PAS.

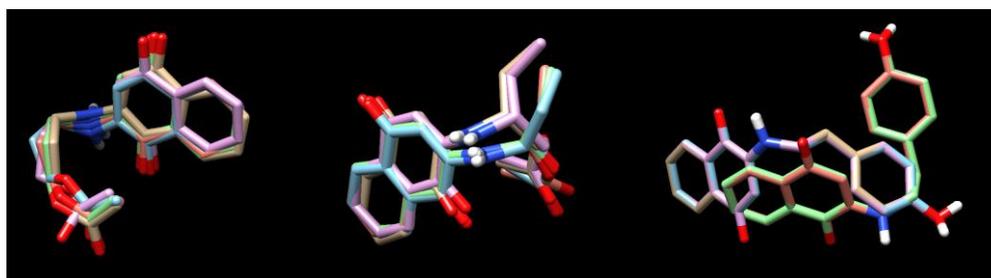


**Figura 3.5.** Cavidad catalítica de la enzima AChE. (Tríada catalítica, rojo; CAS, azul claro; PAS, morado).

Se generó un modelo molecular para los derivados de 1,4-naftoquinona sintetizados. En el caso de los compuestos con centro quiral, **9** NQ-2abu y **9a** NQ-2abu-Ac, el centro quiral proviene desde el precursor 2-amino butanol. Dicho reactivo consistía solamente en el isómero (*S*), por lo que la configuración se mantiene para el producto **9** NQ-2abu y su versión acetilada, **9a** NQ-2abu-Ac. Otro aminoalcohol incorporado sobre el núcleo naftoquinona fue el 1-amino-2-propanol; debido a que este reactivo se encuentra en forma de mezcla racémica, la síntesis de **11** NQ-1a2p y **11a** NQ-1a2p-Ac generó un par de enantiómeros en cada caso. Debido a esto, al momento de generar el modelo molecular para

estos productos se generó un modelo para cada enantiómero, los cuales de manera independiente se analizaron mediante la técnica de *docking* con el receptor AChE.

Al analizar el quintuplicado realizado para cada ligando, se observó congruencias en la mayoría de los casos para cada análisis, siendo mayor en algunos ligandos comparados con otros. En algunos se observó una tendencia a formarse dos sub-grupos de poses como el mejor resultado para los análisis de un compuesto (veáse Figura 3.6). Se revisó cada pose generada para las repeticiones de los ligandos, seleccionando la mejor pose en el caso de la presencia de subgrupos mediante una combinación de los mejores puntajes obtenidos, así como de una mayor incidencia en las repeticiones. De esta manera, se seleccionaron las poses para cada compuesto para poder continuar con el análisis de puntajes e interacciones formadas con el receptor AChE.



**Figura 3.6.** Resultados del quintuplicado para algunos ligandos, con menor a mayor discrepancia. (Izquierda, **5a** NQ-3apr-Ac; centro, **9a** NQ-2abu-Ac; derecha, **6** NQ-Tira).

Teniendo seleccionadas la pose para cada análisis, se hizo un promedio de los puntajes de cada quintuplicado para poder comparar el grado de interacción ligando-receptor calculado por el software. En la Tabla 3.2 se pueden observar los puntajes resultados de realizar el *docking* de los 16 compuestos sintetizados derivados de la 1,4-naftoquinona, contra la enzima AChE.

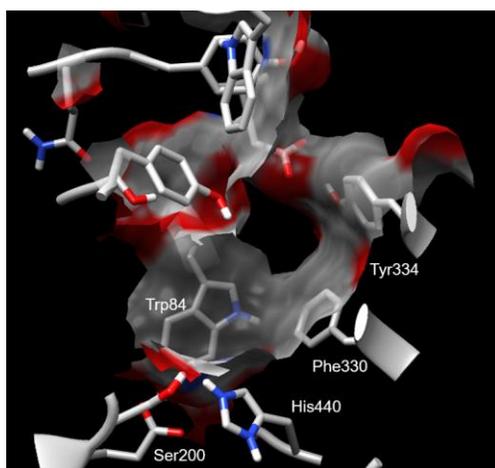
Tabla 3.2. Puntajes del *docking* con AChE.

|    | Compuesto             | Score   |                 |                 |
|----|-----------------------|---------|-----------------|-----------------|
|    |                       | Ligando | Enantiómero (S) | Enantiómero (R) |
| 1  | <b>1</b> NQ-Prop      | -8.24   |                 |                 |
| 2  | <b>2</b> NQ-Buta      | -8.42   |                 |                 |
| 3  | <b>3</b> NQ-Pipe      | -9.36   |                 |                 |
| 4  | <b>4</b> NQ-Bnca      | -10.30  |                 |                 |
| 5  | <b>5</b> NQ-3apr      | -8.08   |                 |                 |
| 6  | <b>5a</b> NQ-3apr-Ac  | -9.12   |                 |                 |
| 7  | <b>6</b> NQ-Tira      | -10.50  |                 |                 |
| 8  | <b>7</b> NQ-ClAn      | -10.10  |                 |                 |
| 9  | <b>8</b> NQ-NOAn      | -10.40  |                 |                 |
| 10 | <b>9</b> NQ-2abu      | -8.56   |                 |                 |
| 11 | <b>9a</b> NQ-2abu-Ac  | -9.06   |                 |                 |
| 12 | <b>10</b> NQ-2aet     | -8.06   |                 |                 |
| 13 | <b>10a</b> NQ-2aet-Ac | -9.00   |                 |                 |
| 14 | <b>11</b> NQ-1a2p     |         | -8.50           | -8.72           |
| 15 | <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac |         | -9.22           | -9.20           |
| 16 | <b>12</b> NQ-Feam     | -10.36  |                 |                 |

El score o puntaje de los softwares empleados para *docking*, si bien pueden tener diferentes unidades, suelen referirse de manera general a la energía necesaria para la interacción de los dos modelos calculados, por lo tanto, un puntaje menor implica un mejor resultado y por ende una mejor interacción ligando-receptor.

Los resultados para el análisis de *docking* de los diferentes ligandos muestra una pequeña mejora al pasar de las cadenas de tipo alifáticas lineales (**10** NQ-2aet y **5** NQ-3apr) a cadenas ramificadas (**11** NQ-1a2p y **9** NQ-2abu). Sin embargo, los mejores puntajes son para las naftoquinonas cuyo fragmento introducido presenta un anillo aromático, **6** NQ-Tira, **8** NQ-NOAn, **12** NQ-Feam, **4** NQ-Bnca y **7** NQ-ClAn, con puntajes menores a -10. Para el compuesto **11** NQ-1a2p y su versión acetilada, donde se generaron modelos para sus diferentes enantiómeros, se ve una pequeña mejoría del enantiómero (*R*) sobre el (*S*), si bien la diferencia es mínima. Por otra parte, es clara la tendencia que muestra mejores puntajes para los compuestos acetilados, con respecto de sus análogos con el grupo alcohol libre (entrada 5 vs 6, 10 vs 11, 12 vs 13, y 14 vs 15 de la Tabla 3.2).

Al observar las poses de cada ligando en cuestión de interacciones con residuos de aminoácidos particulares, se observó que la mayoría de interacciones presentadas fueron de tipo interacciones  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno. Las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  son de las principales que suelen observarse en el caso de inhibidores de acetilcolinesterasa, ya que la presencia de aminoácidos con grupos R con anillos aromáticos es alta dentro de la cavidad catalítica de AChE. Los principales residuos con los que se observaron estas interacciones fueron los aminoácidos Trp84 y Phe330 de la región CAS, y en algunos casos esta interacción se veía hasta el residuo Tyr334 del PAS. Por parte de los enlaces de hidrógeno observados, en su mayoría se daban con los aminoácidos Ser200 e His440, ambos formando parte de la tríada catalítica (Figura 3.7).



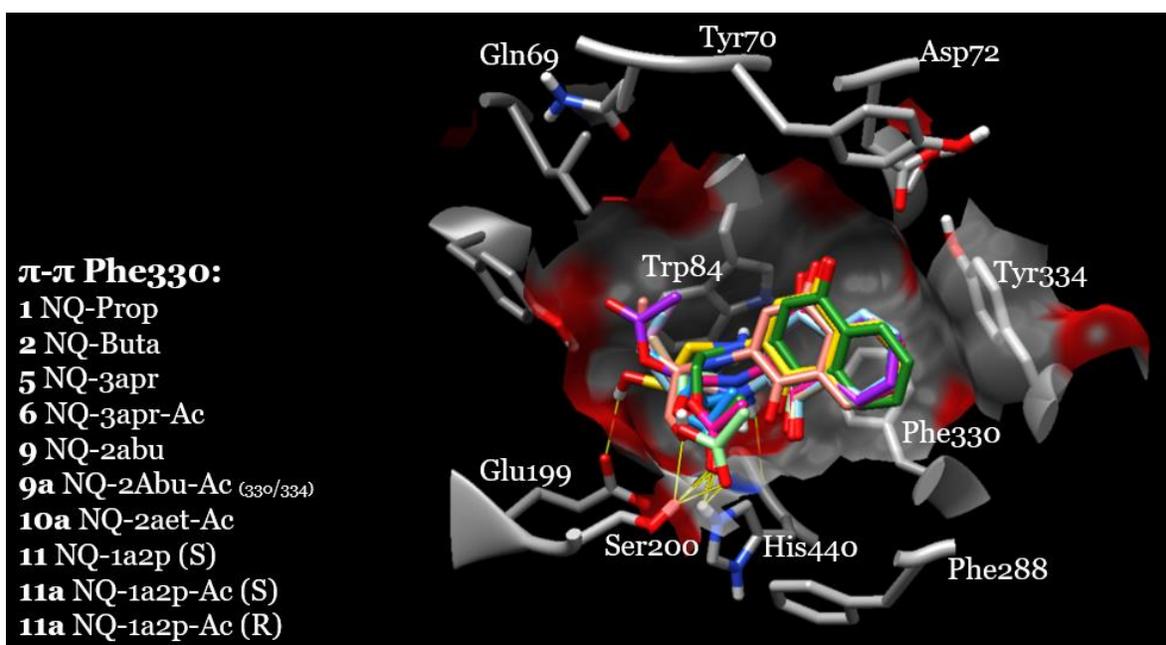
**Figura 3.7.** Principales residuos de interacción en la cavidad de AChE con las naftoquinonas sintetizadas.

En la Tabla 3.3 se puede observar el concentrado de las diferentes interacciones encontradas para cada ligando sintetizado. Es posible formar dos grupos de ligandos basándonos en los residuos con los cuales se da la interacción  $\pi$ - $\pi$ , ya que la mayoría de los ligandos forman esta interacción con el núcleo naftoquinona y el residuo Phe330. Otro pequeño grupo interactúa por su parte con Trp84, de nuevo con el anillo aromático de su núcleo. El caso contrario se da con **6** NQ-Tira, cuya interacción con Trp84 se da mediante el anillo aromático del fenol (Figuras 3.8 y 3.9). Considerando esta interacción de **6** NQ-Tira, y exceptuando a los compuestos con fragmento incorporado alifático **10** NQ-2aet y el isómero *R* de **11** NQ-1a2p, el resto de compuestos cuyo núcleo quinona interactúa con

Trp84 son los que tienen un anillo aromático incorporado durante su síntesis, y que a su vez presentan los mejores puntajes en el acoplamiento molecular automatizado.

De manera diferente para el compuesto **9a** NQ-2abu-Ac, su interacción de tipo  $\pi$  se da con Phe330 y Tyr334, ya que su núcleo se encuentra localizado entra ambos residuos, en lugar de tener un apilamiento casi paralelo con un residuo como sucede con los otros ligandos. El único compuesto con el que no se ve una interacción  $\pi$ - $\pi$  clara es **3** NQ-Pipe, que a su vez difiere del resto de compuestos en que el fragmento introducido es alifático pero cíclico. Su núcleo quinónico también se encuentra ligeramente orientado hacia Trp84, pero en el ángulo en que se encuentra probablemente no llegue a presentar este tipo de interacción.

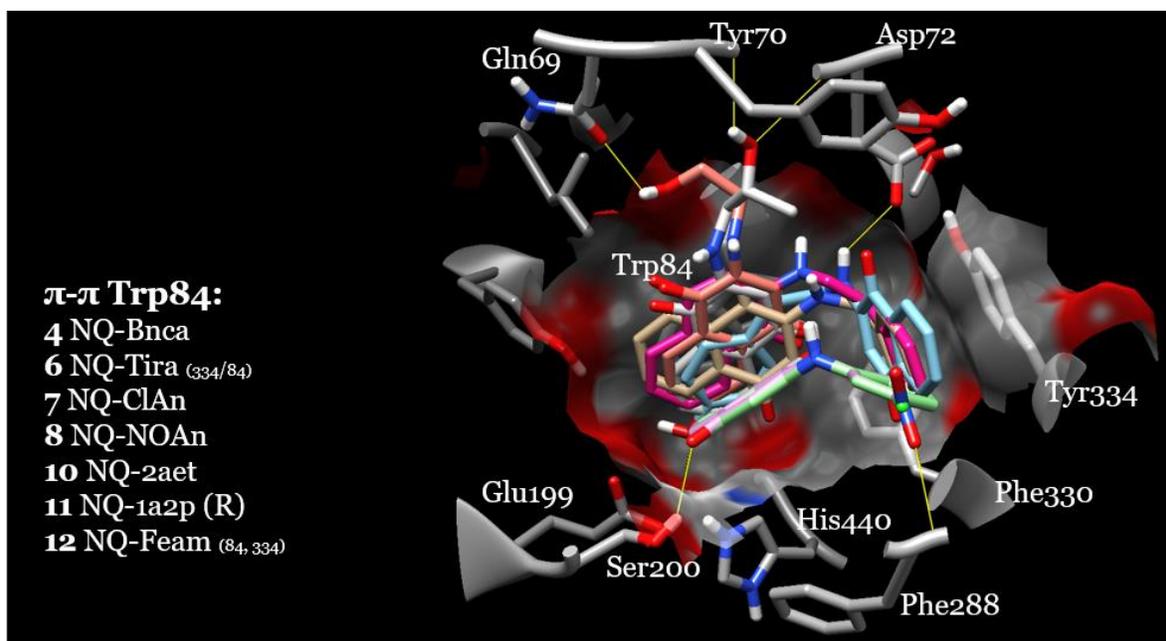
De manera particular, los compuestos **12** NQ-Feam y **6** NQ-Tira que poseen un anillo aromático además del de su núcleo separados por una pequeña cadena, son capaces de extenderse a lo largo de la cavidad catalítica de AChE y formar interacciones  $\pi$ - $\pi$  con dos residuos diferentes, Trp84 y Tyr334. Esta doble interacción podría explicar el por qué estos compuestos presentaron un mejor puntaje en el *docking* con este receptor (primer y tercer mejores puntajes, **6** NQ-Tira con -10.5 y **12** NQ-Feam con -10.36).



**Figura 3.8.** Ligandos con interacción  $\pi$ - $\pi$  con Phe330 de AChE y enlaces de H en color amarillo.

**Tabla 3.3.** Principales interacciones entre AChE y los ligandos naftoquinónicos.

| Compuesto                | Interacciones                              |                                                              |
|--------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                          | $\pi$ - $\pi$                              | Enlaces de H                                                 |
| 1 <b>1</b> NQ-Prop       | Phe330                                     | -                                                            |
| 2 <b>2</b> NQ-Buta       | Phe330                                     | -                                                            |
| 3 <b>3</b> NQ-Pipe       | -                                          | Ser122                                                       |
| 4 <b>4</b> NQ-Bnca       | Trp84                                      | -                                                            |
| 5 <b>5</b> NQ-3apr       | Phe330                                     | Ser200, His440                                               |
| 6 <b>5a</b> NQ-3apr-Ac   | Phe330                                     | Ser200, His440                                               |
| 7 <b>6</b> NQ-Tira       | Tyr334, Trp84 (Ph-OH)                      | Asp72                                                        |
| 8 <b>7</b> NQ-ClAn       | Trp84                                      | Ser200                                                       |
| 9 <b>8</b> NQ-NOAn       | Trp84                                      | Ser200, Phe288                                               |
| 10 <b>9</b> NQ-2abu      | Phe330                                     | Ser200                                                       |
| 11 <b>9a</b> NQ-2abu-Ac  | Phe330/Tyr334                              | Ser200, His440                                               |
| 12 <b>10</b> NQ-2aet     | Trp84                                      | Gln69                                                        |
| 13 <b>10a</b> NQ-2aet-Ac | Phe330                                     | Ser200, His440                                               |
| 14 <b>11</b> NQ-1a2p     | ( <i>S</i> ) Phe330<br>( <i>R</i> ) Trp84  | ( <i>S</i> ) Glu199<br>( <i>R</i> ) Tyr70, Asp72 (Asn85)     |
| 15 <b>11a</b> NQ-1a2p-Ac | ( <i>S</i> ) Phe330<br>( <i>R</i> ) Phe330 | ( <i>S</i> ) -<br>( <i>R</i> ) Ser200, His440 ( $\times 2$ ) |
| 16 <b>12</b> NQ-Feam     | Trp84, Tyr334 (Ph)                         | -                                                            |


**Figura 3.9.** Ligandos con interacción  $\pi$ - $\pi$  con Trp84 de AChE y enlaces de H en color amarillo.

## Capítulo 4. Química Computacional: Modelado Proteoquimiométrico

### Generalidades

#### 1. Inteligencia Artificial y *Machine learning*

La definición de inteligencia, así como su origen y detalles alrededor de ella, ha sido un tema estudiado por mucho tiempo (Legg y Hutter, 2007). Con la generación de las computadoras modernas, en las últimas décadas se ha ido investigando de manera más profunda una idea que viene desde tiempo atrás: ¿Puede una máquina (computadora) ser inteligente como lo somos los humanos?”. El área de la ciencia denominada como Inteligencia Artificial (IA) se ha desarrollado alrededor de esta pregunta, e ido evolucionando con el paso del tiempo, comenzando desde la definición misma de lo que implica la inteligencia por sí sola, así el cómo una computadora podría definirse como inteligente. Desde la definición de IA en 1955 de John McCarthy como “desarrollar máquinas para que se comporten de manera inteligente” hasta la de Elaine Rich que dice que la IA “es el estudio de hacer que las computadoras hagan lo que, de momento, los humanos hacen de mejor manera” se ve una línea de evolución de lo que implica la IA hasta la actualidad, ya que hacer que una máquina se mueva hacia una fuente de luz o haga cálculos enormes de manera rápida podrían ser características de cualquier computadora sin necesidad de que tenga una IA (Ertel, 2017).

Uno de los primeros hitos en el campo de la Inteligencia Artificial es la llamada Neurona de McCulloch-Pitts, así como su aplicación por Rosenblatt. La neurona de McCulloch-Pitts es un modelo matemático que replica de manera lógica el funcionamiento de una neurona (McCulloch y Pitts, 1943), que fue implementado por Rosenblatt en su máquina Perceptrón (Rosenblatt, 1958), a manera de una red de dos neuronas que funcionan basándose en un algoritmo de clasificación. A la postre, al Perceptrón de Rosenblatt se le considera como los inicios de las Redes Neuronales y el Aprendizaje Profundo (*Deep Learning*), ramas de la IA que se han desarrollado ampliamente en los últimos años.

Estas dos ramas de la IA mencionadas son solamente una pequeña porción de lo que implica toda esta área del conocimiento. Dentro de la solución de problemas en ámbitos tan variados, estos pueden resolverse mediante la aplicación de diferentes herramientas de la

IA, programando a las computadoras bajo diferentes tipos de lógicas (por ejemplo, lógica proposicional o lógica predicativa) y algoritmos. Sin embargo, esto no sirve para resolver todos los tipos de problemas, incluso se puede argumentar que no se puede programar de manera lógica la intuición humana que muchas veces es parte de la resolución de problemas. Para ello se necesitaría que las computadoras sean capaces de “aprender” por sí solas, de igual manera que hacen las personas. Este es el campo de estudio de otra rama de la IA, conocido como Aprendizaje automático o *Machine learning (ML)* (Ertel, 2017), la cual se ha ido desarrollando por mucho tiempo. Ya desde la década de los 1970's se llevó este cambio en la manera de pensar de la inteligencia artificial. Si antes se consideraba que una máquina podía aprender siguiendo una serie de reglas de “si-entonces” (ciclos *if-then* en un lenguaje de programación) lo cual requeriría muchas reglas difíciles de implementar, esto se debería cambiar por algoritmos que dieran las instrucciones de manera indirecta para que las máquinas aprendieran de ellas, a partir de ejemplos administrados previamente (Kubat, 2017).

Ya que en el Aprendizaje automático se extrae el conocimiento de ejemplos, uno de los requisitos es precisamente en contar con ejemplos de la información que queremos extraer o extrapolar en un conjunto de información. Por lo tanto, es necesario que se tenga “sets o datos de entrenamiento”, la muestra que contiene la información que se quiere aprender a partir de “agentes”, que será uno de los diferentes algoritmos existentes para tal fin, y unos “sets o datos de prueba” que será datos nuevos con los cuales se evaluará si los agentes que evaluaron los datos de entrenamiento pueden extrapolar correctamente información nueva, empleando una “medición de desempeño” (Ertel, 2017). Los sets de datos se componen de datos o muestras (*data points*) de los cuales se debe de coleccionar diferentes rasgos o propiedades. Estas propiedades pueden ser categóricas (valores predefinidos), ordinales (valores predefinidos que poseen un orden intrínseco) o numéricas (Badillo *et al.*, 2020).

El Aprendizaje automático puede a su vez ser dividido en tres grandes categorías: aprendizaje supervisado, aprendizaje no supervisado, y aprendizaje de refuerzo. En el aprendizaje supervisado, el set de entrenamiento consiste en parejas de datos de ingreso y salida, es decir, ya se tiene etiquetado cada dato con un resultado, y el objetivo es poder predecir dichos resultados para nuevos datos. Las etiquetas para los datos pueden ser

numéricas por lo que los modelos creados son de tipo de regresión, o pueden ser etiquetas categóricas, por lo que los modelos manejados son de clasificación. En el caso del aprendizaje no supervisado, los sets de entrenamiento no están etiquetados, es decir no se cuenta con un valor de salida definido, por lo que el objetivo de dicho aprendizaje es más de exploración de los datos para encontrar patrones subyacentes. Se pueden manejar entonces modelos de “*clustering*” o formación de subgrupos de los datos (los *clusters*), o se puede buscar reducir la dimensionalidad de los datos analizados y manejar precisamente modelos de reducción de dimensionalidad (Simeone, 2018; Badillo *et al.*, 2020). En ocasiones, cuando solamente una porción de los datos se encuentra etiquetada, se habla de un aprendizaje semisupervisado, donde se pueden usar datos etiquetados para entrenar un modelo con el cual clasificar el resto de datos no etiquetados en un principio (Choi *et al.*, 2020).

Por otra parte, el aprendizaje de refuerzo se encuentra en cierto modo entre el aprendizaje supervisado y no supervisado. Esto es porque la supervisión no se crea directamente sobre el etiquetado de los datos, sino que se permite que el modelo genere una respuesta de salida, y se introduce una retroalimentación del mismo con respecto a la respuesta esperada, de manera que el modelo no solamente aprende de los datos sino a partir de una serie de pruebas y errores (Simeone, 2018; Choi *et al.*, 2020).

Dentro del Aprendizaje automático (*ML*) existen numerosos métodos que pueden ser aplicados dependiendo del tipo de aprendizaje y problema que se requiera analizar, por ejemplo, k-medias para modelos de *clustering*, análisis de componente principal (PCA) e incrustaciones estocásticas de vecinos distribuidos en t (tSNE) para reducción de dimensionalidad, máquinas de vectores de soporte (*SVM*, *Support Vector Machines*) y Redes Neuronales para modelos de clasificación, por nombrar algunos (Badillo *et al.*, 2020).

El método de Árboles de decisión (Figura 4.1) se emplea en aprendizajes supervisados para tareas de clasificación, aunque también pueden usarse para casos de regresión (Choi *et al.*, 2020). Comenzando por un nodo raíz, se van formando puntos de decisión que van dividiendo los datos en diferentes clases a partir de sus propiedades que generen una mejor división, y este proceso se da de manera recursiva, hasta que todos los datos de un subset terminan en una misma clase (Ali *et al.*, 2012b). Los Bosques Aleatorios

o *Random Forests* consisten en la aplicación de una serie de Árboles de decisión. Estos comienzan con una selección aleatoria de propiedades para comenzar los árboles, analizando varios de ellos y donde la diversidad de árboles permite analizar patrones más complejos, reducir la posibilidad de generar modelos sobreentrenados y mejorar la eficacia de los modelos. Una mayoría de votos entre los árboles permite generar el modelo predictivo final, y además de una buena predicción los Bosques aleatorios pueden revelar la importancia de las propiedades analizadas, mostrando qué tanto contribuye cada propiedad a la predicción de clase (Ali *et al.*, 2012b; Denisko y Hoffman, 2018; Choi *et al.*, 2020).

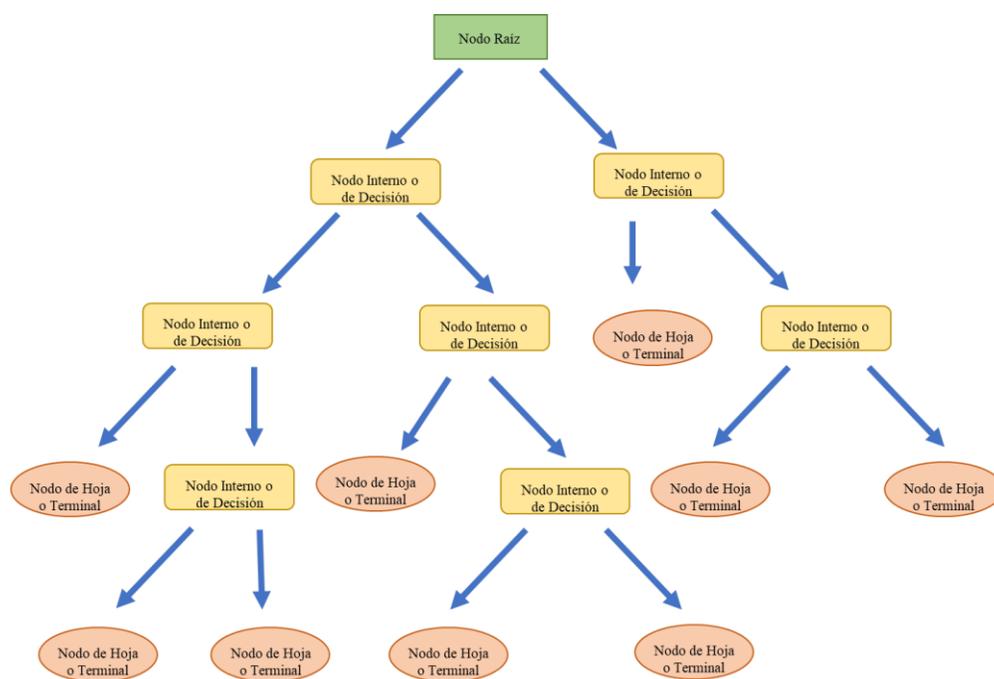


Figura 4.1. Estructura de un árbol de decisión.

## 2. Modelado QSAR y PCM

Dentro de los estudios *in silico* que se realizan durante el diseño de fármacos asistido por computadora (CADD), los estudios de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR, del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationships*) han sido ampliamente empleados. Los modelos QSAR asumen que las estructuras de las moléculas pueden describirse en sus valores o propiedades geométricas, estéricas, electrónicas, etc., y que estas son responsables de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Partiendo del

supuesto en que compuestos con estructuras similares podrían tener actividades biológicas similares, el fin de estos modelos es encontrar la tendencia entre los descriptores, para de forma paralela describir la tendencia en una actividad biológica (Tropsha, 2010; Gramatica, 2013).

Los modelos *QSAR* generalmente se pueden describir como la aplicación de métodos estadísticos y de análisis de datos, junto con la química y la biología, para poder predecir la actividad biológica de los compuestos químicos evaluados (Figura 4.2). Su desarrollo requiere de tres componentes: un set de información con valores experimentales de actividades biológicas de compuestos (el set de entrenamiento); descriptores de estructura moleculares o de propiedades (descriptores o predictores); y los métodos estadísticos para encontrar y validar la relación de los dos sets ya mencionados (Tropsha, 2010; Gramatica, 2013). El núcleo de los modelos *QSAR* se encuentra en los métodos estadísticos, donde pueden emplearse por ejemplo métodos de análisis para regresión, como la regresión múltiple lineal, regresión con componentes principales, mínimos cuadrados parciales, por dar algunos ejemplos (Gramatica, 2013).

Un factor importante en la creación de estos modelos en el dominio de aplicabilidad del modelo, es decir, la región del espacio químico en el que entran los descriptores de las moléculas y respuestas en el set de entrenamiento, y a partir del cual se puede determinar la extensión de dónde se pueden extrapolar resultados del modelo, ya que una extrapolación fuera del dominio puede llevar a predicciones no completamente adecuadas (Gramatica, 2007).

También es necesario que se calcule de manera adecuada la robustez y predictibilidad de los modelos. Una de las técnicas estadísticas de validación interna de los modelos más empleadas es la validación cruzada, donde de manera iterativa se van dejando porciones del set de entrenamiento fuera del mismo para usarse como datos a predecir para verificar la predictibilidad del modelo, por ejemplo mediante métodos de “dejar un dato fuera” o “dejar muchos fuera” (*Leave-one-out cross-validation* y *Leave-many-out cross-validation*). Sin embargo, un problema limitante para un modelo de validación eficiente se encuentra cuando no hay suficientes datos disponibles para llevar esto a cabo. En ocasiones como esta, se puede llevar a cabo una validación externa, con datos nuevos que permitan revisar el rendimiento del modelo así como su dominio de aplicabilidad. Esto puede

llevarse a cabo dividiendo la información antes del modelado en un set de entrenamiento y otro set de predicción, asegurándose que ambos sets ocupen el espacio de descriptores de toda la información conjunta, y que sus propios dominios no sean a la vez muy diferentes (Gramatica, 2007).

La creación y validación de los modelos *QSAR* puede a su vez llevarse a cabo con el apoyo de diversas técnicas dentro del *ML*. De esta manera, ya no solamente se habla de emplear la regresión lineal múltiple o mínimos cuadrados parciales, sino de la aplicación de Redes Neuronales Artificiales o máquinas de vectores de soporte (*SVM*), o en general de los ya mencionados modelos de aprendizaje supervisados, no supervisados o semisupervisados (Gertrudes *et al.*, 2012). Cada uno de los métodos empleados tiene sus propias ventajas y desventajas, así que dependiendo del problema a resolver se puede decantar el análisis con una técnica u otra, si bien comúnmente suelen aplicarse más de una de forma simultánea para comparar resultados entre ellos y decidirse por un modelo final (Gertrudes *et al.*, 2012; Matveieva y Polishchuk, 2021).

En los últimos años, una serie de modelos predictivos en *CADD* se han desarrollado como una extensión de los modelos *QSAR*: los modelos Proteoquimiométricos (*PCM*, en inglés *Proteochemometric modeling*). La principal diferencia, como se puede observar en la Figura 4.2, radica en que los modelos *QSAR* son orientados a los compuestos o ligandos descritos, mientras que los *PCM* incluyen información de las dianas sobre las cuales se busca que los ligandos actúen, como algunas proteínas (van Westen *et al.*, 2011).

La creación de los modelos proteoquimiométricos se da ya que una desventaja de los modelos *QSAR* es que estos consideran la interacción de compuestos contra una única diana y suelen tener problemas en la extrapolación de datos hacia áreas nuevas del espacio químico. Ya que la afinidad de un compuesto a una diana biológica no solamente depende de su estructura química, sino del sitio de unión a la diana y que este sitio presenta cierta flexibilidad (como se explica en el modelo de ajuste inducido en el Capítulo 3 de la presente tesis) es que puede observarse que un modelo *QSAR* no alcanza a describir todos los aspectos de una interacción proteína-ligando (van Westen *et al.*, 2011).

Para crear un modelo *PCM* se necesita como datos la información de bioactividad de diversos compuestos sobre diversas dianas, y al igual que en *QSAR*, se pueden incluir técnicas de Aprendizaje automático que incluyan métodos de análisis lineal o no-lineales.

Ya que se incluyen descriptores de las moléculas y de las dianas, el dominio de aplicabilidad en *PCM* es mayor comparado con *QSAR*, y se puede extrapolar para predecir bioactividades de nuevos compuestos sobre dianas nuevas (incluyendo por ejemplo, dianas ortólogas, o mutaciones en las proteínas), por lo que en muchas ocasiones los modelos *PCM* superan a los *QSAR* (Lapins *et al.*, 2008; van Westen *et al.*, 2011; Cortes-Ciriano *et al.*, 2014).

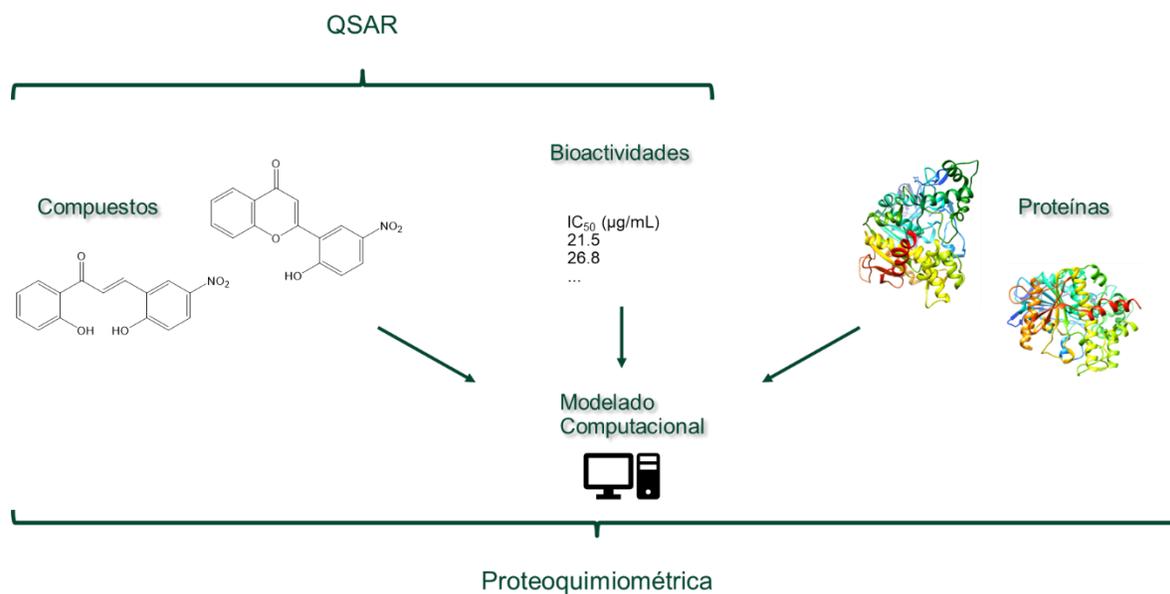


Figura 4.2. Esquema de los modelos *QSAR* y *PCM*.

## Metodología

### Creación de Modelo Proteoquimiométrico de Acetilcolinesterasa

Se obtiene el código de acceso de la proteína a evaluar de la base de datos Uniprot <http://www.uniprot.org/>. En la interfaz de la base de datos se realiza un análisis BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*). Se escoge la base de datos “UniProtKB”, se maneja un límite de valor de expectativa de 10, la matriz se maneja en automático, sin filtrado, generación de vacíos, y “hits” en 1000. Se descarga la lista de resultados en formato FASTA.

### Extracción de datos de bioactividad

De la lista con secuencias de proteínas obtenidas del BLAST, se realizó una extracción de datos y generación de protocolos empleando el software Pipeline Pilot. Se creó un primer protocolo a partir del cual se obtenga una secuencia para cada entrada discriminando por especie, de manera que en el caso de duplicados por especie solamente se maneje una secuencia. A partir de esta delimitación de secuencias, las entradas resultantes se alinean mediante un componente ClustalW.

Para la obtención de los datos de bioactividad, se creó un protocolo donde a partir de las secuencias señaladas (como las obtenidas tras la delimitación por especie) se accede a la base de datos ChEMBL mediante el código de acceso Uniprot de cada secuencia, se extrae los resultados de bioactividad de compuestos ensayados en cada proteína, seleccionando como unidad de bioactividad el valor pchembl. Se descartan las bioactividades sin resultados, y para duplicados de resultados sobre un mismo compuesto, se calcula la media de los valores de pchembl para dicho compuesto.

### Análisis de similitud estructural de los compuestos adquiridos

Se creó un protocolo en Pipeline Pilot (PP) donde se leen las estructuras de los compuestos dentro de un conjunto de datos, y se genera una matriz de similitud molecular empleando el coeficiente de Tanimoto mediante el uso de las huellas dactilares ECFP (6). Posteriormente, empleando el mismo coeficiente y huella dactilar, se calcula en un segundo

componente del protocolo las distancias entre cada par de moléculas ingresadas. Se toma como resultado el valor de la distancia promedio. Se repitió el proceso con una selección de 500 compuestos del total.

Paralelamente, de la entrada de datos al tomar 500 compuestos se calcula la similitud molecular generando un mapa de calor, usando como coeficiente de similitud Tanimoto y huella dactilar ECFP (6), empleando para valores bajos color rojo, valores medios color blanco, y valores altos color verde en su representación final.

En un segundo protocolo, se crearon mapas de t-SNE para los compuestos. Para ello se emplean como propiedades de los compuestos su coeficiente de partición AlogP, peso molecular, número de aceptores de enlaces de H, número de dadores de enlaces de H, número de enlaces rotables, número de átomos, número de anillos, número de anillos aromáticos, solubilidad molecular, área superficial molecular, área superficial polar molecular, cuenta de AlogP, llaves de estado, y huellas dactilares ECFP (6). Se realiza un análisis de componente principal (PCA) con una perplejidad de 30. El análisis de t-SNE se hace en dos dimensiones, con un máximo de 1000 iteraciones y con valores de theta de 0.5 (t-SNE aproximado) y 0 (t-SNE exacto).

### **Creación de descriptores de compuestos y proteínas**

Para la descripción de los compuestos incluidos en el conjunto de datos empleados en el modelado, se basó en los descriptores empleados por Lenselink *et al.* (2017). Para describir a cada compuesto se crearon protocolos en PP donde se calculan sus propiedades de coeficiente de partición AlogP, peso molecular, número de aceptores de enlaces de H, número de dadores de enlaces de H, fracción del área superficial polar molecular y número de enlaces rotables. Se calculó la huella dactilar ECFP (6) con una longitud de 256 bits. Estos descriptores se incluyeron en los compuestos respectivos para cada uno de los cuatro sets formados.

Los descriptores de las proteínas se calcularon basándose en los aminoácidos en la secuencia de cada una de ellas. Tras la alineación de las 11 secuencias y basándose en van Westen *et al.* (2013a, 2013b) se calculan en protocolos de PP las huellas dactilares según los descriptores escalas-Z (3), escalas-ST, MSWHIM y escalas-Z (3) + Promedio, por

separado y para cada uno de las secuencias encontradas en cada uno de los cuatro diferentes sets de datos.

Tras la revisión manual de los descriptores moleculares y de proteínas generados, se unieron en un nuevo protocolo de PP cada uno de los cuatro descriptores de proteínas con los descriptores moleculares, para cada uno de los cuatro sets o conjuntos de datos iniciales, generando 16 conjuntos de datos finales para su empleo posterior en los protocolos de modelado.

### **Modelado proteoquimiométrico**

El modelado se realizó en un protocolo de PP donde se analizó cada uno de los 16 sets de datos finales. Del set empleado, se dividen los datos en conjunto de entrenamiento y conjunto de prueba. Para el modelado se empleó un algoritmo de Bosque aleatorio, con 1000 árboles, fracción especificada de 0.3 y semilla de 144. La validación se realiza en el conjunto de prueba mediante un análisis de regresión lineal. Se varió el tamaño del conjunto de entrenamiento de 10-90% para poder crear las curvas de aprendizaje de cada modelo.

### **Delimitación de la secuencia proteica analizada**

Se tomó como base la acetilcolinesterasa humana (Uniprot P22303), de la cual se buscó y descargó su estructura tridimensional de la base de datos Protein Data Bank (PDB ID: 6O4W). A partir del ligando co-cristalizado (donepezilo) se generó una esfera de 5 Å, basándose en el trabajo previo de van Westen *et al.* (2012). Se seleccionaron los aminoácidos incluidos en este espacio, y a través de la alineación de las secuencias de las otras proteínas, se seleccionaron los aminoácidos correspondientes a cada una de ellas. Con esta delimitación de los aminoácidos, para cada secuencia se calcularon sus descriptores en escalas-Z (3). Estos descriptores se unieron a los correspondientes descriptores y huellas dactilares de los compuestos para el Set 3, para su empleo posterior en el protocolo de modelado proteoquimiométrico.

### Cribado virtual

A partir de las 989 secuencias de AChE iniciales, se seleccionó tanto la secuencia humana (P22303) como de *Tetranychus urticae*, organismo del cual había disponible diferentes secuencias y de las cuales se seleccionó la de código Uniprot D8V7J7 (Anazawa *et al.*, 2003; Khajehali *et al.*, 2009). De manera similar al proceso para el modelado inicial, las secuencias fueron alineadas mediante ClustalW y se seleccionaron los aminoácidos correspondientes del sitio de unión al ligando, y se calcularon las huellas dactilares empleando los descriptores escalas-Z (3).

Basándose en trabajos previos (van Westen *et al.*, 2012) se empleó la base de datos ChemDiv obtenida a través de ZINC (Sterling e Irwin, 2015). Empleando un protocolo en PP se crearon agrupaciones o *clusters* de los compuestos en la base de datos (Promedio por *cluster* de 1000, Propiedades en set predefinido de ECFP 6, Distancia máxima de 0.6 y Función de distancia de huellas dactilares de Tanimoto, generando como resultados centros de *clusters* y sus miembros). Los centros de los *clusters* fueron a su vez tratados para calcular sus huellas dactilares y descriptores de la misma manera que fueron calculadas para el modelado proteoquimiométrico.

La información de los compuestos y de las dos secuencias de AChE usadas como blanco se combinaron y se pasaron a través del modelo proteoquimiométrico final con el sitio de unión al ligando seleccionado para llevar a cabo el cribado virtual, acomodando los resultados según su valor predicho de pchembl de manera descendente.

Tras la selección de los *clusters* con mejor resultado, se tomaron la totalidad de compuestos para dichas agrupaciones y se repitió el proceso de cálculo de descriptores, combinación con los descriptores proteicos y procesamiento del cribado virtual.

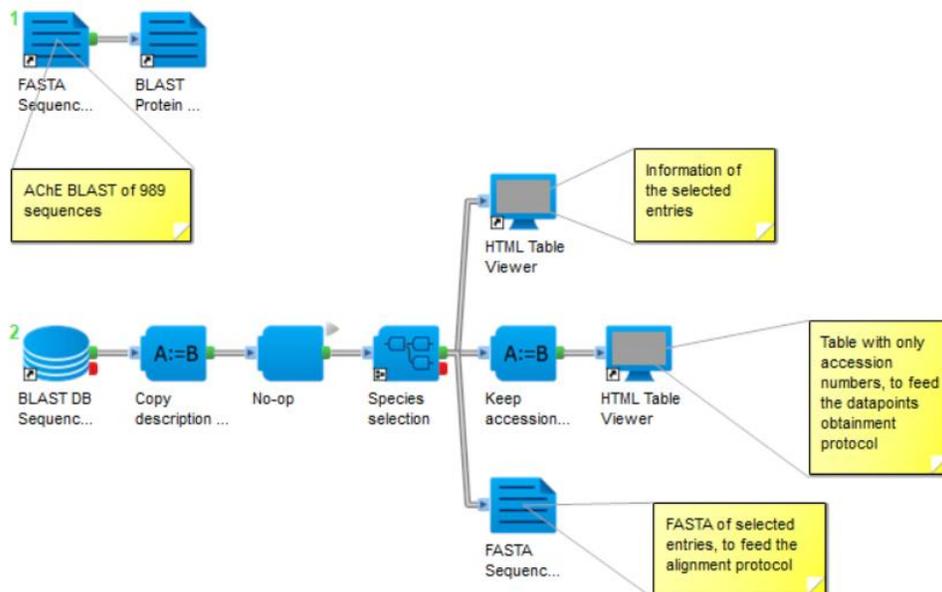
## Discusión de Resultados

### Creación de Modelo Proteoquimiométrico de Acetilcolinesterasa

La creación del modelo proteoquimiométrico comenzó con la selección de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) humana, cuyo código de acceso en Uniprot es P22303, con un estatus de entrada revisada y una referencia cruzada a ChEMBL (código ChEMBL220) con 13,480 actividades biológicas.

Tras el análisis de tipo BLAST se generó como resultado un listado con 989 secuencias de proteínas similares en diferentes especies, descargada en formato FASTA. Tras una revisión manual de las secuencias se encontró representación de 406 especies diferentes, por lo que se generó en Pipeline Pilot un protocolo para la selección de una única secuencia por especie (Figura 4.3).

Un nuevo archivo FASTA conteniendo únicamente las secuencias delimitadas por especie se introdujo en un segundo protocolo para la alineación de las secuencias y encontrar las similitudes entre ellas y los aminoácidos conservados (Figura 4.4). Se obtuvo como resultado un porcentaje de identidad de alineamiento de 55.0%.



**Figura 4.3.** Protocolo de Pipeline Pilot para la revisión de secuencias del BLAST de AChE y posterior análisis.



Debido a la obtención de datos de tres especies de las 406 incluidas en el análisis, se repitió el protocolo de obtención de datos sin delimitar a la primera aparición de cada especie. De esta manera se obtuvo 14334 datos, de 11 códigos de enzimas en Uniprot diferentes (Tabla 4.1). Gracias a una nueva actualización de la base de datos ChEMBL a su versión 28, se pudo adquirir de una nueva extracción de información 17279 datos de bioactividad.

**Tabla 4.1.** Enzimas retribuidas de ChEMBL con datos de bioactividad.

| Código Uniprot | Especie                                                     | Código ChEMBL |
|----------------|-------------------------------------------------------------|---------------|
| P22303         | <i>Homo sapiens</i> (humano)                                | CHEMBL220     |
| P23795         | <i>Bos taurus</i> (res)                                     | CHEMBL4768    |
| P37136         | <i>Rattus norvegicus</i> (rata)                             | CHEMBL3199    |
| P21836         | <i>Mus musculus</i> (ratón)                                 | CHEMBL3198    |
| O42275         | <i>Electrophorus electricus</i> (anguila eléctrica)         | CHEMBL4078    |
| Q9DDE3         | <i>Danio rerio</i> (pez cebra)                              | CHEMBL3308995 |
| P04058         | <i>Tetronarce californica</i> (raya eléctrica del Pacífico) | CHEMBL4780    |
| P06276         | <i>Homo sapiens</i> (humano) <sup>a</sup>                   | CHEMBL1914    |
| P81908         | <i>Equus caballus</i> (caballo) <sup>a</sup>                | CHEMBL5763    |
| Q03311         | <i>Mus musculus</i> (ratón) <sup>a</sup>                    | CHEMBL2528    |
| Q869C3         | <i>Anopheles gambiae</i> (mosquito de malaria africano)     | CHEMBL2046266 |

<sup>a</sup> Colinesterasa.

Debido a la inclusión de dos duplicados de especies en las entradas de Uniprot y ChEMBL, así como de colinesterasas que no eran acetilcolinesterasa, se procedió a dividir el conjunto de datos en cuatro subconjuntos diferentes, para analizar durante la creación del modelo proteoquimiométrico la influencia en la inclusión o exclusión de dichas entradas. Las enzimas empleadas en cada subconjunto, así como el número de datos para cada uno se encuentran representados en la Tabla 4.2.

La alineación de las secuencias originalmente analizadas (406, una por especie) mediante ClustalW mostró un porcentaje de identidad de alineado de 55%; tras la selección de las 11 entradas enzimáticas este porcentaje aumentó a 59.4%, es decir, las secuencias de las 11 enzimas incluidas en el estudio muestran un parecido entre ellas ligeramente mayor comparado al mostrado por las 406 secuencias iniciales. En el caso de los duplicados por especie, los duplicados humanos (Uniprot P22303 y P06276) muestran un porcentaje de

identidad de alineado de 51.7%. Los duplicados de ratón (Uniprot P21836 y Q03311) muestran por su parte un 50.8%. Esto podría sugerir que entre las AChE y ChE de estas especies, aunque hay similitud, la diferencia entre las secuencias es significativa y esto podría ayudar a que su uso simultáneo no implicara una redundancia en la información de las enzimas para el modelaje proteoquimiométrico.

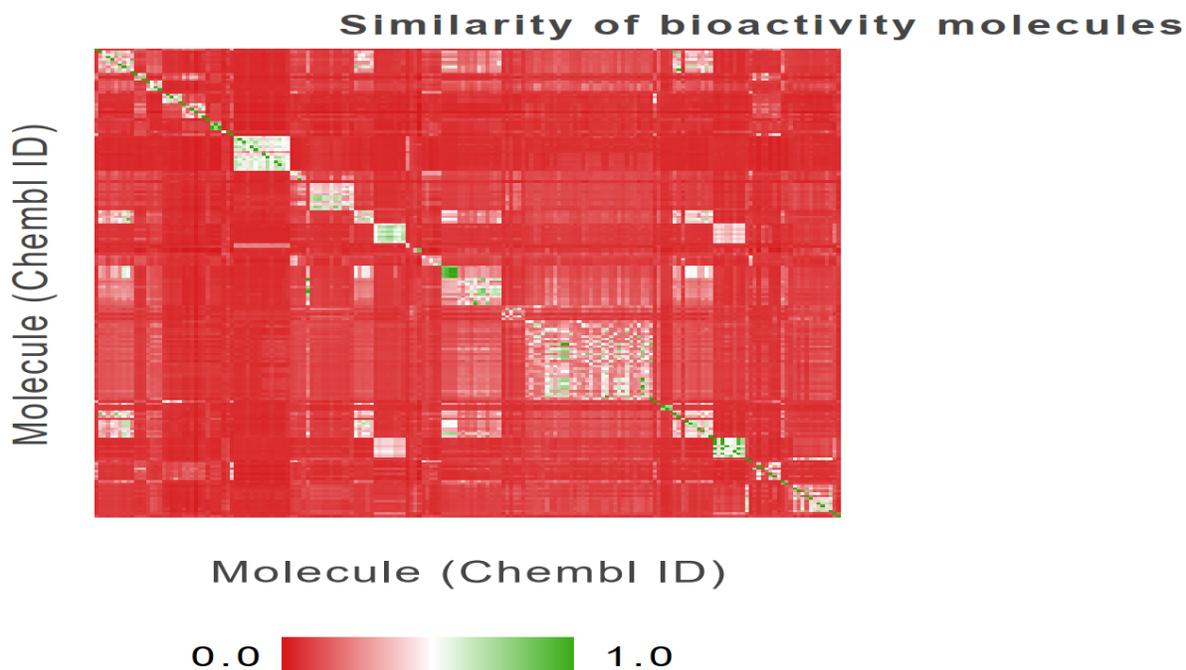
**Tabla 4.2.** Formación de subconjuntos de datos (Códigos Uniprot).

| <b>AChE + duplicados</b> | <b>AChE - duplicados</b> | <b>AChE +ChEs + duplicados</b> | <b>AChE + ChEs - duplicados</b> |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| P22303                   | P22303                   | P22303                         | P22303                          |
| P23795                   | P23795                   | P23795                         | P23795                          |
| P37136                   | P37136                   | P37136                         | P37136                          |
| P21836                   | P21836                   | P21836                         | P21836                          |
| O42275                   | O42275                   | O42275                         | O42275                          |
| Q9DDE3                   | Q9DDE3                   | Q9DDE3                         | Q9DDE3                          |
| P04058                   | P04058                   | P04058                         | P04058                          |
| P06276                   |                          | P06276                         |                                 |
|                          |                          | P81908                         | P81908                          |
| Q03311                   |                          | Q03311                         |                                 |
| Q869C3                   | Q869C3                   | Q869C3                         | Q869C3                          |
| <b>Set 1</b>             | <b>Set 2</b>             | <b>Set 3</b>                   | <b>Set 4</b>                    |
| 13955 datos              | 11443 datos              | 17279 datos                    | 14767 datos                     |

Color naranja: Duplicado de especie; Color amarillo: Diferente a acetilcolinesterasa.

Empleando el subconjunto de datos 3 (Set 3) que contiene el total de información extraída de las bases de datos, se realizó un análisis de los compuestos contenidos para identificar la diferencia estructural existente entre ellos. Empleando como huella dactilar ECFP (6) la distancia promedio en coeficiente de Tanimoto de todos los compuestos es de 0.88262, donde un valor de 0 implica nula similitud estructural y 1 de una completa similitud estructural. El valor obtenido implica una amplia diferencia entre las estructuras de los compuestos en el conjunto de datos utilizados, lo cual es deseado ya que si las estructuras fueran muy similares se podría correr el riesgo de sobre entrenar a los modelos de predicción. Analizando solamente 500 compuestos para poder crear un mapa de calor con las diferencias en coeficiente de Tanimoto, la distancia promedio fue de 0.86534, y el mapa de calor generado (Figura 4.5) muestra esa diferencia entre los compuestos, al

predominar matices de rojo (la diagonal verde representa la comparación de una estructura consigo misma).



**Figura 4.5.** Mapa de calor de 500 compuestos del conjunto de datos, empleando valores de coeficiente de Tanimoto.

Para poder visualizar el espacio químico representado por estos compuestos, se generaron incrustaciones estocásticas de vecinos distribuidos en  $t$  (t-SNE) mediante un cálculo aproximado (que favorece la velocidad del análisis) y uno exacto, los cuales pueden observarse en la Figura 4.6. En ambos casos observamos que la distribución de los compuestos no forma agrupaciones, sino que se encuentran repartidos casi uniformemente sobre la gráfica; esto significa que no hay grupos muy definidos de estructuras químicas similares, y la variación general de todos los compuestos muestra que la exploración del espacio químico en los compuestos analizados no se enfoca en un área en particular.

Para la formación de los sets o conjuntos finales de datos que se usarían en el modelado proteoquimiométrico, se calcularon las propiedades fisicoquímicas de los compuestos basándose en el trabajo de Lenselink *et al.* (2017) incluyendo las huellas dactilares ECFP (6) de 256 bits; mientras que para las proteínas se calcularon según los

aminoácidos de su secuencia los descriptores escalas-Z (3) (que describen a los aminoácidos según sus propiedades fisicoquímicas), escalas-ST (descripción topológica), y MSWHIM (descripción según su potencial electroestático). Se añadió también el descriptor escalas-Z (3) + Promedio ya que se ha reportado que la inclusión de un valor promedio de estas escalas puede favorecer el resultado de los modelos, comparando las escalas-Z con y sin este valor promedio (van Westen *et al.* 2013b).

Se generaron 16 conjuntos de datos finales (Tabla 4.3), donde todos incluyeron para los compuestos los descriptores de Lenselink *et al.* (2017) con su huella dactilar ECFP (6), separando los cuatro descriptores de proteínas para comparar su influencia en el modelado, realizando esto por cada uno de los cuatro sets iniciales de datos.

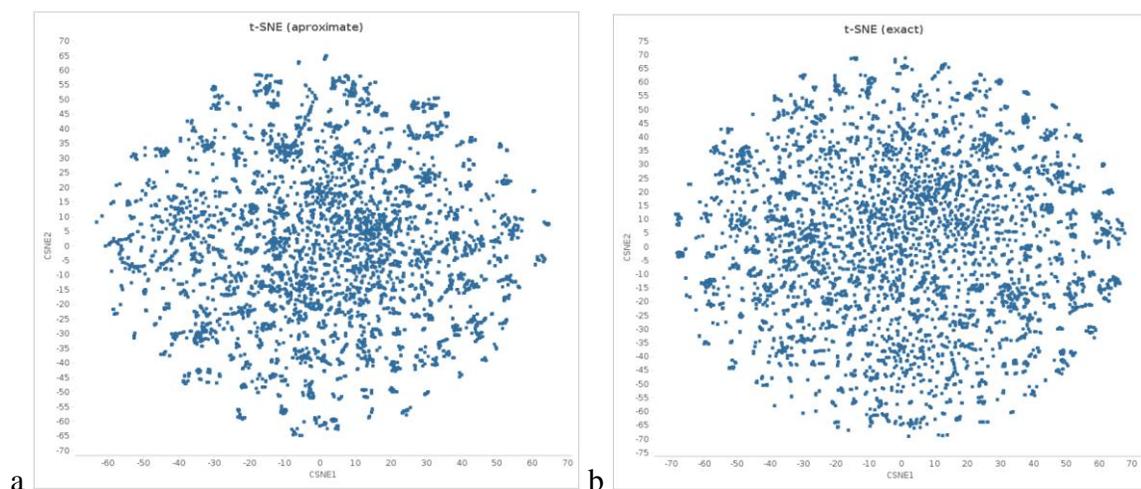


Figura 4.6. t-SNE aproximado (a) y exacto (b) de los compuestos incluidos en el conjunto de datos.

Tabla 4.3. Sets finales para el modelado proteoquimiométrico, según su diferencia en el descriptor de la proteína y set inicial del cual se calcularon.

|                               | Set 1                       | Set 2                       | Set 3                       | Set 4                       |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Descriptores proteicos</b> | Escalas-Z (3)               | Escalas-Z (3)               | Escalas-Z (3)               | Escalas-Z (3)               |
|                               | Escalas-Z (3)<br>+ Promedio | Escalas-Z (3)<br>+ Promedio | Escalas-Z (3)<br>+ Promedio | Escalas-Z (3)<br>+ Promedio |
|                               | Escalas-ST                  | Escalas-ST                  | Escalas-ST                  | Escalas-ST                  |
|                               | MSWHIM                      | MSWHIM                      | MSWHIM                      | MSWHIM                      |

Para cada uno de los 16 sets o conjuntos de datos finales se realizó un modelado mediante el algoritmo de Bosque aleatorio, variando el tamaño del conjunto de entrenamiento. Mediante un análisis de regresión lineal sobre el conjunto de prueba, se evaluó la capacidad de predicción de los modelos obtenidos. Las curvas de aprendizaje (Figuras 4.7 y 4.8) muestran los efectos de cada uno de los 4 sets de datos iniciales sobre el valor predictivo final, así como el efecto de cada uno de los diferentes descriptores proteicos empleados.

En las curvas de aprendizaje de la Figura 4.7 se puede observar que los descriptores escalas-Z (3), escalas-Z (3) + promedio y MWSHIM tienen efectos muy similares sobre la predicción de los modelos, ya que sus respectivas curvas de aprendizaje se encuentran casi solapadas las unas sobre las otras. Este comportamiento se observa tanto en el modelado con datos de los cuatro sets de datos iniciales, si bien en cada set las curvas son ligeramente diferentes. A partir de un tamaño de 30% para el conjunto de entrenamiento se sobrepasa un valor de  $R^2$  de 0.6, a partir del cual se puede considerar que se tiene un modelo predictivo. A su vez, siempre se manejan valores de RMSE (raíz del error cuadrático medio) menores de 1.0, lo cual también es lo que se busca para indicar un modelo con bajo error al momento de predecir los resultados en el conjunto de prueba. Solamente el empleo del descriptor proteico escalas-ST genera curvas de aprendizaje diferentes a los otros descriptores; sin embargo, sus valores de  $R^2$  son menores y los valores de RMSE mayores, lo cual indica un menor desempeño de estos modelos.

En el caso del efecto de cada uno de los cuatro sets de datos iniciales sobre el modelado proteoquimiométrico, las respectivas curvas de aprendizaje (Figura 4.8) muestran que de manera relativamente homogénea en el caso de los diferentes descriptores, el Set 1 y Set 2 tienden a comportarse de manera similar, teniendo sus curvas casi solapadas, sobre todo la del error en función de su RMSE. De manera similar las curvas de RMSE del Set 3 y Set 4 se observan bastante similares. En el caso de las curvas de  $R^2$ , el solapamiento por par de sets se observa aunque en menor medida, ya que los cuatro sets se parecen más entre sí simultáneamente. La curva de  $R^2$  del Set 4 se muestra ligeramente mejor, si bien la diferencia es mínima. Estas curvas demuestran que existe una influencia muy baja de cada uno de los cuatro sets iniciales sobre el desempeño de los modelos.

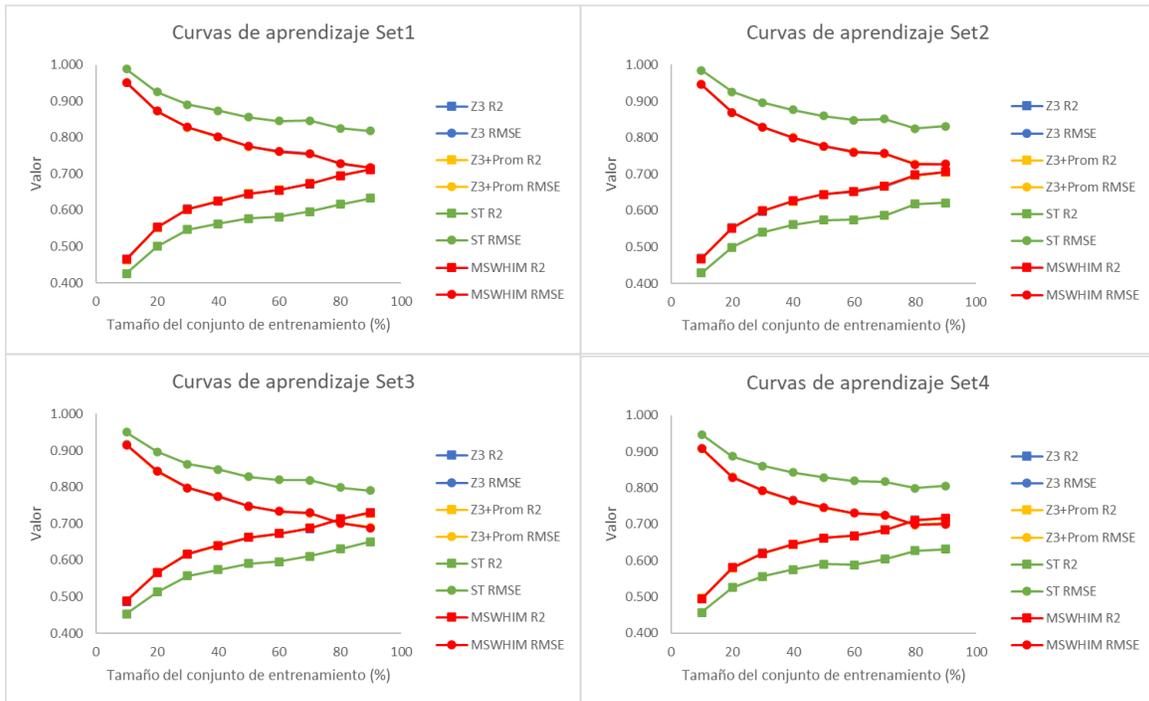


Figura 4.7. Curvas de aprendizaje mostrando el efecto de los descriptores proteicos.

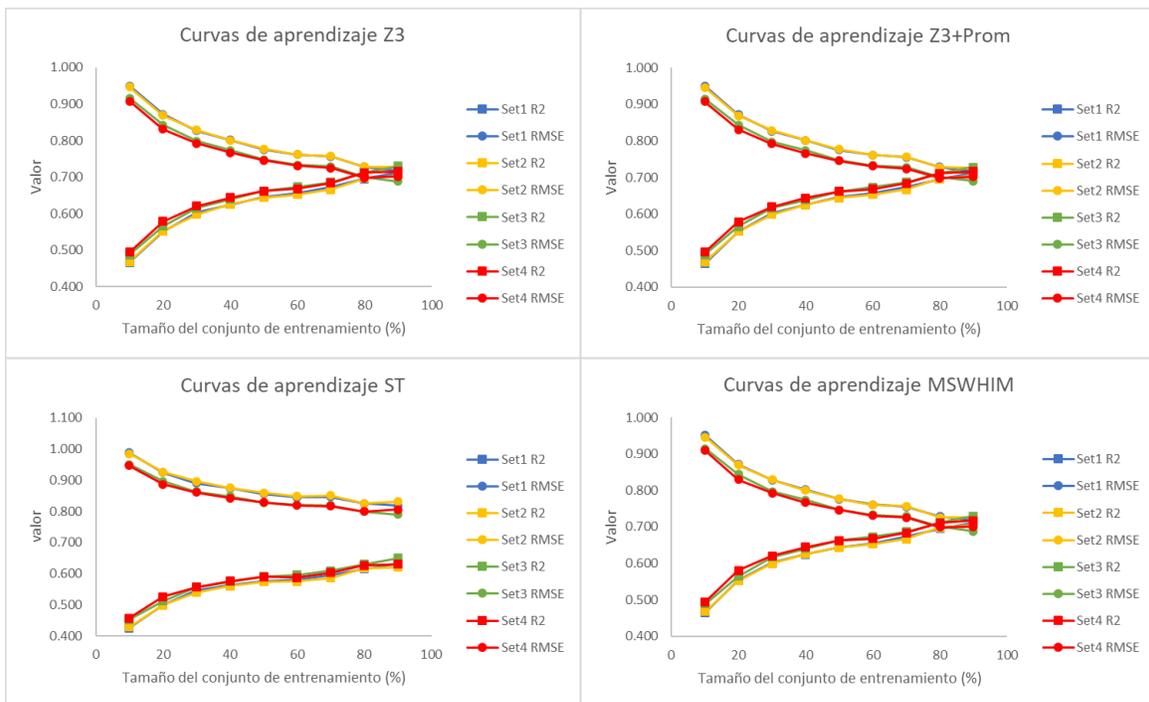
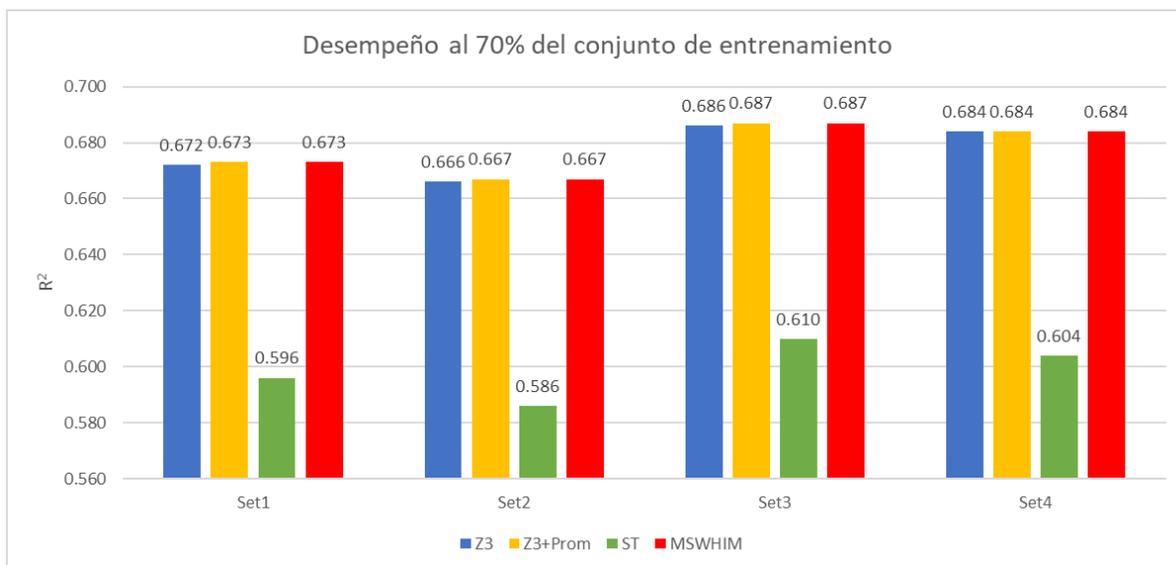


Figura 4.8. Curvas de aprendizaje mostrando el efecto de los sets de datos iniciales.

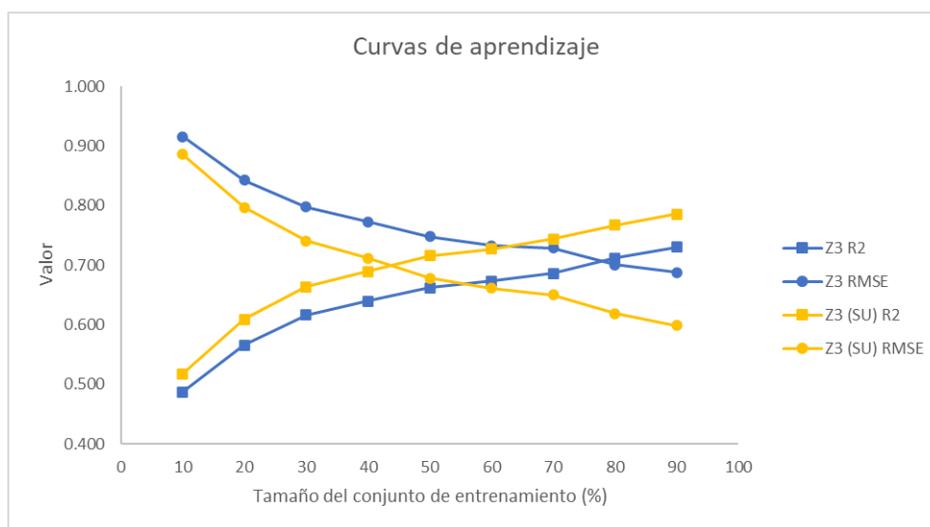
Revisando el desempeño de los 16 modelos generados a partir de una división del conjunto de entrenamiento y prueba de 70-30% (Figura 4.9) vemos, como ya se describió anteriormente, que el uso de las escalas-ST genera los modelos menos predictivos. El uso de escalas-ST en conjunto con el Set 1 y Set 2 presenta valores de  $R^2$  menores a 0.6; el resto de modelos presentan un valor superior y pueden considerarse predictivos. En el caso de los otros descriptores, sus desempeños son muy similares, asemejándose más en el caso del Set 1 con respecto al Set 2, y el Set 3 con respecto al Set 4, siendo estos últimos dos casos donde se ve una ligera mejora en los resultados de los modelos.

Excluyendo las escalas-ST, se observa que los otros descriptores obtuvieron el mismo resultado en combinación con el Set 4 ( $R^2 = 0.684$ ). En comparación, en el Set 3 se observa una mejoría si bien mínima, con  $R^2 = 0.686$  para las escalas-Z (3) y de  $R^2 = 0.687$  en las escalas-Z (3) + Promedio y MSWHIM. Ya que las escalas-Z (3) solamente difieren en un valor de 0.001 con respecto a los otros descriptores, y se emplean menos descriptores por aminoácido sin incluir el promedio que no puede relacionarse directamente a una propiedad físico química, se selecciona el modelo de escalas-Z (3) del Set 3 como el mejor modelo predictivo en este punto del estudio.



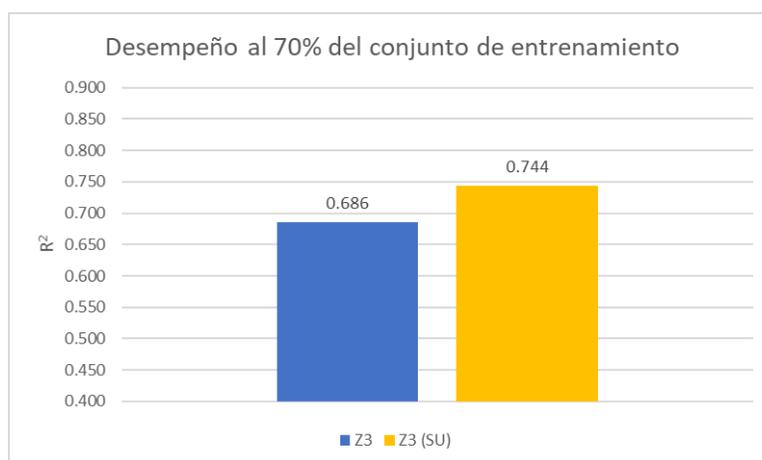
**Figura 4.9.** Desempeño de los modelos proteoquimiométricos (conjunto de entrenamiento al 70%).

Ya que para la generación de los modelos anteriormente descritos se considera la secuencia de aminoácidos completa de cada proteína, se plantea repetir el mejor modelo cambiando la descripción proteica a solamente los aminoácidos del sitio de unión a los ligandos. A partir de la AChE humana (Uniprot P22303) y su correspondiente estructura tridimensional (PDB ID: 6O4W) se analizó el sitio de unión al ligando. La estructura tridimensional seleccionada presenta en su sitio de unión a donepezilo, un inhibidor de AChE. A partir de un trabajo previo (van Westen *et al.* 2012) se tiene el antecedente que un volumen menor alrededor del ligando co-cristalizado ayuda a seleccionar aminoácidos y obtener modelos predictivos mejores (comparando una esfera de 5 Å contra una de 7 Å alrededor del ligando). Se generó la esfera de 5 Å alrededor de donepezilo y se seleccionaron los 22 aminoácidos que se encontraron en esa zona. A partir de la alineación de las 11 secuencias con las que se realizó el modelado, se determinaron los 22 aminoácidos correspondientes el resto de secuencias. Por haber generado el mejor modelo anterior, se calcularon las escalas-Z (3) sobre el Set 3 con esta selección delimitada de aminoácidos condiciones, con el fin de observar el efecto de esto sobre el modelo proteoquimiométrico.



**Figura 4.10.** Curvas de aprendizaje del mejor modelo usando la secuencia de las proteínas completas, en comparación con la selección del sitio de unión (SU) de las mismas.

Tras la generación de los nuevos modelos variando el tamaño del conjunto de entrenamiento se generaron las curvas de entrenamiento del nuevo modelo (Figura 4.10). Comparando con el anterior mejor modelo se observa una mejoría, ya que usando solamente el sitio de unión al ligando se genera curvas de RMSE menores en todos los tamaños del conjunto de entrenamiento. De la misma forma, en todo momento la curva de validación por análisis de regresión presenta valores de  $R^2$  mayores al delimitar la descripción de las proteínas a sus sitios de unión. Usando el 70% de los datos como conjunto de entrenamiento (Figura 4.11), el desempeño del mejor modelo anterior ( $R^2 = 0.686$ ) incrementa significativamente en el nuevo modelo con una  $R^2 = 0.744$ . Este nuevo modelo se selecciona para los siguientes pasos de validación y cribaje de compuestos para buscar inhibidores de AChE.



**Figura 4.11.** Desempeño del mejor modelo usando la secuencia de las proteínas completas, en comparación con la selección del sitio de unión (SU) de las mismas (conjunto de entrenamiento al 70%).

En cuanto a las propiedades evaluadas en el modelo con mayor importancia destacan entre las 30 principales (Anexo 69) las propiedades de los compuestos evaluados, estando el peso molecular, la fracción del área superficial polar molecular, ALogP y número de enlaces rotables en las primeras cuatro posiciones. Las otras propiedades son el número de aceptores y donadores de enlaces de H. En cuanto a los descriptores de los aminoácidos, entre las primeras posiciones solamente se encuentra los tres descriptores de escalas Z del residuo 13 (Val325 en *Homo sapiens* Uniprot:P22303 y Val395 en *Tetranychus urticae* Uniprot:D8V7J7). En esta selección mencionada de propiedades

principales, las huellas dactilares de los compuestos tienden a mostrar fragmentos con nitrógenos cerca de estructuras de anillos y cadenas alifáticas con enlaces  $\pi$  que puedan relocalizarse por resonancia. Se pueden destacar las huellas dactilares CM#ECFP\_6#-1685106965, que muestra un fragmento carbamato, y CM#ECFP\_6#-2003064156 que es una porción de un fenilcarbamato; esto debido a que una clase de pesticidas e insecticidas que se han empleado desde hace tiempo son los carbamatos, como inhibidores de AChE (Fukuto, 1990; Mutunga *et al.*, 2019).

### Cribado virtual

El cribado virtual se llevó a cabo sobre la secuencia de AChE humana con el fin de buscar nuevos compuestos que puedan destinarse como terapia contra Alzheimer, así como la secuencia de AChE de *Tetranychus urticae* para la búsqueda de nuevos insecticidas. De las 989 secuencias de AChE obtenidas tras el análisis BLAST inicial, se encontraron diferentes versiones de la enzima del ácaro ya mencionado. De sus entradas de Uniprot, se buscó sus referencias cruzadas a otras bases de datos, y no se encontraron entradas en PDB para dichas secuencias, pero sí las referencias a sus artículos originales (Anazawa *et al.*, 2003; Khajehali *et al.*, 2009). La mayoría de las secuencias correspondían a *Tetranychus urticae* resistentes a insecticidas, de origen europeo y japonés, y una variante japonesa susceptible. Debido a que se necesitaría secuenciar a los ácaros de la región de Baja California, donde se plantea se pudiera aplicar nuevos insecticidas desarrollados más adelante en este proyecto, para definir si existen o no mutaciones en la secuencia de AChE, se decidió seleccionar la secuencia de referencia del estudio europeo para partir de un ácaro no mutado como inicio de este estudio (código Uniprot: D8V7J7).

Debido a que el mejor modelo desarrollado se obtuvo tras la delimitación de la secuencia del sitio de unión a ligandos de la enzima, las secuencias tanto humana como de *Tetranychus urticae* fueron alineadas para la selección de los aminoácidos correspondientes (Tabla 4.4) antes del cálculo de sus huellas dactilares.

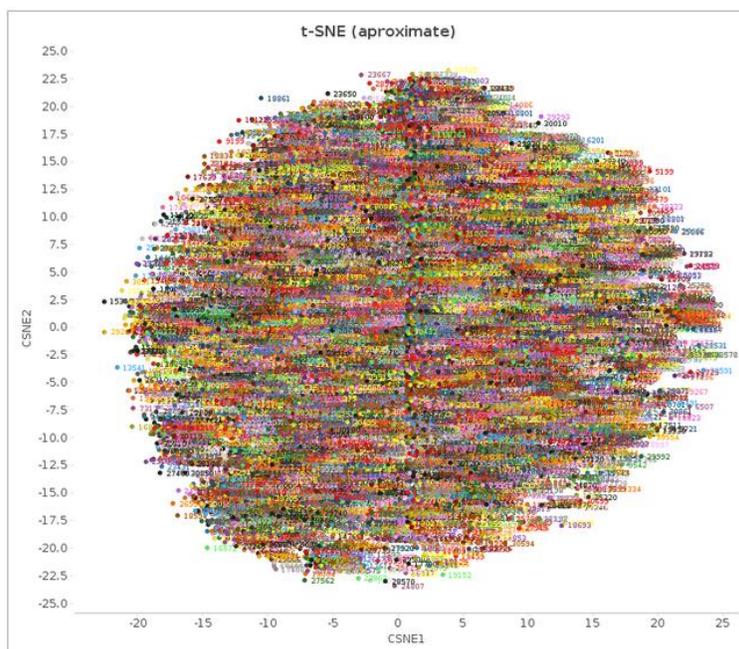
El cribado virtual se llevó a cabo con los compuestos incluidos en la base de datos ChemDiv de ZINC (Sterling e Irwin, 2015) que consta de aproximadamente 1.5 millones de compuestos. Para realizar el cribado de manera más manejable, primero se realizó una agrupación (*clustering*) de los compuestos según su similitud estructural, para hacer un

primer cribado con los centros de los *clusters* formados (un representante por agrupación). Una vez identificados los centros de *cluster* con mejor valor de inhibición predicho según el modelo, se podrían tomar todos los miembros de dichas agrupaciones (relacionados estructuralmente entre sí) para hacer una segunda ronda más exhaustiva del cribado ya con compuestos que pudieran proporcionar mejores resultados.

**Tabla 4.4.** Aminoácidos seleccionados de la secuencia de AChE de *Homo sapiens* y *Tetranychus urticae* para el cribado virtual.

| Código de acceso | Secuencia              |
|------------------|------------------------|
| P22303           | YDWGGYYESWLSVFRFYFYHGI |
| D8V7J7           | VDWGGWYESET.VVEFYFYHGI |

Calculando las huellas dactilares de los compuestos con ECFP 6 al igual que en los modelos generados, en un principio se delimitó un límite de distancia máxima de 0.2 del coeficiente de Tanimoto entre los compuestos para generar *clusters* de moléculas lo más parecidas entre sí, sin embargo esto generaba casi tantas agrupaciones como compuestos incluidos, con grupos de una o muy pocas estructuras. Por lo tanto se fue relajando la restricción para que un mayor número de *clusters* pudieran crearse. Al final se obtuvo con una distancia máxima de 0.6 para el índice de Tanimoto un total de 30985 *clusters* a partir de 1527499 compuestos de la base de datos, donde los centros de estas agrupaciones muestran en un t-SNE una distribución dispersa mayormente homogénea (Figura 4.12) por lo que se puede considerar que la agrupación fue adecuada.



**Figura 4.12.** Gráfica de t-SNE aproximada con los centros de *cluster* generados para el cribado virtual.

Los 30985 compuestos centros de grupo fueron descritos de la misma manera que los compuestos en los modelos (descriptores químicos según Lenselink *et al.* (2017) y huellas dactilares ECFP 6), y combinados con las dos secuencias diana para crear un total de 61970 combinaciones ligando-receptor. Estas combinaciones fueron introducidas al mejor modelo proteoquimiométrico seleccionado (uso de escalas Z (3) y delimitación del sitio de unión a ligando con  $R^2 = 0.744$ ) ordenando los resultados de valor de pchembl calculado en orden descendente.

Los resultados se encontraron entre un valor de pchembl de 8.2926 (para la combinación del compuesto V003-5153 contra P22303) y de 4.8896 (compuesto 8003-4102 contra P22303). Dado que el primer y último resultado pertenecen a la inhibición de la AChE humana, se revisó el rango en el que se obtuvieron los resultados contra la AChE de la araña roja, que se encontraron entre un valor de pchembl de 7.1895 (compuesto V003-5153 contra D8V7J7) y de 5.1193 (compuesto 8003-4102 contra D8V7J7). Para ambas secuencias de la enzima, coincidió el compuesto centro de *cluster* con mejor y peor valor predicho.

Revisando en conjunto los primeros 100 valores resultado, 95 de los resultados son de la combinación de un compuesto con la secuencia humana P22303 y solamente cinco de

estos resultados son de compuestos con la secuencia de araña roja D8V7J7. Revisando entonces los mejores 100 valores considerando por separado las dos secuencias de AChE, tenemos que para la secuencia P22303 los mejores resultados se encuentran entre pchembl 8.2926 y 6.6006 (compuesto V003-5153 del *cluster* 29405 y compuesto C183-0062 del *cluster* 13977) y para la secuencia D8V7J7 los mejores resultados se encuentran entre pchembl 7.1895 y 6.2144 (compuesto V003-5153 del *cluster* 29405 y compuesto F801-0218 del *cluster* 17705). Entre estos resultados, 70 *clusters* se encuentran representados en los mejores 100 resultados de ambas secuencias de AChE, mientras que 60 de ellos solamente están presentes en los mejores resultados de una sola secuencia, dando un total de 130 *clusters* (Anexo 70). Si bien algunos de ellos solamente se encuentran dentro de los mejores resultados para una sola secuencia de AChE, se decidieron incluir ya que el cribado en estos casos fue con los centros de los *clusters*, y cabe la posibilidad de que tomando el total de miembros de cada agrupación se puedan encontrar compuestos activos contra cualquiera de las dos secuencias.

De estas 130 agrupaciones o *clusters* se tomaron entonces la totalidad de sus miembros, siendo en total 18779 compuestos. De manera similar a la primera ronda de cribado, se calcularon los descriptores y huellas dactilares de los compuestos, se combinaron con la información respectiva de las dos secuencias diana y se llevó a cabo su cribado contra el modelo proteoquimiométrico seleccionado.

Del mismo modo comparado a la primer ronda de cribado, observando los mejores 100 resultados todos ellos fueron combinaciones de compuestos contra la secuencia humana P22303, por lo que se revisaron los 50 mejores resultados por secuencia. Lo primero que se puede notar con estos valores seleccionados para cada secuencia, es que los compuestos pertenecen a los mismos 7 *clusters* como puede observarse en la Tabla 4.5. El *cluster* que aporta los mejores resultados para ambas secuencias es el *cluster* 29405, con 22 compuestos pronosticados contra la secuencia P22303 y 21 compuestos contra D8V7J7; y a pesar de que el *cluster* 20313 solamente aporta tres compuestos para cada secuencia, es del cual pertenece el mejor resultado en cada caso, que resulta ser el mismo compuesto.

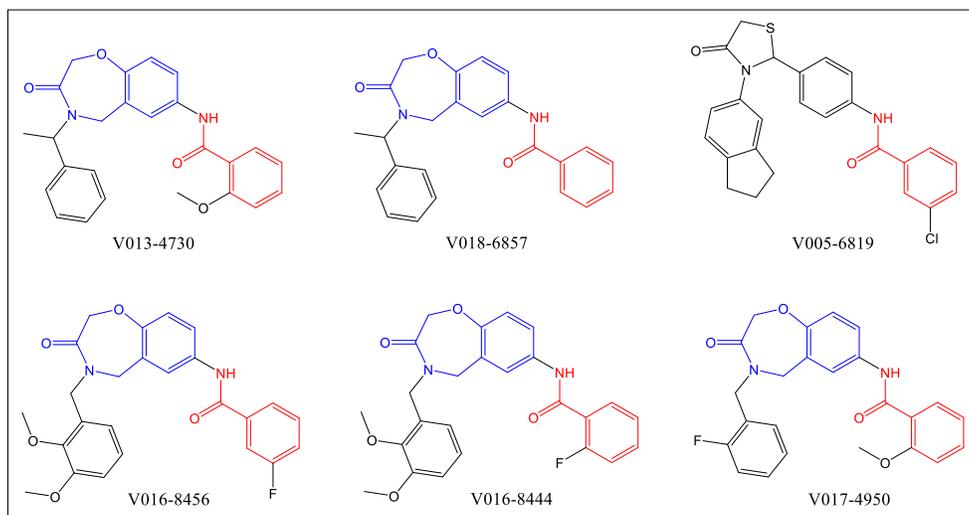
El compuesto con clave V013-4730 (Figura 4.13) presenta el mejor resultado de pchembl contra ambas secuencias: contra P22303 con un valor de 8.5699, y un valor de pchembl de 7.4133 contra la secuencia del ácaro D8V7J7. El rango de valores predichos

para la secuencia de la araña roja es menor que el de la secuencia humana para sus respectivas selecciones de los primeros 50 resultados (Tabla 4.6): el último compuesto seleccionado de la secuencia D8V7J7 con clave V003-7217 (*cluster* 19896) tiene un valor de pchembl de 6.9536, mientras que para la secuencia P223033 es la molécula V018-3552 (*cluster* 20313) con un pchembl de 7.8707. Cabe resaltar que en esta selección de las moléculas con mejores valores predichos, 45 se encuentran pareadas con ambas secuencias mientras que 10 son compuestos pareados únicamente a una de las dos secuencias. Por lo tanto, tomando los primeros 50 resultados para cada secuencia arrojan un total de 55 compuestos, de los cuales algunas estructuras pueden observarse en la Figura 4.13, mientras que el total se encuentran en el Anexo 71.

**Tabla 4.5.** Frecuencia de aparición de cada *cluster* por secuencia de AChE en los 50 mejores resultados del cribado final.

| <i>Cluster</i> | Frecuencia en P22303 | Frecuencia en D8V7J7 |
|----------------|----------------------|----------------------|
| 29405          | 22                   | 21                   |
| 19901          | 15                   | 12                   |
| 30995          | 4                    | 6                    |
| 19896          | 4                    | 6                    |
| 20313          | 3                    | 3                    |
| 30931          | 1                    | 1                    |
| 3056           | 1                    | 1                    |

Todos las moléculas de estos primeros resultados seleccionados cuentan con un fragmento benzamida en su estructura, y todos menos el compuesto V005-6819 presentan además un fragmento benzoxazepinona (3-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzoxazepina), marcados en rojo y azul respectivamente en la Figura 4.13. Sin embargo, el compuesto V005-6819 tiene en el lugar de la benzoxazepinona un anillo benceno unido por un enlace a un anillo oxo tiazolina; es decir, un anillo de cinco miembros en lugar de siete que sigue presentando una cetona adyacente a un nitrógeno, y en donde análogamente se encontraría el oxígeno de la benzoxazepinona se observa un átomo de azufre, siendo estos dos elementos de la misma familia en la tabla periódica. Por lo tanto este fragmento diferente en V005-6819 sigue guardando cierta semejanza química con el resto de compuestos seleccionados.



**Figura 4.13.** Estructuras de compuestos seleccionados obtenidos en el cribado virtual. En rojo se remarcan los fragmentos benzamida y en azul los benzoxazepinona.

Estos fragmentos comunes a los compuestos señalados en los primeros lugares en el cribado virtual han sido señalados en la literatura como núcleos de moléculas con actividades inhibitorias de colinesterasas.

En el caso del fragmento benzamida, se ha propuesto como un núcleo con el cual diseñar terapias contra Alzheimer, encontrando moléculas con este fragmento que son inhibitorias de tanto de acetilcolinesterasa como butirilcolinesterasa (BuChE) (Peng *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018; Abdullaha, Nuthakki y Bharate, 2020).

Por otra parte, núcleos de 1,4-benzoxazepinas y en mayor medida 1,5-benzoxazepinas han sido identificados como inhibidores de colinesterasas, o propuestos como tratamiento contra Alzheimer por otras vías (Szalóki Vargáné *et al.*, 2020; Stefaniak y Olszewska, 2021). En el caso de 1,4-benzoxazepinonas, estas han presentado inhibición de AChE y BuChE (Chen *et al.*, 2018) así como de monoamino oxidasa B (MAO-B), lo cual también se ha reportado como una vía para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Chen *et al.*, 2016).

Por lo tanto, los resultados del cribado virtual con el modelo creado parece indicar propuestas viables en la búsqueda de nuevos inhibidores de AChE, ya que estos dos fragmentos en conjunto pudieran formar un nuevo grupo de moléculas por estudiar en la inhibición de acetilcolinesterasa y el tratamiento contra Alzheimer.

**Tabla 4.6.** Primeros 50 resultados del cribado virtual por secuencia analizada.

| P22303 |           |         |         |        | D8V7J7    |         |         |        |
|--------|-----------|---------|---------|--------|-----------|---------|---------|--------|
|        | Compuesto | Cluster | pchembl | D.E.   | Compuesto | Cluster | pchembl | D.E.   |
| 1      | V013-4730 | 20313   | 8.5699  | 2.4180 | V013-4730 | 20313   | 7.4133  | 2.4073 |
| 2      | V017-4950 | 29405   | 8.3129  | 2.4048 | V018-6857 | 20313   | 7.2393  | 2.3339 |
| 3      | V016-8444 | 29405   | 8.2578  | 2.4170 | V017-4950 | 29405   | 7.2292  | 2.3976 |
| 4      | V016-8456 | 29405   | 8.2409  | 2.3951 | V016-8444 | 29405   | 7.1977  | 2.3835 |
| 5      | V018-6857 | 20313   | 8.2029  | 2.4511 | V016-8456 | 29405   | 7.1668  | 2.3412 |
| 6      | V017-6883 | 29405   | 8.1980  | 2.4167 | V017-6883 | 29405   | 7.1475  | 2.3567 |
| 7      | V020-6797 | 29405   | 8.1591  | 2.4931 | V016-8397 | 29405   | 7.1464  | 2.3638 |
| 8      | V016-8397 | 29405   | 8.1576  | 2.4503 | V017-4593 | 29405   | 7.1225  | 2.3415 |
| 9      | V017-4593 | 29405   | 8.1516  | 2.4184 | V017-4476 | 29405   | 7.1164  | 2.2525 |
| 10     | V016-9268 | 19901   | 8.1475  | 2.3597 | V005-6819 | 30931   | 7.1150  | 2.2823 |
| 11     | V028-8055 | 29405   | 8.1289  | 2.3726 | V020-6797 | 29405   | 7.1149  | 2.3902 |
| 12     | V017-4419 | 3056    | 8.1252  | 2.3580 | V017-4419 | 3056    | 7.1087  | 2.2817 |
| 13     | V016-8624 | 19896   | 8.0952  | 2.4183 | V003-5522 | 30995   | 7.0960  | 2.2015 |
| 14     | V017-6871 | 29405   | 8.0838  | 2.4466 | V017-6871 | 29405   | 7.0946  | 2.3547 |
| 15     | V018-0311 | 29405   | 8.0567  | 2.4211 | V017-6882 | 29405   | 7.0931  | 2.3386 |
| 16     | V016-8457 | 29405   | 8.0511  | 2.4273 | V016-9268 | 19901   | 7.0883  | 2.2940 |
| 17     | V017-6882 | 29405   | 8.0502  | 2.4455 | V028-8055 | 29405   | 7.0880  | 2.2987 |
| 18     | V016-8596 | 19901   | 8.0447  | 2.3451 | V016-8584 | 19896   | 7.0833  | 2.3207 |
| 19     | V018-0262 | 19901   | 8.0331  | 2.3505 | V016-8624 | 19896   | 7.0792  | 2.3075 |
| 20     | V017-4525 | 29405   | 8.0243  | 2.4403 | V016-8457 | 29405   | 7.0772  | 2.3120 |
| 21     | V016-9186 | 19901   | 8.0231  | 2.3854 | V003-5557 | 30995   | 7.0700  | 2.2088 |
| 22     | V017-4476 | 29405   | 8.0134  | 2.3315 | V014-5704 | 30995   | 7.0614  | 2.3111 |
| 23     | V017-4432 | 29405   | 8.0132  | 2.3186 | V018-0311 | 29405   | 7.0499  | 2.3068 |
| 24     | V016-8385 | 29405   | 8.0127  | 2.4116 | V016-9598 | 30995   | 7.0489  | 2.3064 |
| 25     | V014-5704 | 30995   | 8.0085  | 2.4310 | V017-4606 | 19901   | 7.0472  | 2.3374 |
| 26     | V017-4985 | 29405   | 8.0025  | 2.3395 | V017-4985 | 29405   | 7.0391  | 2.2623 |
| 27     | V016-8584 | 19896   | 7.9994  | 2.4086 | V016-8596 | 19901   | 7.0306  | 2.2715 |
| 28     | V015-8616 | 19901   | 7.9924  | 2.3489 | V017-4432 | 29405   | 7.0303  | 2.2405 |
| 29     | V016-9598 | 30995   | 7.9759  | 2.4186 | V018-0262 | 19901   | 7.0262  | 2.2717 |
| 30     | V005-6819 | 30931   | 7.9752  | 2.4686 | V011-1631 | 19896   | 7.0255  | 2.2057 |
| 31     | V018-0274 | 19901   | 7.9749  | 2.3948 | V017-4706 | 30995   | 7.0109  | 2.3042 |
| 32     | V003-5165 | 29405   | 7.9605  | 2.3669 | V016-9186 | 19901   | 7.0095  | 2.2766 |
| 33     | V017-4606 | 19901   | 7.9544  | 2.4485 | V017-4525 | 29405   | 7.0074  | 2.3180 |
| 34     | V017-4582 | 19901   | 7.9507  | 2.3659 | V015-8616 | 19901   | 7.0054  | 2.2607 |
| 35     | V011-1631 | 19896   | 7.9408  | 2.3992 | V016-8380 | 19901   | 7.0050  | 2.2863 |
| 36     | V003-4943 | 19896   | 7.9362  | 2.4733 | V016-8385 | 29405   | 7.0006  | 2.2895 |
| 37     | V017-4706 | 30995   | 7.9206  | 2.4359 | V017-4131 | 19901   | 6.9982  | 2.2766 |
| 38     | V003-5153 | 29405   | 7.9200  | 2.4417 | V016-9245 | 29405   | 6.9919  | 2.2961 |
| 39     | V017-4545 | 29405   | 7.9126  | 2.3358 | V018-0274 | 19901   | 6.9917  | 2.2849 |
| 40     | V003-5522 | 30995   | 7.9110  | 2.3545 | V018-0310 | 19901   | 6.9913  | 2.2819 |
| 41     | V003-5828 | 19901   | 7.9080  | 2.3210 | V017-4582 | 19901   | 6.9806  | 2.2697 |
| 42     | V028-6741 | 19901   | 7.9078  | 2.3653 | V016-8382 | 19896   | 6.9705  | 2.2613 |
| 43     | V018-0310 | 19901   | 7.9066  | 2.3998 | V003-4943 | 19896   | 6.9702  | 2.2927 |
| 44     | V016-8380 | 19901   | 7.9059  | 2.4053 | V017-4545 | 29405   | 6.9689  | 2.2282 |
| 45     | V017-4131 | 19901   | 7.9036  | 2.4238 | V016-8655 | 19901   | 6.9688  | 2.3150 |
| 46     | V016-9209 | 29405   | 7.9023  | 2.3789 | V003-5153 | 29405   | 6.9680  | 2.3028 |
| 47     | V018-0298 | 19901   | 7.9020  | 2.3388 | V003-5165 | 29405   | 6.9656  | 2.2376 |
| 48     | V016-8655 | 19901   | 7.8866  | 2.4416 | V018-4986 | 20313   | 6.9647  | 2.3241 |
| 49     | V016-9245 | 29405   | 7.8813  | 2.4310 | V028-8167 | 30995   | 6.9565  | 2.1834 |
| 50     | V018-3552 | 20313   | 7.8707  | 2.3987 | V003-7217 | 19896   | 6.9536  | 2.2487 |

D.E.: Desviación estándar.

## Conclusiones

Se llevó a cabo una metodología de síntesis orgánica con reacciones de adición conjugada tipo Aza-Michael, en el que se generaron 16 productos con estructuras: 2-alkilamino-1,4-naftoquinonas y 2-arilamino-1,4-naftoquinonas.

Los 16 compuestos sintéticos obtenidos fueron caracterizados estructuralmente por las técnicas de IR, CG-EM, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C, identificándose estos productos con los siguientes nombres sistemáticos:

- 2-(propilamino)naftalen-1,4-diona (**1**),
- 2-(butilamino)naftalen-1,4-diona (**2**),
- 2-(piperidin-1-il)naftalen-1,4-diona (**3**),
- 2-(bencilamino)naftalen-1,4-diona (**4**),
- 2-((3-hidroxiopropil)amino)naftalen-1,4-diona (**5**),
- Acetato de 3-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) propilo (**5a**),
- 2-((4-hidroxifenil)amino)naftalen-1,4-diona (**6**),
- 2-((3-clorofenil)amino)naftalen-1,4-diona (**7**),
- 2-((3-nitrofenil)amino)naftalen-1,4-diona (**8**),
- 2-((1-hidroxibutan-2-il)amino)naftalen-1,4-diona (**9**),
- Acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) butilo (**9a**),
- 2-((2-hidroxietil)amino)naftalen-1,4-diona (**10**),
- Acetato de 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino) etilo (**10a**),
- 2-((2-hidroxiopropil)amino)naftalen-1,4-diona (**11**),
- Acetato de 1-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)2-propilo (**11a**),
- 2-(fenetilamino)naftalen-1,4-diona (**12**).

Se determinó la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados mediante dos técnicas diferentes. Mediante la prueba del secuestro del radical de DPPH el compuesto sintetizado con mejor actividad fue **9a** NQ-2abu-Ac con un 52% de actividad. En el ensayo del secuestro del catión radical de ABTS el compuesto sintetizado con mejor actividad fue **6** NQ-Tira con un 47% de actividad.

No se lograron actividades antioxidantes comparables con el control empleado, vitamina C, ni se determinó que los fragmentos incorporados mejoraran la capacidad antioxidante del núcleo naftoquinónico.

Se determinó *in vitro* la inhibición enzimática de acetilcolinesterasa de los compuestos sintetizados. No se obtuvo un compuesto con mejor actividad inhibitoria que el control positivo empleado, galantamina.

El compuesto sintetizado con mejor actividad inhibitoria fue **6** NQ-Tira con una  $CI_{50}$  de 17.2  $\mu\text{g/mL}$ , equivalente a 0.0586 mM. En el caso de los compuestos con un grupo alcohol, la acetilación tiende a disminuir su actividad inhibitoria.

Se llevó a cabo una evaluación *in silico* de los compuestos sintetizados, mediante un estudio de acoplamiento molecular (*docking*) con la enzima acetilcolinesterasa (PDB ID: 1EVE). Se identificaron interacciones con residuos de aminoácidos con los que inhibidores de la enzima ya han sido reportados, como Trp84.

El compuesto **6** NQ-Tira presentó el mejor resultado en el análisis de *docking* con un puntaje de -10.50, coincidiendo en que este compuesto fue también el más activo en el estudio *in vitro*. Esto se atribuye a interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los residuos Trp84 y Tyr334, así como con un enlace de puente de H con Asp72.

Se creó una serie de modelos proteoquimiométricos para moléculas inhibitoras de AChE, de los cuales el mejor fue el Set 3 de secuencias de AChE, con un descriptor escalas-Z (3) para las proteínas y delimitación a los aminoácidos del sitio activo, con una  $R^2 = 0.744$  y  $RMSE = 0.650$ .

Con el modelo proteoquimiométrico seleccionado se llevó a cabo un cribado virtual de la base de datos ChemDiv de ZINC para las AChE humana y de araña roja. Para ambas dianas se encontró como mejores inhibidores estructuras que contienen fragmentos benzamida y benzoxazepinona.

### Trabajo futuro

Sintetizar derivados de la 1,4-naftoquinona con mayor diversidad estructural en el fragmento incorporado, así como ampliar la batería de ensayos *in vitro* a realizar con ellos para aumentar el cribado biológico de esta familia de compuestos.

Evaluar *in vitro* la inhibición de acetilcolinesterasa de los mejores compuestos pronosticados por el modelo proteoquimiométrico en líneas celulares humanas para el desarrollo de terapias contra la enfermedad de Alzheimer, así como *in vitro* o *in vivo* con insectos para el desarrollo de nuevos insecticidas.

**Bibliografia**

- Abdullaha, M., Nuthakki, V. K., Bharate, S. B. (2020) "Discovery of methoxy-naphthyl linked N-(1-benzylpiperidine) benzamide as a blood-brain permeable dual inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase" *European Journal of Medicinal Chemistry* (207):112761
- Abu-Elfotoh, A.-M., Tsuzuki, K., Nguyen, T. B., Chanthamath, S., Shibatomi, K., Iwasa, S. (2013) "Quinones synthesis via hydrogen peroxide oxidation of dihydroxy arenes catalyzed by homogeneous and macroporous-polymer-supported ruthenium catalysts" *Tetrahedron* (69):8612-8617
- Acharya, B. R., Bhattacharyya, B., Chakrabarti, G. (2008) "The natural naphthoquinone Plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding" *Biochemistry* (47):7838-7845
- Adewusi, E. A., Moodley, N., Steenkamp, V. (2011) "Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants" *South African Journal of Botany* (77):638-644
- Adwas, A. A., Elsayed, A. S. I., Azab, A. E., Quwaydir, F. A. (2019) "Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body" *Journal of applied Biotechnology & Bioengineering* (6):43-47
- Agarwal, G., Gupta, S., Gabrani, R., Gupta, A., Chaudhary, V. K., Gupta, V. (2019) "Virtual screening of inhibitors against Envelope glycoprotein of Chikungunya Virus: a drug repositioning approach" *Bioinformation* (15):439-447
- Akagi, Y., Harasawa, K., Komatsu, T. (2021) "Total synthesis of phenanthroviridin aglycon and its analog" *Asian Journal of Organic Chemistry* (10):1094-1096
- Alam, Md. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, Md. (2013) "Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity" *Saudi Pharmaceutical Journal* (21):143-152
- Ali, J., Camilleri, P., Brown, M. B., Hutt, A. J., Kirton, S. B. (2012a) "Revisiting the general solubility equation: *in silico* prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area" *Journal of Chemical Information and Modeling* (52):420-428
- Ali, J., Khan, R., Ahmad, N., Maqsood, I. (2012b) "Random forests and decision trees" *International Journal of Computer Science Issues* (9):272-278

- Amin, Sk. A., Ghosh, K., Gayen, S., Jha, T. (2021) “Chemical-informatics approach to COVID-19 drug discovery: Monte Carlo based QSAR, virtual screening and molecular docking study of some *in-house* molecules as papain-like protease (PLpro) inhibitors” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (39):4764-4773
- Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T., Kono, Y. (2003) “Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (33):509-514
- Badillo, S., Banfai, B., Birzele, F., Davydov, I. I., Hutchinson, L., Kam-Thong, T., Siebourg-Polster, J., Steiert, B., Zhang, J. D. (2020) “An introduction to machine learning” *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (107):871-885
- Bartolucci, C. Perola, E., Pilger, C., Fels, G., Lamba, D. (2001) “Three-dimensional structure of a complex of galantamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implication for the design of new anti-Alzheimer drugs” *Proteins* (42):182-191
- Bayrak, N., Yıldız, M., Yıldırım, H., Mataracı Kara, E., Ozbek Celik, B., Tuyun, A. F. (2020) “Brominated plastoquinone analogs: synthesis, structural characterization, and biological evaluation” *Journal of Molecular Structure* (1219):128560
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000) “The Protein Data Bank” *Nucleic Acids Research* (28):235-242
- Bharatam, P. V. (2021) *Computer-Aided Drug Design*. En: *Drug Discovery and Development*, 1º edición, Singapur:Springer
- Bhavya, M. L., Chandu, A. G. S., Devi, S. S. (2018) “*Ocimum tenuiflorum* oil, a potential insecticide against rice weevil with anti-acetylcholinesterase activity” *Industrial Crops & Products* (126):434-439
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z. (2013) “Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods”
- Boström, J., Brown, D. G., Young, R. J., Keserü, G. M. (2018) “Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox” *Nature Reviews Drug Discovery* (17):709-727

- Burda, S., Oleszek, W. (2001) "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (49):2774-2779
- Boonyaketguson, S., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Trisuwan, K. (2018) "Naphthoquinones from the leaves of *Rhinacanthus nasutus* having acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities" *Fitoterapia* (124):206-210
- Chen, R., Xiao, J., Ni, Y., Xu, H.-F., Zheng, M., Tong, X., Zhang, T.-T., Liao, C., Tang, W.-J. (2016) "Novel tricyclic pyrazolo[1,5-*d*][1,4]benzoxazepine-5(6*H*)-one: Design, synthesis, model and use as hMAO-B inhibitors" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (24):1741-1748
- Chen, S.-C., Qiu, G.-L., Li, B., Shi, J.-B., Liu, X.-H., Tang, W.-J. (2018) "Tricyclic pyrazolo[1,5-*d*][1,4]benzoxazepine-5(6*H*)-one scaffold derivatives: Synthesis and biological evaluation as selective BuChE inhibitors" *European Journal of Medicinal Chemistry* (147):194-204
- Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L., Carlier, P. R. (2018) "Structure of the G119S mutant acetylcholinesterase of the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals basis of insecticide resistance" *Structure* (26):130-136
- Choi, R. Y., Coyner, A. S., Kalpathy-Cramer, J., Chiang, M. F., Campbell, J. P. (2020) "Introduction to machine learning, neural networks, and deep learning" *Translational Vision science & Technology* (9):14
- Cortes-Ciriano, I., van Westen, G. J. P., Lenselink, E. B., Murrell, D. S., Bender, A., Malliavin, T. (2014) "Proteochemometric modeling in a Bayesian framework" *Journal of Cheminformatics* (6):35
- Couladouros, E. A., Plyta, Z. F., Papageorgiou, V. P. (1996) "A general procedure for the efficient synthesis of (alkylamino)naphthoquinones" *The Journal of Organic Chemistry* (61):3031-3033
- Da Silva, F. de C., Ferreira, V. F. (2016) "Natural naphthoquinones with great importance in Medicinal Chemistry" *Current Organic Synthesis* (13):334-371
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017) "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules" *Scientific Reports* (7):42717
- De la Torre, P., Astudillo Saavedra, L., Caballero, J., Quiroga, J., Alzate-Morales, J. H., Gutiérrez Cabrera, M., Trilleras, J. (2012) "A novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis and evaluation of (E)-2-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-heteroarylacrylonitriles" *Molecules* (17):12072-12085

- Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C., Joglar Tamargo, J. (2003) *Introducción a la Química Terapéutica*, 2º edición, Barcelona: Díaz de Santos
- Denisko, D., Hoffman, M. M. (2018) “Classification and interaction in random forests” *Proceedings of the National Academy of Sciences* (115):1690-1692
- Dias, F. R. F., Novais, J. S., Devillart, T. A. do N. S., da Silva, W. A., Ferreira, M. O., Loureiro, R. de S., Campos, V. R., Ferreira, V. F., de Souza, M. C. B. V., Castro, H. C., Cunha, A.C. (2018) “Synthesis and antimicrobial evaluation of amino sugar-based naphthoquinones and isoquinoline-5,8-diones and their halogenated compounds” *European Journal of Medicinal Chemistry* (156):1-12
- Díaz-Rubio, L., Hernández-Martínez, R., Estolano-Cobián, A., Chávez-Velasco, D., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., Rivero, I. A., García-González, V., Ramos, M. A., Córdova-Guerrero, I. (2019) “Synthesis, biological evaluation and docking studies of chalcone and flavone analogs as antioxidants and acetylcholinesterase inhibitors” *Applied Sciences* (9):410
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., Sussman, J. L. (2010) “Acetylcholinesterase: from 3D structure to function” *Chemico-biological interactions* (187):10-22
- Ertel, W. (2017) *Introduction to Artificial Intelligence*, 2º edición, Suiza: Springer International Publishing
- Fan, J., Fu, A., Zhang, L. (2019) “Progress in molecular docking” *Quantitative Biology* (7):83-89
- Fernandez, H. L., Moreno, R. D., Inestrosa, N. C. (2002) “Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization, and physiological regulation” *Journal of Neurochemistry* (66):1335-1346
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., Ribeiro, F. M. (2016) “Alzheimer’s disease: targeting the cholinergic system” *Current Neuropharmacology* (14):101-115
- Forman, H. J., Zhang, H. (2021) “Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy” *Nature Reviews Drug Discovery* (20):689-709
- Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A. (2008) *Foye’s Principles of Medicinal Chemistry*, 6º edición, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins

Friedman, R., Boye, K., Flatmark, K. (2013) "Molecular modelling and simulations in cancer research" *Biochimica et Biophysica Acta* (1836):1-14

Fukuto, T. R. (1990) "Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides" *Environmental Health Perspectives* (87):245-254

Gaikwad, R., Ghorai, S., Amin, Sk. A., Adhikari, N., Patel, T., Das, K., Jha, T., Gayen, S. (2018) "Monte Carlo based modelling approach for designing and predicting cytotoxicity of 2-phenylindole derivatives against breast cancer cell line MCF7" *Toxicology in Vitro* (52):23-32

Gao, X.-h., Liu, L.-b., Liu, H.-r., Tang, J.-j., Kang, L., Wu, H., Cui, P., Y., J. (2018) "Structure-activity relationship investigation of benzamide and picolinamide derivatives containing dimethylamine side chain as acetylcholinesterase inhibitors" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (33):110-114

Gertrudes, J. C., Maltarollo, V. G., Silva, R. A., Oliveira, P. R., Honório, K. M., da Silva, A. B. F. (2012) "Machine learning techniques and drug design" *Current Medicinal Chemistry* (19):4289-4297

Gorecki, L., Andrys, R., Schmidt, M., Kucera, T., Psotka, M., Svobodova, B., Hrabcova, V., Hepnarova, V., Bzonek, P., Jun, D., Kuca, K., Korabecny, J., Musilek, K. (2020) "Cysteine-targeted insecticides against *A. gambiae* acetylcholinesterase are neither selective nor reversible inhibitors" *ACS Medicinal Chemistry Letters* (11):65-71

Gramatica, P. (2007) "Principles of QSAR models validation: internal and external" *QSAR & Combinatorial Science* (26):694-701

Gramatica, P. (2013) On the development and validation of QSAR models. En: *Computational Toxicology, Volume II*, 1º edición, New Jersey:Humana Totowa

Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., Giacobini, E., Khachaturian, Z. S. (2019) "Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research" *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* (6):2-15

Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I., Sussman, J. L. (1993) "Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (90):9031-9035

- Havaux, M. (2020) "Plastoquinone in and beyond photosynthesis" *Trends in Plant Science* (25):1252-1265
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D.M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., Lee, R. E. (2009) "Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase" *Journal of Chemical Information and Modeling* (49):444-460.
- Hou, Y., Vasileva, E. A., Carne, A., McConell, M., Bekhit, A. E.-D. A., Mishchenko, N. P. (2018) "Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications" *RSC Advances* (8):32637-32650
- Ibezim, A., Onah, E., Dim, E. N., Ntie-Kang, F. (2021) "A computational multi-targeting approach for drug repositioning for psoriasis treatment" *BMC Complementary Medicina and Therapies* (21):193
- Kamauchi, H., Oda, T., Horiuchi, K., Takao, K., Sugita, Y. (2020) "Synthesis of natural product-like polyprenylated phenols and quinones: Evaluation of their neuroprotective activities" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (28):115156
- Karlsson, J. O., Nguyen, N. V., Foland, L. D., Moore, H. W. (1985) "(2-alkynylethenyl) ketenes: A new benzoquinone synthesis" *Journal of the American Chemical Society* (107):3392-3393
- Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J., Tsagkarakou, A. (2009) "Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates" *Pest Management Science* (66):220-228
- Khelifi, I., Saada, M., Hayouni, E. A., Tourette, A., Bouajila, J., Ksouri, R. (2020) "Development and characterization of novel bigel-based 1,4-naphthoquinones for topical application with antioxidant potential" *Arabian Journal for Science and Engineering* (45):53-61
- Kim, Y. H., Lee, S. H. (2013) "Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta?" *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (43):47-53
- Kocanci, F. G., Hamamcioglu, B., Aslim, B. (2017) "The anti-AChE and anti-proliferative activities of *Glaucium acutidentatum* and *Glaucium corniculatum* alkaloid extracts" *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (7):191-200

Koshland Jr., D. E. (1995) "The key-lock theory and the induced fit theory" *Angewandte Chemie International Edition in English* (33):2375-2378

Kroese, D. P., Brereton, T., Taimre, T., Botev, Z. I. (2014) "Why the Monte Carlo method is so important today" *WIREs Computational Statistics* (6):386-392

Kryger, G., Silman, I., Sussman, J. L. (1999) "Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs" *Structure* (7):297-307.

Kubat, M. (2017) *An introduction to Machine Learning*, 2º edición, Suiza: Springer International Publishing

Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., Snezhkina, A. V. (2016) "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer" *Oncotarget* (7):44879-44905

Kumar, P., Kumar, A., Sindhu, J. (2019) "Design and development of novel focal adhesion kinase (FAK) inhibitors using Monte Carlo method with index of ideality of correlation to validate QSAR" *SAR and QSAR in Environmental Research* (30):63-80

Kumar, S., Malachowski, W. P., DuHadaway, J. B., LaLonde, J. M., Carroll, P. J., Jaller, D., Metz, R., Prendergast, G. C., Muller, A. J. (2008) "Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone based inhibitors" *Journal of Medicinal Chemistry* (51):1706-1718

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005) "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos" *Food Science and Technology* (25):726-732

Lang, G.-J., Yan Zhu, K., Zhang, C.-X. (2012) "Can acetylcholinesterase serve as a target for developing more selective insecticides?" *Current Drug Targets* (13):495-501

Lapillo, M., Tuccinardi, T., Martinelli, A., Macchia, M., Giordano, A., Poli, G. (2019) "Extensive reliability evaluation of docking-based target-fishing strategies" *International Journal of Molecular Sciences* (20):1023

Lapins, M., Eklund, M., Spjuth, O., Prusis, P., Wikberg, J. E. S. (2008) "Proteochemometric modeling of HIV protease susceptibility" *BMC Bioinformatics* (9):181

- Lazarević-Pašti, T., Leskovac, A., Momić, T., Petrović, S., Vasić, V. (2017) "Modulators of acetylcholinesterase activity: from Alzheimer's disease to anti-cancer drugs" *Current Medicinal Chemistry* (24):3283-3309
- Legg, S., Hutter, M. (2007) "A collection of definitions of intelligence" *Frontiers in Artificial Intelligence and Applications* (157):17-24
- Lenselink, E. B., ten Dijke, N., Bongers, B., Papadatos, G., van Vlijmen, H. W. T., Kowalczyk, W., IJzerman, A. P., van Westen, G. J. P. (2017) "Beyond the hype: deep neural networks outperform established methods using a ChEMBL bioactivity benchmark set" *Journal of Cheminformatics* (9):45
- Liebeskind, L. S., Riesinger, S. W. (1993) "Substituted quinone synthesis by palladium-copper cocatalyzed cross-coupling of stannylquinones with aryl and heteroaryl iodides" *The Journal of Organic Chemistry* (58):408-413
- 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
- Liu, C., Shen, G.-N., Luo, Y.-H., Piao, X.-J., Jiang, X.-Y., Meng, L.-Q., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J.-R., Wang, H., Xu, W.-T., Li, J.-Q., Liu, Y., Wu, Y.-Q., Sun, H.-N., Han, Y.-H., Jin, M.-H., Cui, Y.-D., Fang, N.-Z., Jin, C.-H. (2018) "Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (96):9-19
- López L., L. I., Leyva, E., García de la Cruz, R. F. (2011) "Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales" *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* (42):6-17
- Luo, H., Fokoue-Nkoutche, A., Singh, N., Yang, L., Hu, J., Zhang, P. (2018) "Molecular docking for prediction and interpretation of adverse drug reactions" *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* (21):314-322
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006) "Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review" *Journal of the Science of Food and Agriculture* (86):2046-2056

- Macías López, M. A., López López, L. I., Sáenz Galindo, A., Silva Belmares, S. Y. (2013) “Síntesis de derivados de 1,4-naftoquinona por metodologías verdes y su importancia biológica” *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* (5):20-26
- Marcos Llorente, A. (1995) “Reactividad de aminoquinonas frente a electrófilos. Síntesis de análogos de diazaquinomicina A” (Tesis de Doctorado)
- Martínez Cifuentes, M. A. (2013) “Regioselectividad en el acoplamiento oxidativo C-N de quinonas con aminas y su utilización en la obtención de inhibidores de fosfatasa Cdc25B e inhibidores de la proliferación de células cancerosas” (Tesis de Doctorado)
- Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D. D., Lambertucci, C., Volpini, R., Armenta, F. (2021) “Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease” *Neuropharmacology* (190):108352
- Matveieva, M., Polishchuk, P. (2021) “Benchmarks for interpretation of QSAR models” *Journal of Cheminformatics* (13):41
- McCulloch, W. S., Pitts, W. (1943) “A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity” *Bulletin of Mathematical Biophysics* (5):115-133
- 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
- Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., DesJarlais, R. L. (2005) “Docking: successes and challenges” *Current Pharmaceutical Design* (11):323-333
- Mone, N. S., Bhagwat, S. A., Sharma, D., Chaskar, M., Patil, R. H., Zamboni, P., Nawani, N. N., Satpute, S. K. (2021) “Naphthoquinones and their derivatives: emerging trends in combating microbial pathogens” *Coatings* (11):434
- Mughal, E. U., Sadiq, A., Murtaza, S., Rafique, H., Zafar, M. N., Riaz, T., Khan, B. A., Hameed, A., Khan, K. M. (2017) “Synthesis, structure-activity relationship and molecular docking of 3-oxoaurones and 3-thioaurones as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (25):100–106

Mutunga, J. M., Ma, M., Chen, Q.-H., Hartsel, J. A., Wong, D. M., Ding, S., Totrov, M., Carlier, P. R., Bloomquist, J. R. (2019) "Mosquito acetylcholinesterase as a target for novel phenyl-substituted carbamates" *International Journal of Environmental Research and Public Health* (16):1500

Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., Zhang, H.-Y. (2004) "Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>•+</sup> assay" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (52):4669-4674

Olalere, O. A., Abdurahman, N. H., Alara, O. R. (2017) "Extraction, radical scavenging activities and physicochemical fingerprints of black pepper (*Piper nigrum*) extract" *Journal of Food Measurement and Characterization* (11):2195-2201

Olawode, E. O., Tandlich, R., Prinsloo, E., Isaacs, M., Hoppe, H., Seldon, R., Warner, D. F., Steenkamp, V., Kaye, P. T. (2019) "Synthesis and biological evaluation of 2-chloro-3-[(thiazol-2-yl)amino]-1,4-naphthoquinones" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (29):1572-1575

Patel, O. P. S., Beteck, R. M., Legoabe, L. J. (2021) "Antimalarial application of quinones: A recent update" *European Journal of Medicinal Chemistry* (210):113084

Peng, D.-Y., Sun, Q., Zhu, X.-L., Lin, H.-Y., Chen, Q., Yu, N.-X., Yang, W.-C., Yang, G.-F. (2012) "Design, synthesis, and bioevaluation of benzamides: Novel acetylcholinesterase inhibitors with multi-functions on butyrylcholinesterase, A $\beta$  aggregation, and  $\beta$ -secretase" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (20):6739-6750

Pereyra, C. E., Dantas, R. F., Ferreira, S. B., Gomes, L. P., Silva-Jr, F. P. (2019) "The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones" *Cancer Cell International* (19):207

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) "UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis" *Journal of Computational Chemistry* (25):1605-1612

Pinzi, L., Rastelli, G. (2019) "Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery" *International Journal of Molecular Sciences* (20):4331

Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., Serban, A. I. (2021) "Oxidative stress mitigation by antioxidants – An overview on their chemistry and influences on health status" *European Journal of Medicinal Chemistry* (209):112891

- Qiu, H.-Y., Wang, P.-F., Lin, H.-Y., Tang, C.-Y., Zhu, H.-L., Yang, Y.-H. (2018) "Naphthoquinones: a continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents" *Chemical Biology & Drug Design* (91):681-690
- Rani, R., Narasimhan, B., Varma, R. S., Kumar, R. (2021) "Naphthoquinone derivatives exhibit apoptosis-like effect and anti-trypanosomal activity against *Trypanosoma evansi*" *Veterinary Parasitology* (290):109367
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine* (26):1231-1237
- Rosenblatt, F. (1958) "The Perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain" *t* (65):386-408
- Salazar-Aranda, R., Granados-Guzmán, G., Pérez-Meseguer, J., González, G. M., Waksman de Torres, N. (2015) "Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*" *Molecules* (20):17903-17912
- Sanner, M. F., (1999) "Python: A programming language for software integration and development" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* (17):57-61
- Shang, X. F., Liu, Y. Q., Guo, X., Miao, X. L., Chen, C., Zhang, J. X., Xu, X. S., Yang, G. Z., Yang, C. J., Li, J. C., Zhang, X. S. (2018) "Application of sustainable natural resources in agriculture: acaricidal and enzyme inhibitory activities of naphthoquinones and their analogs against *Psoroptes cuniculi*" *Scientific Reports* (8):1609
- Shen, C., Ding, J., Wang, Z., Cao, D., Ding, X., Hou, T. (2020) "From machine learning to deep learning: advances in scoring functions for protein-ligand docking" *WIREs Computational Molecular Science* (10):e1429
- Shim, K. H., Go, H. G., Bae, H., Jeong, D. E., Kim, D., Youn, Y. C., Kim, S., An, S. S. A., Kang, M. J. (2021) "Decreased exosomal acetylcholinesterase activity in the plasma of patients with Parkinson's disease" *Frontiers in Aging Neuroscience* (13):665400
- Simeone, O. (2018) "A very brief introduction to machine learning with applications to communication systems" *IEEE Transactions on Cognitive Communications and Networking* (4):648-664

- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., Singh, D. (2013) "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection" *European Journal of Medicinal Chemistry* (70):165-188
- Stafford, D. W. (2005) "The vitamin K cycle" *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (3):1873-1878
- Stefaniak, M., Olszewska, B. (2021) "1,5-Benzoxazepines as a unique and potent scaffold for activity drugs: A review" *Archiv der Pharmazie* (354):2100224
- Stepanova, E. E., Balandina, S. Y., Drobkova, V. A., Dmitriev, M. V., Mashevskaya, I. V., Maslivets, A. N. (2021) "Synthesis, in vitro antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and reverse docking-based target fishing of 1,4-benzoxazin-2-one derivatives" *Archiv der Pharmazie* (354):2000199
- Sterling, T., Irwin, J. (2015) "ZINC15—Ligand discovery for everyone" *Journal of Chemical Information and Modeling* (55):2324-2337
- Szalóki Vargáné, D., Tóth, L., Buglyó, B., Kiss-Szikszai, A., Mándi, A., Mátyus, P., Antus, S., Chen, Y., Li, D., Tao, L., Zhang, H., Kurtán, T. (2020) "[1,5]-Hydride shift-cyclization versus C(sp<sup>2</sup>)-H functionalization in the Knoevenagel-cyclization domino reactions of 1,4- and 1,5-benzoxazepines" *Molecules* (25):1265
- Takata, T., Tajima, R., Ando, W. (1983) "Oxidation of dihydroxy aromatics by hypervalent iodine oxides: a facile quinone synthesis" *The Journal of Organic Chemistry* (48):4764-4766
- Tran, T. D., Nguyen, T. C. V., Nguyen, N. S., Nguyen, D. M., Nguyen, T. T. H., Le, M. T., Thai, K. M. (2016) "Synthesis of novel chalcones as acetylcholinesterase inhibitors" *Applied Sciences* (6):198
- Trott, A., Olson, A. J. (2010) "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading" *Journal of Computational Chemistry* (31):455-461
- Tropsha, A. (2010) "Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation" *Molecular Informatics* (29):476-488
- Vale, V. V., Cruz, J. N., Viana, G. M. R., Póvoa, M. M., Brasil, D. do S. B., Dolabela, M. F. (2020) "Naphthoquinones isolated from *Eleutherine plicata* herb: in vitro antimalarial activity and molecular modeling to investigate their binding modes" *Medicinal Chemistry Research* (29):487-494

van Westen, G. J. P., Wegner, J. K., IJzerman, A. P., van Vlijmen, H. W. T., Bender, A. (2011) "Proteochemometric modeling as a tool to design selective compounds and for extrapolating to novel targets" *MedChemComm* (2):16-30

van Westen, G. J. P., den Hoven, O. O., van der Pijl, R., Mulder-Krieger, T., de Vries, H., Wegner, J. K., IJzerman, A. P., van Vlijmen, H. W. T., Bender, A. (2012) "Identifying novel adenosine receptor ligands by simultaneous proteochemometric modeling of rat and human bioactivity data" *Journal of Medicinal Chemistry* (55):7010-7020

van Westen, G. J. P., Swier, R. F., Wegner, J. K., IJzerman, A. P., van Vlijmen, H. W. T., Bender, A. (2013a) "Benchmarking of protein descriptor sets in proteochemometric modeling (part 1): comparative study of 13 amino acid descriptor sets" *Journal of Cheminformatics* (5):41

van Westen, G. J. P., Swier, R. F., Cortes-Ciriano, I., Wegner, J. K., Overington, J. P., IJzerman, A. P., van Vlijmen, H. W. T., Bender, A. (2013b) "Benchmarking of protein descriptor sets in proteochemometric modeling (part 2): modeling performance of 13 amino acid descriptor sets" *Journal of Cheminformatics* (5):42

Weininger, D. (1988) "SMILES, a Chemical Language and Information System. 1. Introduction to methodology and encoding rules" *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* (28):31-36

Yousafi, Q., Sarfaraz, A., Saad Khan, M., Saleem, S., Shahzad, U., Abbas Khan, A., Sadiq, M., Ditta Abid, A., Sohail Shahzad, M., ul Hassan, N. (2021) "In silico annotation of unrevised acetylcholinesterase (AChE) in some lepidopteran insect pest species reveals the causes of insecticide resistance" *Saudi Journal of Biological Sciences* (28):2197-2209

Zhao, X.-J., Gong, D.-M., Jiang, Y.-R., Guo, D., Zhu, Y., Deng, Y.-C. (2017) "Multipotent AChE and BACE-1 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and bio-analysis of 7-amino-1,4-dihydro-2H-isoquinolin-3-one derivatives" *European Journal of Medicinal Chemistry* (138):738-747

## Técnicas experimentales

### Instrumentación

#### - Resonancia Magnética Nuclear

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro BRUKER de 400 MHz, y un espectrómetro Spinsolve Magritek de 60 MHz. Se utilizó  $\text{CDCl}_3$ , DMSO y Piridina deuterada como disolventes y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) 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; sa=singulete ancho; d=doblete; t=triplete; ta= triplete ancho; c=cuarteto; quin=quintuplete; dd=doble de doblete; ddd=doble de doble 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 ( $\nu$ ) están expresados en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### - 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  $120^\circ\text{C}$  y la de la fuente de iones  $240^\circ\text{C}$ . La rampa de calentamiento de la columna comenzó a  $120^\circ\text{C}$  manteniendo esta temperatura 1 minuto, para subir a una velocidad de  $40^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $280^\circ\text{C}$ , y manteniendo esta temperatura 10 minutos.

#### -Espectrofotometría UV-Vis

Las mediciones de absorbancia en las determinaciones de capacidad antioxidante fueron obtenidas en un espectrofotómetro Genesys 20, para las lecturas en el ensayo de inhibición de AChE se empleó un lector de microplacas Multiskan FC, ambos modelos de la marca Thermo Scientific.

### 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 de columna

Se empleó gel de sílice 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

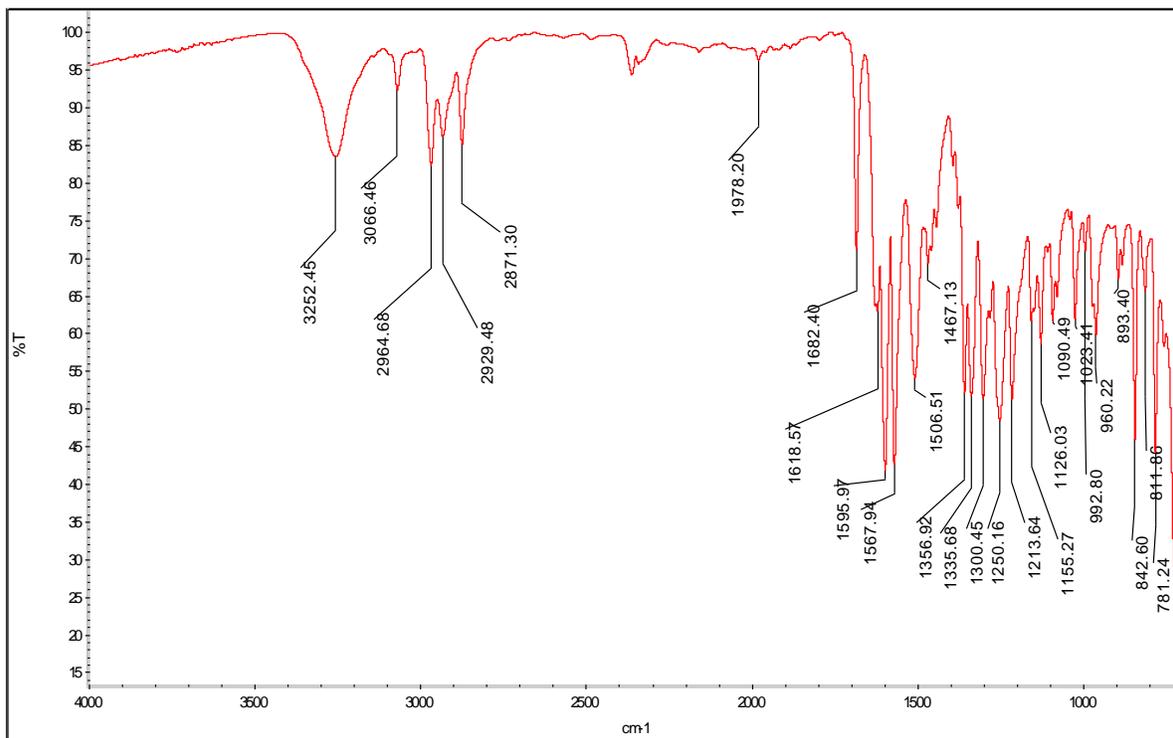
Se empleó el programa ChemDraw Professional 16.0 de Perkin Elmer para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados, así como para la obtención de sus códigos SMILES.

Se empleó el paquete AutoDock Tools 1.5.6 para la preparación de ligandos y receptores previos a los análisis de *docking*. El algoritmo empleado para dicho fin fue AutoDock Vina.

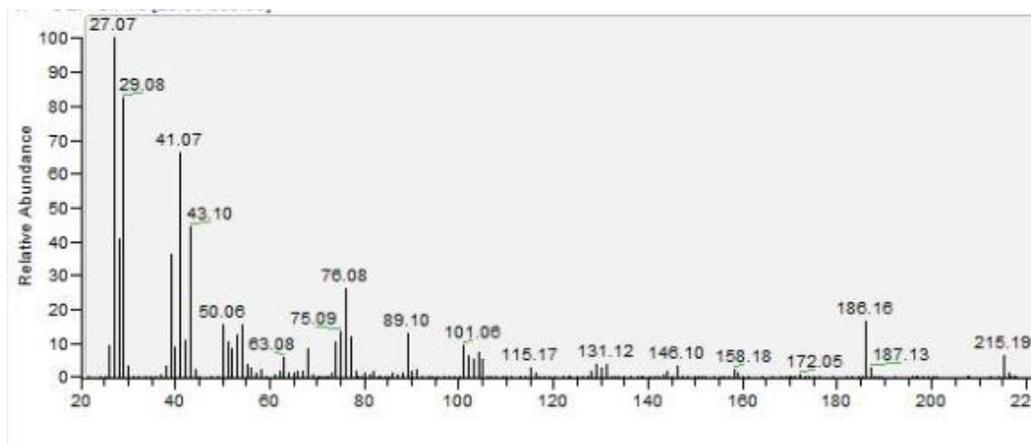
Para la generación de modelos moleculares de ligandos, su minimización energética, y la visualización de las poses generadas tras los análisis de *docking* se empleó el visualizador UCSF Chimera.

Para la creación de protocolos de acceso y manejo de información, así como de creación de modelos proteoquimiométricos y cribado virtual, se empleó Pipeline Pilot Professional Client 18.1 de Dassault Systèmes Biovia Corp.

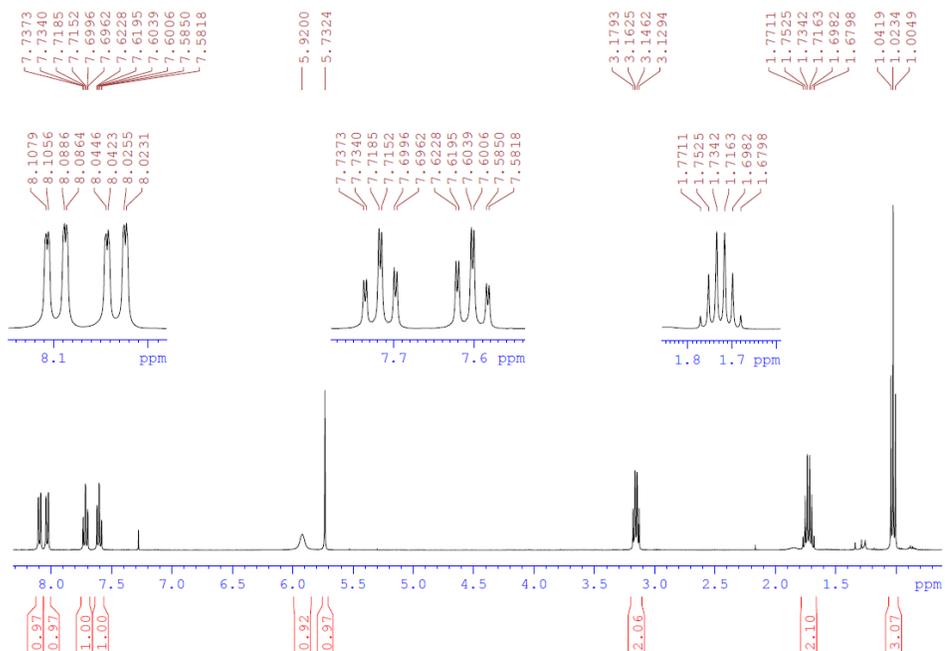
Anexos



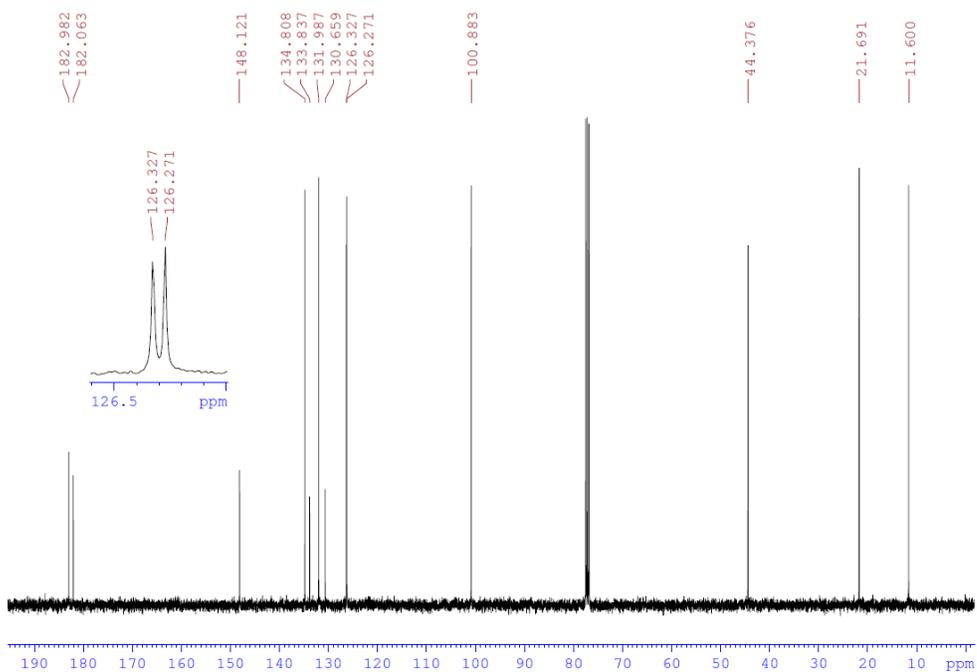
Anexo 1. Espectro de IR del compuesto NQ-Prop (1).



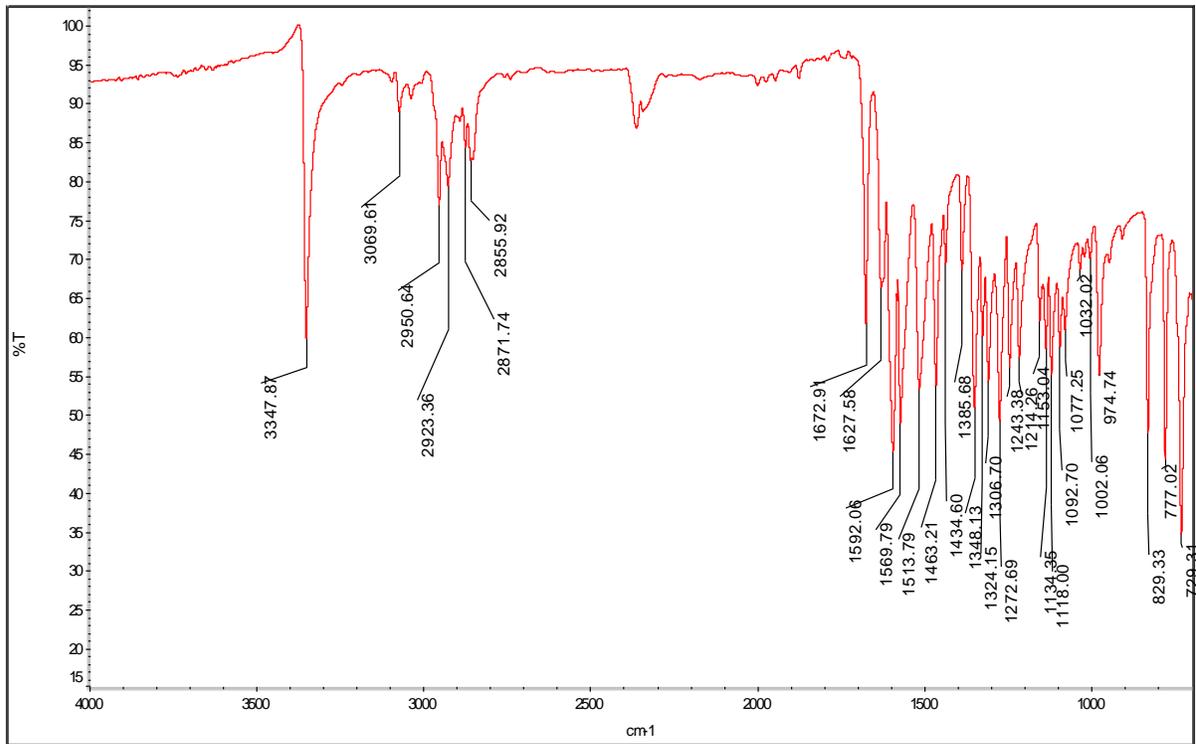
Anexo 2. Espectro de masas del compuesto NQ-Prop (1).



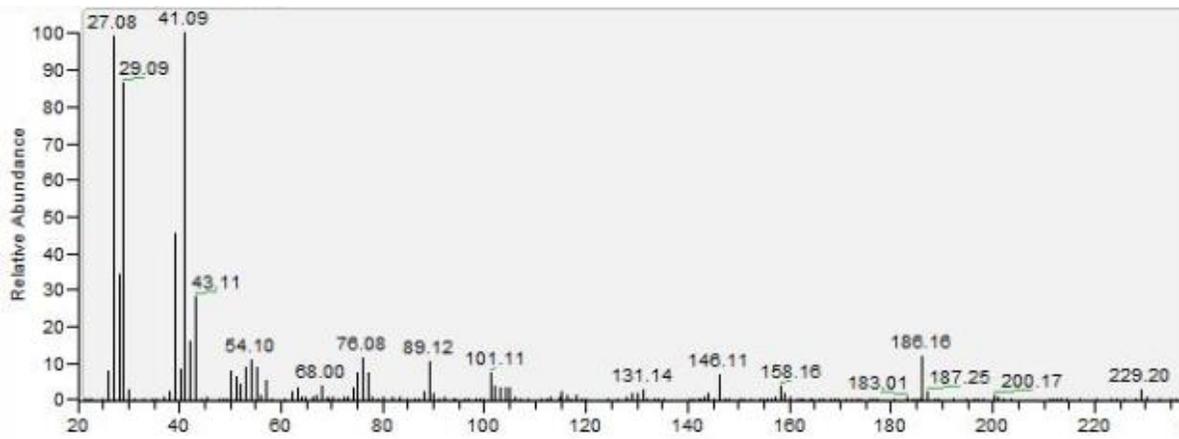
Anexo 3. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-Prop (1).



Anexo 4. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-Prop (1).

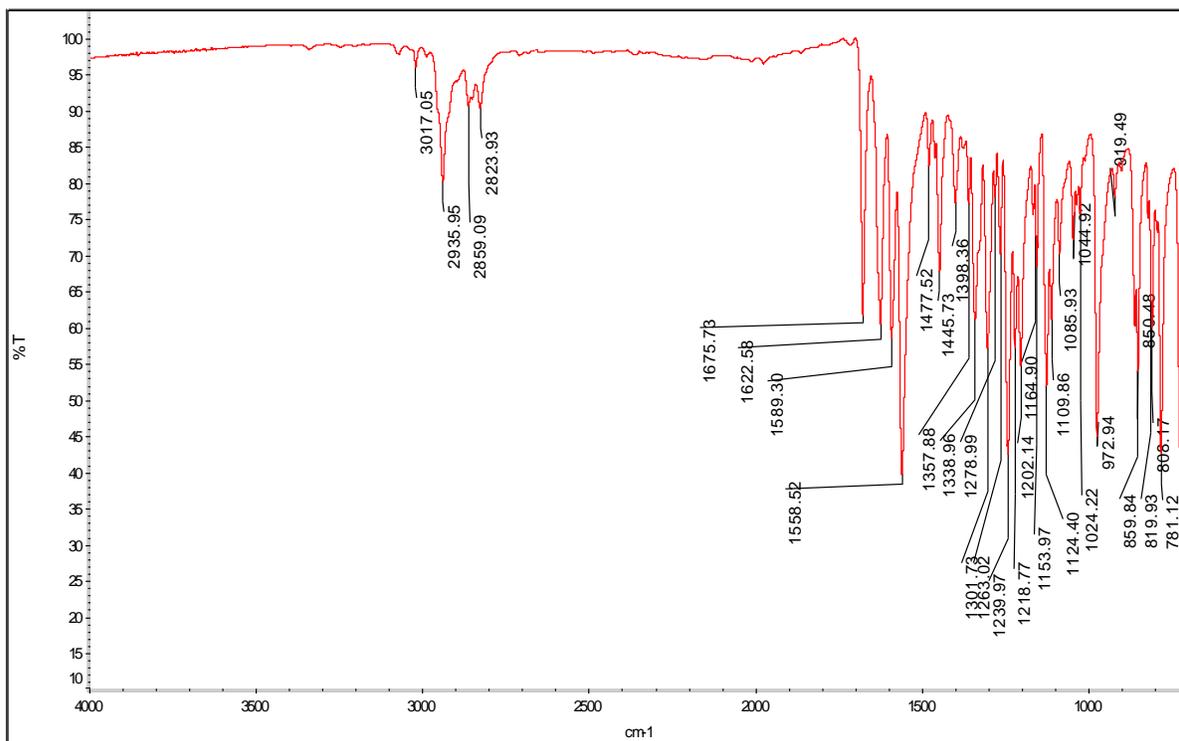


Anexo 5. Espectro de IR del compuesto NQ-Buta (2).

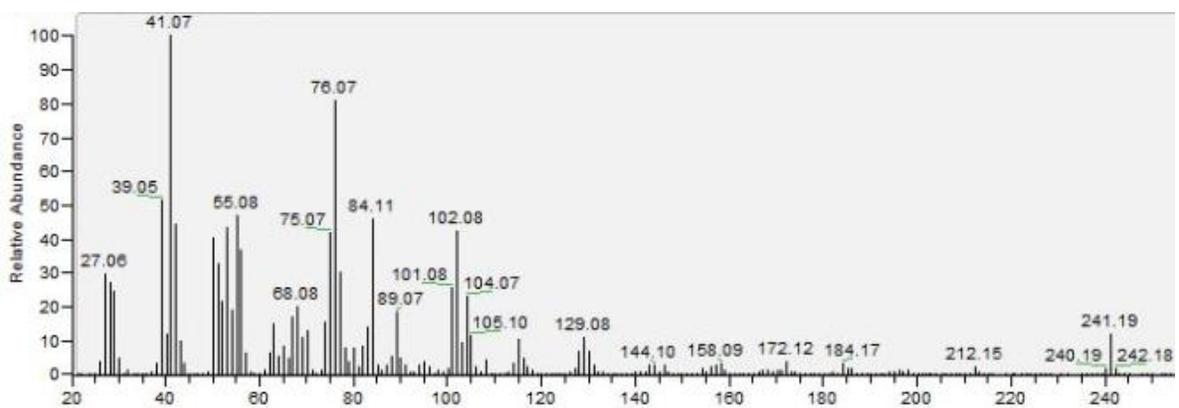


Anexo 6. Espectro de masas del compuesto NQ-Buta (2).

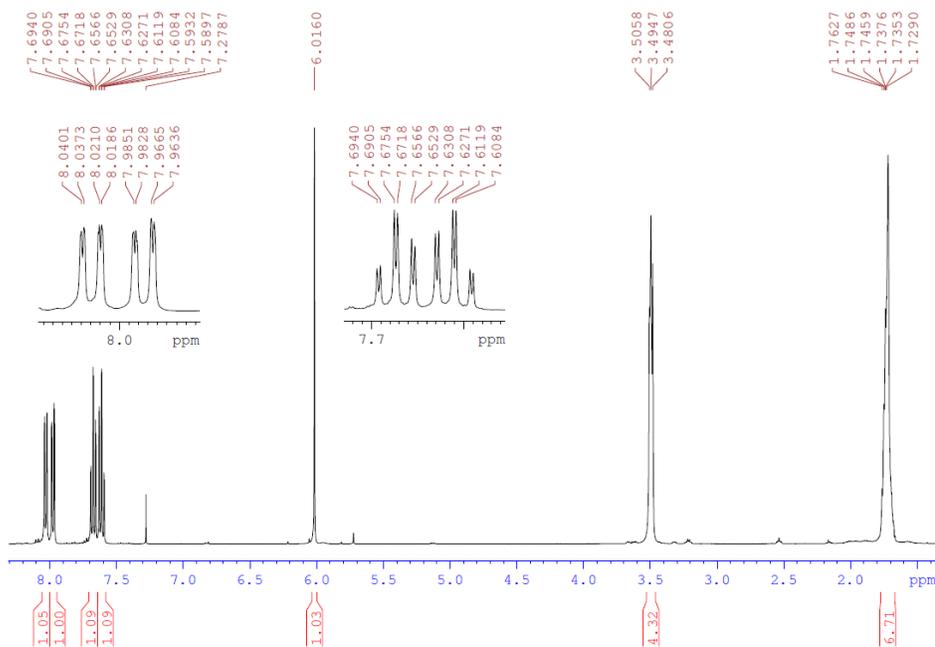




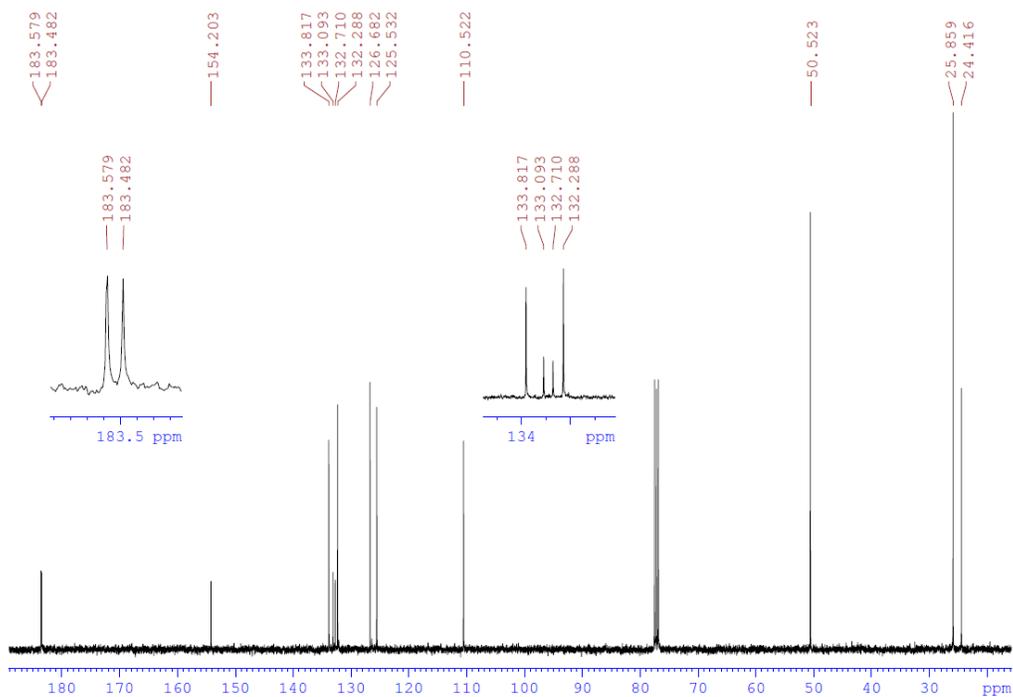
Anexo 9. Espectro de IR del compuesto NQ-Pipe (3).



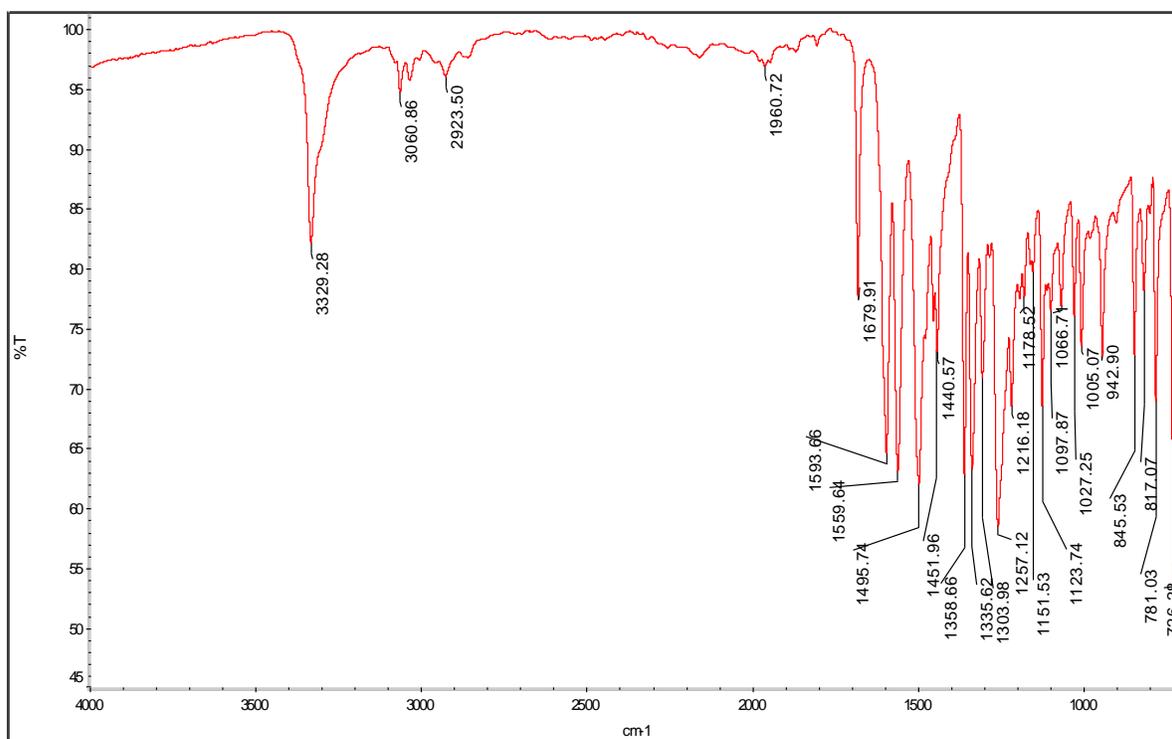
Anexo 10. Espectro de masas del compuesto NQ-Pipe (3).



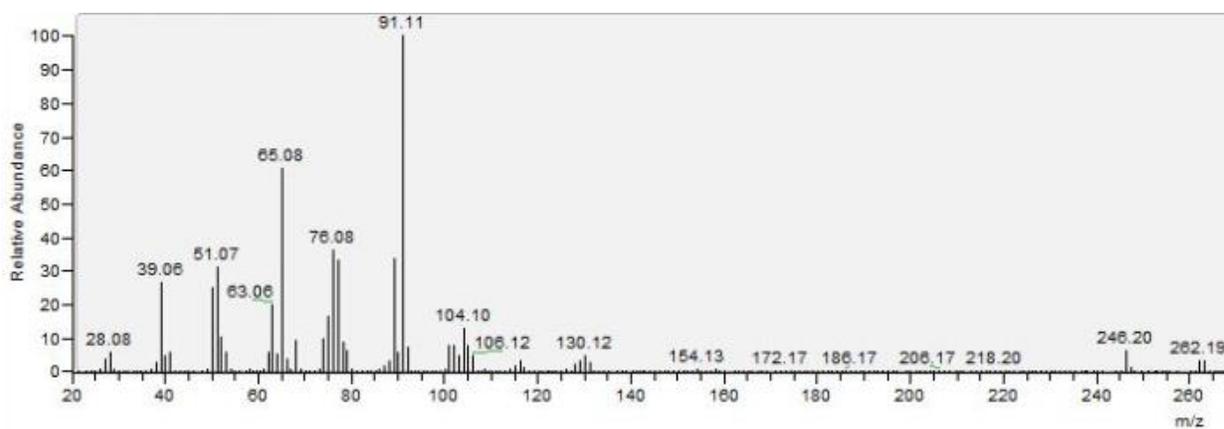
Anexo 11. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-Pipe (3).



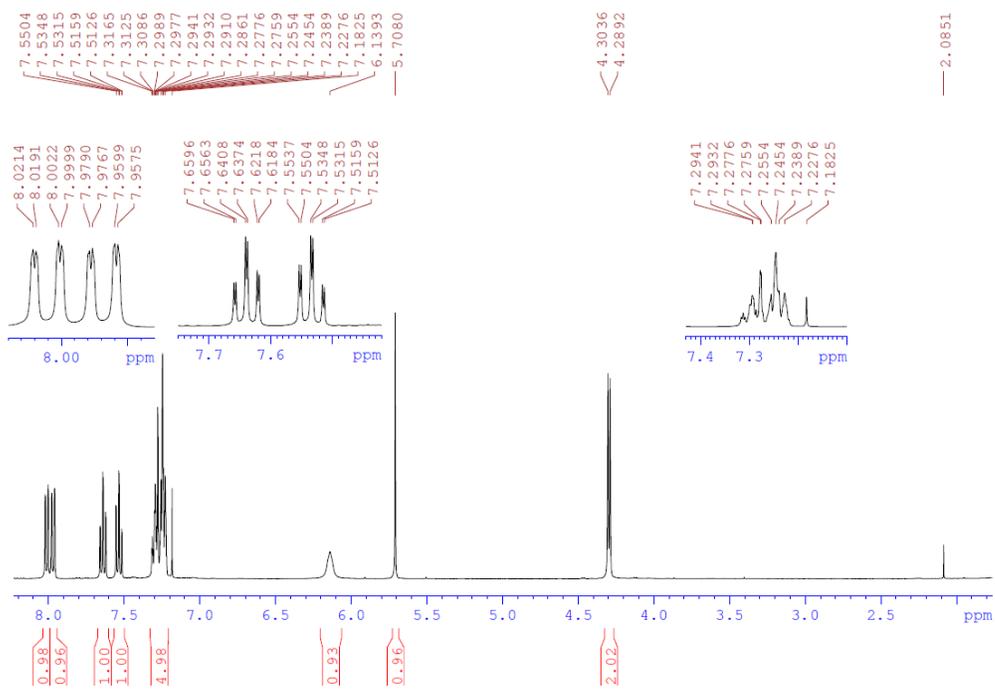
Anexo 12. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-Pipe (3).



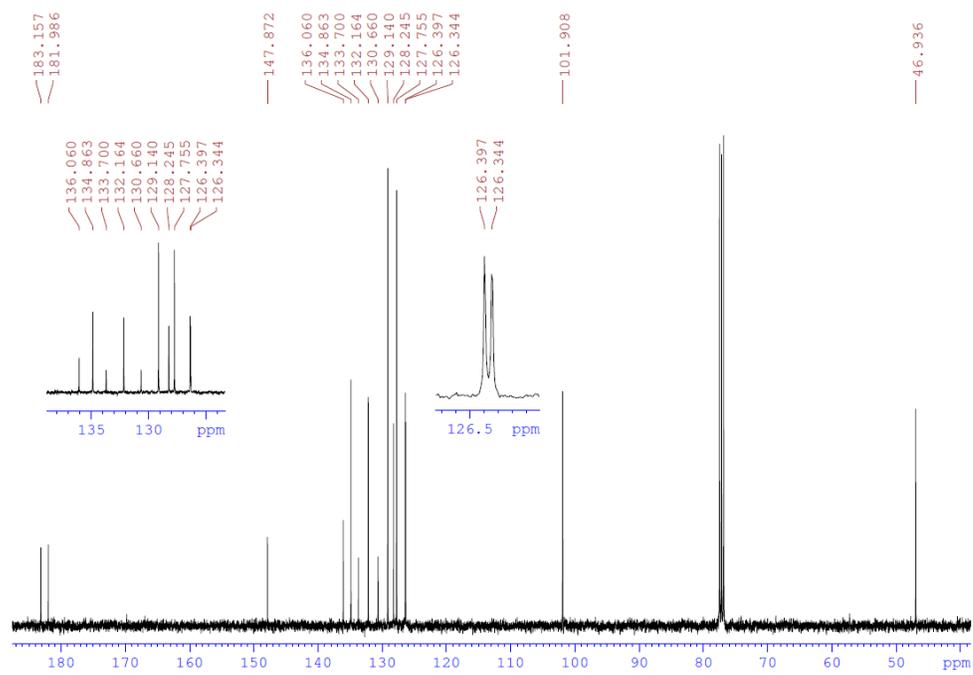
Anexo 13. Espectro de IR del compuesto NQ-Bnca (4).



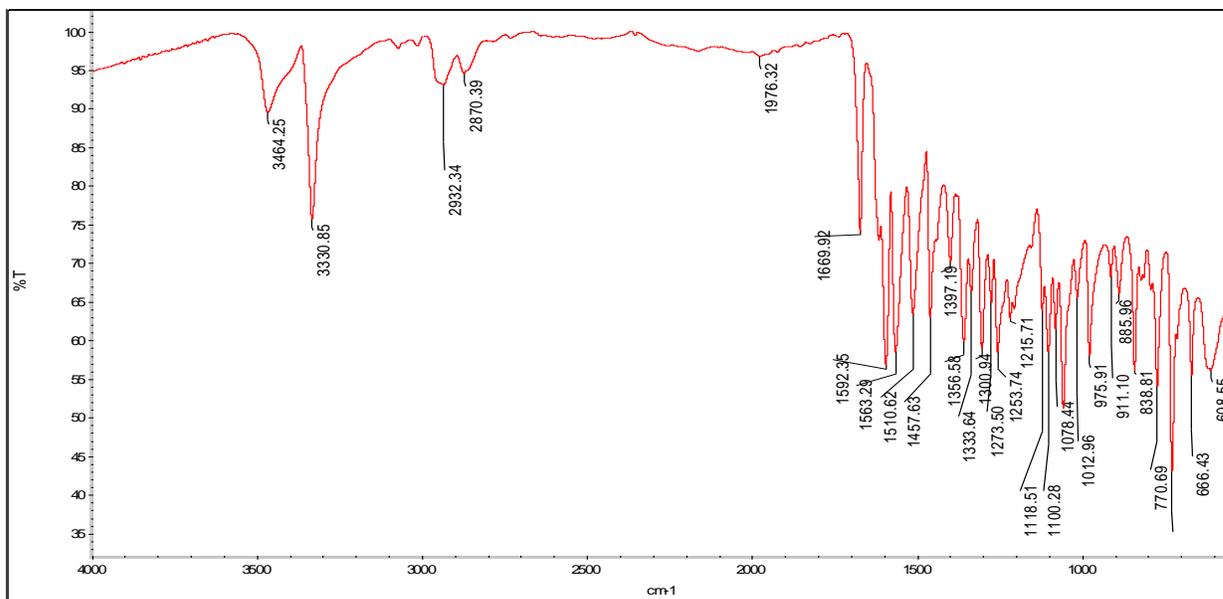
Anexo 14. Espectro de masas del compuesto NQ-Bnca (4).



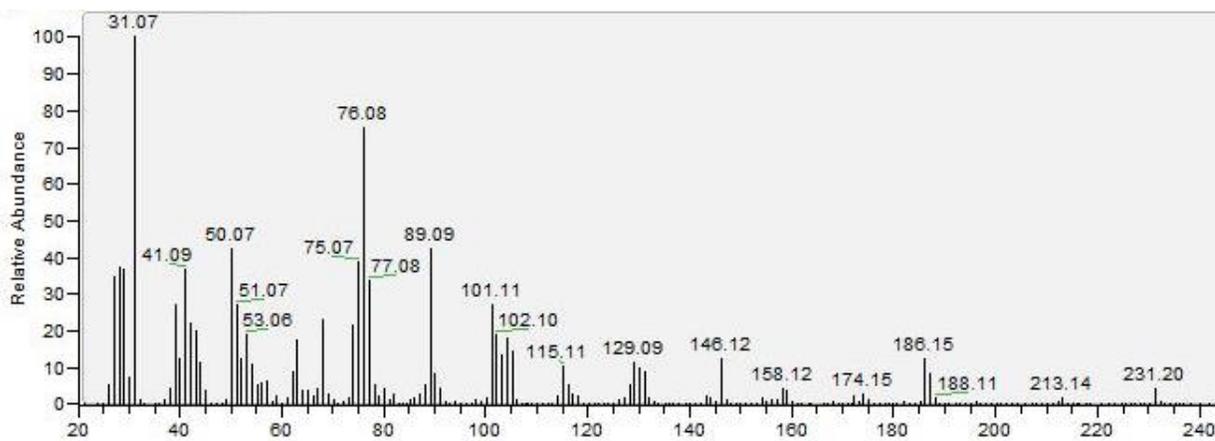
Anexo 15. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-Bnca (4).



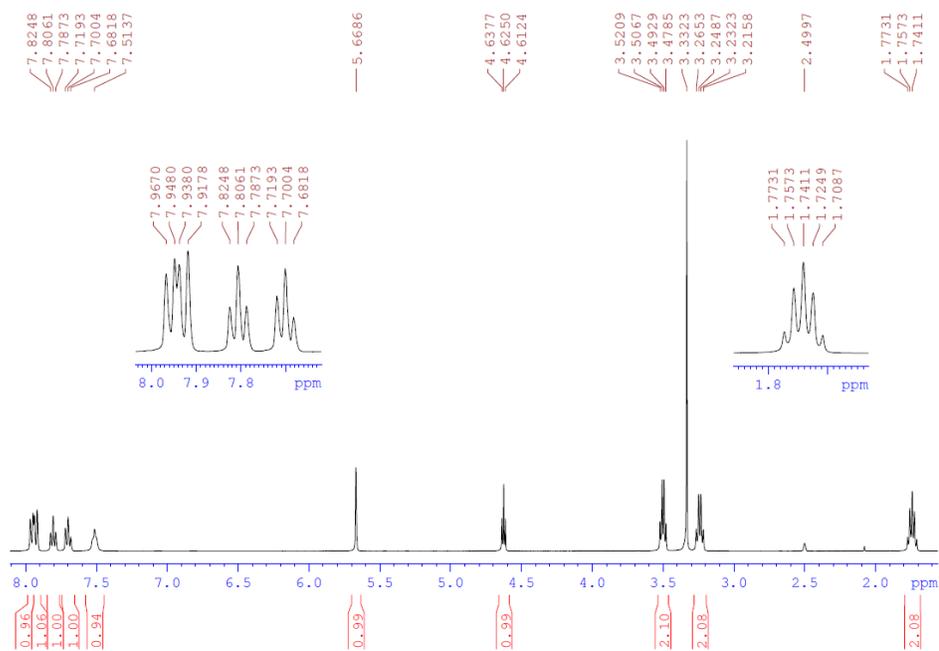
Anexo 16. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-Bnca (4).



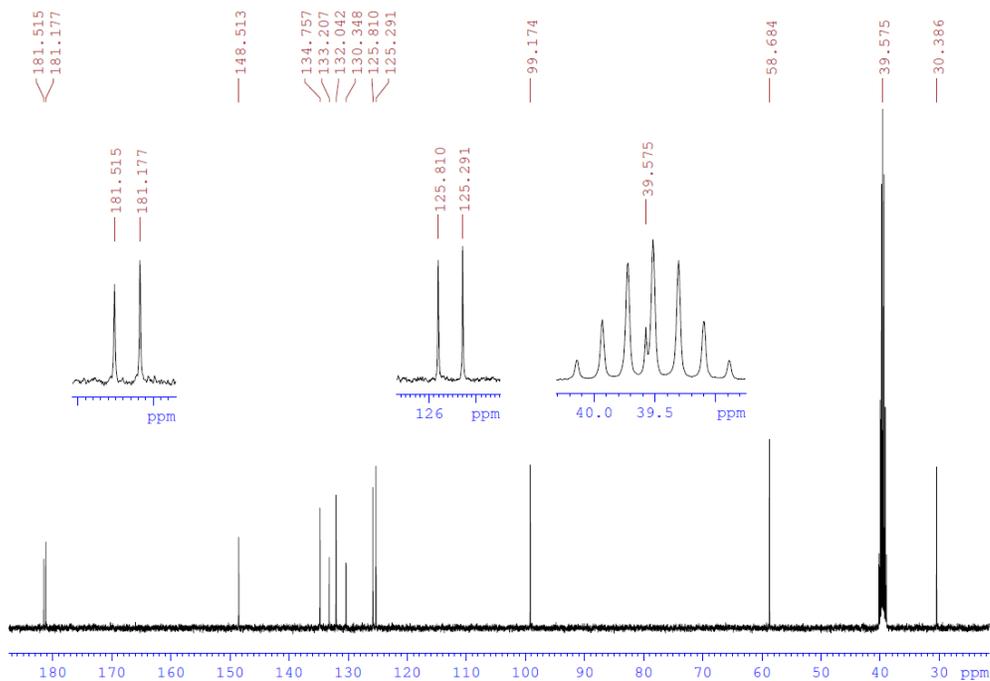
Anexo 17. Espectro de IR del compuesto NQ-3apr (5).



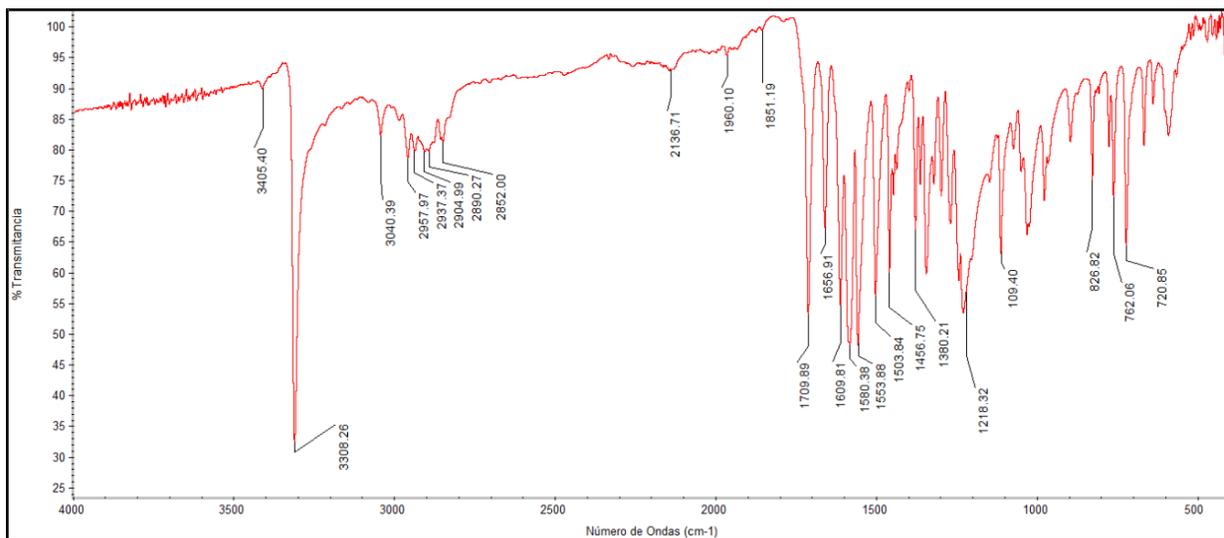
Anexo 18. Espectro de masas del compuesto NQ-3apr (5).



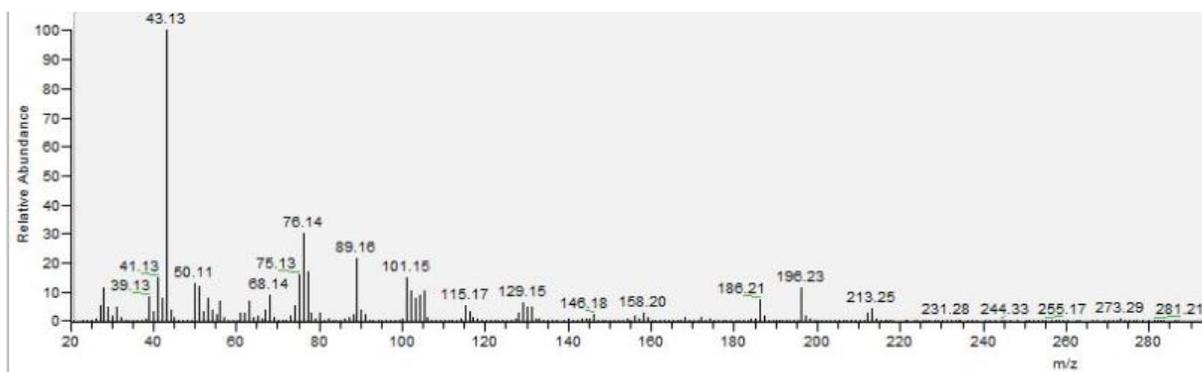
Anexo 19. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-3apr (5).



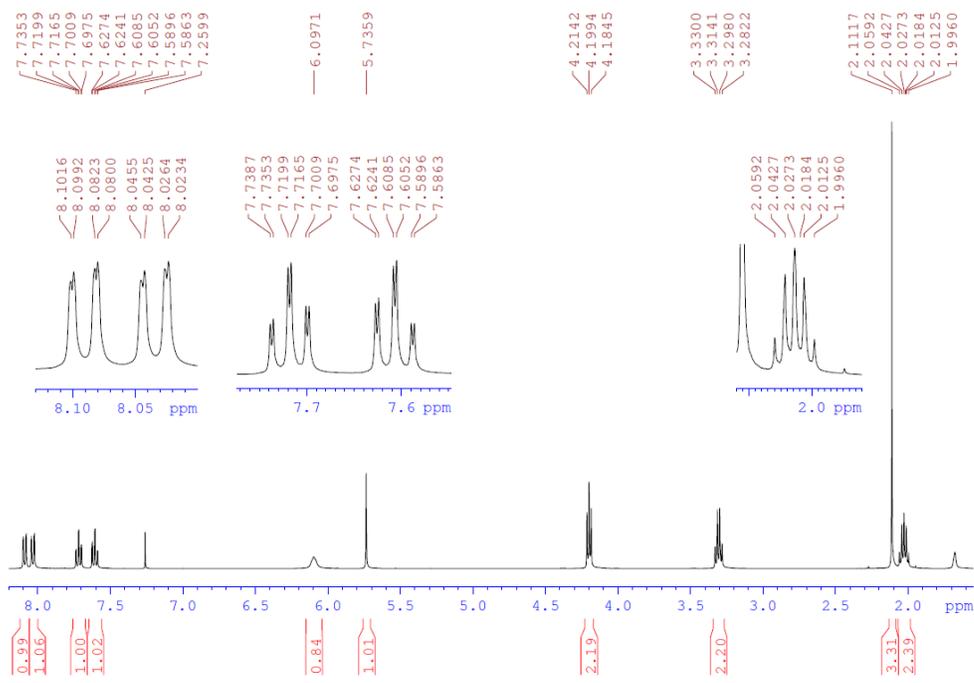
Anexo 20. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-3apr (5).



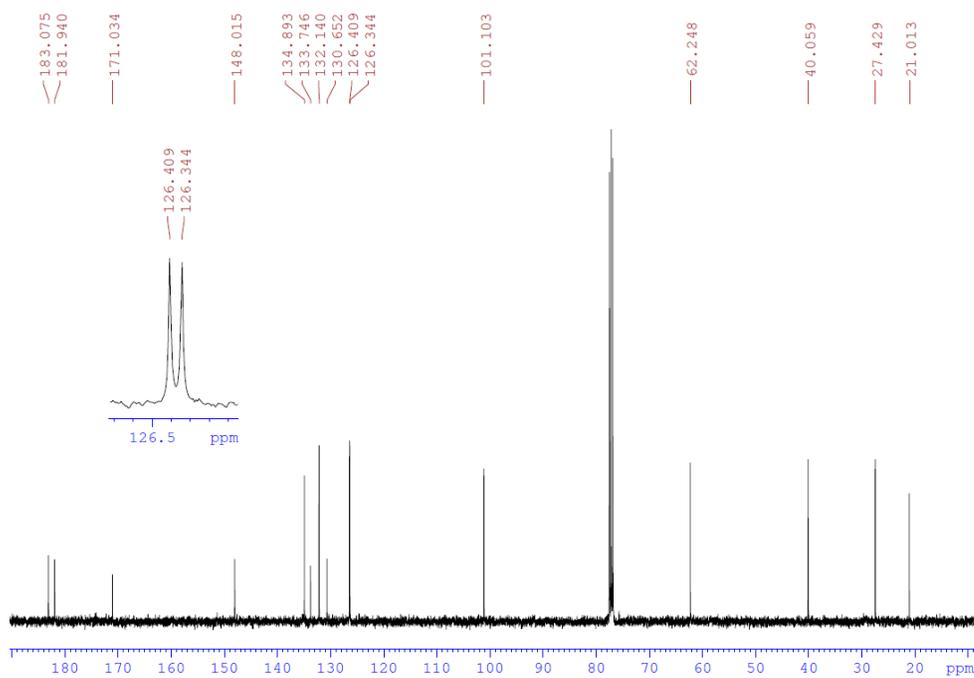
Anexo 21. Espectro de IR del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).



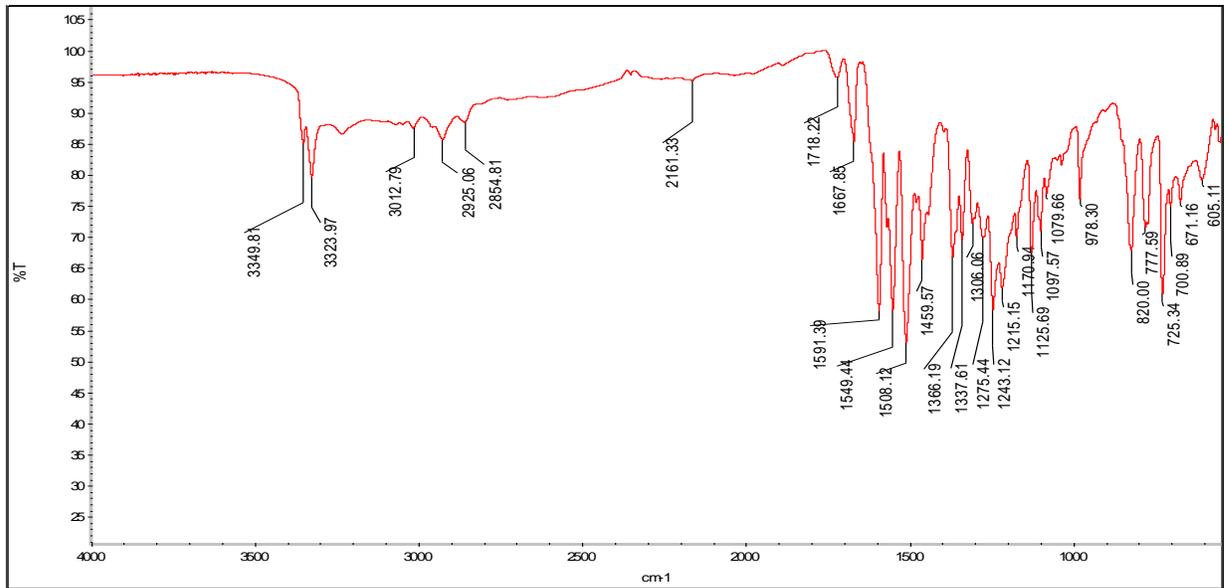
Anexo 22. Espectro de masas del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).



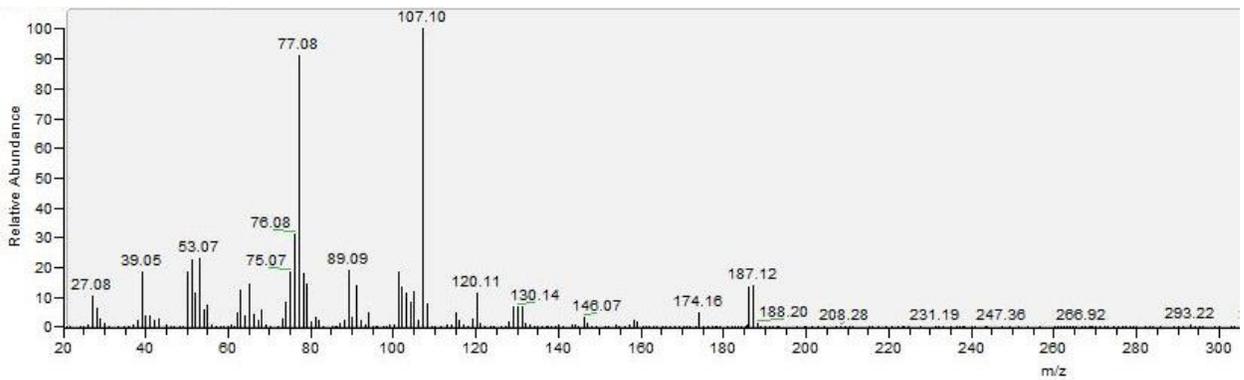
Anexo 23. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).



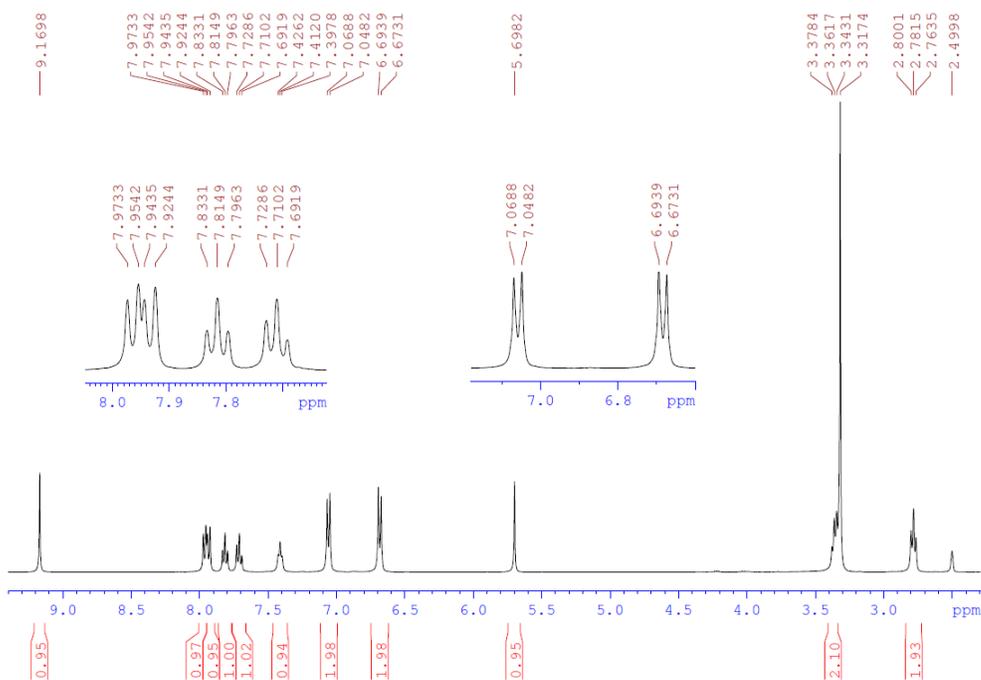
Anexo 24. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-3apr-Ac (5a).



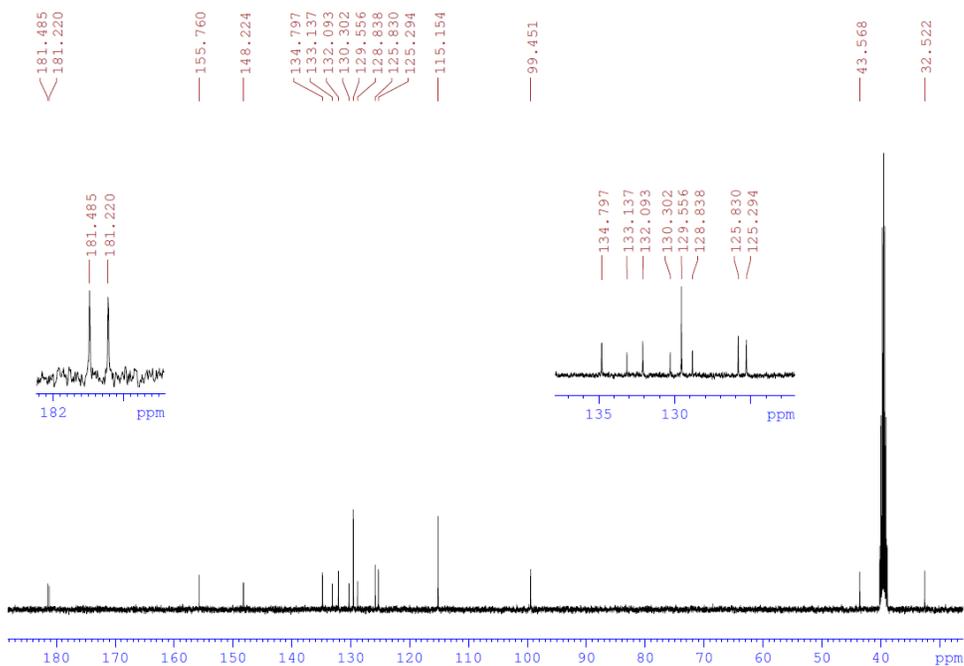
Anexo 25. Espectro de IR del compuesto NQ-Tira (6).



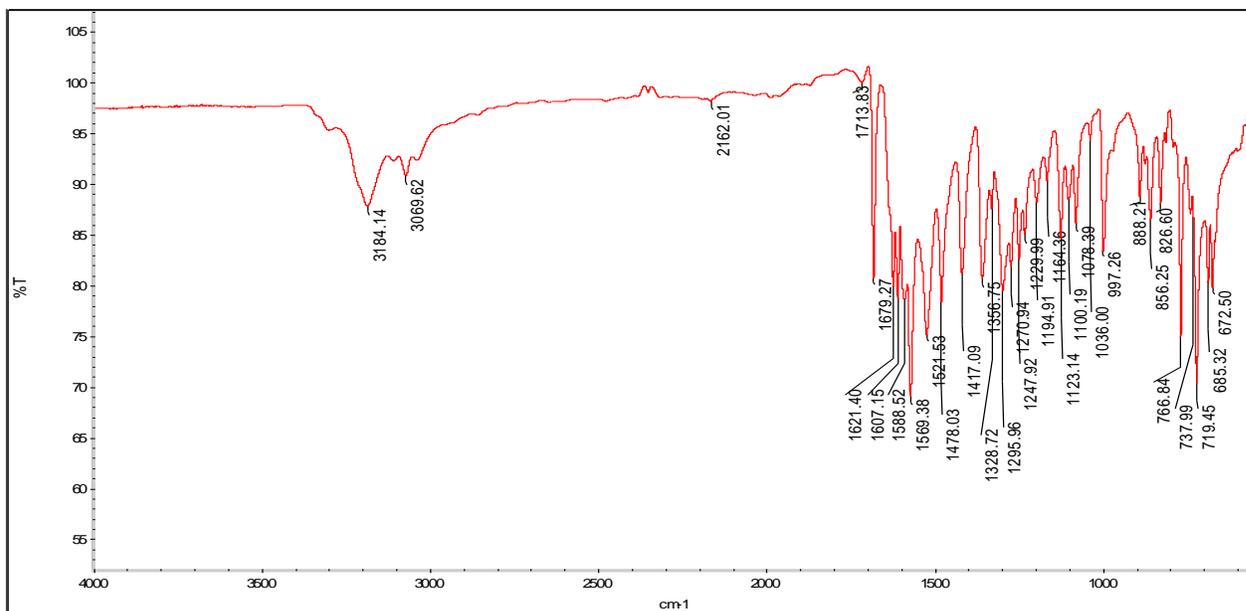
Anexo 26. Espectro de masas del compuesto NQ-Tira (6).



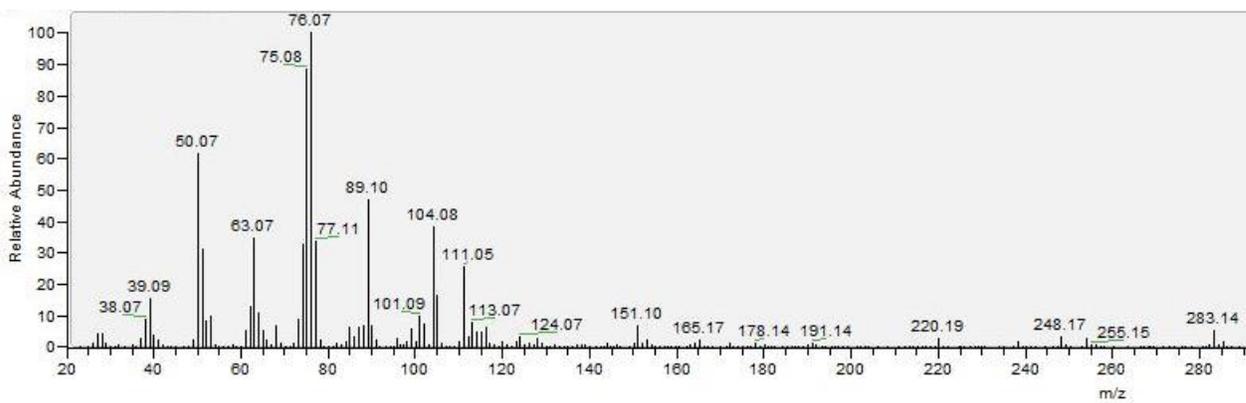
Anexo 27. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-Tira (6).



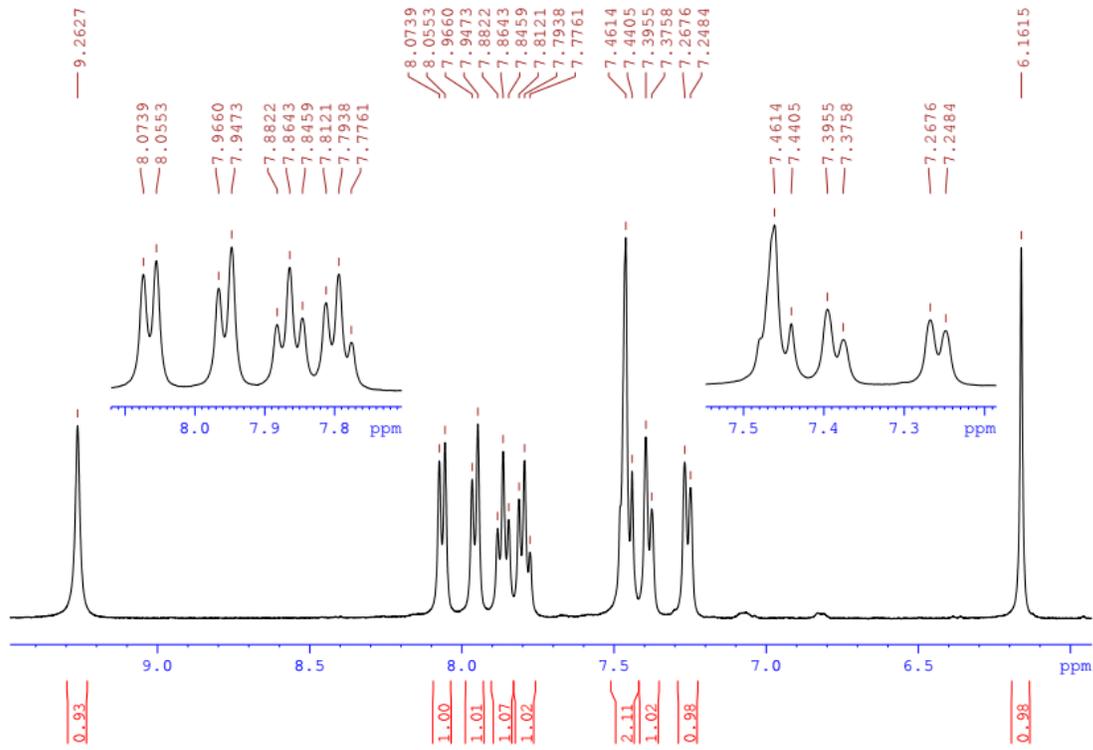
Anexo 28. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-Tira (6).



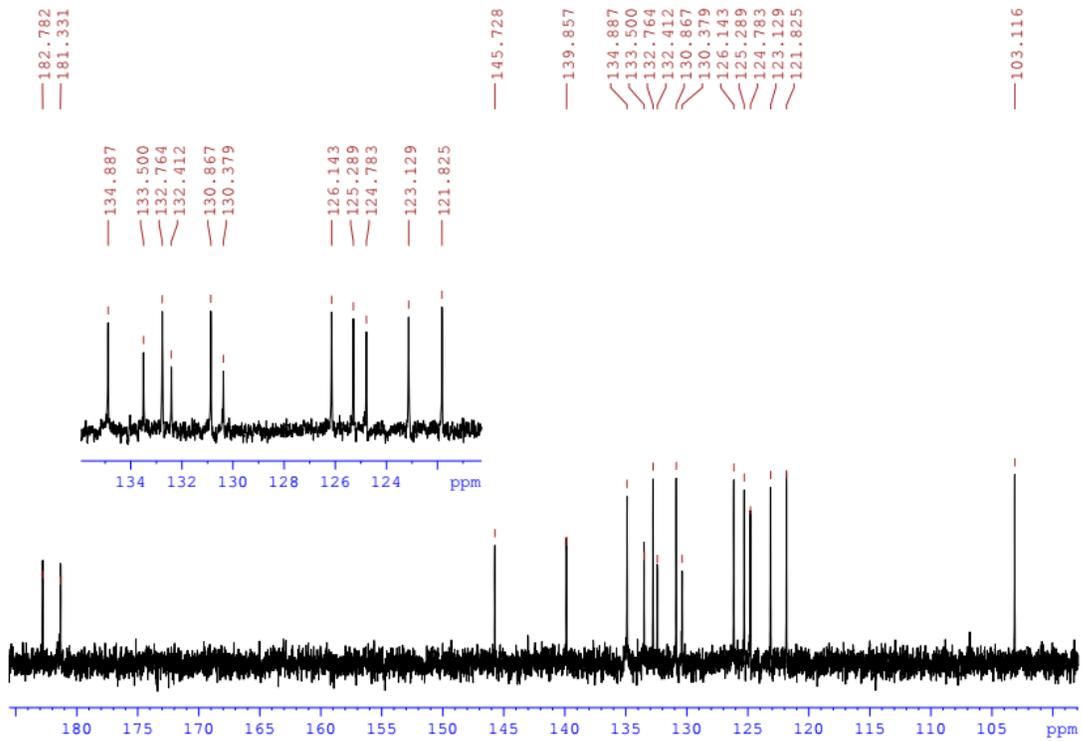
Anexo 29. Espectro de IR del compuesto NQ-ClAn (7).



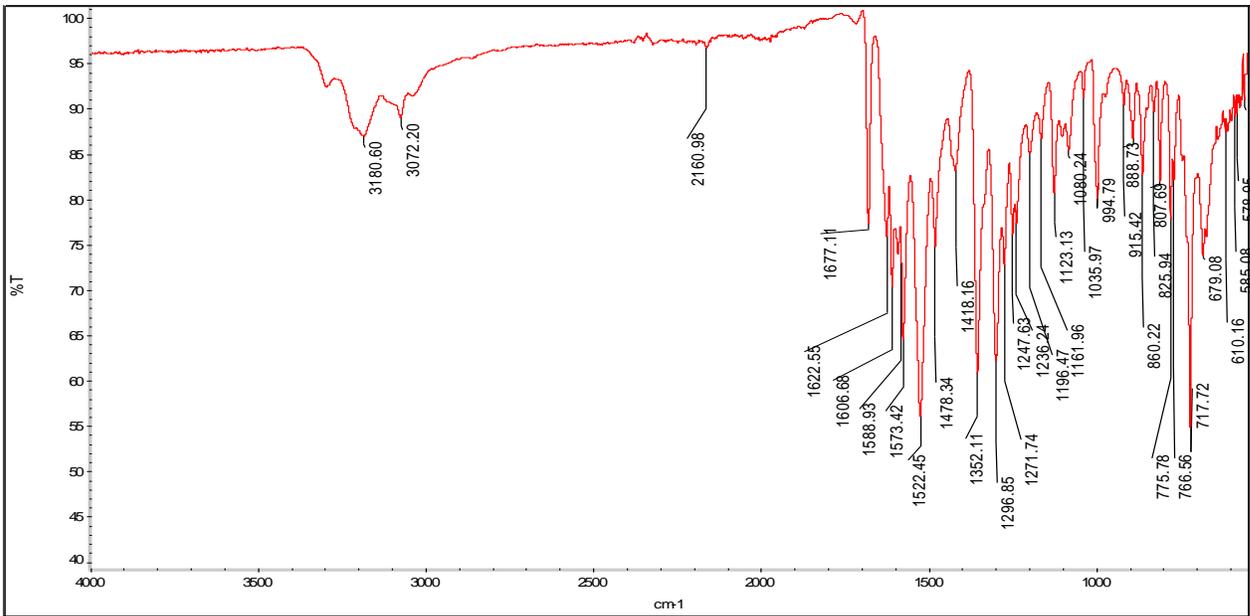
Anexo 30. Espectro de masas del compuesto NQ-ClAn (7).



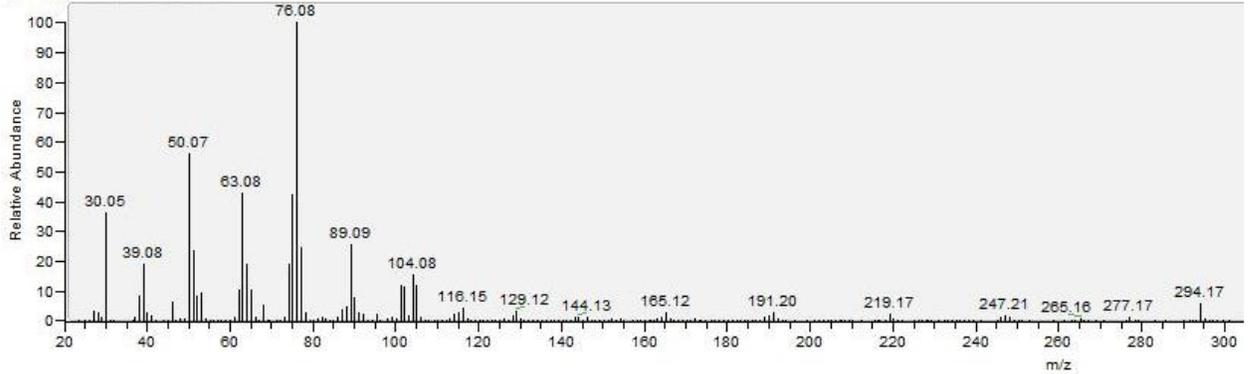
Anexo 31. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-ClAn (7).



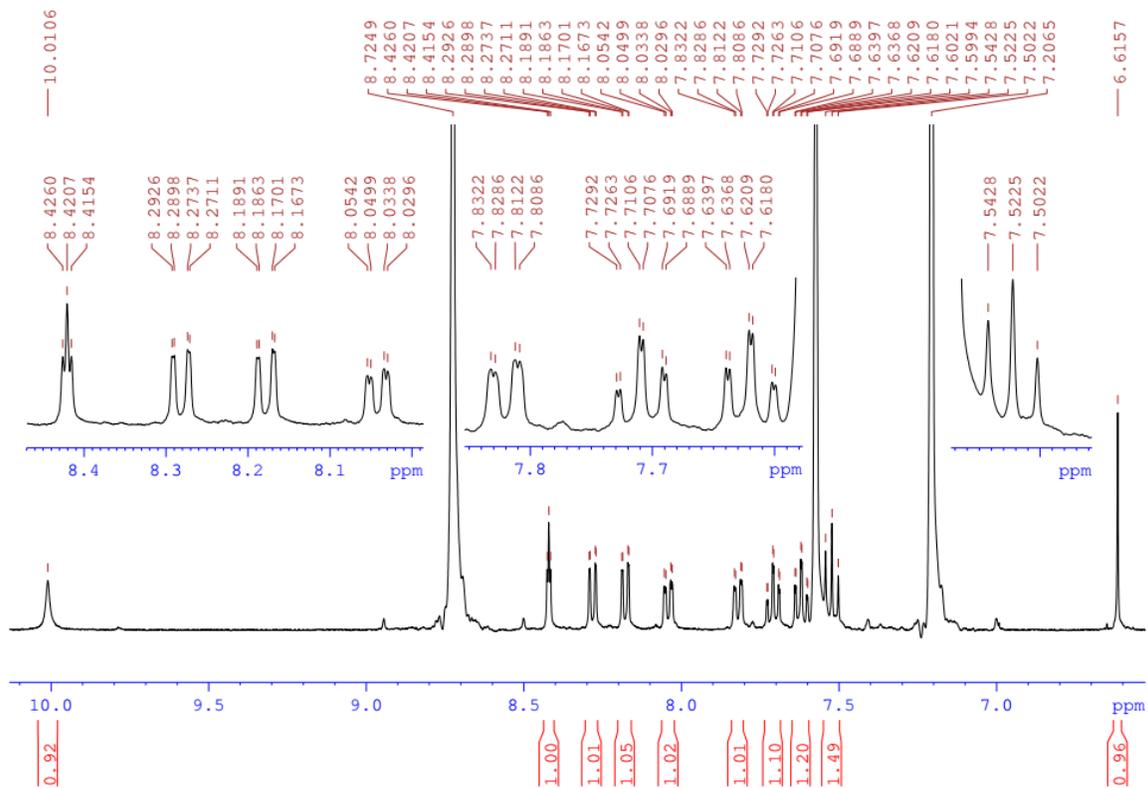
Anexo 32. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-ClAn (7).



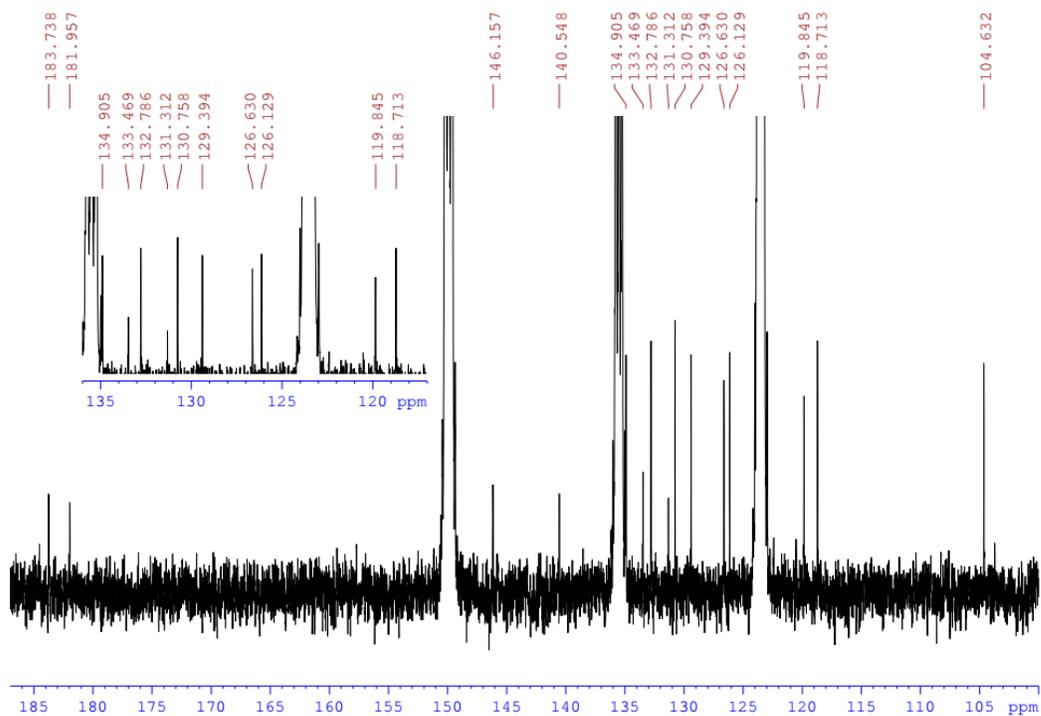
Anexo 33. Espectro de IR del compuesto NQ-NOAn (8).



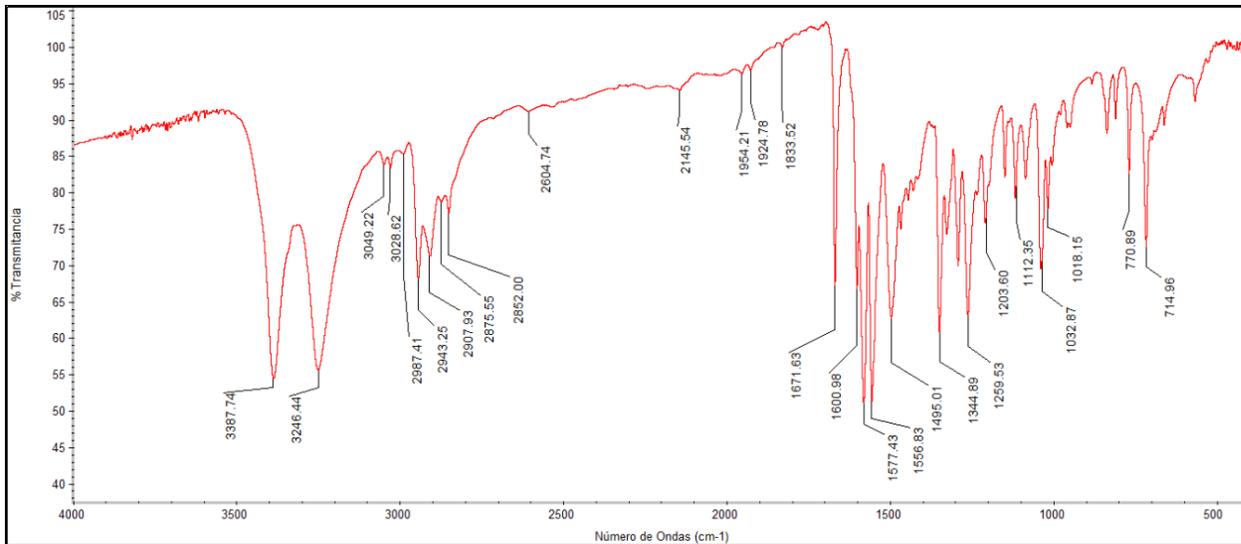
Anexo 34. Espectro de masas del compuesto NQ-NOAn (8).



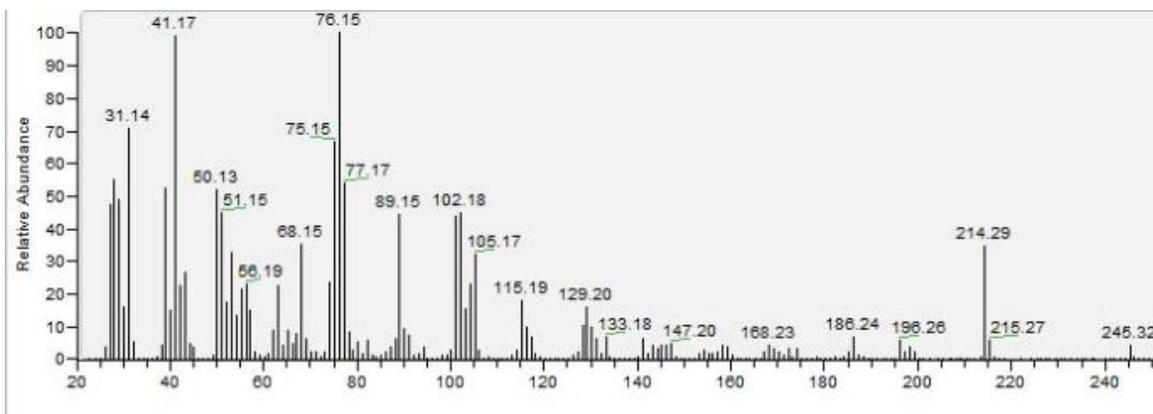
Anexo 35. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-NOAn (8).



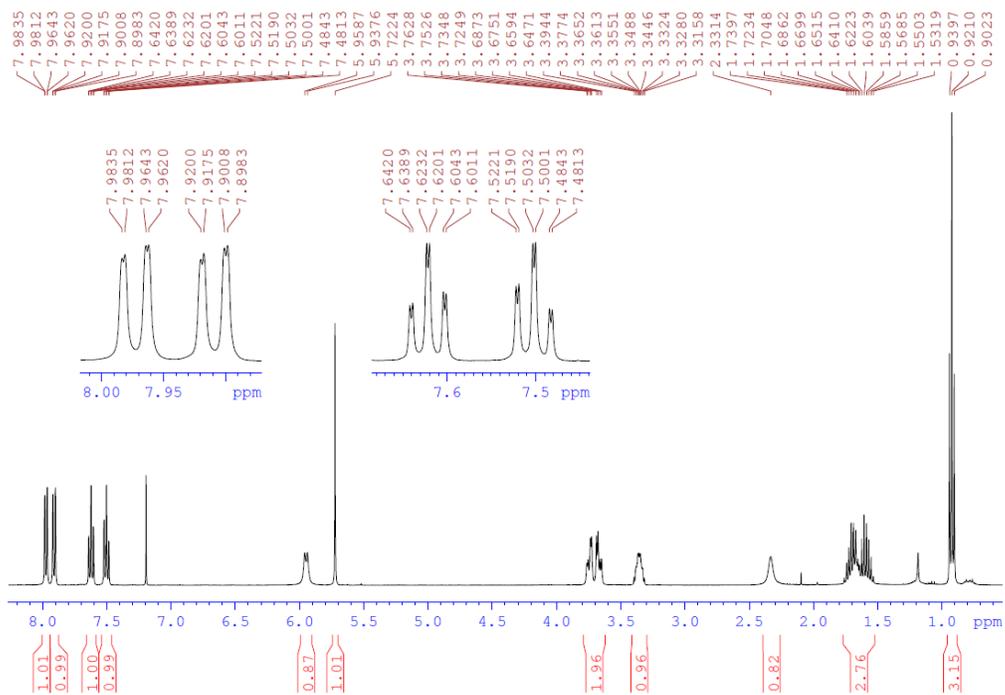
Anexo 36. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-NOAn (8).



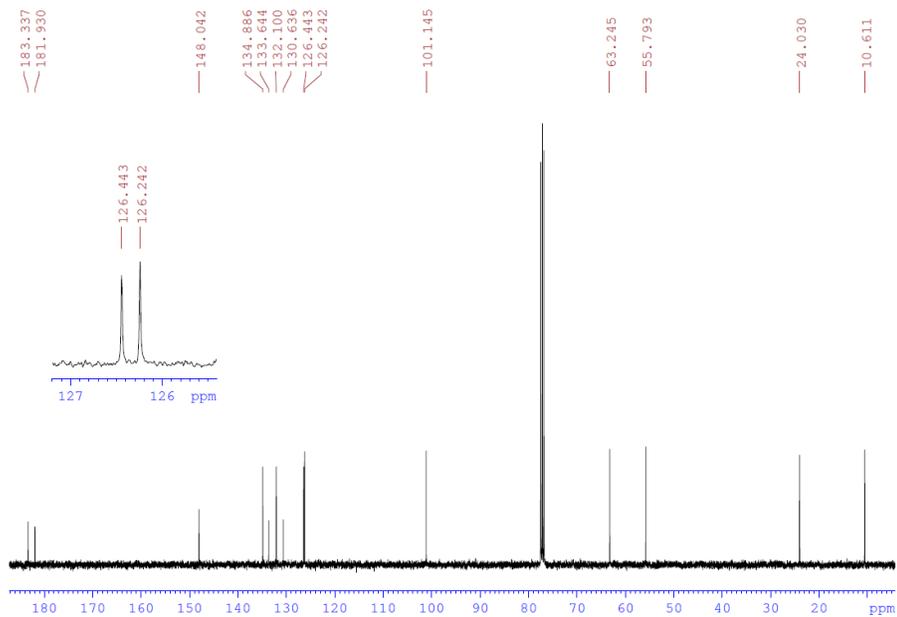
Anexo 37. Espectro de IR del compuesto NQ-2abu (9).



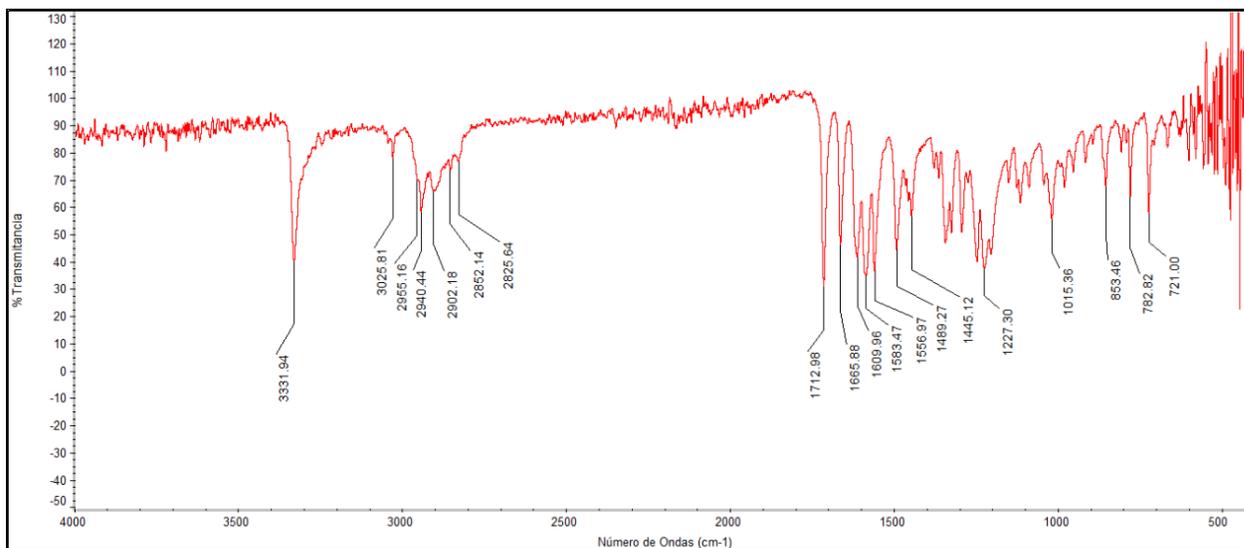
Anexo 38. Espectro de masas del compuesto NQ-2abu (9).



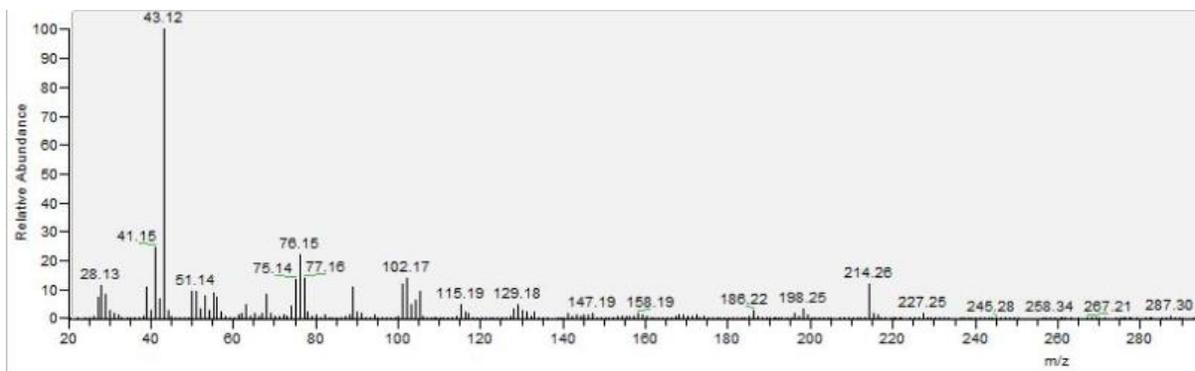
Anexo 39. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-2abu (9).



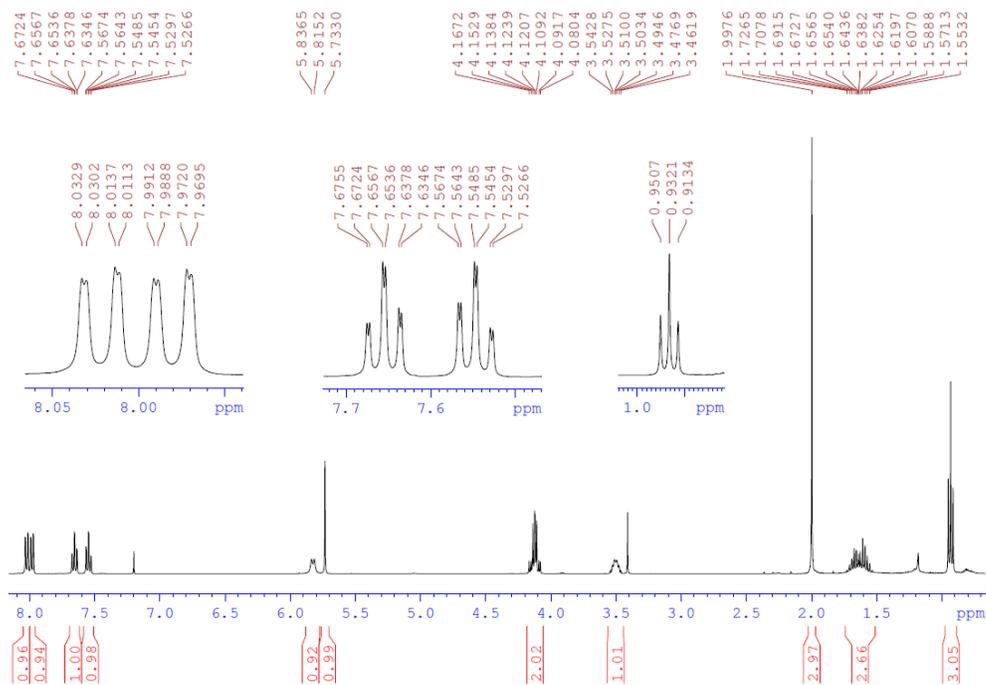
Anexo 40. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-2abu (9).



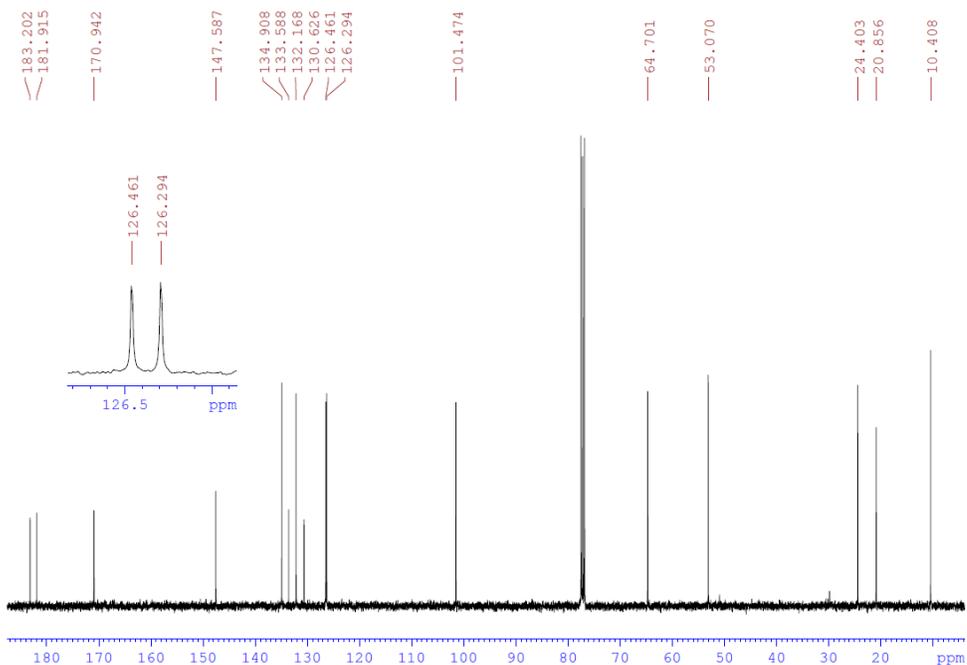
Anexo 41. Espectro de IR del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).



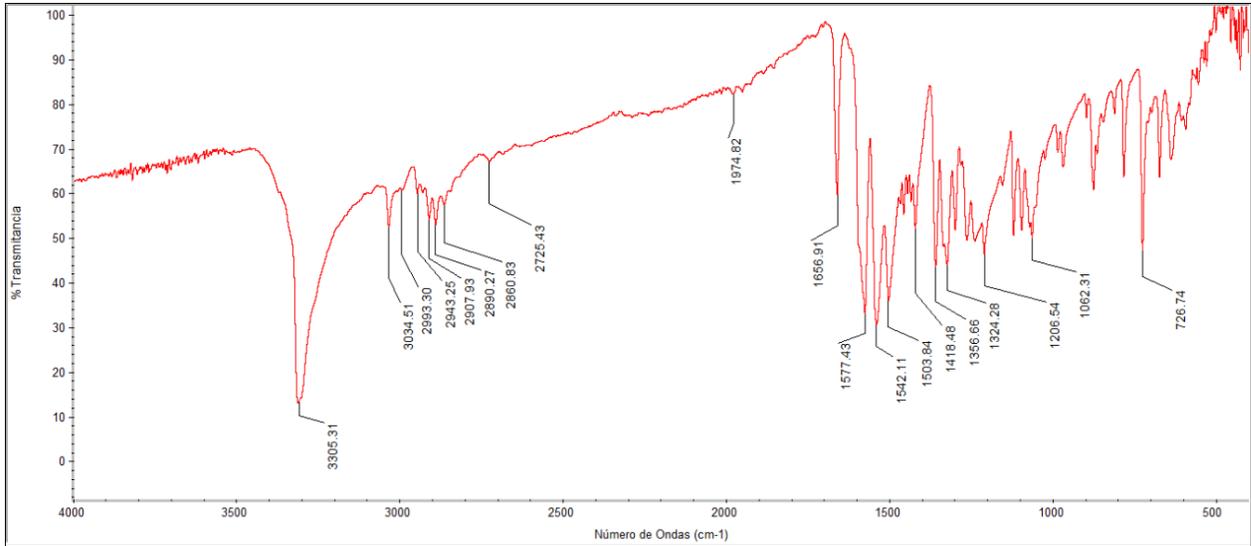
Anexo 42. Espectro de masas del compuesto NQ-2abu-Ac (9a).



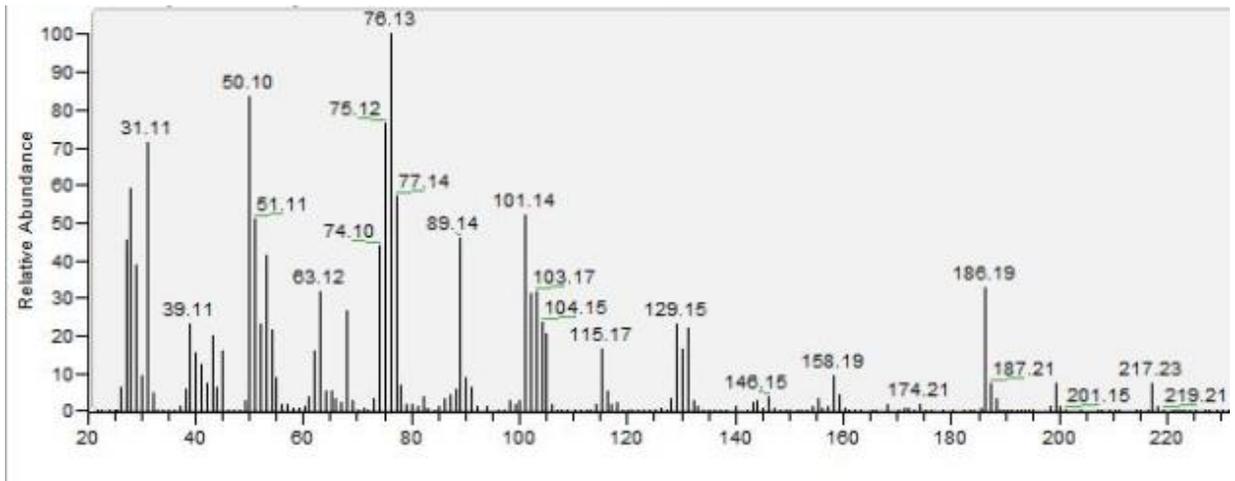
Anexo 43. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-2abu-Ac (**9a**).



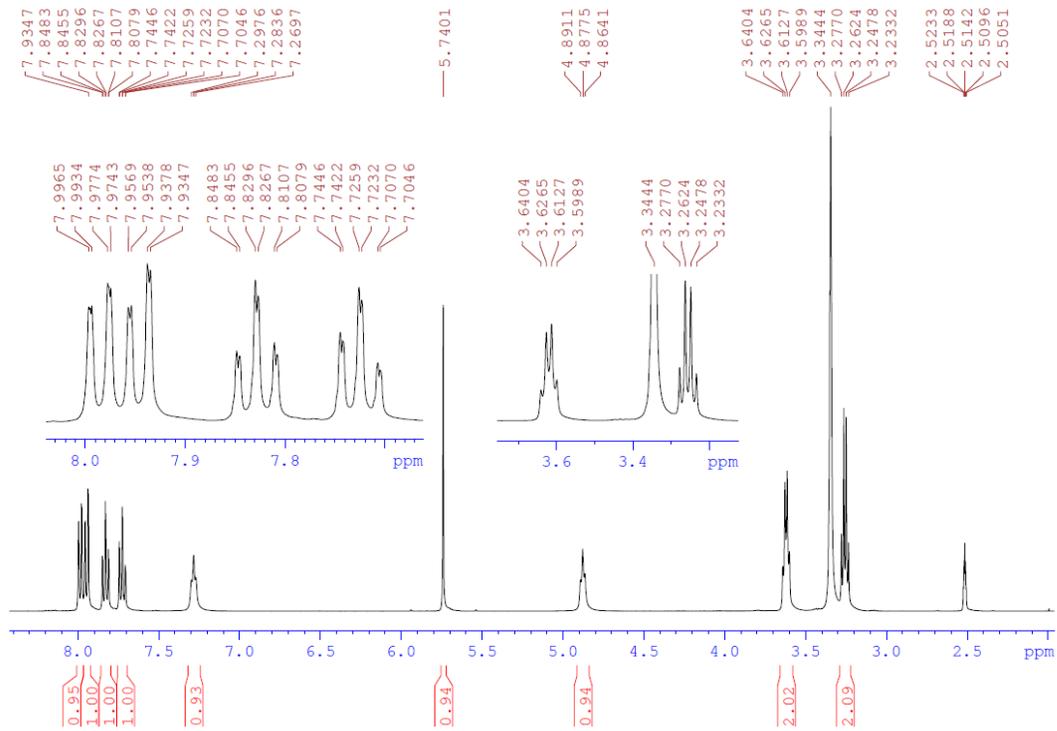
Anexo 44. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-2abu-Ac (**9a**).



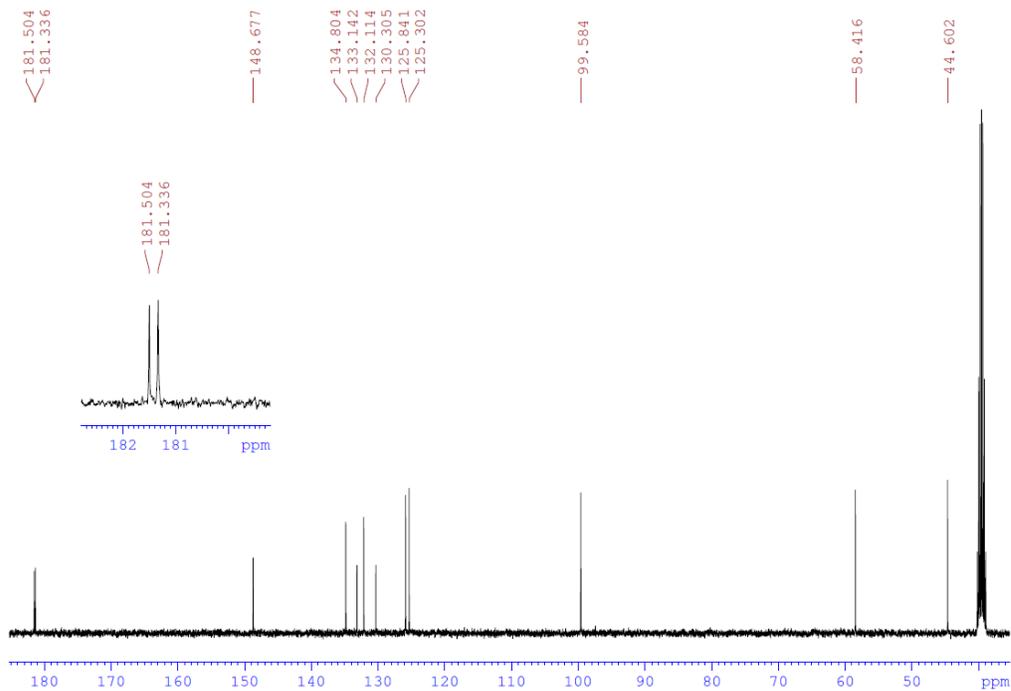
Anexo 45. Espectro de IR del compuesto NQ-2aet (10).



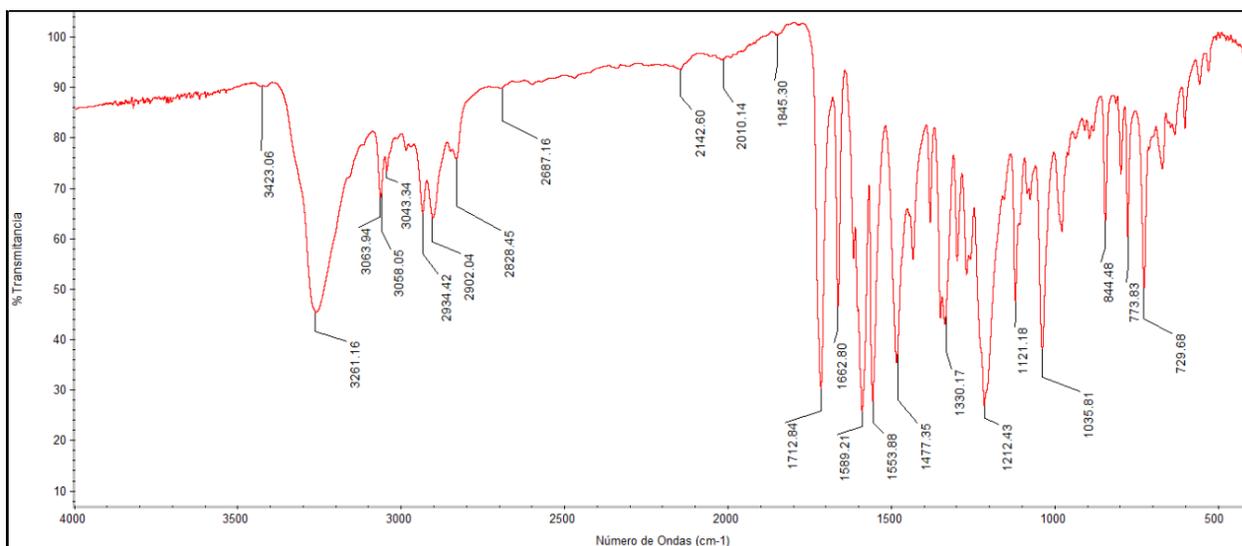
Anexo 46. Espectro de masas del compuesto NQ-2aet (10).



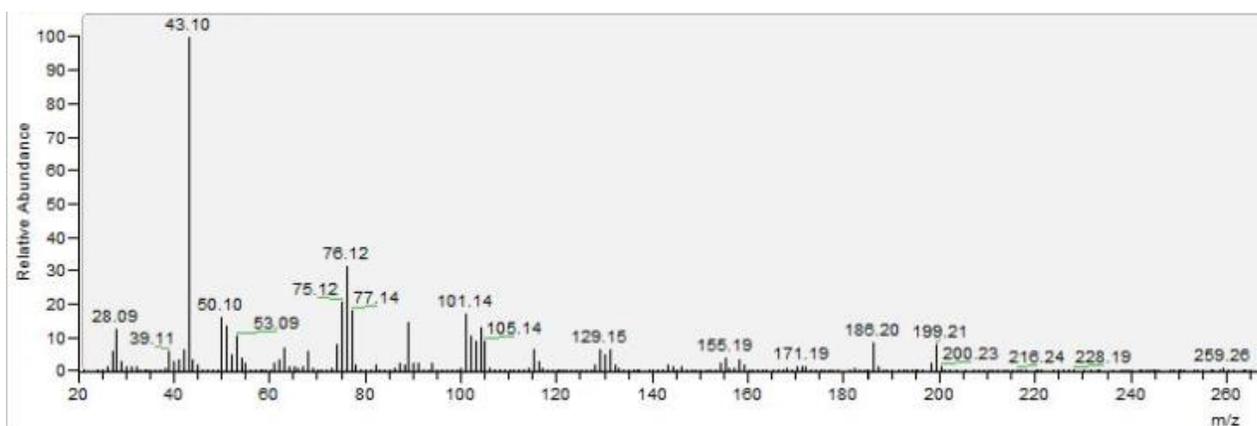
Anexo 47. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-2aet (10).



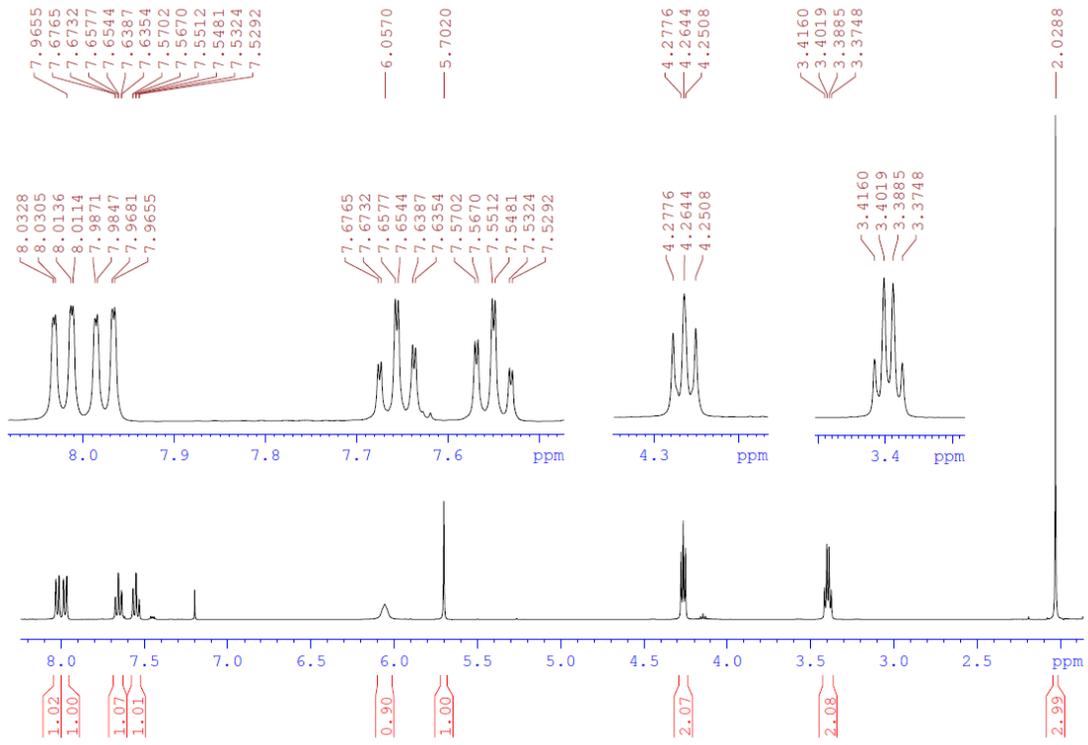
Anexo 48. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-2aet (10).



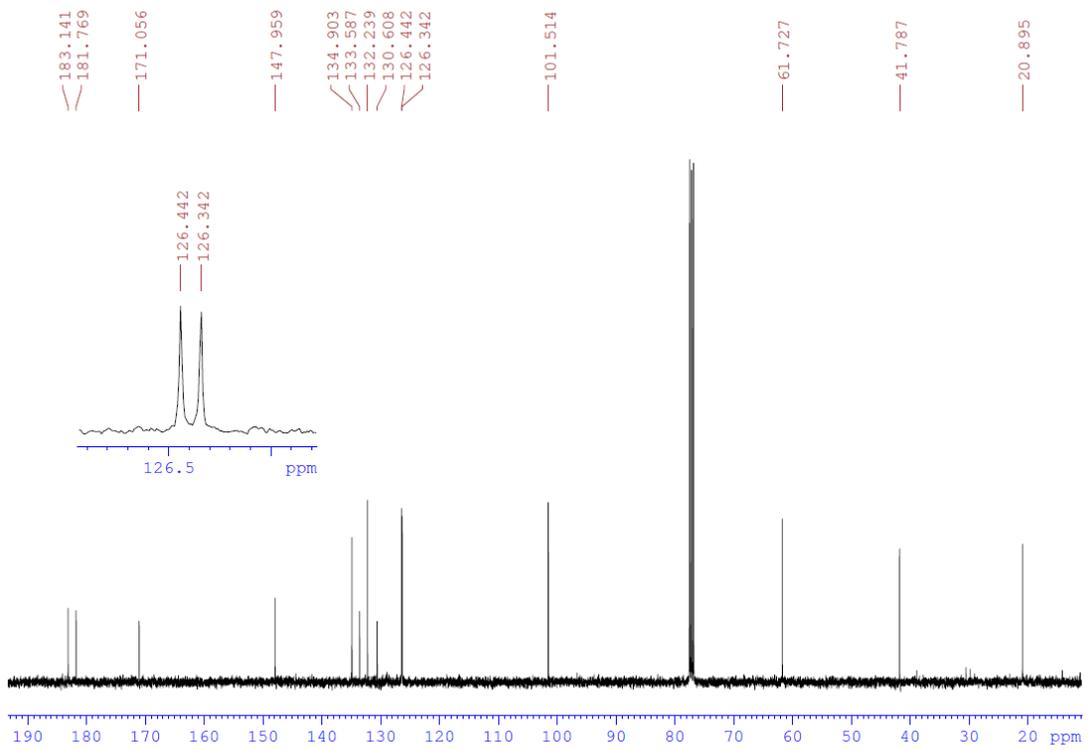
Anexo 49. Espectro de IR del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).



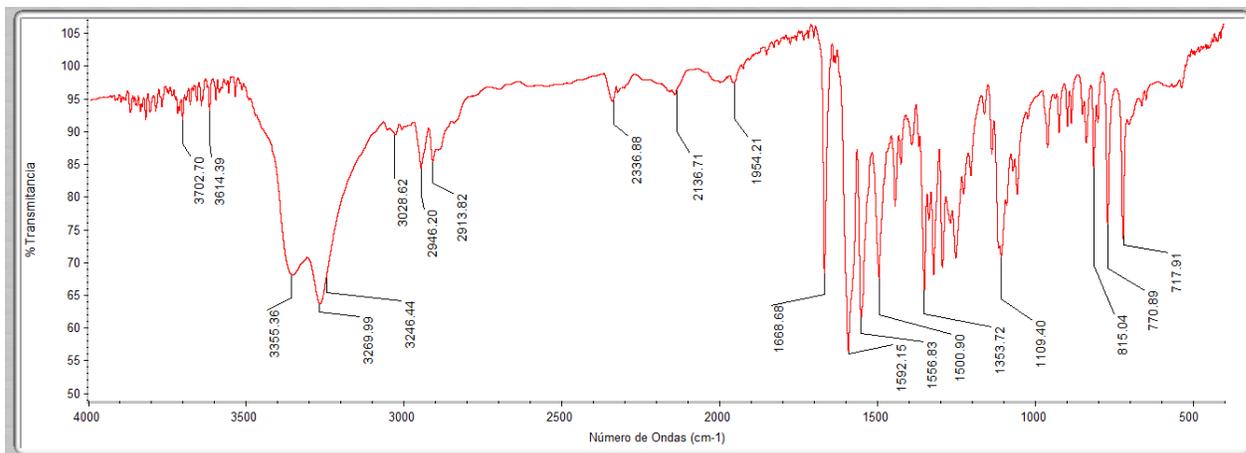
Anexo 50. Espectro de masas del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).



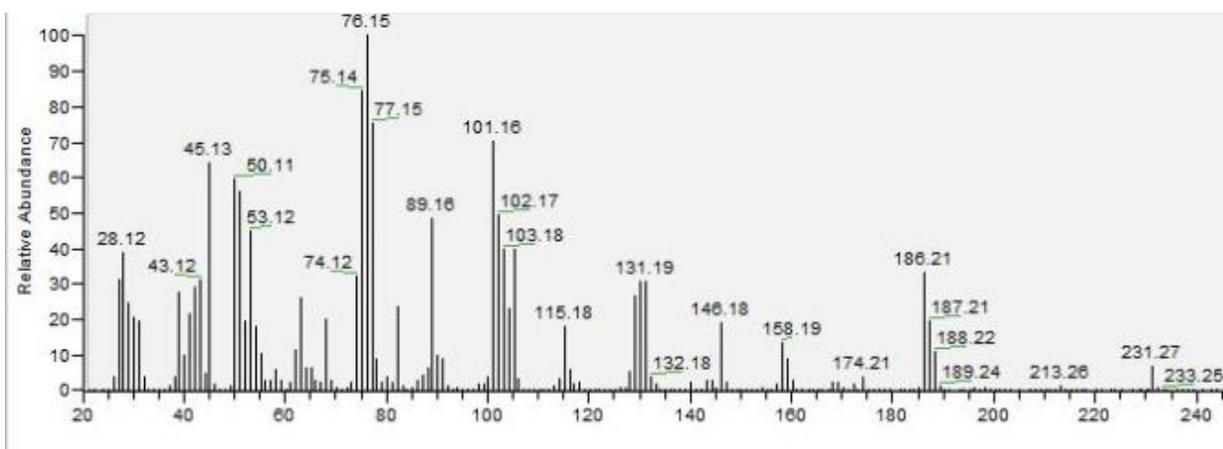
Anexo 51. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).



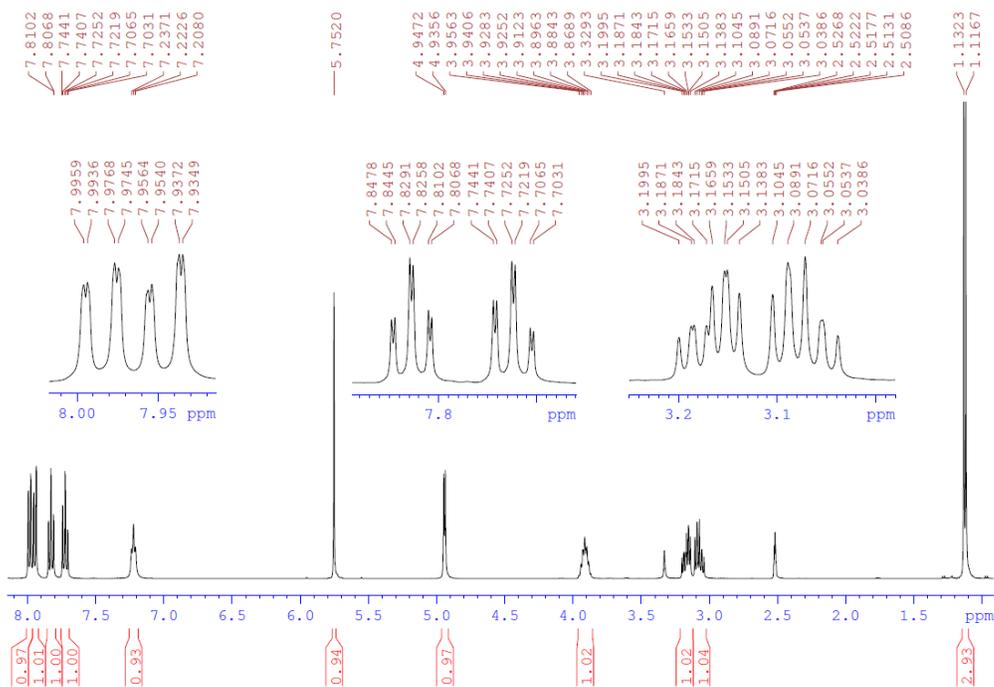
Anexo 52. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-2aet-Ac (10a).



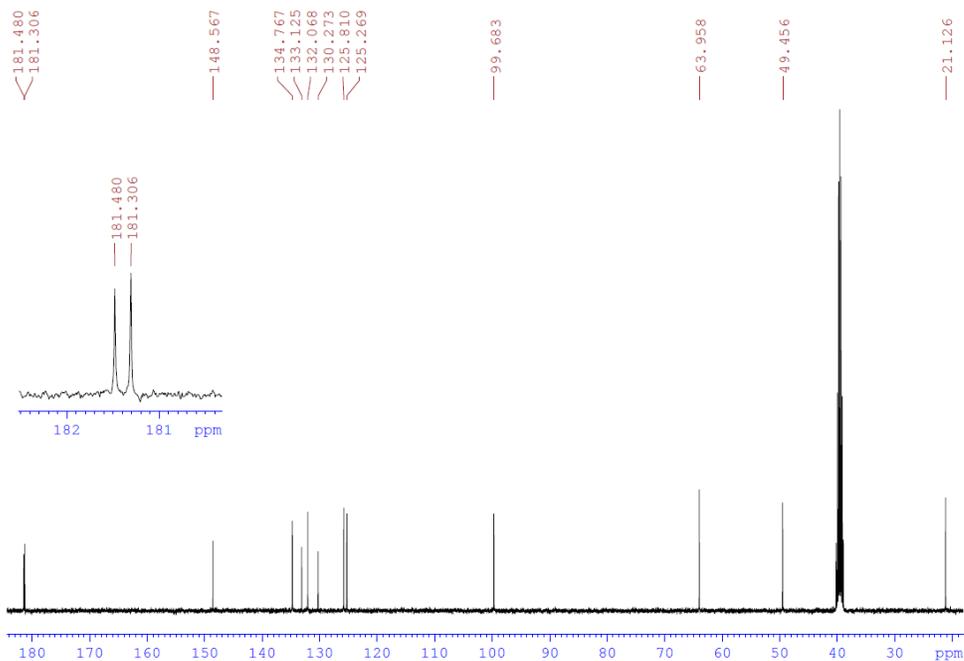
Anexo 53. Espectro de IR del compuesto NQ-1a2p (11).



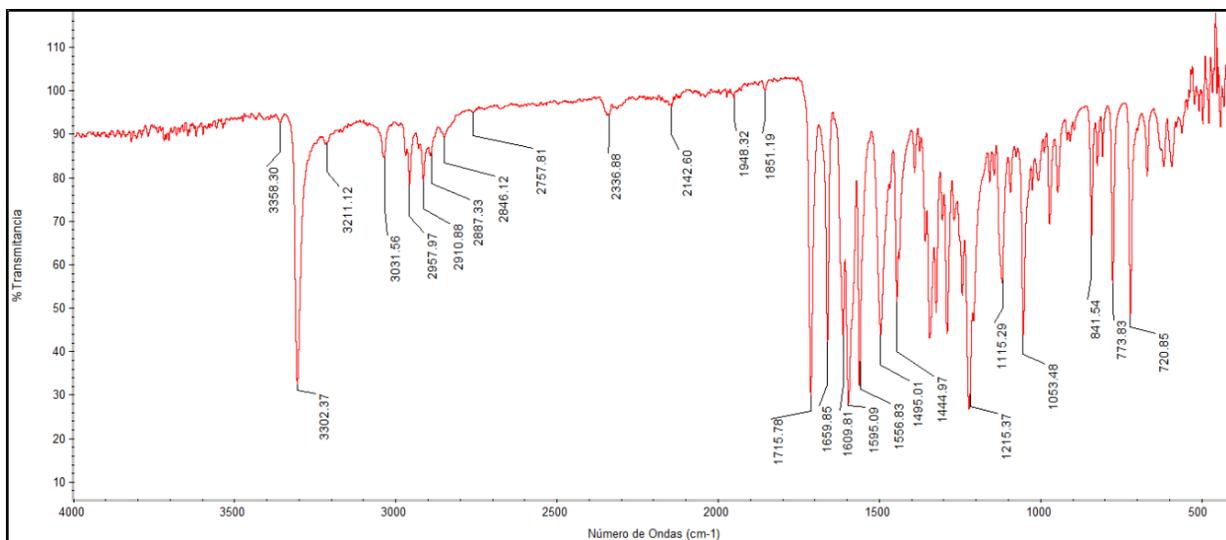
Anexo 54. Espectro de masas del compuesto NQ-1a2p (11).



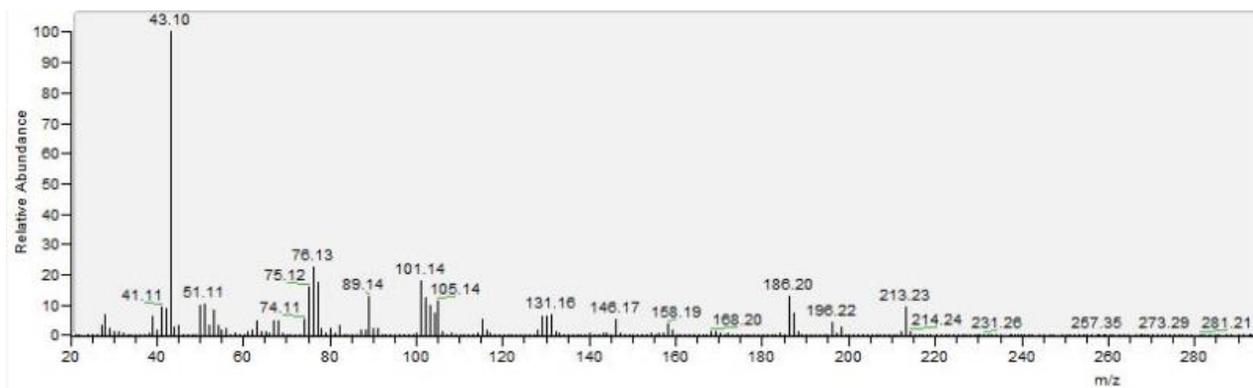
Anexo 55. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-1a2p (11).



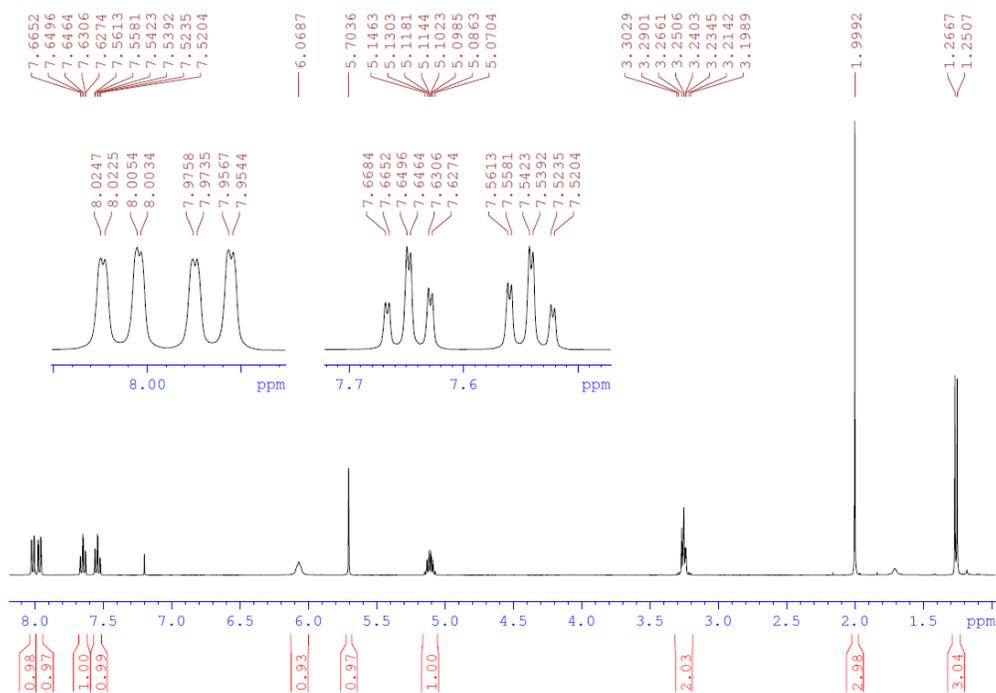
Anexo 56. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-1a2p (11).



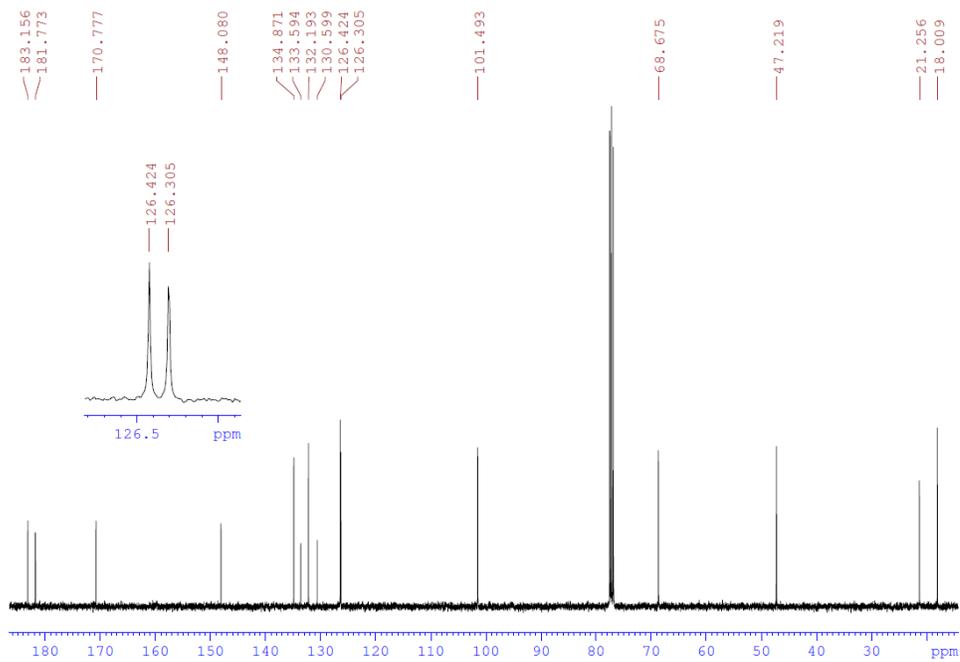
Anexo 57. Espectro de IR del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).



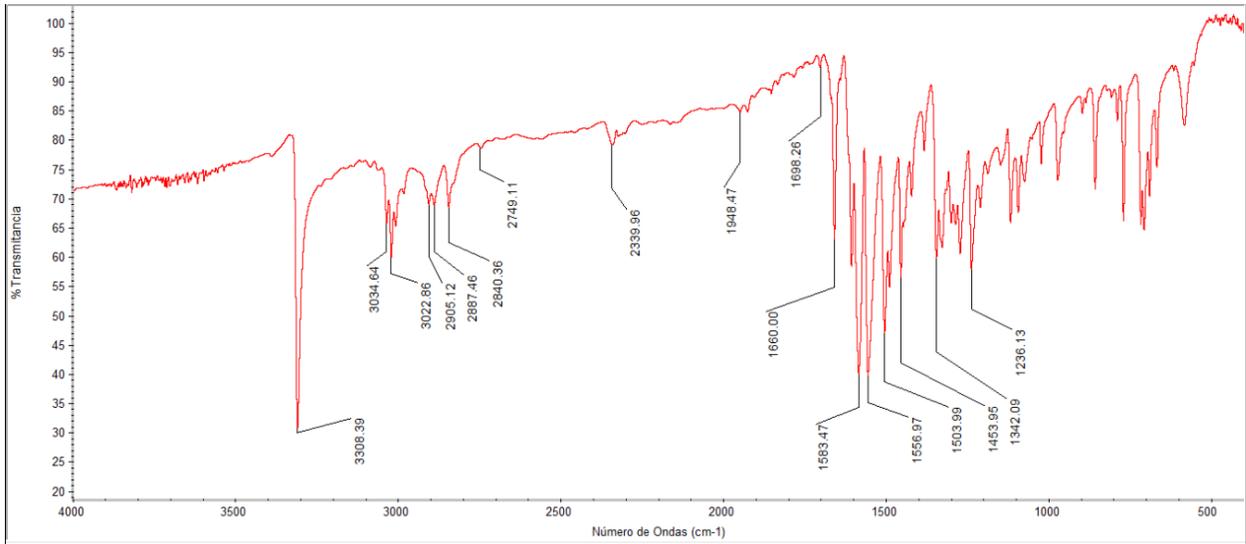
Anexo 58. Espectro de masas del compuesto NQ-1a2p-Ac (11a).



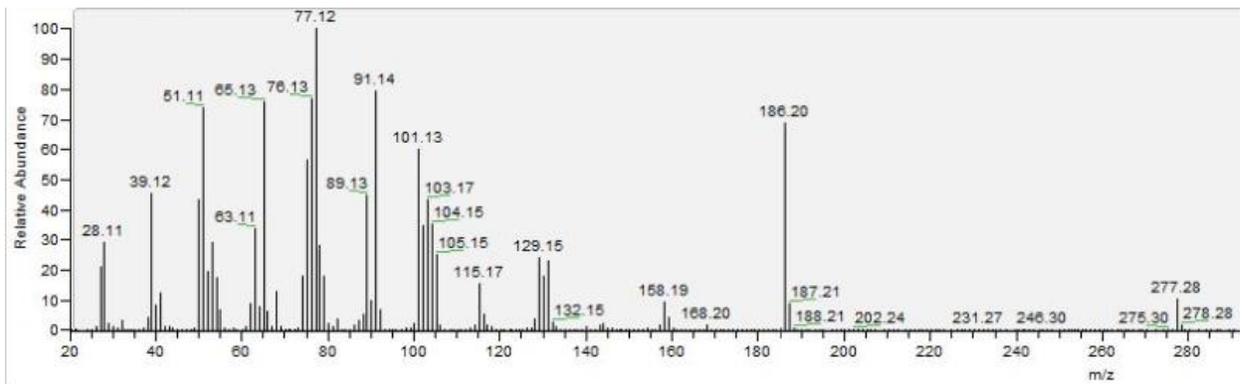
Anexo 59. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-1a2p-Ac (**11a**).



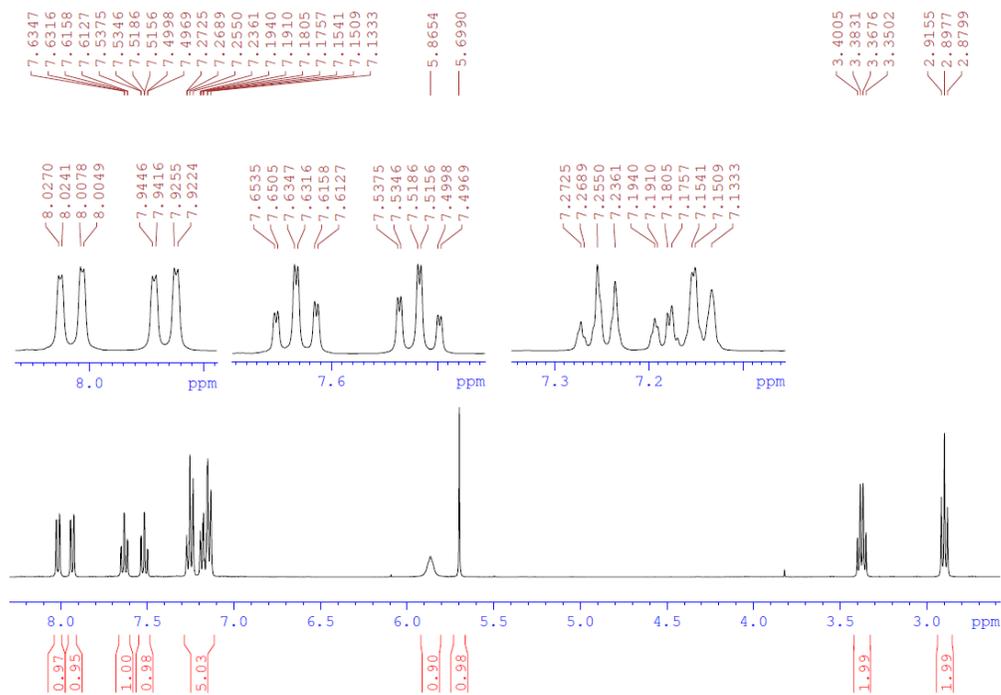
Anexo 60. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-1a2p-Ac (**11a**).



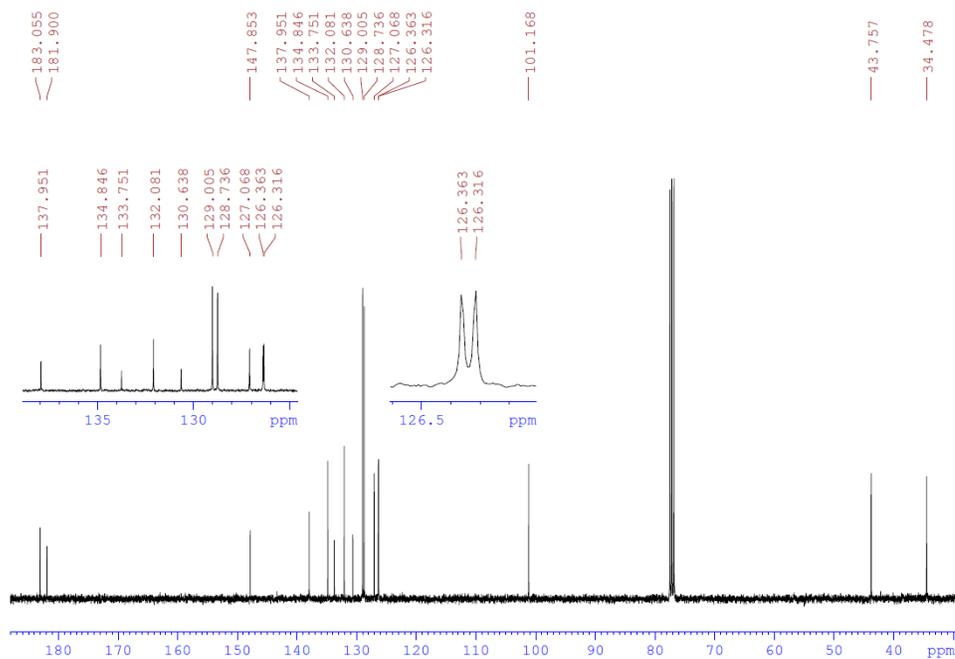
Anexo 61. Espectro de IR del compuesto NQ-Feam (12).



Anexo 62. Espectro de masas del compuesto NQ-Feam (12).



Anexo 63. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto NQ-Feam (12).



Anexo 64. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto NQ-Feam (12).

| (% Conjunto de entrenamiento) | Set1  |        |       |        | Set2  |        |       |        | Set3  |        |       |        | Set4  |        |       |        |
|-------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
|                               | Z3    | Z3+Avg | ST    | MSWHIM |
| 10                            | 0.466 | 0.464  | 0.426 | 0.465  | 0.469 | 0.468  | 0.429 | 0.468  | 0.487 | 0.488  | 0.453 | 0.489  | 0.495 | 0.496  | 0.457 | 0.494  |
| 20                            | 0.552 | 0.552  | 0.501 | 0.553  | 0.553 | 0.552  | 0.499 | 0.552  | 0.566 | 0.566  | 0.513 | 0.565  | 0.579 | 0.579  | 0.526 | 0.581  |
| 30                            | 0.604 | 0.603  | 0.547 | 0.602  | 0.598 | 0.599  | 0.540 | 0.599  | 0.616 | 0.617  | 0.557 | 0.617  | 0.621 | 0.620  | 0.557 | 0.620  |
| 40                            | 0.625 | 0.626  | 0.563 | 0.625  | 0.626 | 0.625  | 0.561 | 0.626  | 0.640 | 0.639  | 0.574 | 0.640  | 0.644 | 0.644  | 0.576 | 0.645  |
| 50                            | 0.646 | 0.646  | 0.577 | 0.645  | 0.644 | 0.644  | 0.574 | 0.644  | 0.662 | 0.662  | 0.591 | 0.662  | 0.662 | 0.662  | 0.590 | 0.662  |
| 60                            | 0.655 | 0.656  | 0.581 | 0.655  | 0.652 | 0.653  | 0.575 | 0.653  | 0.673 | 0.673  | 0.596 | 0.673  | 0.668 | 0.668  | 0.588 | 0.668  |
| 70                            | 0.672 | 0.673  | 0.596 | 0.673  | 0.666 | 0.667  | 0.586 | 0.667  | 0.686 | 0.687  | 0.610 | 0.687  | 0.684 | 0.684  | 0.604 | 0.684  |
| 80                            | 0.695 | 0.695  | 0.616 | 0.695  | 0.696 | 0.696  | 0.618 | 0.698  | 0.712 | 0.711  | 0.631 | 0.712  | 0.712 | 0.711  | 0.627 | 0.711  |
| 90                            | 0.713 | 0.713  | 0.633 | 0.712  | 0.705 | 0.705  | 0.621 | 0.706  | 0.730 | 0.728  | 0.650 | 0.730  | 0.715 | 0.716  | 0.631 | 0.717  |

Anexo 65. Valores de R<sup>2</sup> para los diferentes modelados proteoquimiométricos.

| (% Conjunto de entrenamiento) | Set1  |        |       |        | Set2  |        |       |        | Set3  |        |       |        | Set4  |        |       |        |
|-------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
|                               | Z3    | Z3+Avg | ST    | MSWHIM |
| 10                            | 0.950 | 0.951  | 0.988 | 0.951  | 0.946 | 0.946  | 0.985 | 0.946  | 0.916 | 0.915  | 0.950 | 0.915  | 0.908 | 0.908  | 0.947 | 0.909  |
| 20                            | 0.872 | 0.872  | 0.925 | 0.872  | 0.869 | 0.869  | 0.926 | 0.869  | 0.843 | 0.843  | 0.896 | 0.844  | 0.831 | 0.831  | 0.887 | 0.829  |
| 30                            | 0.827 | 0.827  | 0.890 | 0.828  | 0.829 | 0.829  | 0.896 | 0.829  | 0.798 | 0.797  | 0.863 | 0.797  | 0.792 | 0.792  | 0.861 | 0.793  |
| 40                            | 0.802 | 0.801  | 0.874 | 0.802  | 0.800 | 0.801  | 0.876 | 0.800  | 0.773 | 0.774  | 0.848 | 0.774  | 0.767 | 0.766  | 0.843 | 0.766  |
| 50                            | 0.775 | 0.775  | 0.856 | 0.776  | 0.777 | 0.777  | 0.859 | 0.777  | 0.748 | 0.747  | 0.828 | 0.747  | 0.746 | 0.746  | 0.829 | 0.747  |
| 60                            | 0.762 | 0.761  | 0.845 | 0.761  | 0.762 | 0.761  | 0.848 | 0.760  | 0.733 | 0.733  | 0.820 | 0.733  | 0.731 | 0.731  | 0.819 | 0.731  |
| 70                            | 0.756 | 0.755  | 0.846 | 0.755  | 0.757 | 0.756  | 0.851 | 0.757  | 0.729 | 0.728  | 0.819 | 0.729  | 0.725 | 0.724  | 0.817 | 0.725  |
| 80                            | 0.728 | 0.729  | 0.825 | 0.729  | 0.728 | 0.728  | 0.825 | 0.726  | 0.701 | 0.701  | 0.799 | 0.701  | 0.698 | 0.698  | 0.799 | 0.699  |
| 90                            | 0.716 | 0.716  | 0.818 | 0.717  | 0.727 | 0.727  | 0.831 | 0.727  | 0.688 | 0.690  | 0.790 | 0.688  | 0.702 | 0.702  | 0.806 | 0.700  |

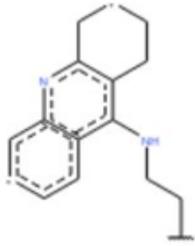
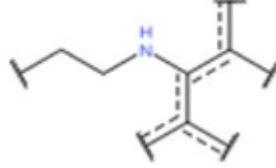
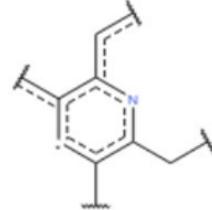
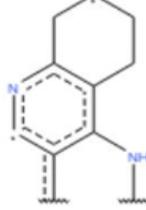
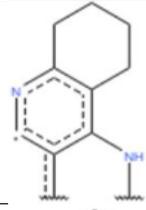
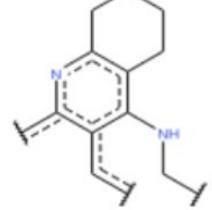
Anexo 66. Valores de RMSE para los diferentes modelados proteoquimiométricos.

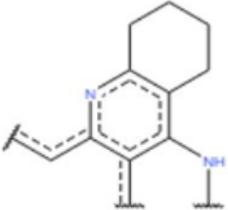
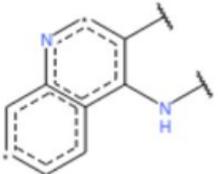
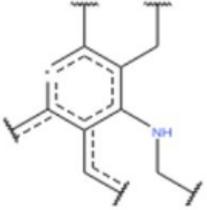
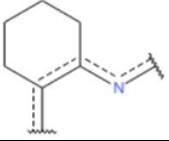
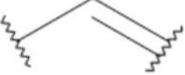
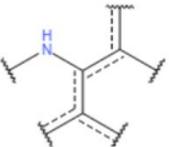
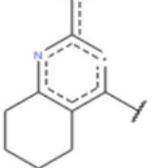
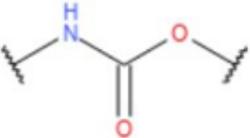
| (% Conjunto de entrenamiento) | Set3  |         |
|-------------------------------|-------|---------|
|                               | Z3    | Z3 (SU) |
| 10                            | 0.487 | 0.518   |
| 20                            | 0.566 | 0.609   |
| 30                            | 0.616 | 0.664   |
| 40                            | 0.640 | 0.689   |
| 50                            | 0.662 | 0.716   |
| 60                            | 0.673 | 0.727   |
| 70                            | 0.686 | 0.744   |
| 80                            | 0.712 | 0.767   |
| 90                            | 0.730 | 0.786   |

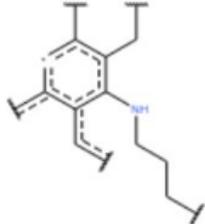
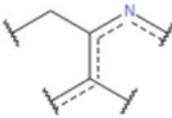
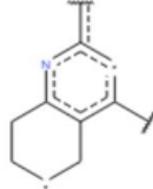
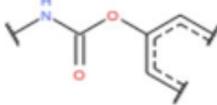
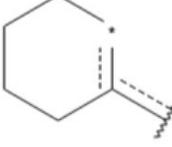
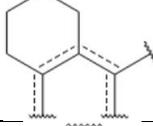
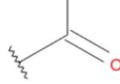
**Anexo 67.** Valores de  $R^2$  comparando un modelo con descripción total de la secuencia de aminoácidos, contra la delimitación al sitio de unión (SU).

| (% Conjunto de entrenamiento) | Set3  |         |
|-------------------------------|-------|---------|
|                               | Z3    | Z3 (SU) |
| 10                            | 0.916 | 0.886   |
| 20                            | 0.843 | 0.797   |
| 30                            | 0.798 | 0.741   |
| 40                            | 0.773 | 0.712   |
| 50                            | 0.748 | 0.678   |
| 60                            | 0.733 | 0.661   |
| 70                            | 0.729 | 0.650   |
| 80                            | 0.701 | 0.619   |
| 90                            | 0.688 | 0.599   |

**Anexo 68.** Valores de RMSE comparando un modelo con descripción total de la secuencia de aminoácidos, contra la delimitación al sitio de unión (SU).

| Propiedad                                     | Importancia (Exactitud) | Importancia (Split RSS*) | Correlación con pchembl_value_Mean | Datos de estructura                                                                   |
|-----------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Peso molecular                                | 62.930                  | 567.87                   | 0.23439                            |                                                                                       |
| Fracción del área superficial polar molecular | 76.352                  | 509.33                   | -0.087022                          |                                                                                       |
| ALogP                                         | 70.738                  | 490.24                   | 0.24342                            |                                                                                       |
| Número de enlaces rotables                    | 58.730                  | 397.81                   | 0.21905                            |                                                                                       |
| CM#ECFP_6#-335913928                          | 15.133                  | 296.28                   | 0.44298                            |    |
| CM#ECFP_6#-235775199                          | 14.017                  | 282.05                   | 0.43840                            |    |
| Número de Aceptores de enlaces H              | 64.925                  | 268.92                   | 0.067968                           |                                                                                       |
| CM#ECFP_6#-1831810252                         | 15.989                  | 222.29                   | 0.43539                            |   |
| CM#ECFP_6#-1031507393                         | 10.188                  | 217.13                   | 0.43901                            |  |
| CM#ECFP_6#-354715218                          | 11.803                  | 210.73                   | 0.43832                            |  |
| CM#ECFP_6#151512550                           | 9.9384                  | 209.57                   | 0.43389                            |  |

|                                  |        |        |           |                                                                                       |
|----------------------------------|--------|--------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| CM#EFCP_6#-1638843444            | 10.365 | 204.20 | 0.43713   |    |
| CM#EFCP_6#-1109225267            | 14.607 | 200.37 | 0.44188   |    |
| Número de Donadores de enlaces H | 47.074 | 184.66 | 0.13821   |                                                                                       |
| CM#EFCP_6#1334101934             | 10.201 | 173.04 | 0.43411   |    |
| CM#EFCP_6#-1915556752            | 11.636 | 151.42 | 0.41313   |   |
| AA_13_Z2                         | 21.577 | 141.67 | -0.075752 |                                                                                       |
| CM#EFCP_6#-1925046727            | 35.126 | 136.55 | -0.17689  |  |
| AA_13_Z3                         | 18.034 | 136.44 | 0.0078857 |                                                                                       |
| CM#EFCP_6#-1660205591            | 9.5670 | 136.27 | 0.42553   |  |
| CM#EFCP_6#-1219017517            | 10.970 | 132.63 | 0.41279   |  |
| CM#EFCP_6#-1685106965            | 29.026 | 132.28 | 0.10317   |  |

|                       |        |        |           |                                                                                       |
|-----------------------|--------|--------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| CM#EFCP_6#-212998624  | 8.5462 | 131.13 | 0.41496   |    |
| CM#EFCP_6#1049633513  | 13.782 | 123.63 | 0.40623   |    |
| CM#EFCP_6#-100144301  | 10.314 | 123.79 | 0.40712   |    |
| CM#EFCP_6#-2003064156 | 24.278 | 123.12 | 0.12943   |    |
| AA_13_Z1              | 21.451 | 120.47 | 0.10696   |                                                                                       |
| CM#EFCP_6#2086924722  | 13.282 | 114.45 | 0.40116   |   |
| CM#EFCP_6#-1442960233 | 11.850 | 114.13 | 0.40968   |  |
| CM#EFCP_6#2106656448  | 30.439 | 114.01 | -0.014494 |  |

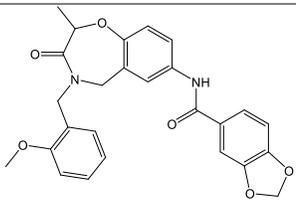
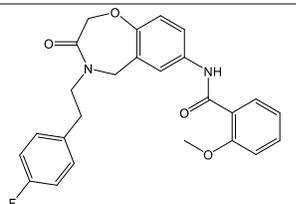
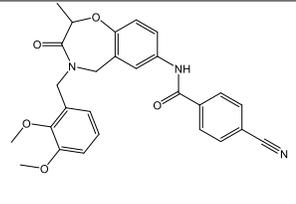
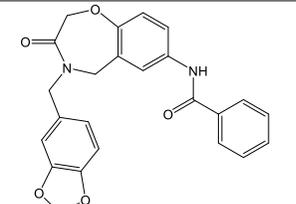
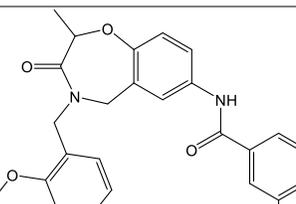
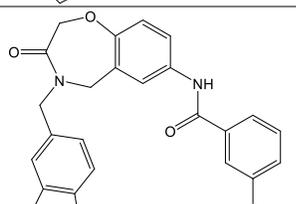
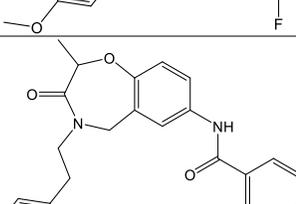
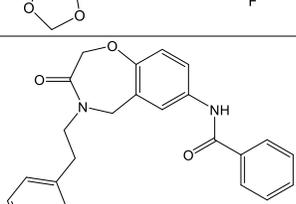
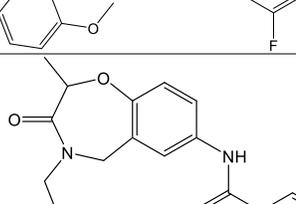
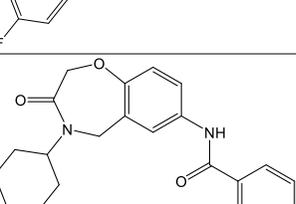
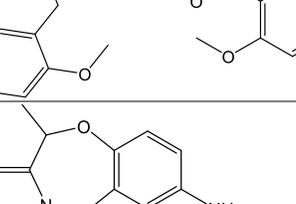
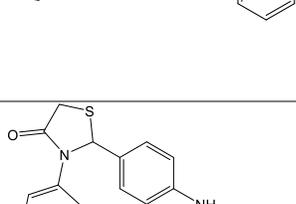
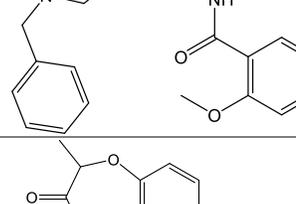
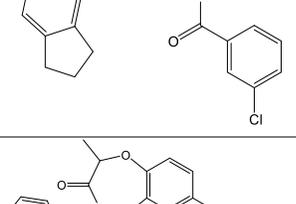
**Anexo 69.** Lista de propiedades con sus valores de importancia para el modelo proteoquimiométrico. \*Suma Residual de Cuadrados.

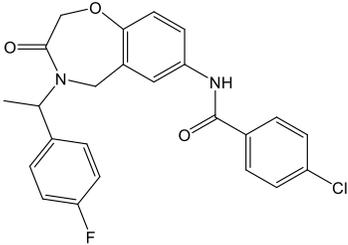
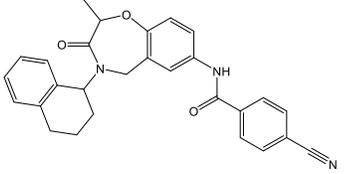
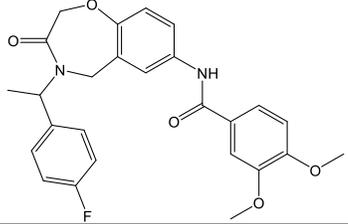
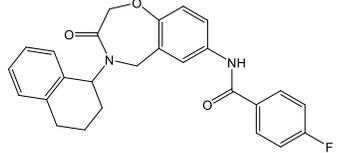
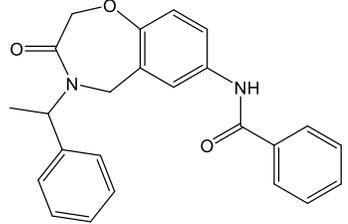
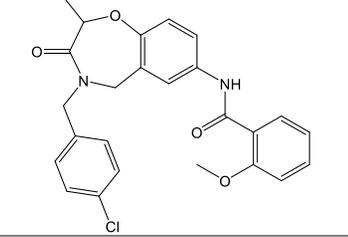
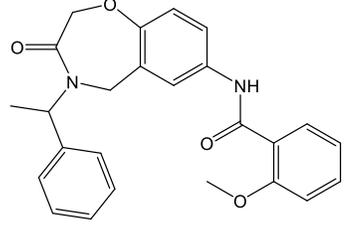
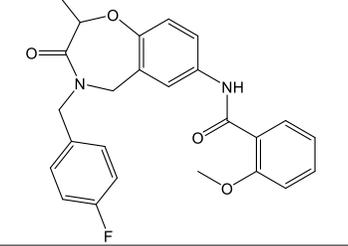
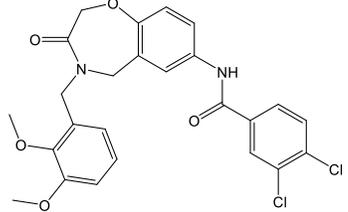
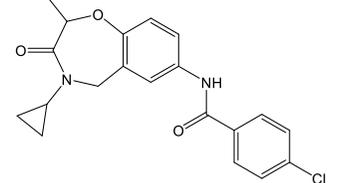
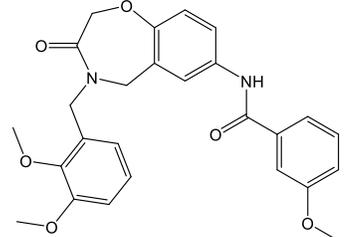
|           | Código de acceso |        |           |        |        |            |       |       |
|-----------|------------------|--------|-----------|--------|--------|------------|-------|-------|
|           | P22303           | D8V7J7 | P22303    | D8V7J7 | P22303 | D8V7J7     |       |       |
| <b>1</b>  | 29405            | 29405  | <b>41</b> | 30639  | 25266  | <b>81</b>  | 27387 | 29074 |
| <b>2</b>  | 3569             | 30995  | <b>42</b> | 17649  | 14735  | <b>82</b>  | 11606 | 18150 |
| <b>3</b>  | 30995            | 26654  | <b>43</b> | 13881  | 25875  | <b>83</b>  | 29562 | 15651 |
| <b>4</b>  | 26654            | 23375  | <b>44</b> | 26591  | 26044  | <b>84</b>  | 25875 | 28393 |
| <b>5</b>  | 5463             | 3569   | <b>45</b> | 30989  | 1987   | <b>85</b>  | 28531 | 17606 |
| <b>6</b>  | 23375            | 28468  | <b>46</b> | 22945  | 17348  | <b>86</b>  | 28732 | 19852 |
| <b>7</b>  | 8154             | 20313  | <b>47</b> | 25514  | 25514  | <b>87</b>  | 14094 | 27387 |
| <b>8</b>  | 20313            | 8154   | <b>48</b> | 14735  | 27903  | <b>88</b>  | 13779 | 16869 |
| <b>9</b>  | 15103            | 19896  | <b>49</b> | 30946  | 14273  | <b>89</b>  | 29846 | 12899 |
| <b>10</b> | 19896            | 5463   | <b>50</b> | 28393  | 25241  | <b>90</b>  | 27929 | 29115 |
| <b>11</b> | 7112             | 25634  | <b>51</b> | 18177  | 13641  | <b>91</b>  | 6508  | 16907 |
| <b>12</b> | 25634            | 30683  | <b>52</b> | 25489  | 17649  | <b>92</b>  | 14731 | 22729 |
| <b>13</b> | 29956            | 7112   | <b>53</b> | 25510  | 30989  | <b>93</b>  | 22343 | 3473  |
| <b>14</b> | 28330            | 29956  | <b>54</b> | 8528   | 15783  | <b>94</b>  | 14770 | 13738 |
| <b>15</b> | 28468            | 30073  | <b>55</b> | 27045  | 15103  | <b>95</b>  | 25734 | 13998 |
| <b>16</b> | 22372            | 22372  | <b>56</b> | 3473   | 28734  | <b>96</b>  | 25241 | 30955 |
| <b>17</b> | 13163            | 9520   | <b>57</b> | 10490  | 18177  | <b>97</b>  | 15333 | 16767 |
| <b>18</b> | 29301            | 26591  | <b>58</b> | 14520  | 3708   | <b>98</b>  | 27205 | 30899 |
| <b>19</b> | 17457            | 28330  | <b>59</b> | 1987   | 13881  | <b>99</b>  | 11506 | 2662  |
| <b>20</b> | 9520             | 13163  | <b>60</b> | 15173  | 24916  | <b>100</b> | 13977 | 17705 |
| <b>21</b> | 30683            | 15963  | <b>61</b> | 20005  | 11962  |            |       |       |
| <b>22</b> | 14273            | 17457  | <b>62</b> | 30899  | 17427  |            |       |       |
| <b>23</b> | 16971            | 29301  | <b>63</b> | 25266  | 27504  |            |       |       |
| <b>24</b> | 20153            | 31001  | <b>64</b> | 24916  | 26869  |            |       |       |
| <b>25</b> | 29270            | 5647   | <b>65</b> | 19901  | 13779  |            |       |       |
| <b>26</b> | 17427            | 30931  | <b>66</b> | 6188   | 14520  |            |       |       |
| <b>27</b> | 30931            | 28158  | <b>67</b> | 13689  | 25386  |            |       |       |
| <b>28</b> | 5647             | 20153  | <b>68</b> | 16369  | 3056   |            |       |       |
| <b>29</b> | 30978            | 14733  | <b>69</b> | 17316  | 30978  |            |       |       |
| <b>30</b> | 17606            | 23342  | <b>70</b> | 18150  | 22945  |            |       |       |
| <b>31</b> | 30073            | 25515  | <b>71</b> | 14733  | 14313  |            |       |       |
| <b>32</b> | 31001            | 25489  | <b>72</b> | 27432  | 22951  |            |       |       |
| <b>33</b> | 28158            | 18160  | <b>73</b> | 23342  | 18697  |            |       |       |
| <b>34</b> | 19851            | 19851  | <b>74</b> | 14587  | 12028  |            |       |       |
| <b>35</b> | 25515            | 27929  | <b>75</b> | 14155  | 27940  |            |       |       |
| <b>36</b> | 3708             | 25510  | <b>76</b> | 13641  | 14155  |            |       |       |
| <b>37</b> | 27940            | 14094  | <b>77</b> | 22729  | 1189   |            |       |       |
| <b>38</b> | 11962            | 16971  | <b>78</b> | 15826  | 17645  |            |       |       |
| <b>39</b> | 12028            | 14213  | <b>79</b> | 20862  | 11606  |            |       |       |
| <b>40</b> | 27504            | 25734  | <b>80</b> | 23017  | 21222  |            |       |       |

**Anexo 70.** Primeros 100 *clusters* con mejor resultados por secuencia de AChE.

| Compuesto | Cluster | Estructura | Compuesto | Cluster | Estructura |
|-----------|---------|------------|-----------|---------|------------|
| V017-4419 | 3056    |            | V016-8456 | 29405   |            |
| V003-7217 | 19896   |            | V016-8397 | 29405   |            |
| V016-8584 | 19896   |            | V003-5165 | 29405   |            |
| V016-8382 | 19896   |            | V016-8457 | 29405   |            |
| V016-8624 | 19896   |            | V016-8444 | 29405   |            |
| V011-1631 | 19896   |            | V017-4525 | 29405   |            |
| V003-4943 | 19896   |            | V017-4950 | 29405   |            |

|           |       |  |           |       |  |
|-----------|-------|--|-----------|-------|--|
| V003-5828 | 19901 |  | V017-6871 | 29405 |  |
| V017-4582 | 19901 |  | V017-6883 | 29405 |  |
| V016-8655 | 19901 |  | V016-9209 | 29405 |  |
| V016-8596 | 19901 |  | V016-9245 | 29405 |  |
| V016-9268 | 19901 |  | V017-6882 | 29405 |  |
| V017-4606 | 19901 |  | V020-6797 | 29405 |  |
| V018-0262 | 19901 |  | V018-0311 | 29405 |  |
| V018-0298 | 19901 |  | V017-4985 | 29405 |  |

|           |       |                                                                                     |           |       |                                                                                       |
|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| V015-8616 | 19901 |    | V017-4593 | 29405 |    |
| V028-6741 | 19901 |    | V017-4432 | 29405 |    |
| V016-9186 | 19901 |    | V028-8055 | 29405 |    |
| V018-0274 | 19901 |   | V017-4545 | 29405 |   |
| V018-0310 | 19901 |  | V017-4476 | 29405 |  |
| V017-4131 | 19901 |  | V005-6819 | 30931 |  |
| V016-8380 | 19901 |  | V003-5557 | 30995 |  |

|           |       |                                                                                     |           |       |                                                                                       |
|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| V018-4986 | 20313 |    | V003-5522 | 30995 |    |
| V018-3552 | 20313 |    | V028-8167 | 30995 |    |
| V018-6857 | 20313 |    | V017-4706 | 30995 |    |
| V013-4730 | 20313 |   | V016-9598 | 30995 |   |
| V003-5153 | 29405 |  | V014-5704 | 30995 |  |
| V016-8385 | 29405 |  |           |       |                                                                                       |

**Anexo 71.** Estructuras de los mejores resultados del cribado.