

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



“Síntesis, caracterización estructural y evaluación *in silico* de
compuestos derivados de menadiona”

Que para obtener el título de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta

Andrea Muñoz Ayala

Tijuana, B.C.

Agosto del 2018


Tijuana, B. C., a 16 de agosto de 2018

C. Andrea Muñoz Ayala
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente


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

Es propuesto, por el Dr. Iván Córdova Guerrero y el M.C. Arturo Estolano Cobián quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Síntesis, Caracterización Estructural y Evaluación *IN SÍLICO* de Compuestos Derivados de Menadiona", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII. ANEXOS



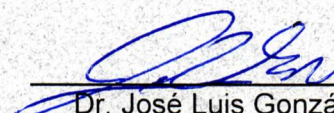
Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis



M.C. Arturo Estolano Cobián
Co- Director de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Margarita y Samuel y a mi hermana Faby, por apoyarme con todo lo que estuvo en sus manos, por motivarme a superarme y a ser cada vez una mejor persona, cada logro mío, pequeño o grande, también es suyo.

Al doctor Iván Córdova por dejarme ser parte de su laboratorio y por guiarme en la realización de este proyecto.

A mis amigos y Raúl por ser mi segunda familia en Tijuana.

A mis maestros, por su dedicación y sobre todo por contagiarme su gusto por las materias de la carrera.

Al laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales por su paciencia y por apoyarme siempre con la mejor disposición.

A la Universidad Autónoma de Baja California por 4 años de aprendizaje.

RESUMEN

En el siguiente trabajo se presenta una ruta sintética para la generación de derivados de menadiona, su caracterización y la evaluación preliminar de su actividad anticoagulante mediante un método *in silico*.

En la **INTRODUCCIÓN** se mencionan brevemente algunos hallazgos importantes a lo largo de la historia que permitieron el desarrollo de la química medicinal, además de una breve descripción de los padecimientos trombóticos y la importancia del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para estas afecciones.

En las **GENERALIDADES** se describen las características principales de las quinonas, sus propiedades biológicas y la importancia farmacológica de estas moléculas, además se presentan los antecedentes metodológicos para la síntesis de derivados de 1,4-naftoquinonas. También se da una breve descripción del proceso de coagulación, haciendo énfasis en los factores proteicos involucrados, entre los que se incluyen los dependientes de vitamina K. Se presenta a la vitamina K y cuál es su papel en la coagulación, así como las enzimas que permiten que ésta cumpla su función, con un mayor enfoque en la enzima VKOR. Por último se describe de manera breve la técnica de docking molecular y su importancia.

En la **METODOLOGÍA** se muestran las condiciones, reactivos y pasos a seguir para llevar a cabo las reacciones involucradas en la síntesis de los derivados de menadiona y su posterior purificación. De igual manera, se explica el proceso que se siguió para realizar la evaluación de la interacción de la enzima VKOR, los precursores y productos sintetizados mediante docking molecular.

En la sección de **RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS** se presentan los productos obtenidos, así como los hallazgos generados mediante su caracterización. Además, se muestra la evaluación mediante docking molecular, el análisis y la comparación de los resultados obtenidos con los de estudios previos del mismo grupo de investigación.

Por último, en las **CONCLUSIONES** se resumen los resultados obtenidos en este trabajo y se plantea el trabajo a futuro para continuar con este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS	VIII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo General	6
3.2 Objetivos Particulares	6
4. GENERALIDADES	7
4.1 Las quinonas.....	7
4.1.1 Características generales.....	7
4.1.2 Propiedades biológicas.....	8
4.2 Síntesis química de derivados de 1,4-naftoquinona	11
4.3 Hemostasia y la cascada de la coagulación.	14
4.3.1 Vía intrínseca.....	15
4.3.2 Vía extrínseca	16
4.3.3 Vía común.....	17
4.4 Vitamina K y su relación con la coagulación.	18
4.4.1 ¿Qué es la vitamina K?.....	18
4.4.2 Ciclo de la vitamina K y la γ -carboxilación de los factores de la coagulación.	19
4.5 Enzima VKOR humana y homólogos	21
4.5.1 VKOR humana	21

4.5.2 Anticoagulantes con acción sobre hVKOR	23
4.5.3 VKOR de <i>Synechococcus</i> sp.....	25
4.6 Docking molecular, un estudio <i>in silico</i>	26
4.6.1 Complejo ligando-receptor	26
4.6.2 Aspectos generales sobre el docking molecular	27
4.6.3 Importancia del docking molecular	28
5. METODOLOGÍA	30
5.1 Síntesis química y caracterización estructural.....	30
5.1.1 Preparación del epóxido.....	30
5.1.2 Apertura del epóxido de menadiona con propilamina	31
5.1.3 Apertura del epóxido de menadiona con butilamina	33
5.2 Docking molecular.....	34
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
6.1 Síntesis y caracterización	37
6.2 Evaluación <i>in silico</i> (Docking molecular)	45
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA.....	53
9. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	57
9.1 Instrumentación	57
9.2 Condiciones de reacción	57
9.3 Técnicas cromatográficas	58
9.3 Programas informáticos.....	58
10. ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primeros compuestos puros utilizados como agentes terapéuticos.....	1
Figura 2. Relación estructural entre la sulfonamidas y el ácido p-amino benzoico.....	2
Figura 3. Naftoquinonas de origen vegetal.....	8
Figura 4. Estructura química de fármacos quinónicos que se utilizan actualmente en la práctica clínica.....	9
Figura 5. Estructura común de los compuestos con actividad antiplaquetaria.....	11
Figura 6. Cascada de la coagulación.....	17
Figura 7. Estructura de las vitaminas K1, K2 y K3.....	18
Figura 8. Mecanismo propuesto para la gamma carboxilación de los residuos de glutamato en las proteínas K dependientes.....	20
Figura 9. Ciclo de la vitamina K.....	20
Figura 10. Mecanismo de reducción del epóxido de vitamina K en el sitio catalítico de la hVKOR.....	22
Figura 11. Topología de membrana propuesta de 3 DTM para hVKOR.....	23
Figura 12. Estructura química del dicumarol.....	23
Figura 13. Estructura química de la warfarina.....	24
Figura 14. Estructura cristalina determinada mediante rayos X de la synVKOR.....	25
Figura 15. Estructura de la molécula (3) obtenida.....	32
Figura 16. Estructura de la molécula (4) obtenida.....	34
Figura 17. Estructura transmembranal de la synVKOR, con la ubiquinona e iones de mercurio co-cristalizados.....	35
Figura 18. Designación del espacio de búsqueda sobre el receptor VKOR en el programa UCSF Chimera.....	36
Figura 19. Cromatografía en columna del crudo de reacción de la apertura del epóxido con propilamina.....	39
Figura 20. Propuesta de estructura de fragmentos en espectrometría de masas.....	40

Figura 21. Estructura del compuesto (3).....	41
Figura 22. Estructura del compuesto (4).....	43
Figura 23. Localización del ligando en su mejor pose en relación al sitio catalítico de synVKOR	47
Figura 24. Estructura química de los ligandos naturales ubiquinona y vitamina K de las enzimas synVKOR y hVKOR respectivamente.....	48
Figura 25. Interacción entre ligando (4) y la enzima synVKOR.....	49
Figura 26. Enlaces hidrófobos involucrados en la interacción entre el ligando (4) y el receptor.....	50
Figura 27. Compuestos sintetizados en un trabajo de investigación previo con estructura relacionada.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los factores de la coagulación.....	15
Tabla 2. Condiciones para el minimizado de energía en UCSF Chimera.....	34
Tabla 3. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones de HMBC del compuesto (3).....	42
Tabla 4. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones de HMBC del compuesto (4).....	44
Tabla 5. Ligandos con los que se realizó el docking y la posterior comparación entre los <i>scores</i>	45
Tabla 6. Mejores puntajes para cada ligando analizado.....	46

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de oxido-reducción de la 1,4-Naftoquinona.....	7
Esquema 2. Mecanismo de reacción de la adición nucleofílica conjugada.....	11
Esquema 3. Síntesis y mecanismo de reacción para la síntesis de hidroxiamino- naftoquinonas.....	13
Esquema 4. Diagrama general de reacción.....	30
Esquema 5. Reacción de formación del epóxido de menadiona.....	30
Esquema 6. Reacción de apertura del epóxido de menadiona con propilamina.....	31
Esquema 7. Reacción de apertura del epóxido de menadiona con butilamina.....	33
Esquema 8. Diagrama general de las reacciones planteadas para la síntesis de aminoalcoholes derivados de menadiona.....	37
Esquema 9. Reacción de formación del epóxido de menadiona.....	38
Esquema 10. Propuesta de reacción de formación y deshidratación del aminoalcohol.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas del compuesto menadiona.....	59
Anexo 2. Espectro de IR del compuesto menadiona.....	59
Anexo 3. Espectro de masas del epóxido de menadiona.....	60
Anexo 4. Espectro de IR del epóxido de menadiona.....	60
Anexo 5. Espectro de RMN- ¹ H de 60 MHz del epóxido de menadiona.....	61
Anexo 6. Espectro de masas del compuesto (3).....	62
Anexo 7. Espectro de IR del compuesto (3).....	62
Anexo 8. Espectro de RMN- ¹ H de 400 MHz del compuesto (3).....	62
Anexo 9. Espectro de RMN- ¹³ C de 400 MHz del compuesto (3).....	63
Anexo 10. Espectro de RMN bidimensional COSY del compuesto (3).....	64
Anexo 11. Espectro de RMN bidimensional HSQC del compuesto (3).....	65
Anexo 12. Espectro de RMN bidimensional HMBC del compuesto (3).....	66
Anexo 13. Espectro de masas del compuesto (4).....	67
Anexo 14. Espectro de IR del compuesto (4).....	67
Anexo 15. Espectro de RMN- ¹ H de 400 MHz del compuesto (4).....	68
Anexo 16. Espectro de RMN- ¹³ C de 400 MHz del compuesto (4).....	69
Anexo 17. Espectro de RMN bidimensional COSY del compuesto (4).....	70
Anexo 18. Espectro de RMN bidimensional HSQC del compuesto (4).....	71
Anexo 19. Espectro de RMN bidimensional HMBC del compuesto (4).....	72
Anexo 20. Energía potencial inicial y final de los ligandos después del minimizado de energía y RMSD de la molécula inicial contra la final.....	73
Anexo 21. Mejores scores del ligando menadiona (1) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.....	73
Anexo 22. Mejores scores del ligando epóxido de menadiona (2) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.....	74

Anexo 23. Mejores scores del ligando (3) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas..... 74

Anexo 24. Mejores scores del ligando (4) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas..... 75

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Alanina
Å	Angstrom
aa	Aminoácidos
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados centígrados
c	Cuarteto
CAMP	Cinínógeno de alto peso molecular
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopía de correlación (CORrelation Spectroscopy)
CuCl ₂	Cloruro de cobre
Cu(OAc) ₂	Acetato de cobre
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DTM	Dominios transmembranales
F	Fenilalanina
FT	Factor tisular
Gla	Residuos de γ -carboxiglutamato
GGCX	γ -Glutamil Carboxilasa
HMBC	Correlación heteronuclear de multienlace (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlación heteronuclear simple (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
hVKOR	Enzima vitamina K epóxido reductasa humana (human vitamin K epoxide reductase)

InCl ₃	Tricloruro de indio
InI	Yoduro de indio
IR	Espectroscopía infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
m	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	MegaHertz
mm	Milímetros
mmoles	Milimoles
m/z	Masa sobre carga
NaOH	Hidróxido de sodio
n-Hex	n-Hexano
nm	Nanómetros
Nu	Nucleófilo
PM	Peso molecular
PK	Precalicroína
ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media (Root-mean-square deviation)
s	Singulete
synVKOR	Enzima vitamina K epóxido reductasa de <i>Synechococcus</i> sp.
t	Triplete
T	Treonina

TLC	Cromatografía en capa fina (thin layer chromatography).
Trx	Tiorredoxinas
VKOR	Enzima vitamina K epóxido reductasa
Y	Tirosina
ZnCl ₂	Cloruro de Zinc
ZrO(NO ₃) ₂	Oxinitrato de zirconio (IV)
δ	Desplazamiento químico
δ _H	Desplazamiento en RMN- ¹ H
δ _C	Desplazamiento en RMN- ¹³ C

1. INTRODUCCIÓN

La química medicinal es una disciplina orientada al descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Los trabajos en este ámbito se basan en la determinación de la relación existente entre la estructura química, las propiedades fisicoquímicas, la reactividad y la respuesta biológica (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2013), proporcionando los conocimientos necesarios para la generación de nuevos fármacos y el mejoramiento de los fármacos existentes.

Inicialmente las plantas fueron los principales agentes terapéuticos utilizados por el hombre. El aislamiento de principios activos puros de fuentes naturales, principalmente alcaloides (morfina, emetina, cafeína, quinina, colchicina), propició el uso de sustancias puras para el tratamiento de diversas afecciones. Las técnicas de elucidación estructural permitieron relacionar la estructura química con la actividad biológica observada y el desarrollo de la química orgánica dio pie a la síntesis de análogos con mejor efectividad, tolerancia y simplicidad química.

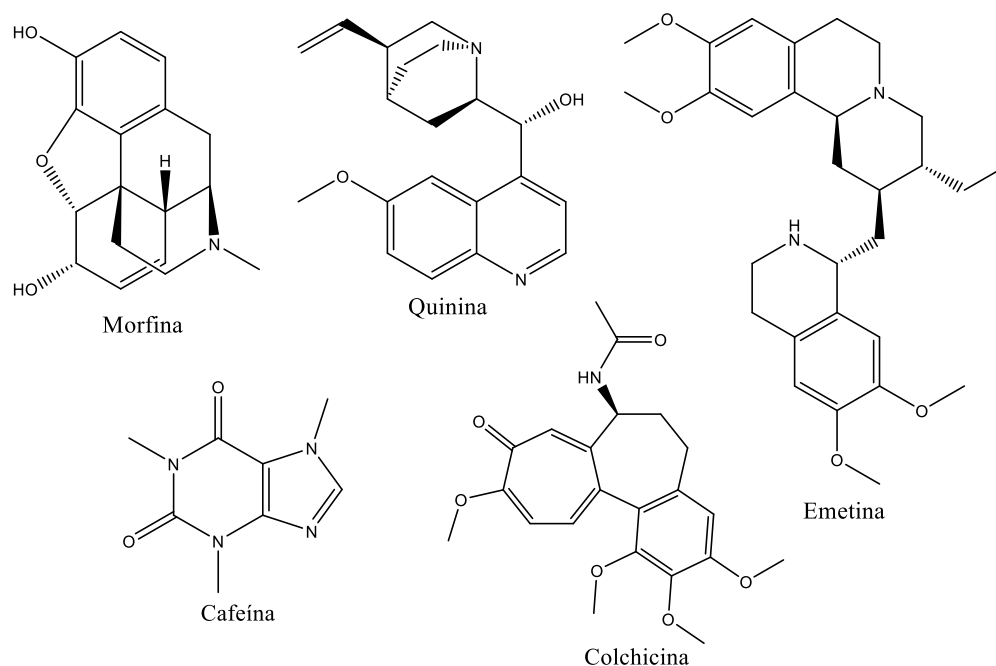


Figura 1. Primeros compuestos puros utilizados como agentes terapéuticos.

Paul Erlich fue uno de los pioneros en la química medicinal, ya que fue el primero en plantear que las sustancias químicas tenían blancos específicos en las células, aún cuando sus ideas no fueran muy claras. Además, casi logró el control de la tripanosomiasis

utilizando tripán rojo y tripán azul y desarrolló la arsfenamina contra la sífilis, compuesto que aunque era efectivo también era demasiado tóxico (Tichler, 1960).

Gerhar Domagk desarrolló el Prontosil (2,4-diaminoazobenceno-4'-sulfonamida), un colorante que curó exitosamente infecciones bacterianas por microorganismos gram positivos. Investigaciones posteriores dieron origen a las sulfonamidas. En 1940, Woods y Fildes descubrieron que la acción bacteriostática de las sulfonamidas era antagonizada por el ácido *p*-aminobenzoico, representando una de las primeras ejemplificaciones del concepto de competencia bioquímica (Dhirajlal, 2006; Tichler, 1960). La elucidación de este concepto permitió concluir que parte importante de las respuestas terapéuticas generadas por los fármacos depende de su relación estructural con ligandos endógenos y de su capacidad para competir con ellos y actuar como agonistas o antagonistas de su acción.

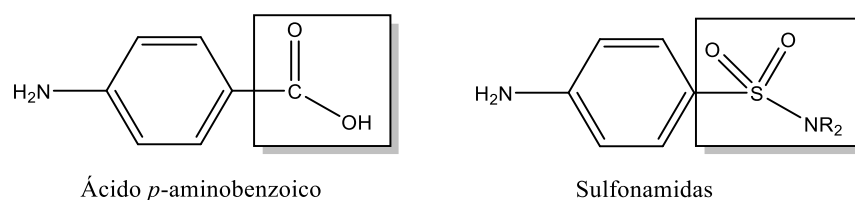


Figura 2. Relación estructural entre las sulfonamidas y el ácido *p*-amino benzoico.

La penicilina, descubierta de manera “accidental” por Fleming y estudiada posteriormente por Florey y Chain resultó ser el primer agente quimioterapéutico con baja toxicidad efectivo contra un gran número de infecciones bacterianas (Dhirajlal, 2006). Esto despertó el interés de utilizar microorganismos para la obtención de fármacos. El posterior descubrimiento de una variedad de agentes antiinfecciosos generó grandes avances en la práctica médica.

No solo se desarrollaron agentes antibacterianos, si no también moléculas con diferentes campos de acción para el tratamiento de diversas afecciones. La clorpromacina, sintetizada por Charpentier causó una revolución en el tratamiento de la esquizofrenia. La epinefrina fue la primera hormona aislada de una glándula endócrina y su estructura sirvió de base para el desarrollo de aminas simpaticomiméticas y simpaticolíticas basadas en el concepto de competencia bioquímica. El desarrollo de las técnicas cromatográficas permitió el aislamiento y la caracterización de un sin número de hormonas. Frederick G. Banting y Charles H. Best aislaron la hormona polipeptídica insulina, la cual para el año de 1922 ya era producida a partir de animales en grandes cantidades. Fue hasta el año 1978 que la compañía Genetech produjo insulina humana mediante tecnología de ADN recombinante

(Dhirajlal, 2006). Hoy en día la biotecnología juega un papel importante en la generación de fármacos.

El desarrollo de la biología molecular y de la ingeniería genética han permitido el estudio detallado de la estructura de las moléculas diana (por ejemplo receptores y enzimas) en la que los fármacos ejercen su acción, lográndose incluso la determinación de las características tridimensionales del centro activo. Estos avances contribuyeron al desarrollo de métodos computacionales que apoyan a la química medicinal.

El diseño de fármacos asistido por ordenador, también conocido como CADD (por sus siglas en inglés), es una de las estrategias utilizadas actualmente para la obtención de nuevos fármacos. Puede llevarse a cabo mediante dos aproximaciones: la aproximación directa, que es posible cuando se conoce la estructura tridimensional de la macromolécula diana, y la aproximación indirecta, utilizada cuando no se disponen de datos sobre la estructura tridimensional del receptor y se basa en la estructura de los ligandos conocidos para dicha diana (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2013).

El docking o anclaje molecular se encuentra dentro de la aproximación directa y su uso se ha vuelto común en la comunidad científica gracias a su enorme utilidad y bajo costo.

Desarrollo de agentes anticoagulantes

Las enfermedades trombóticas, como su nombre lo dice, se caracterizan por la formación de un trombo que obstruye la circulación sanguínea a nivel local o que puede desprenderse y ocluir el flujo sanguíneo distal (tromboembolia).

Estas afecciones representan una de las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Además del riesgo de muerte, se asocian con complicaciones crónicas que disminuyen la calidad de vida de las personas. Es por esto que la Organización Mundial de la Salud las considera como un problema de salud pública prioritario. (García-Frade & Cuellar-Gamboa, 2015)

La warfarina es uno de los fármacos comúnmente prescritos en los tratamientos a largo plazo de estas afecciones. Sin embargo, la terapia con warfarina es complicada debido a su estrecho margen terapéutico y a que la sensibilidad de los pacientes a este fármaco puede diferir en su valor hasta 20 veces dependiendo de distintos factores genéticos, lo que aumenta el riesgo de sangrado o de que se presente inefectividad del tratamiento. (Van Horn, 2013).

La warfarina, que pertenece a la familia de los anticoagulantes cumarínicos, actúa sobre la enzima vitamina K epóxido reductasa humana (hVKOR, por sus siglas en inglés) interrumpiendo el “ciclo de la vitamina K” y dificultando que se lleve a cabo la γ -carboxilación de los factores de la coagulación K dependientes (II, VII, IX, X) e impidiendo que estos participen en la cascada de la coagulación.

Aunque en la actualidad se han desarrollado un número considerable de fármacos no cumarínicos para el tratamiento de esta afección, la generación de fármacos anticoagulantes con mayor seguridad y efectividad sigue siendo de interés para la comunidad científica.

Es conocido que los compuestos naftoquinónicos poseen un sin número de propiedades biológicas entre las que destacan la anticancerígena, antiparasitaria, fungicida, antibacteriana y antitrombótica. Esta última actividad se ha atribuido a la inhibición de la agregación plaquetaria, que no se relaciona con el mecanismo de acción de la warfarina.

La vitamina K es el sustrato natural de la enzima hVKOR. Utilizando como material de partida a la naftoquinona menadiona se busca generar compuestos con similitud estructural a la vitamina K, que de modo similar a la warfarina, actúen sobre la enzima hVKOR e inhiban su función.

En este trabajo se llevará a cabo un estudio preliminar para valorar la potencial actividad anticoagulante de estos compuestos evaluando su interacción con la enzima VKOR (vitamina K epóxido reductasa) haciendo uso de una herramienta computacional, el “docking molecular”.

2. HIPÓTESIS

La síntesis de derivados de menadiona permite la generación de moléculas bioactivas, con actividad anticoagulante, evaluables de forma preliminar mediante técnicas *in silico*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Sintetizar compuestos aminados derivados de menadiona y evaluar *in silico* su actividad anticoagulante.

3.2 Objetivos Particulares

- Diseñar una ruta sintética para la obtención de compuestos derivados de menadiona.
- Caracterizar los productos e intermedios de la ruta sintética propuesta.
- Evaluar *in silico* los compuestos sintetizados mediante docking molecular.
- Comparar los puntajes generados en el docking para los compuestos sintetizados con los de otras moléculas análogas.

4. GENERALIDADES

4.1 Las quinonas

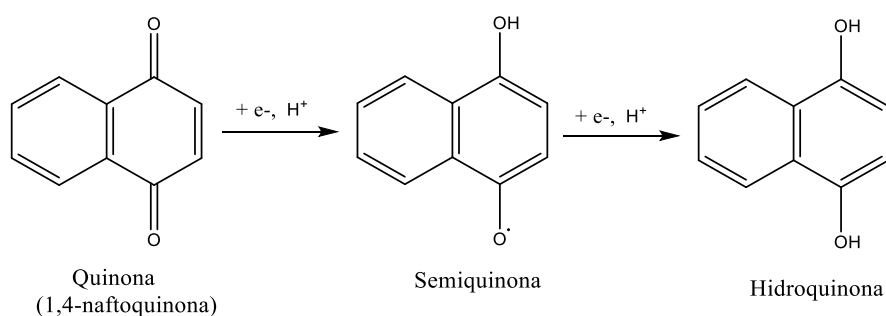
4.1.1 Características generales

Las quinonas comparten un patrón estructural común, un ciclo insaturado de 6 miembros sustituido con dos grupos carbonilos en posiciones 1,2 o 1,4. Pertenecen al grupo de los compuestos carbonílicos α,β -insaturados. (El-Najjar, *et al.*, 2011). Se forman por la oxidación de compuestos aromáticos y se clasifican de acuerdo a su grado de complejidad química en benzoquinonas (monocíclicas), naftoquinonas (bicíclicas) y antraquinonas (tricíclicas). (Leyva, *et al.*, 2016)

Son compuestos sólidos con puntos de fusión superiores a 100°C. Los grupos carbonílicos conjugados con los dobles enlaces le confieren a estas moléculas una coloración intensa generalmente amarilla, anaranjada, roja o morada. (Leyva, *et al.*, 2016)

Las quinonas poseen 2 propiedades químicas características estrechamente relacionadas. La primera de ellas es que pueden participar en reacciones de óxido-reducción reversibles y la segunda es que son susceptibles al ataque nucleofílico por su carácter electrofílico. (El-Najjar, *et al.*, 2011)

Con respecto a su propiedad redox, las quinonas son capaces de aceptar un electrón, convirtiéndose en semiquinonas (un radical aniónico aromático) o dos electrones convirtiéndose en un di-anión que al protonarse es llamado hidroquinona (Sainsbury, 1995).



Esquema 1. Proceso de oxido-reducción de la 1,4-Naftoquinona.

Adaptado de El-Najjar, *et al.*, 2011

Con respecto a su propiedad electrofílica, esta las vuelve susceptibles al ataque de grupos ricos en electrones como los grupos hidroxilo, amino y tiol. Dicho ataque genera una adición nucleofílica conjugada (adición 1,4), de la cual se hablará más adelante. (El-Najjar, *et al.*, 2011). Esta propiedad ha sido aprovechada desde mucho tiempo atrás para la síntesis de derivados quinónicos.

Los sustituyentes sustractores de electrones (halógenos, nitro o carbonilos) en las quinonas favorecen su estado reducido, mientras que los sustituyentes donadores (amino, hidroxilo, metoxilo) presentan el efecto contrario favoreciendo su estado oxidado, lo que las vuelve más susceptibles al ataque nucleofílico (Sainsbury, 1995). Es por ello que al enlazar distintos grupos al núcleo quinónico es posible modular su actividad redox y su reactividad (Salmon-Chemin, *et al.*, 2001).

Las quinonas se encuentran de manera natural en una amplia variedad de especies vegetales, en hongos, bacterias y animales. Por sus propiedades químicas, poseen múltiples funciones biológicas en diversos sistemas. Por ejemplo, son partícipes en la fotosíntesis, en la cadena respiratoria y en la coagulación. (El-Najjar, *et al.*, 2011)

Este trabajo se centrará en las naftoquinonas, específicamente en las que presentan sus grupos carbonilo en posición 1,4. Numerosos compuestos con núcleo de 1,4-naftoquinona han sido aislados de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales. Algunos ejemplos son la lawsona, la juglona, la plumbagina, y el lapachol (**Figura 3**). Estas moléculas fueron utilizadas inicialmente como pigmentos por sus característicos colores, sin embargo, actualmente son conocidas por sus diversas propiedades biológicas (Cantú, *et al.*, 2012).

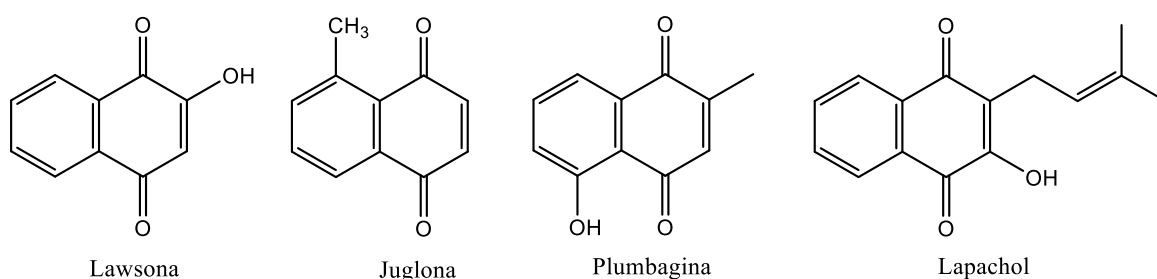


Figura 3. Naftoquinonas de origen vegetal.

4.1.2 Propiedades biológicas

Es conocido que las quinonas, tanto de origen natural como sintético, poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Se ha aprovechado la bioactividad de estas moléculas

desde tiempo atrás. Por ejemplo, la tetraclorobenzoquinona (cloranil) y la 2,3-dicloronaftoquinona fueron sintetizadas en 1940 y utilizadas como fungicidas para semillas. (O'Brien, 1991).

En cuanto a la actividad farmacológica, una de las más conocidas y estudiadas es su actividad citotóxica. En la actualidad, los fármacos anticancerígenos con núcleo quinónico conforman una de las clases más grandes de fármacos citotóxicos. La mitoicina C, la daunorubicina y la doxorubicina (**Figura 4**), aisladas de *Streptomyces spp.*, fueron los primeros en ser utilizadas para la terapia anticancerígena. Las aziridinilbenzoquinonas fueron los primeros fármacos anticancerígenos sintéticos. (O'Brien, 1991).

La atovaquona (**Figura 4**), un fármaco naftoquinónico derivado de la lawsona, fue desarrollada en el año 1980 contra la malaria. Posteriormente se descubrió su utilidad en el tratamiento de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, toxoplasmosis y babesiosis. Debido a la alta tasa de recaídas de los pacientes con malaria tratados únicamente con este fármaco, actualmente es utilizado en combinación con el clorhidrato de proguanilo para tratar casos de malaria no complicada por *Plasmodium falciparum* en adultos y niños. (Vaidya & Mather, 2000; Brunton, Lazo, & Parker, 2007). Otro fármaco derivado de la lawsona es la buparvaquona, el cual se utiliza para el tratamiento de la theileriosis bovina.

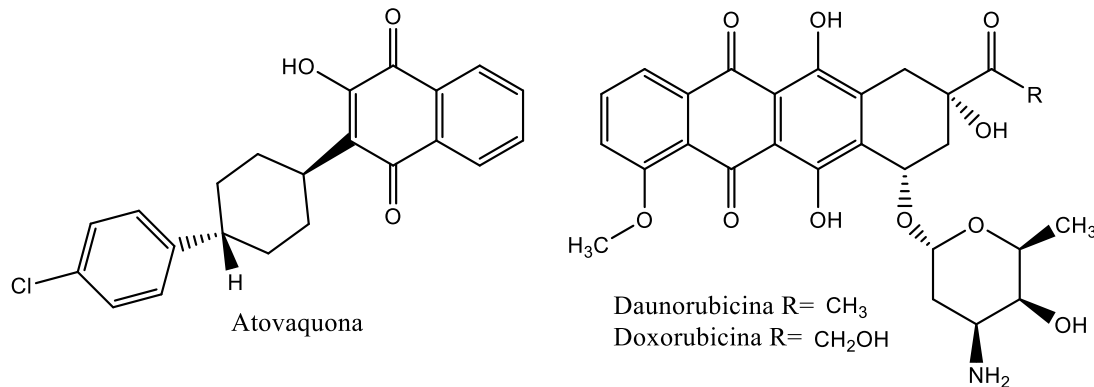


Figura 4. Estructura química de fármacos quinónicos que se utilizan actualmente en la práctica clínica.

La obtención de nuevas moléculas con núcleo quinónico con actividad farmacológica sigue siendo de interés para la comunidad científica. Específicamente hablando de moléculas derivadas de la 1,4-naftoquinona, se han logrado sintetizar nuevos compuestos con actividad antibacteriana (Tandon, *et al.*, 2005), antiviral (Tandon, *et al.*, 2005; Mahapatra, *et al.*, 2012), antifúngica (Tandon, *et al.*, 2004), antiparasitaria (Dias de Rezende, *et al.*, 2013; Salmon-Chemin, *et al.*, 2001), anticancerígena (Bonifazi, 2012; Tandon, *et al.*, 2004), antiinflamatoria (Huang, *et al.*, 1998) y antiplaquetaria (Jin, *et al.*, 2004; Yuk, *et al.*, 2000;

Yuk, *et al.*, 2000). La actividad farmacológica de estas moléculas es atribuible a su propiedad redox y electrofílica (O'Brien, 1991), mencionadas en la sección anterior. Algunos ejemplos de dichas investigaciones se mencionan a continuación.

Salomon-Chemin *et al.* sintetizaron derivados aminados de menadiona, lawsona y plumbagina, 1,4-naftoquinonas que se sabe presentan actividad tripanocida. Los derivados presentaron una mayor selectividad para estos parásitos que sus moléculas precursoras (Salmon-Chemin, *et al.*, 2001).

Dias de Rezende y colaboradores sintetizaron moléculas con estructuras 2-hidroxi-3-anilino-1,4-naftoquinonas y probaron su actividad antiparasitaria, específicamente antiplasmódica, *in vivo* en ratones infectados, utilizando como control la cloroquina. Algunos de estos productos mostraron una actividad antiparasitaria considerable pero menor a la del control (Dias de Rezende, *et al.*, 2013).

Tandon *et al.* evaluaron la actividad fungicida de derivados azufrados de 1,4-naftoquinona contra distintas cepas de hongos patógenos, así como su actividad anticancerígena. Con respecto a su actividad fungicida, se obtuvo que algunas de las moléculas sintetizadas exhibían mejor actividad que los controles nistatina y miconazol contra algunas cepas de hongos (Tandon, *et al.*, 2004).

Miembros del mismo grupo de investigación obtuvieron de igual manera compuestos derivados de 1,4-naftoquinona con azufre en su estructura cuya actividad antibacteriana contra distintas cepas fue probada y comparada con la del fármaco control Gentamicina. Ninguna de las moléculas sintetizadas exhibió mejor actividad bactericida que el control. Además, dos de los compuestos sintetizados presentaron actividad antiviral contra el virus de la polio tipo 2 en células HeLa infectadas (Tandon, *et al.*, 2005).

Mahapatra y colaboradores evaluaron la actividad de 1,4-naftoquinonas tanto de origen natural como sintético sobre la Transcriptasa Inversa del VIH encontrándose resultados favorables para algunos de los compuestos sintetizados (Mahapatra, *et al.*, 2012).

Diversos estudios de un mismo grupo de investigación demostraron la actividad antiplaquetaria de derivados de 1,4-naftoquinona con estructura semejante (un átomo de cloro en posición 2 y en la posición 3 una fenilamina con distintas sustituciones) (**Figura 5**). Dicha actividad se probó mediante el modelo *in vivo* de trombosis pulmonar y pruebas de agregación plaquetaria *ex vivo* e *in vitro*. Se midió el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina activada después de incubar plasma pobre en plaquetas con los compuestos evaluados, sin embargo, no se observó variación en estos parámetros (Jin, *et al.*, 2004; Yuk, *et al.*, 2000; Yuk, *et al.*, 2000).

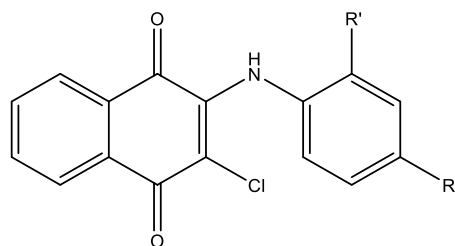


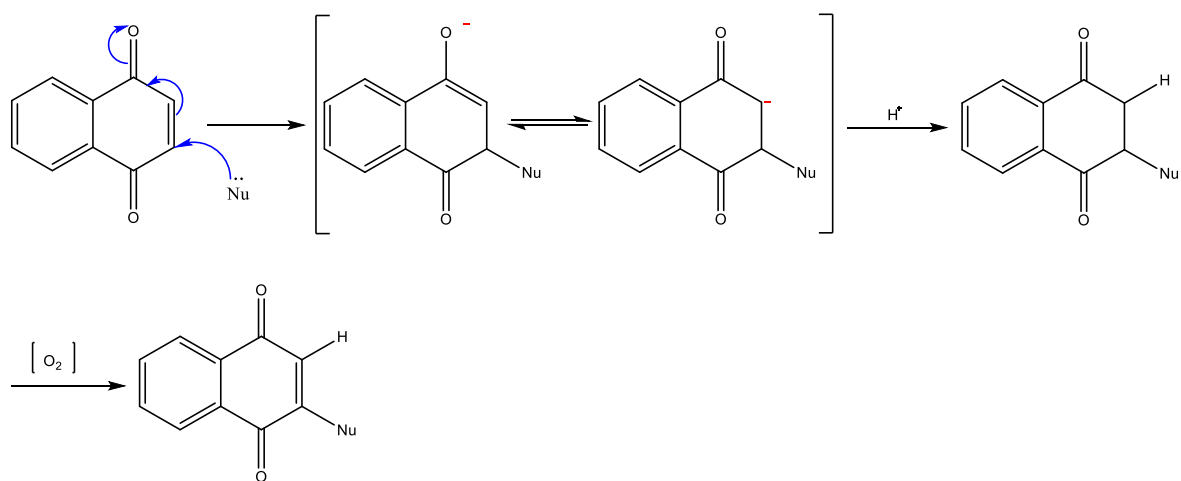
Figura 5. Estructura común de los compuestos con actividad antiplaquetaria.

4.2 Síntesis química de derivados de 1,4-naftoquinona

La adición de diversos grupos funcionales al esqueleto de 1,4 naftoquinona genera moléculas con distinta distribución electrónica. De esta manera es posible modular sus propiedades químicas e influir sobre su actividad biológica.

Aprovechando la propiedad electrofílica de las quinonas, la forma más utilizada para añadir grupos funcionales con heteroátomos ricos en electrones a este núcleo es mediante la reacción de adición nucleofílica conjugada o adición tipo Michael (**Esquema 2**).

Es muy común la adición de grupos amino con distintas cadenas alquílicas o aromáticas mediante la reacción tipo Michael para la obtención de derivados bioactivos (Salmon-Chemin, *et al.*, 2001; Yuk, *et al.*, 2000).



Esquema 2. Mecanismo de reacción de la adición nucleofílica conjugada.

También es posible la síntesis de amino-naftoquinonas a partir del desplazamiento nucleofílico de un sustituyente halogenado enlazado al núcleo de naftoquinona (Leyva, *et al.*, 2016).

Debido a que las naftoquinonas contienen varios centros electrofílicos de reactividad semejante, gracias a su naturaleza dicarbonílica α , β -insaturada, es común la formación de subproductos en las reacciones antes mencionadas que reducen su rendimiento. Se ha reportado la adición de catalizadores ácidos de Lewis para favorecer la formación del producto deseado. El ácido de Lewis forma un aducto con el grupo carbonilo de la naftoquinona haciendo más positivo al carbono β -insaturado, volviéndolo más susceptible al ataque nucleofílico, lo que facilita la reacción (Leyva, *et al.*, 2016).

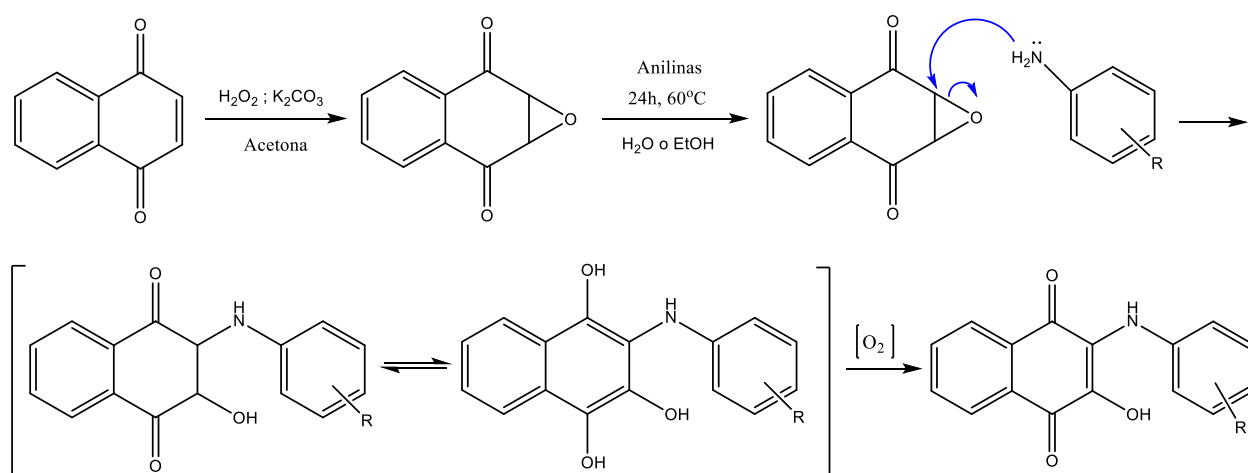
Son conocidas diversas moléculas con funcionalidad aminoalcohol que presentan propiedades farmacológicas. La generación de aminoalcoholes con núcleo de 1,4-naftoquinona, al presentar dos fragmentos por sí solos bioactivos, es de interés para la comunidad científica. Además, la posterior deshidratación de los aminoalcoholes permite generar amino-naftoquinonas de una forma alternativa a los métodos anteriormente mencionados.

La metodología más común para la síntesis de amino-hidroxi-naftoquinonas involucra la sustitución nucleofílica de halonaftoquinonas, utilizando aminas como nucleófilos, seguida por una hidrólisis básica (Kozikowski, Sugiyama, & Springer, 1980; Dias de Rezende, *et al.*, 2013).

Francisco *et al.* describen dos métodos para la síntesis de 2-amino-3-hidroxi-1,4-naftoquinona partiendo de la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona que involucran la preparación del precursor 3-(4'-nitrofenilazo)-4-hidroxi-1,2-naftoquinona, con la posterior reducción del grupo azo y la liberación de 4-nitroanilina. También se ha reportado la preparación hidroxiamino-naftoquinonas mediante la reducción selectiva de grupos nitro y nitroso haciendo uso de diversos reactivos (Francisco, Casellato, & Vargas, 2008).

Husu y colaboradores reportan la síntesis de 2-amino-3-hidroxi-1,4-naftoquinona con un buen rendimiento a partir del 2,3-epoxi-2,3-dihidro-1,4-naftoquinona y azidotrimetilsilano en N,N-dimetilformamina como medio de reacción (Husu, *et al.*, 1988).

Dias de Rezende *et al.* describen un método de dos pasos para la síntesis de N-fenil- aminoalcoholes partiendo de la 1,4-naftoquinona (**Esquema 3**). El primer paso consiste en epoxidar a la 1,4-naftoquinona y el segundo en la aminólisis del epóxido formado. Para llevar a cabo la epoxidación utilizan peróxido de hidrógeno y carbonato de potasio en acetona como medio de reacción. Para la apertura nucleofílica del epóxido utilizan aminas aromáticas (anilinas) en etanol o agua como medio de reacción a una temperatura de 60°C. El motivo quinona se regenera por acción del oxígeno ambiental. Los autores señalan haber probado la adición de distintos ácidos de Lewis como catalizadores en la reacción de apertura nucleofílica a manera de mejorar el rendimiento. El mejor de los ácidos de Lewis probados para esta tarea fue el cloruro de zinc ($ZnCl_2$) (Dias de Rezende, *et al.*, 2013).



Esquema 3. Síntesis y mecanismo de reacción para la síntesis de hidroxilamino-naftoquinonas. Adaptado de Dias de Rezende, *et al.*, 2013)

La preparación de precursores que contengan al grupo epóxido en su estructura no es algo nuevo, es una técnica recurrente en la síntesis orgánica. La reactividad del óxido de estireno y sus homólogos ha sido aprovechada durante muchos años para la generación de moléculas más complejas tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial. (Nam, 2005)

Para la epoxidación de compuestos carbonílicos α,β -insaturados como las 1,4-naftoquinonas es comúnmente utilizado el peróxido de hidrógeno en medio básico. Inicialmente era utilizado NaOH para la generación del medio básico, sin embargo, este generaba la formación de subproductos por el ataque del ión hidroxilo al epóxido formado. Su sustitución con carbonato de potasio genera mejores resultados (Betts, Murphy, & Johnson, 2004) y es el método utilizado por Dias de Rezende, *et al.*, 2013.

Existen otros métodos reportados para la epoxidación de naftoquinonas. Marmor reporta que es posible utilizar al ión hipoclorito en sustitución al peróxido de hidrógeno para este fin. Describe la síntesis del epóxido de la 1,4-naftoquinona y de la 2-metil-1,4-naftoquinona utilizando hipoclorito de sodio acuoso y dioxano como medio de reacción (Marmor, 1962).

Por otra parte, la adición nucleofílica a epóxidos es una de las reacciones más estudiadas de estos compuestos, y es bien sabido que variando las condiciones o adicionando catalizadores es posible obtener distintos productos. Si la reacción es llevada a cabo en condiciones neutras o básicas procede mediante una S_N2 , el ataque se da sobre el carbono menos sustituido y se obtiene un producto disustituido con una relación trans o anti entre el nucleófilo y el hidroxilo (Bonollo, Lanari, & Vaccaro, 2011). Bajo condiciones ácidas la adición se da por lo general sobre el carbono más sustituido mediante una reacción tipo

SN₁, en la que el ácido interactúa con el oxígeno del epóxido, debilitando el enlace entre el carbono más sustituido y el oxígeno, generándose una carga parcial positiva sobre dicho carbono, que es el más capaz de soportarla por el efecto inductivo de los sustituyentes (Parker & Isaacs, 1959).

Es conocido que la apertura de epóxidos se ve favorecida por la adición de ácidos de Lewis. Se ha reportado el uso de diversos ácidos de Lewis para catalizar la aminólisis de epóxidos tales como el CuCl₂, InI, Cu(OAc)₂, InCl₃, ZnCl₂ (Dias de Rezende, et al., 2013) y ZrO(NO₃)₂ (Shinde, et al., 2015), entre otros. Se ha reportado que la adición de ZnCl₂, un reactivo accesible a comparación de muchos otros ácidos de Lewis, mejora considerablemente los rendimientos de reacción. (Durán, et al., 2003).

En este trabajo se utiliza una variante del método de Dias de Rezende, et al., 2013 para la síntesis de derivados de menadiona.

4.3 Hemostasia y la cascada de la coagulación.

Cuando ocurre una lesión en un vaso sanguíneo se desencadenan una serie de procesos para restablecer el equilibrio mientras se repara el tejido dañado. A esto se le conoce como hemostasia y se divide en primaria y secundaria. La hemostasia primaria (que involucra la adhesión, agregación y secreción plaquetaria), es suficiente en el caso de lesiones leves, sin embargo, cuando se trata de heridas más severas entra en acción la hemostasia secundaria.

La hemostasia secundaria involucra la formación de un coágulo de fibrina que permite la estabilización del tapón plaquetario previamente formado en la hemostasia primaria. La formación del coágulo de fibrina es un proceso complejo que requiere la participación alrededor de 16 glucoproteínas, la mayoría de ellas serina proteasas y otras pocas cofactores, que en conjunto se denominan factores de la coagulación. Las serinas proteasas corresponden a los factores IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa y calicreína, los cuales son sintetizados en el hígado y liberados a la circulación como zimógenos, es decir, en forma inactiva. Los factores VII, IX, X y trombina necesitan de una modificación post-traducciona dependiente de vitamina K (de la cual se hablará más adelante) antes de ser liberados a circulación sanguínea. Los cofactores corresponden con el factor V, el VIII y el HMWK, los cuales se unen a las serinas proteasas para darles estabilidad y aumentar su reactividad. Por su parte, el factor XIIIa es una transglutaminasa que cataliza la transferencia de aminoácidos durante la formación del polímero de fibrina (Rodak, 2004).

Los números romanos que reciben por nombre los factores de la coagulación corresponden con el orden de su descubrimiento y no al orden en el que actúan en la cascada de la coagulación. Los factores activados se representan con el número romano seguido de la letra "a".

Tabla 1. Los factores de la coagulación.

Factor	Sinónimo	Función
I*	Fibrinógeno	Se polimeriza en forma de red de fibrina
II*	Protrombina	Serina proteasa
III*	Factor tisular	Cofactor
IV*	Calcio iónico	Mineral
V	Factor lábil	Cofactor
VII	Proconvertina	Serina proteasa
VIII	Factor anti-hemolítico	Cofactor
IX	Factor Christmas	Serina proteasa
X	Factor Stuart-Prower	Serina proteasa
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	Serina proteasa
XII	Factor Hageman	Serina proteasa
Precalicreína	Factor Fletcher	Serina proteasa
Cininógeno de alto peso molecular	Factor Fitzgerald, HMWK	Cofactor
XIII	Factor estabilizador de fibrina (FSF)	Transglutaminasa

*Por lo general a estos factores no se les llama por su número romano.

Adaptada de Rodak, 2004

La cascada de la coagulación puede activarse mediante dos vías: la extrínseca y la intrínseca, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas. Las dos convergen en la vía común que da como resultado la formación del trombo de fibrina.

4.3.1 Vía intrínseca

La vía intrínseca, también conocida como la vía de activación por contacto, requiere de los factores de la coagulación: XII, VIII, IX, X y XI. También requiere de las proteínas Precalicroína (PK) y el cininógeno de alto peso molecular (CAMP), así como iones calcio y los fosfolípidos secretados por las plaquetas. Esta vía de activación está implicada en procesos patológicos como la aterosclerosis y las infecciones bacterianas que llevan a la formación de trombos.

Cuando el plasma se pone en contacto con una superficie cargada negativamente (sustancia extraña al endotelio vascular como pueden ser las fibras de colágeno del subendotelio, piel, ácidos grasos, hematina, protoporfirina, cartílago articular, endotoxinas) el factor XII se une y es autoactivado a factor XIIa. El factor XIIa activa la PK a calicreína la cual escinde a CAMP generando la liberación de bradiquinina, un potente vasodilatador. También existe una activación recíproca del factor XII por la calicreína resultando en la amplificación del sistema. Estas enzimas activadas se adsorben en la superficie plaquetaria y forman el complejo de iniciación. El factor XIIa activa posteriormente al factor XI a factor XIa.

En presencia de Ca^{+2} , el factor XIa activa al factor IX. El factor IX (que es dependiente de vitamina K) se une a calcio, volviéndose activo. El factor IXa activa al factor X mediante el complejo tenasa.

El ensamblaje del complejo tenasa (Ca^{+2} , factores VIIIa, IX y X) se lleva a cabo en la superficie plaquetaria activada. El factor VIIIa actúa como receptor para los factores IXa y X. La activación del factor VIII a factor VIIIa se lleva a cabo por la presencia de diminutas cantidades de trombina. Cuando la concentración de trombina se incrementa, el factor VIIa es escindido por la trombina e inactivado. Esta acción dual de la trombina sobre el factor VIIa regula la generación del complejo tenasa y la extensión de la cascada de la coagulación. (King, 2018; Rodak, 2004).

4.3.2 Vía extrínseca

En la vía extrínseca la coagulación se activa por la exposición del factor tisular (FT) (proteína constitutiva no circulante del subendotelio, de origen extrínseco a la circulación) a las proteínas plasmáticas. El primer factor de la coagulación en actuar es el factor VII el cual se activa por acción de la trombina o por el factor Xa. La habilidad del factor Xa de activar al factor VII muestra la relación existente entre la vía intrínseca y la vía extrínseca.

El factor VIIa (dependiente de vitamina K) se une al FT en presencia de calcio y fosfolípidos y genera la activación de los factores IX y X.

El factor IXa forma parte del complejo tenasa, como se describió en la vía intrínseca, el cual genera también la activación del factor X. (King, 2018; Rodak, 2004).

4.3.3 Vía común

El factor Xa (dependiente de vitamina K), activado por cualquier vía, se une al factor Va en la superficie de los fosfolípidos, gracias a la formación de complejos con el calcio. Al igual que el factor VIII, el factor V es activado a Va por la acción de cantidades minúsculas de trombina. El complejo Xa-Va, conocido como protrombinasa, activa la protrombina en un proceso hidrolítico de varios pasos. La protrombina activada se denomina trombina.

La trombina (dependiente de vitamina K) escinde al fibrinógeno convirtiéndolo en un monómero de fibrina, el cual tiene afinidad por monómeros vecinos. Su unión forma un polímero de fibrina insoluble.

El factor XIIIa cataliza el entrecruzamiento del polímero de fibrina. Los entrecruzamientos múltiples forman una red insoluble de fibrina. (King, 2018; Rodak, 2004).

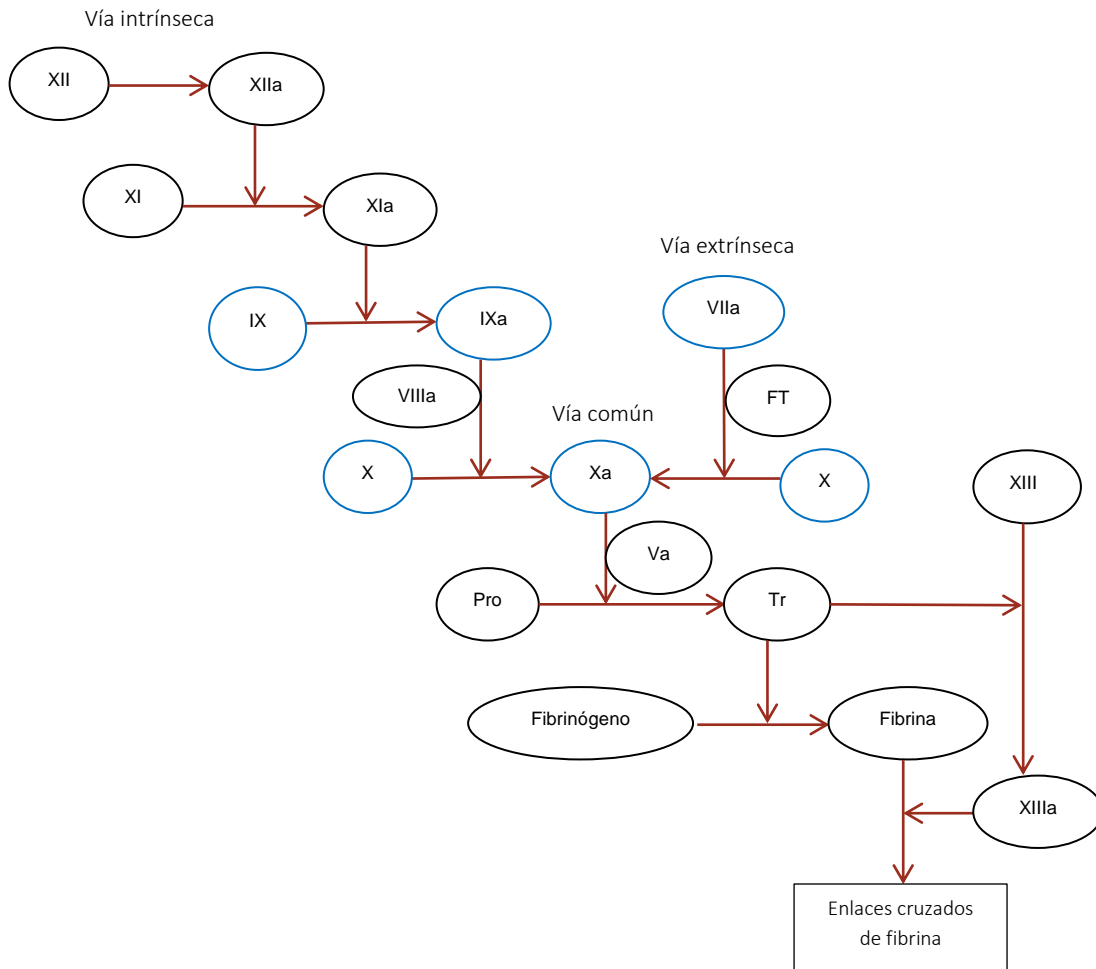


Figura 6. Cascada de la coagulación. Los factores dependientes de vitamina K se encuentran en un círculo de color azul. Pr=protrombina, Tr=trombina

4.4 Vitamina K y su relación con la coagulación.

4.4.1 ¿Qué es la vitamina K?

El término vitamina K hace referencia a un grupo de naftoquinonas con características hidrofóbicas que comparten el núcleo 2-metil-2,4-naftoquinona, pero difieren en sus sustituyentes en posición 3 (Olson, 1984; Van Horn, 2013) (**Figura 7**).

La vitamina K1 o filoquinona posee en la posición 3 un grupo fitil (grupo isoprenoide), se produce en todas las plantas que realizan la fotosíntesis, ya que trabaja como un cofactor en el transporte de electrones en el fotosistema I. Aunque la filoquinona es la forma más abundante de vitamina K en la dieta humana, no se encuentra presente en grandes concentraciones en el cuerpo humano. (Van Horn, 2013)

La vitamina K2, hace referencia a un grupo de moléculas conocidas como menaquinonas, las cuales se agrupan en diversos subtipos dependiendo del número de repeticiones de las unidades de isopreno que presenten en la posición 3 y se les asigna un nombre dependiendo de este número. Comúnmente esta cadena lateral o cola puede ir desde 4 hasta 12 unidades de isopreno. Las menaquinonas se producen naturalmente por las bacterias, incluidas aquellas anaerobias gastrointestinales. Son la forma más abundante de vitamina K presente en el hígado humano. (Van Horn, 2013; Nakagawa, *et al.*, 2010)

La vitamina K3 o menadiona (2-metil-1,4 naftoquinona) es producida de manera sintética, su estructura presenta en la posición 3 un hidrógeno únicamente. Para fines de este trabajo, se engloba con el término “vitamina K” únicamente a las vitaminas K1 y K2.

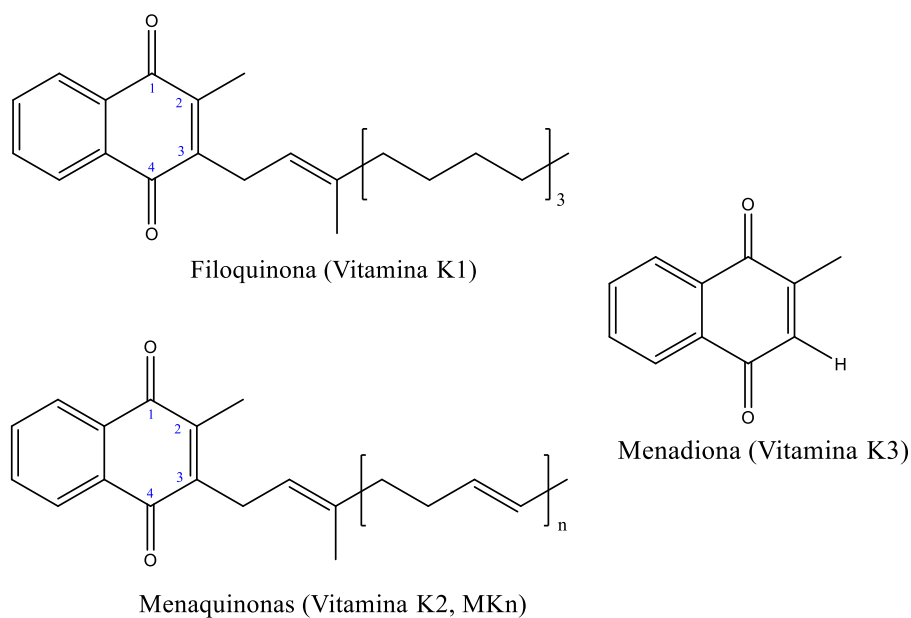


Figura 7. Estructura de las vitaminas K1, K2 y K3.

4.4.2 Ciclo de la vitamina K y la γ -carboxilación de los factores de la coagulación.

La vitamina K fue descubierta por Henrik Dam en 1929 cuando se realizaban estudios sobre el metabolismo del colesterol en pollos alimentados con dietas libres de grasas. Él observó que algunos de estos animales desarrollaban hemorragias sin explicación, y al llevar a cabo análisis de laboratorio encontró tiempos de coagulación prolongados y sugirió que esto se debía a deficiencia de vitaminas liposolubles. Descartando que la causa fuera la deficiencia de cualquier vitamina conocida hasta ese momento, todas ellas hidrosolubles, él le asignó el nombre vitamina K (por la palabra *Koagulation* en alemán) a la sustancia responsable. Años de estudio después, se llegó a la conclusión de que la vitamina K participaba en la γ -carboxilación de residuos de glutamato en ciertos factores de la coagulación a los que posteriormente se las llamó “dependientes de vitamina K”, modificación sin la cual no podían cumplir con su función. (Olson, 1984; Oldenburg, *et al.*, 2006)

Para participar en la γ -carboxilación la vitamina K en forma naftoquinona debe reducirse a su forma hidroquinona (KH_2). Esta reducción inicial es llevada a cabo por la enzima vitamina K epóxido reductasa (VKOR), de la cual se hablará con mayor profundidad posteriormente.

La forma hidroquinona de la vitamina K actúa como un cofactor para la enzima γ -Glutamil Carboxilasa (GGCX), la cual es responsable de catalizar la carboxilación en posición gamma de residuos de glutamato de los factores de la coagulación K dependientes (II, VII, IX, X), dando como resultado residuos γ -carboxiglutamato (Gla). Esta modificación post traduccional se lleva a cabo en el retículo endoplásmico de las células hepáticas, sitio donde se localizan las enzimas GGCX y VKOR, antes de que la proteína circule en sangre. Los factores de la coagulación dependientes de vitamina K poseen entre 10 y 12 residuos Gla en una región homóloga cercana al amino-terminal conocida como dominio Gla. Los residuos Gla tienen similitud estructural con el ácido malónico y le confieren a los factores una mayor afinidad a calcio. La interacción calcio- proteína presenta afinidad por los grupos fosfatos de las cabezas de los fosfolípidos de membrana de células endoteliales dañadas o de las plaquetas activadas, permitiendo la formación de los complejos proteína- Ca^{+2} -fosfolípidos necesarios en la cascada de la coagulación (Van Horn, 2013; Olson, 1984; Tie & Stafford, 2016).

Para poder llevar a cabo la γ -carboxilación, además de la vitamina K en forma de hidroquinona, la enzima GGCX utiliza CO_2 y O_2 como cofactores. La carboxilasa utiliza la energía generada por la oxidación de la hidroquinona de vitamina K para llevar a cabo su función. Se sugiere que el proceso de carboxilación inicia con la remoción del hidrógeno- γ del residuo de glutamato, generando un carbanión que ataca nucleofílicamente a una molécula de CO_2 , dando como resultado una γ -carboxilación del residuo. (Oldenburg, Bevans, Muller, & Watzka, 2006; Stafford, 2005)

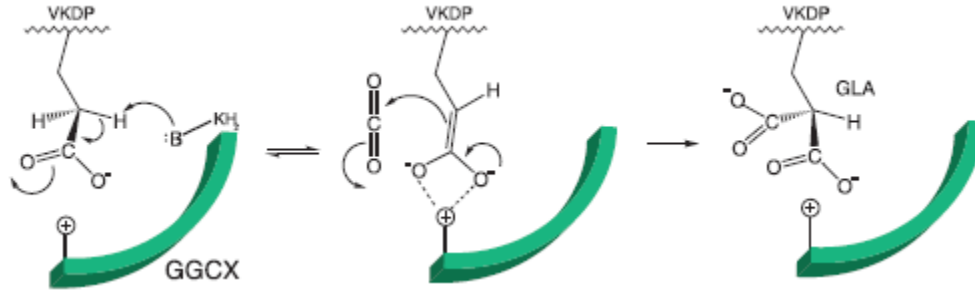


Figura 8. Mecanismo propuesto para la gamma carboxilación de los residuos de glutamato en las proteínas K dependientes. Tomada de Van Horn, 2013.

El proceso de γ -carboxilación convierte la vitamina K en 2,3- epóxido de vitamina K. La vitamina K en forma de epóxido no se desecha, si no que se recicla. La forma oxidada vuelve a su forma quinónica y posteriormente a su forma hidroquinona gracias a la enzima VKOR, permitiendo que esta sea vuelta a utilizar por la enzima GGCX. A esto se le conoce como “ciclo de vitamina K”, el cual se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplasmático. Las cantidades nanomolares de vitamina K presentes en el hígado y otros tejidos hacen necesario este reciclaje. (Van Horn, 2013; Olson, 1984; Oldenburg, *et al.*, 2006).

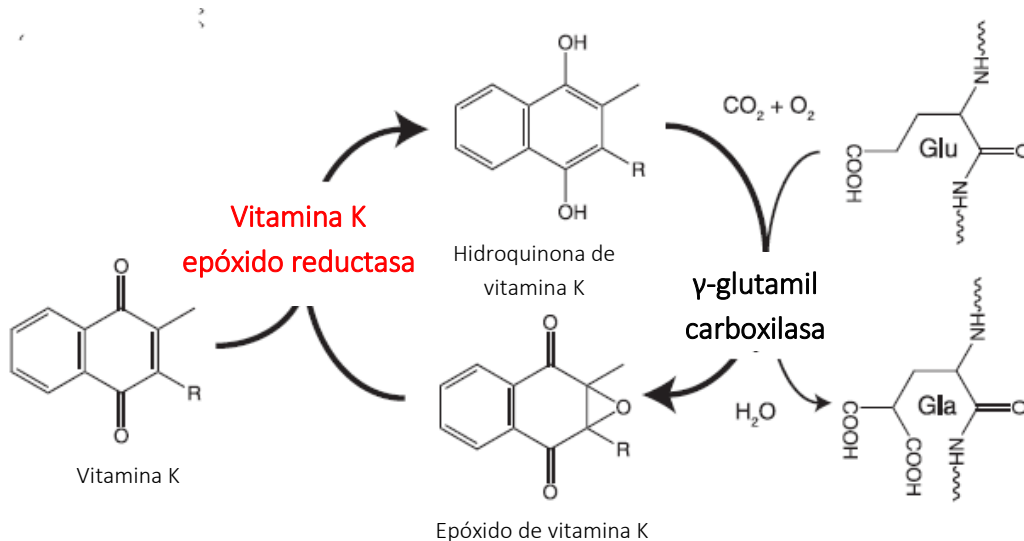


Figura 9. Ciclo de la vitamina K, adaptado de Van Horn, 2013

4.5 Enzima VKOR humana y homólogos

4.5.1 VKOR humana

La VKOR humana (hVKOR) es una proteína transmembranal que pesa 18kDa y posee 163 residuos. Es capaz de reducir la vitamina K y el 2-3-epóxido de vitamina K en hidroquinona (KH₂) según se requiera para completar el ciclo. (Van Horn, 2013).

El gen que codifica para la hVKOR se encuentra localizado en el cromosoma 16 del genoma humano. El análisis filogenético de este gen llevó al descubrimiento de que enzimas homólogas no solo se encuentran presentes en vertebrados, sino también en plantas, insectos, bacterias y arqueas. Se llegó a la conclusión de que las VKOR son una familia amplia de proteínas con roles variados y con seguridad no únicamente ligadas al proceso de coagulación. (Van Horn, 2013; Tie & Stafford, 2016).

La alineación de las secuencias permitió identificar 4 residuos de cisteína (aa 43, 51, 132 y 135 en la hVKOR) y un residuo que puede ser de serina o treonina (aa 57) completamente conservados en todas las especies analizadas. (Oldenburg, *et al.*, 2007)

Se planteó que la región C₁₃₂XXC₁₃₅ correspondía al sitio catalítico de hVKOR, al igual que la región equivalente en las enzimas homólogas. Lo anterior se confirmó mediante estudios de mutagénesis, en los que al cambiar estos residuos por otros, la enzima perdía su actividad. Dicha región resulta ser similar al sitio catalítico de las enzimas tipo tiorredoxinas (Trx). El mecanismo propuesto para la reducción consiste en que uno de los grupos tiol de las cisteínas en su forma reducida lleva a cabo un ataque nucleofílico al epóxido de vitamina K y dona un par de electrones, generando así la reducción de dicha molécula. Como se trata de una reacción de óxido-reducción los grupos tiol terminan formando un puente disulfuro (forma oxidada), dejando inactiva a la enzima. El rol de los otros dos residuos conservados de cisteína (43 y 57) sigue siendo en la actualidad controversial. Tomando como referencia su función en versiones bacterianas de la VKOR, se originó la teoría de que dichas cisteínas podrían aceptar electrones y transferirlos a las cisteínas del sitio catalítico, activando de esta forma a la enzima, sin embargo esto no ha podido comprobarse (Tie & Stafford, 2016; Oldenburg, *et al.*, 2007; Rishavy, *et al.*, 2011).

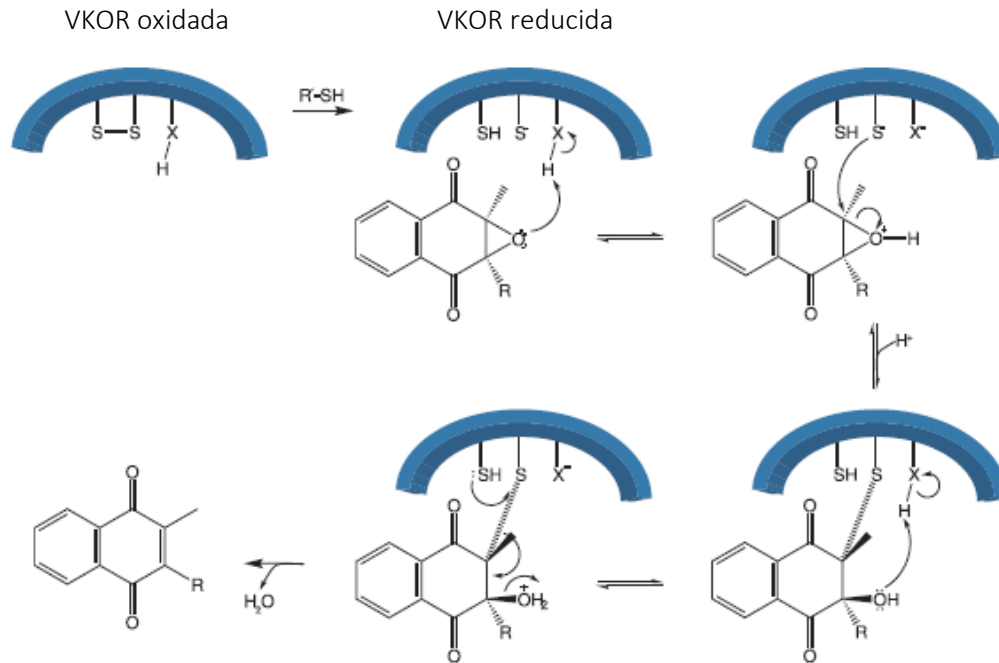


Figura 10. Mecanismo de reducción del epóxido de vitamina K en el sitio catalítico de la hVKOR. Adaptada de Van Horn, 2013

En la actualidad se encuentra en discusión la topología de membrana de la enzima hVKOR. Al ser una proteína integral, su purificación y cristalización manteniendo su estructura nativa intacta aún no se ha logrado. (Tie & Stafford, 2016; Van Horn, 2013).

Mientras que algunos autores afirman que presenta 4 dominios transmembranales, otros aseguran que posee sólo 3. Los dos modelos se encuentran basados en aproximaciones bioquímicas y en la estructura cristalina de la VKOR de *Synechococcus* sp. (synVKOR) (de la cual se hablará más adelante), la única estructura de VKOR en su conformación activa que ha sido elucidada mediante rayos X hasta hoy. Sin embargo, la hVKOR y la synVKOR comparten únicamente un 20% de su secuencia. (Tie & Stafford, 2016)

En el modelo de 3 dominios transembranales (DTM) de la hVKOR, que parece ser el más aceptado en la actualidad, el N-terminal está localizado en el lumen del retículo endoplásmico y el C-terminal se encuentra localizado en el citoplasma, posee un bucle o asa de alrededor de 69 aminoácidos entre el DTM 1 y el DMT 2 del lado citoplasmático en donde se localizan los residuos conservados de cisteína 43 y 51 y un bucle pequeño de alrededor de 7 aminoácidos entre el DTM 2 y el DMT 3 en el lumen del retículo endoplásmico. El sitio activo CXXC (cisteínas 132 y 135) se localiza en el DTM 3, cerca del lumen del retículo endoplásmico, rodeado de un ambiente hidrofóbico, lo que es consistente con la hidrofobicidad de su ligando vitamina K. Parte de la evidencia que

sustenta el modelo de los 3 DTM, es que en este el DTM 1 se encuentra flanqueado por residuos con carga positiva del lado citoplasmático, lo que coincide con la “regla de positivos adentro” que señala que las asas no translocadas o citoplásmicas muestran una mayor proporción de aminoácidos con carga positiva (principalmente arginina y lisina), en comparación con las asas que son translocadas al periplasma. En este modelo, las cisteínas 43 y 51 se encuentran “del lado contrario” de las cisteínas del sitio catalítico 132 y 135, cosa que no sucede en el modelo de 4 DTM. En caso de que se comprobara el papel de estas cisteínas en la transferencia de electrones a las cisteínas del sitio catalítico, el modelo de 3 DTM se vería comprometido. (Oldenburg, Watzka, Rost, & Muller, 2007; Tie & Stafford, 2016; Van Horn, 2013).

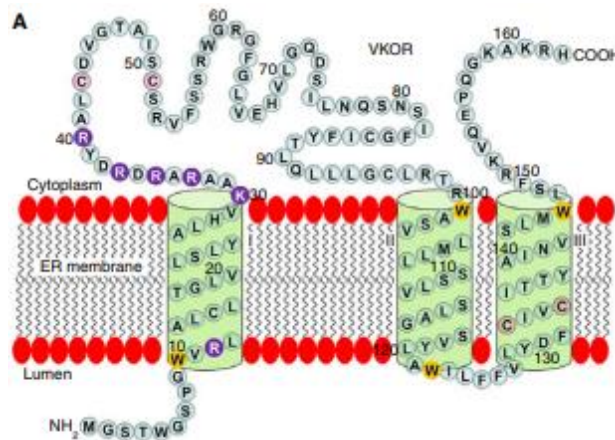


Figura 11. Topología de membrana propuesta de 3 DTM para hVKOR. Los residuos conservados de cisteína se encuentran coloreados de rosa, los residuos con carga positiva que flanquean el DTM 1 se muestran de color morado, obtenida de Tie & Stafford, 2016

4.5.2 Anticoagulantes con acción sobre hVKOR

En 1922 en Estados Unidos se describieron casos de hemorragia en el ganado después de que este había consumido tréboles en descomposición, las hemorragias se atribuyeron a niveles de protrombina disminuidos. Se demostró que el ingrediente que generaba esta acción en los tréboles en mal estado era el dicumarol (IUPC- 3,3'-metilenbis[4-hidroxicumarina]) (Olson, 1984).

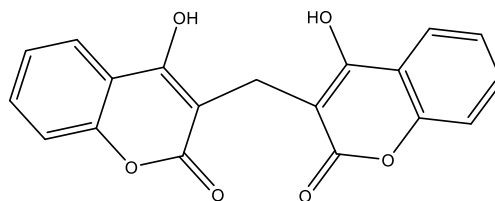


Figura 12. Estructura química del dicumarol.

Poco después, se descubrió que la vitamina K era un antídoto efectivo para esta condición hemorrágica, determinándose que el dicumarol era un antagonista de la Vitamina K (Van Horn, 2013).

La eficacia anticoagulante del dicumarol fue evaluada en la clínica y los resultados obtenidos no fueron favorables por lo que desde su descubrimiento hasta la actualidad se han sintetizado un número elevado de análogos a esta molécula. Uno de estos análogos es la warfarina (3-[α -acetonilbencil]-4-hidroxycumarina), la cual fue primero utilizada como un eficaz rodenticida y posteriormente lanzada al mercado como anticoagulante en el año 1954. Desde su lanzamiento la warfarina se convirtió en uno de los fármacos anticoagulantes más ampliamente prescritos (Van Horn, 2013; Olson, 1984).

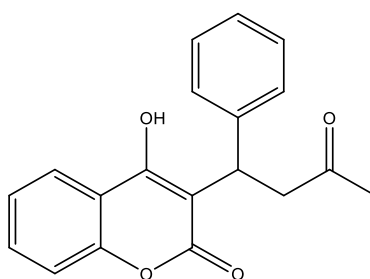


Figura 13. Estructura química de la warfarina.

Se estima que en los Estados Unidos, la warfarina es prescrita a un millón de pacientes al año como agente profiláctico y terapéutico en el tratamiento de enfermedades tromboticas como la trombosis venosa profunda, el embolismo pulmonar, las embolias y el infarto al miocardio. Sin embargo, la terapia con warfarina es complicada. Se ha reportado que alrededor de 12% de los pacientes que reciben warfarina sufren de episodios hemorrágicos. Su estrecho margen terapéutico sumado a la variable sensibilidad que presentan los pacientes a este fármaco (generalmente causada por factores genéticos) vuelven a su correcta dosificación una tarea complicada. (Van Horn, 2013; Stafford, 2005)

El mecanismo de acción de la warfarina involucra su interacción con la enzima hVKOR, inhibiendo su acción y generando la reducción de las concentraciones de hidroquinona de vitamina K. Aún no se conoce detalladamente como se lleva a cabo la interacción de la warfarina con la hVKOR, sin embargo, existen diversas teorías. Estudios afirman que la inhibición de la hVKOR por la warfarina es irreversible y que la unión se da únicamente cuando la enzima se encuentra en estado reducido. Se ha planteado que el sitio de unión a warfarina está conformado por los residuos Treonina (T) 138, Tirosina (Y) 139 y Alanina(A) 140, cercanos al sitio catalítico. El cambio del residuo de tirosina 139 por fenilalanina (Y139F) genera mutantes resistentes a warfarina. Debido a que la única diferencia entre la tirosina y la fenilalanina es la presencia del grupo hidroxilo, se ha propuesto que este grupo OH juega un papel fundamental en la unión de warfarina. Además, cualquier mutación en

el residuo Y139 genera la producción de 3-hidroxi-vitamina K, lo que sugiere que el grupo hidroxilo de Y139 está involucrado en el mecanismo catalítico de deshidratación del epóxido de vitamina K. La evidencia apunta que TYA y CXXC forman parte del hueco de unión tanto para el sustrato (epóxido de vitamina K) como para el inhibidor (warfarina) (Tie & Stafford, 2016; Van Horn, 2013).

4.5.3 VKOR de *Synechococcus* sp.

La estructura cristalina de la enzima homóloga VKOR de *Synechococcus* sp., reportada por Weikai *et al.* en el año 2010, presenta 5 dominios transmembranales (DTM) y un dominio tipo tiorredoxina (Trx) en el lado extracelular. La región terminal y el bucle entre los DTM 1 y 2 se encuentran en el citosol. Los DMT 1-4 se encuentran agrupados y rodean a una molécula de ubiquinona, ligando natural de la enzima con la que fue co-cristalizada. La ubiquinona se encuentra próxima al lado periplásmico de la membrana y su motivo benzoquinona se encuentra cercano al sitio catalítico CXXC (C130 y C133) en el DTM4. El DTM5 se encuentra fuera del grupo y conecta con el dominio tipo Trx mediante una región enlazante o “linker”. El bucle entre los DTM 1 y 2 se encuentra del lado periplásmico, es el más largo de todos y contiene los otros dos residuos conservados de cisteína (C50 y C56) así como el residuo serina/treonina. Este bucle se divide en 3 secciones, la sección N-terminal llamada “segmento 1/2”, un segmento helicoidal conocido como “hélice 1/2” y un pequeño segmento C-terminal. El segmento hélice 1/2 cubre a manera de tapa al grupo de los DTM 1-4, protegiendo al ligando ubiquinona del espacio periplásmico. (Weikai, *et al.*, 2010; Van Horn, 2013). La estructura cristalina antes descrita puede encontrarse en Protein Data Bank con la clave 3KP9.

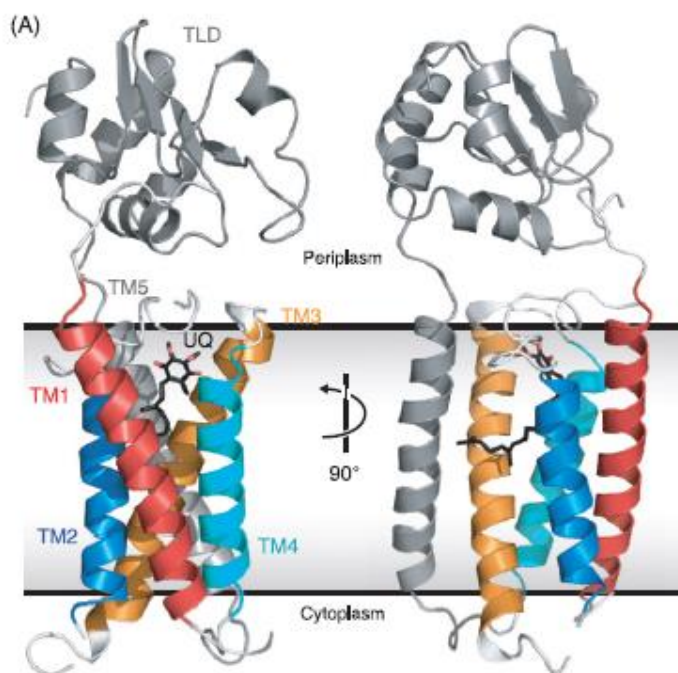


Figura 14.

Estructura cristalina determinada mediante rayos X de la synVKOR (Código PDB 3PK9). En gris se encuentran los dominios de la enzima que no se encuentran presentes en la versión de 4 DTM de la hVKOR. Obtenida de Van Horn, 2013.

Mediante docking molecular (técnica cuya descripción se presentará en los próximos apartados) se evaluará la interacción entre los derivados de menadiona y la enzima syn VKOR, a modo de aproximación de la interacción entre dichos ligandos y la versión humana de esta enzima.

4.6 Docking molecular, un estudio *in silico*

El término "*in silico*" hace referencia a las simulaciones o reproducciones de experimentos *in vivo* o *in vitro* mediante herramientas computacionales. Estos análisis no sustituyen a los otros, si no que los complementan. Los experimentos *in silico* tienen la cualidad de poder ser realizados en un corto periodo de tiempo y de ser económicos. (Fina, Lobarte, & Rigalli, 2013)

El docking molecular es un ejemplo de análisis *in silico* y ha sido utilizado ampliamente desde los años ochenta (Meng, *et al.*, 2011). Este permite modelar la interacción entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor) a nivel atómico, generando detallada información tridimensional del complejo formado (Trott & Olson, 2010).

Antes de profundizar en el tema del docking molecular, es de importancia recordar las implicaciones de la interacción entre ligando y receptor.

4.6.1 Complejo ligando-receptor

La unión entre ligando y receptor (que por lo general es una proteína) se da por medio de enlaces químicos, usualmente no covalentes. Los tipos de enlace formados dependen directamente de la naturaleza del ligando y de los aminoácidos presentes en el sitio de unión de la proteína. Los tipos de enlace más comunes en esta interacción son los iónicos (fuerza de enlace 20-25 kJ/mol), uniones dipolares (5-30 kJ/mol), puentes de hidrógeno (5-30 kJ/mol), enlace por transferencia de carga (5-30 kJ/mol) y enlaces de van der Waals o enlaces hidrofóbicos (2kJ/mol por cada metileno). La capacidad de un fármaco de activar o de bloquear un receptor dependerá de que los enlaces formados se sitúen en determinados ángulos y distancias (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2013).

En cuanto al mecanismo de unión, las primeras elucidaciones corresponden con la teoría propuesta por Fisher en el año 1894, en la cual el ligando encaja con el receptor como si se tratase de una llave y una cerradura, representado a ambos como estructuras rígidas. (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2013)

Posteriormente se desarrolló la teoría del ajuste inducido, creada por Koshland alrededor de 1980, que explica de una mejor manera la selectividad que poseen las enzimas o receptores por sus ligandos. La teoría, expresada en relación a las enzimas, establece que se requiere de una orientación precisa de los grupos catalíticos de la enzima para que esta pueda llevar a cabo su función, que el sustrato genera un cambio en la localización tridimensional de los aminoácidos en el sitio activo y que este cambio genera la orientación exacta de los grupos catalíticos requerida para que la enzima funcione, cosa que no sucede con moléculas que no son sustratos (Koshland, 1994). En resumidas cuentas, la teoría establece que la unión de la proteína con su ligando genera un cambio en la conformación de ambos a fin de lograr una adaptación mutua, necesaria para que se desencadene la respuesta biológica deseada. Por lo tanto, afirma que ni el ligando ni el receptor son moléculas rígidas, como lo establece la teoría de la llave y la cerradura, sino más bien flexibles como lo sería un guante al adaptarse a una mano.

4.6.2 Aspectos generales sobre el docking molecular

Para que el docking molecular pueda llevarse a cabo es necesario que se conozca de manera detallada la estructura tridimensional del receptor al que se enlazará el ligando y preferentemente el sitio de unión. La elucidación del genoma humano que permitió el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, además, el desarrollo de técnicas para la obtención de proteínas con un alto grado de pureza, de la cristalografía y de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear que permitieron la determinación de la estructura de manera detallada de los receptores y del complejo ligando-proteína, fueron piezas claves en su desarrollo. Asimismo, el crecimiento del poder computacional y la disponibilidad de las bases de datos de receptores y moléculas pequeñas permitieron la expansión de su uso en la comunidad científica (Meng, Zhang, Mezei, & Cui, 2011; Ruyck, Brysbaert, Blossey, & Lensink, 2016).

El objetivo principal del docking molecular es generar una predicción de la estructura del complejo ligando-receptor y de la afinidad de unión. El docking se lleva a cabo mediante dos pasos:

El primero de ellos consiste en buscar las posibles conformaciones, posiciones y orientaciones del ligando en un sitio de la proteína, idealmente en el sitio de unión conocido. Es decir, consta en definir las posibles “poses” del ligando en relación con el receptor. Debido a que existen un sin número de posibles modos de unión entre el ligando y receptor y que probarlos todos requeriría de una enorme capacidad computacional, se han desarrollado diversos algoritmos, conocidos como algoritmos de muestreo o de búsqueda, que simplifican esta tarea (Meng, *et al.*, 2011). Los dos elementos críticos en el

algoritmo de búsqueda son la velocidad y la efectividad de cubrir todas las conformaciones relevantes en el espacio. Los algoritmos se agrupan en 3 categorías principales dependiendo de su forma de predecir las poses del ligando como métodos sistemáticos, métodos aleatorios o estocásticos y métodos de simulación (Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006).

El segundo paso consiste en evaluar la afinidad de la unión ligando-receptor en cada pose, arrojando un puntaje o *score* para cada una de ellas, jerarquizándolas y permitiendo discriminar entre las más favorables de las menos favorables. A esto se le conoce como función de puntuación. Por el hecho de que la determinación debe ser suficientemente rápida para aplicarla a un gran número de soluciones o poses potenciales, la función de puntuación involucra la estimación y no el cálculo de la energía libre del complejo ligando-receptor, adoptando varias suposiciones y simplificaciones para reducir su complejidad, lo que disminuye su precisión. Las funciones de puntuación se dividen en aquellas basadas en el campo de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento (Meng, *et al.*, 2011).

Para obtener el resultado deseado en docking molecular lo ideal sería combinar al mejor algoritmo de búsqueda, capaz de reproducir la unión experimental entre ligando-receptor y la mejor función de puntuación capaz de asignarle el mejor puntaje por sobre los otros, sin embargo, se ha demostrado que la estimación depende de las características del sitio de unión y del ligando, por lo que es imposible designar a un algoritmo de muestreo y a una función de puntuación como los ganadores absolutos. (Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006)

Los primeros reportes de docking molecular basaban la interacción ligando-receptor en la teoría de Fisher de la llave y la cerradura, tratando a ambos como cuerpos rígidos. Después del surgimiento de la teoría de Koshland se buscó la manera de representar a ligando y receptor como estructuras flexibles. En la actualidad, debido a las limitaciones en los recursos computacionales, por lo general el docking se lleva a cabo a través de la aproximación de un ligando flexible y un receptor rígido. (Delgado, Minguillón, & Joglar, 2013)

4.6.3 Importancia del docking molecular

En la actualidad, el docking molecular es una herramienta importante para el desarrollo de nuevos fármacos.

El docking molecular permitió el surgimiento del screening virtual, en el que se evalúa la interacción entre blancos farmacológicos cuya estructura cristalina es conocida y amplias

bibliotecas de compuestos, permitiendo la obtención de nuevas moléculas cabezas de serie a un muy bajo costo.

De igual manera, permite la optimización de las moléculas cabezas de serie. Mediante el análisis de la estructura tridimensional del complejo ligando-receptor formado entre la molécula líder y el receptor conocido es posible determinar qué tipo de enlaces se encuentran involucrados, información que puede utilizarse para diseñar análogos más potentes y selectivos.

También se utiliza el docking molecular para llevar a cabo estudios de relación estructura actividad, para generar hipótesis de unión entre ligando y receptor que ayuden en estudios de mutagénesis y como auxiliar en la elucidación del mecanismo de acción de enzimas. (Morris & Lim-Wilby)

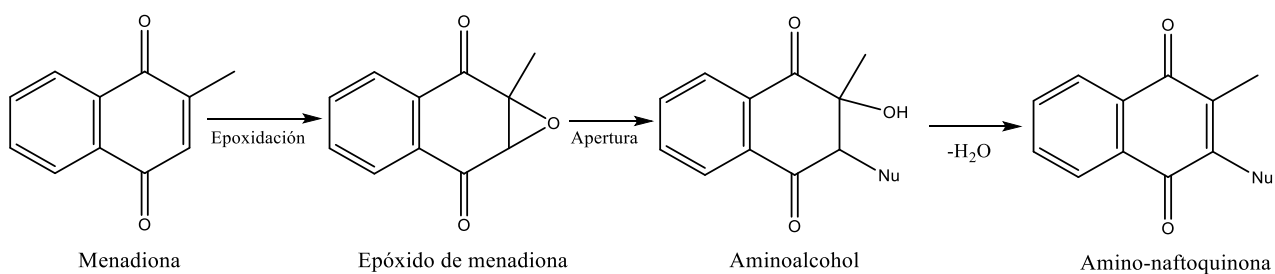
Existen numerosas referencias bibliográficas que ejemplifican las distintas aplicaciones del docking molecular. Por ejemplo, se han obtenido compuestos con elevada afinidad hacia la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) presente en microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis y *Plasmodium falciparum* agente causal de la malaria, que interviene en la síntesis de compuestos isoprenoides necesarios para su supervivencia y que no se encuentra presente en las células humanas. (Ruyck, *et al.*, 2016). Otro ejemplo descrito en la literatura es la evaluación mediante docking molecular que se llevó a cabo entre la enzima dihidropteroato sintetasa de *Staphylococcus aureus*, blanco conocido de las sulfonamidas, y moléculas con la estructura común de 4-cumarinilpirano[2,3-c]pirazol. Aquellos compuestos que tuvieron las mejores puntuaciones en docking también obtuvieron los mismo resultados *in vitro* contra el crecimiento bacteriano, denotando una considerable correlación (Chougala, *et al.*, 2017).

Las aplicaciones del docking molecular en el área de la química medicinal siguen creciendo y demuestran la importancia que ha adquirido esta herramienta para la generación de nuevos fármacos en los últimos años. Sin embargo, debido a su naturaleza predictiva, su uso no sustituye al uso de ensayos *in vivo* o *in vitro*.

5. METODOLOGÍA

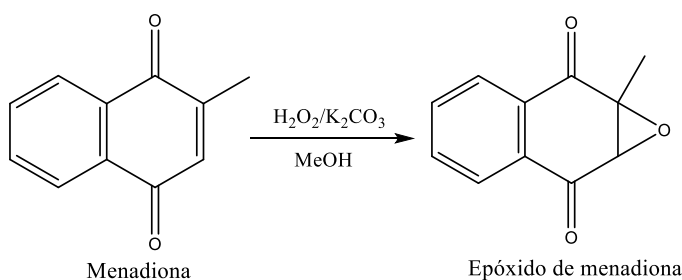
5.1 Síntesis química y caracterización estructural

La síntesis química consistió en dos etapas consecutivas. La primera de ellas fue la epoxidación del doble enlace en la posición 2,3 de la menadiona (1) (nombre IUPAC: 2-metil-naftaleno-1,4-diona) y la segunda fue la apertura del epóxido (2) mediante un ataque nucleofílico para el que se utilizaron la propilamina y la butilamina.



Esquema 4. Diagrama general de reacción.

5.1.1 Preparación del epóxido



Esquema 5. Reacción de formación del epóxido de menadiona.

Se colocaron 1.37 g de menadiona (1), correspondientes a 8 mmoles, en el matraz bola de 500 mL donde se llevó a cabo la reacción, posteriormente se adicionaron 20 mL de metanol caliente al matraz de reacción y se disolvió la menadiona (1) mediante agitación. Una vez disuelta, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Cuando se alcanzó dicha temperatura, se colocó el matraz en baño de hielo.

Se preparó aparte en un vaso de precipitados la solución que daría origen al ión hidroperóxido adicionando lentamente 0.65g de carbonato de potasio (K_2CO_3) a 8.2 mL de H_2O_2 al 30%.

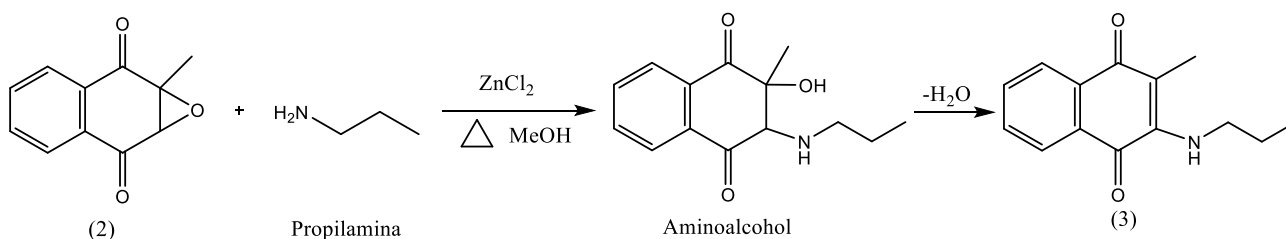
Una vez frío el matraz de reacción, se adicionó la solución de ión hidroperóxido lentamente a la disolución de (1). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación. Se monitoreó el progreso de la reacción cada 15 min y se detuvo a los 30 min después de iniciada la reacción mediante la adición de 200 mL de agua destilada, obteniéndose un precipitado blanco. El precipitado se filtró al vacío utilizando un filtro de papel Whatman.

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación utilizando carbón activado de la siguiente manera: El precipitado obtenido de la reacción anterior se disolvió en acetona y se adicionó carbón activado. Se calentó a ebullición la solución con el carbón activado y se mantuvo en agitación aproximadamente por 3 minutos. La solución se filtró al vacío utilizando un filtro de papel Whatman y a continuación se hizo pasar por un filtro de jeringa para eliminar los remanentes del carbón activado.

Por último, se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente, obteniéndose cristales color blanco-transparente con una masa de 1.03 g correspondientes al epóxido de menadiona (2) con el nombre IUPAC de 1a-metil-1a,7a-dihidonaftol[2,3-b]oxirano-2,7-diona. El rendimiento de reacción fue de 69 %.

Se determinó la pureza del producto y se caracterizó, confirmándose que se trataba de la molécula deseada, mediante las siguientes técnicas: cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), espectroscopía infrarroja (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN- 1H).

5.1.2 Apertura del epóxido de menadiona con propilamina



Esquema 6. Reacción de apertura del epóxido de menadiona con propilamina.

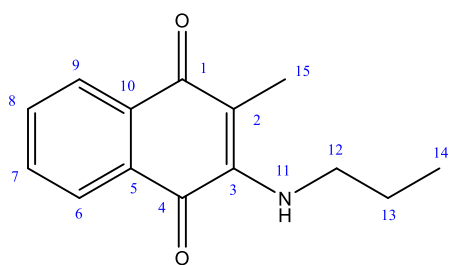
Se disolvieron 200 mg (1.06 mmoles) de (2) previamente caracterizado en un matraz bola utilizando 40 mL de metanol. A la disolución se le adicionaron 131 μ L (94.25 mg o 1.59 mmoles) de propilamina por goteo utilizando una micropipeta y posteriormente cantidades catalíticas de cloruro de zinc. La reacción se mantuvo en reflujo a una temperatura aproximada de 65 °C y en agitación. Se monitoreó el avance de reacción utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). La reacción se detuvo pasadas 23 horas de haber iniciado.

Al crudo de reacción se le adicionó agua y le fue realizada una extracción con una cantidad equivalente de AcOEt (acetato de etilo) al volumen del crudo de reacción más el agua, posteriormente se le realizaron lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio, agua destilada y solución saturada de cloruro de sodio, después se eliminó el solvente a presión reducida.

Posteriormente, se llevó a cabo la separación de los compuestos obtenidos en el crudo de reacción mediante una cromatografía en columna con una fase estacionaria de sílica-gel y una fase móvil de AcOEt: n-hexano al 2%. Se determinaron las fracciones de interés mediante CG-EM.

El producto se purificó mediante una re-cristalización con n-hexano y diclorometano, obteniéndose cristales de color rojo con una masa de 16.5 mg. El producto se conservó en una atmósfera inerte (nitrógeno) hasta el momento de su caracterización.

La determinación estructural se llevó a cabo mediante espectroscopía IR, RMN-¹H, RMN-¹³C con una resolución de 400 MHz mediante técnicas uni y bidimensionales. Como resultado de dicha caracterización se determinó la estructura de la molécula con el nombre IUPAC de 2-metil-3-(propilamino)naftaleno-1,4-diona (3) (**Figura 15**). El rendimiento de reacción se calculó utilizando el peso molecular de la molécula obtenida, resultando ser del 7 %.



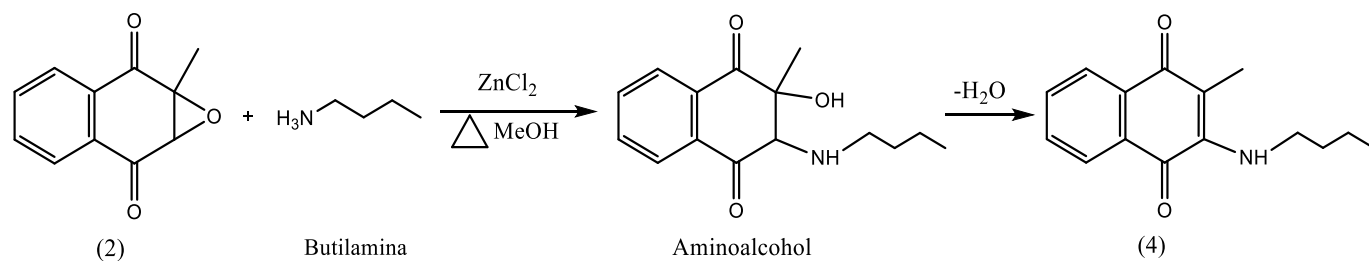
Fórmula condensada: C₁₄H₁₅NO₂

PM= 229.22 g/mol

Aspecto físico: Cristales color rojo

Figura 15. Estructura de la molécula (3) obtenida.

5.1.3 Apertura del epóxido de menadiona con butilamina



Esquema 7. Reacción de apertura del epóxido de menadiona con butilamina.

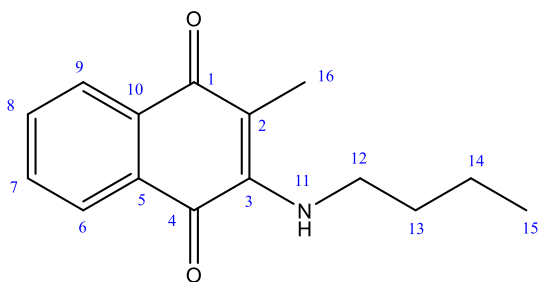
Se disolvieron 400 mg (2.13 mmoles) del epóxido de menadiona previamente caracterizado en un matraz bola utilizando 70 mL de metanol. A la disolución se le adicionaron 316 μL (234.1 mg o 3.19 mmoles) de butilamina por goteo utilizando una micropipeta y posteriormente cantidades catalíticas de ZnCl_2 . La reacción se mantuvo en reflujo a una temperatura aproximada de 65°C y en agitación. Se monitoreó el avance de reacción mediante TLC. La reacción se detuvo pasadas 24 horas de haber iniciado.

Al crudo de reacción se le adicionó agua y se extrajo con AcOEt, posteriormente se le realizaron lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio, agua destilada y solución sobresaturada de cloruro de sodio, después, se eliminó el disolvente utilizando un rotaevaporador.

Posteriormente, se llevó a cabo la separación de los compuestos obtenidos en el crudo de reacción mediante cromatografía en columna con una fase estacionaria de sílica-gel y una fase móvil de AcOEt: hexano al 2%. Se determinaron las fracciones de interés mediante CG-EM.

El producto se purificó mediante una re-cristalización con n-hexano y diclorometano, obteniéndose cristales de color rojo con una masa de 37 mg. El producto se conservó en una atmósfera inerte (nitrógeno) hasta el momento de su caracterización.

La determinación estructural se llevó a cabo mediante espectroscopía IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C con una resolución de 400 MHz mediante técnicas uni y bidimensionales. Como resultado de dicha caracterización se determinó la estructura de la molécula con el nombre IUPAC de 2-metil-3-(butilamino)naftaleno-1,4-diona (4) (**Figura 16**). El rendimiento de reacción se obtuvo utilizando el peso molecular de la molécula obtenida, resultando ser del 7%.



Fórmula condensada: C₁₅H₁₇NO₂

PM= 243.25 g/mol

Aspecto físico: Cristales color rojo

Figura 16. Estructura de la molécula (4) obtenida.

5.2 Docking molecular

Se designaron los ligandos menadiona (1), epóxido de menadiona (2), (3) y (4). Todos ellos se dibujaron utilizando el programa UCSF Chimera, introduciendo el código SMILES generado mediante la página de internet MOLINSPIRATION.

Los ligandos se prepararon individualmente seleccionando los enlaces rotables en AutoDock Tools y minimizando su energía en UCSF Chimera utilizando las condiciones predeterminadas para este proceso (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones para el minimizado de energía en UCSF Chimera

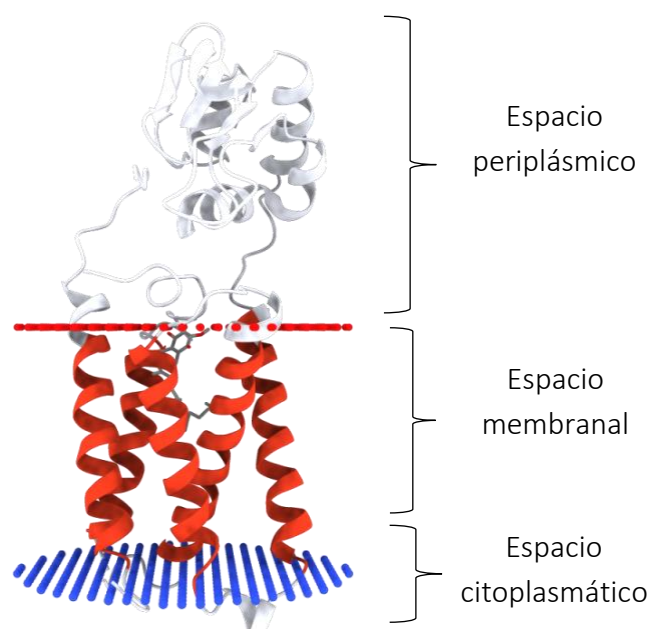
Pasos descendentes más pronunciados	100
Tamaño de pasos descendentes más pronunciados	0.02 Å
Pasos de gradiente conjugados	10
Tamaño de pasos de gradiente conjugados	0.02 Å
Intervalo de actualización	10
Átomos fijos	Ninguno

De igual manera, se adicionaron hidrógenos y se designaron las cargas mediante el método Gasteiger dentro de UCSF Chimera. La energía potencial de los ligando antes y después de la minimización de energía, así como el RMSD del estado inicial de la molécula contra el estado final se muestran en el Anexo 20. Los ligandos se grabaron en formato .pdb para ser utilizados posteriormente.

Por otra parte, el receptor, que corresponde a la enzima bacteriana vitamina K epóxido reductasa de *Synechococcus* (synVKOR) homóloga a la humana, se descargó de la página de internet Protein Data Bank.

Figura 17.

Estructura transmembranal de la synVKOR, con la ubiquinona e iones de mercurio co-cristalizados. Obtenida de Protein Data Bank.



El archivo presentaba a la enzima co-cristalizada con la molécula ubiquinona en el sitio activo e iones de mercurio. El ligando y los iones fueron removidos de la enzima en el programa Vega ZZ y se preparó para el docking en el mismo programa mediante la adición de hidrógenos, la remoción del agua, el cálculo de las cargas y de la superficie del receptor. El receptor se guardó en formato .mol2 para su uso posterior.

El docking molecular se llevó a cabo en el programa UCSF Chimera mediante el algoritmo AutoDockVina, el análisis se realizó mientras que tanto el archivo del ligando como el del receptor con sus respectivas modificaciones se encontraban abiertos. Se designó el espacio de búsqueda mediante una “caja”, con la cual se delimitó una región de la proteína que comprende el sitio catalítico, región en donde se encontraba localizada originalmente la ubiquinona en el archivo de Protein Data Bank. Se utilizó el mismo tamaño de caja y la misma localización de ésta con respecto a la enzima para todos los ligandos, haciendo posible la comparación entre los resultados obtenidos. La posición central de los ejes X, Y y Z en la caja fue de 38.0821, 66.6703, 21.0812 respectivamente y la longitud que abarcó la caja en cada eje fue en X de 19.7705 Å, en Y de 20.9395 Å y en Z de 27.8564 Å. (**Figura 18**)

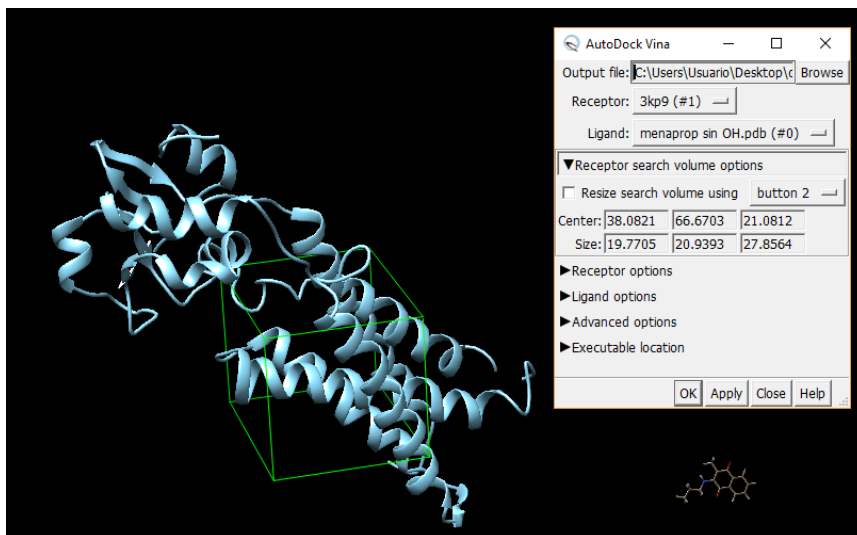


Figura 18. Designación del espacio de búsqueda sobre el receptor VKOR en el programa UCSF Chimera.

En cada análisis se obtuvieron los 10 mejores puntajes correspondientes a las 10 poses del ligando con mejor interacción con la enzima. La exhaustividad de la búsqueda fue de 8, que es el valor por *default*. El docking se llevó a cabo por triplicado para cada ligando y se promediaron los mejores puntajes de cada repetición para obtener el puntaje final.

Los scores obtenidos de los productos y materiales de partida se compararon con los scores obtenidos para dos moléculas con estructura relacionada sintetizadas en un trabajo previo del mismo grupo de investigación.

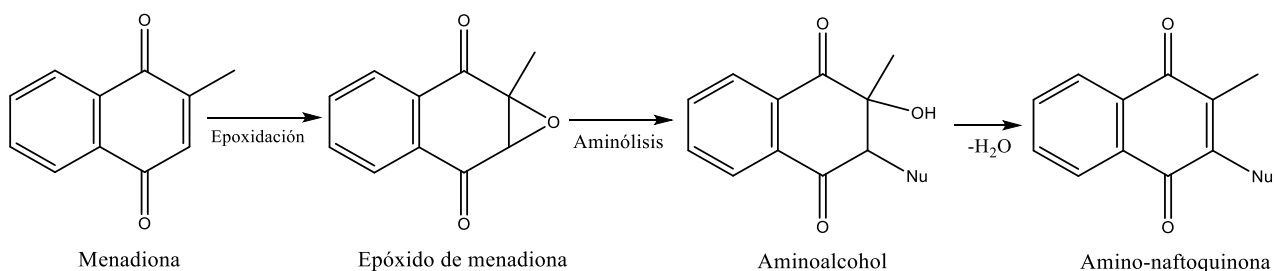
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las moléculas que presentan el motivo naftoquinona en su estructura son conocidas por poseer diversas actividades farmacológicas.

Se planteó la síntesis de derivados aminados con núcleo de 1,4-naftoquinona partiendo de la menadiona, molécula que comparte su esqueleto con la Vitamina K1 y Vitamina K2 (a las que se les llamará en conjunto Vitamina K). La vitamina K, como ya se mencionó con anterioridad, es un cofactor para la enzima Gamma Glutamil Carboxilasa (GGCX) encargada de la gamma-carboxilación de los factores de coagulación dependientes de vitamina K, los cuales necesitan de esta modificación para su correcto funcionamiento. La GGCX aprovecha la capacidad de la vitamina K de donar electrones. Después de haber participado en la gamma-carboxilación, la vitamina K oxidada, en forma de epóxido, se recicla, volviendo a su forma reducida gracias a la enzima Vitamina K epóxido reductasa (VKOR). Por la similitud estructural de los derivados de menadiona con la vitamina K, se plantea que estos interactúen con la VKOR dificultando la interacción con su sustrato, obstaculizando su reciclaje y con ello la coagulación.

6.1 Síntesis y caracterización

La síntesis de derivados de menadiona se llevó a cabo en dos etapas consecutivas que consistieron en una epoxidación y una aminólisis.

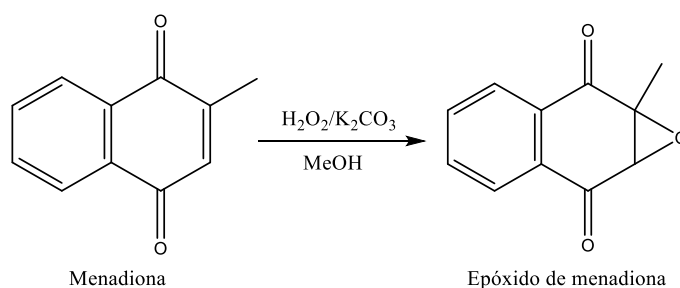


Esquema 8. Diagrama general de las reacciones para la síntesis de derivados de menadiona.

Para la primera etapa, correspondiente a la epoxidación, se utilizó menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) (1) como material de partida. La menadiona (1) se caracterizó mediante espectrometría de masas (EM) obteniéndose un ión molecular de 172.15 m/z (**Anexo 1**). En el espectro de IR se obtuvo una banda en 1654 cm^{-1} asignada al estiramiento del enlace carbonílico, así como una banda a 1622 cm^{-1} correspondiente al doble enlace conjugado en

posición 2,3. Las bandas obtenidas en espectroscopía IR (**Anexo 2**) se compararon con las reportados por Hassan (Hassan, 2013), observándose una notable similitud entre aquellas características del compuesto.

La epoxidación se llevó a cabo utilizando un método reportado en la literatura que consiste en la formación del ión electrofílico hidroperóxido, que al entrar en contacto con la menadiona da como resultado la generación del epóxido en posición 2 y 3 en una reacción concertada. La reacción entre la menadiona y el ión hidroperóxido fue rápida y visualmente perceptible ya que la disolución pasó en pocos minutos de ser color amarillo a adquirir una consistencia pastosa y un color blanco.



Esquema 9. Reacción de formación del epóxido de menadiona.

Se obtuvo como producto al epóxido de menadiona (2) con nombre IUPAC 1a-metil-1a,7a-dihidonaftol[2,3-b]oxirano-2,7-diona) con fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_3$ el cual, después de ser purificado mediante recristalización, adquirió la apariencia de finos cristales color blanco. Se caracterizó con técnicas instrumentales de espectrometría de masas (**Anexo 3**), espectroscopía IR (**Anexo 4**) y Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN- ^1H) (**Anexo 5**). En el espectro de masas fue posible observar al ión molecular de 188.15 m/z. En el espectro de IR las señales destacables fueron una banda en 1695 cm^{-1} asignado a los carbonilos del esqueleto de naftoquinona, la cual que se encuentra más desplazada hacia la izquierda en comparación a dicha banda en el espectro de (1) debido a la pérdida del doble enlace que generaba la deslocalización de los electrones π del carbonilo, y dos bandas en 853 y 748 cm^{-1} correspondientes con el estiramiento del anillo del epóxido. En el espectro de RMN- ^1H son observadas 3 señales: un multiplete con integración de 4 con un desplazamiento en 7.87 ppm correspondiente a los hidrógenos del anillo aromático, un singulete con integración de 1 con un desplazamiento de 3.92 ppm correspondiente al hidrógeno directamente enlazado al anillo del epóxido y otro singulete que integra para 3 con un desplazamiento de 1.8 ppm correspondiente a los hidrógenos del metilo.

La segunda etapa consistió en la apertura del anillo de epóxido en (2) mediante una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ utilizando como nucleófilos a la propilamina y la butilamina (una aminólisis), en condiciones generales de metanol como disolvente y en reflujo por 24 horas.

Aunque el sitio más propenso a reaccionar con el nucleófilo es el anillo de epóxido en posición 2,3 debido a su alta reactividad, las naftoquinonas presentan varios centros electrofílicos también capaces de reaccionar que podrían dar lugar a la formación de subproductos. Con el propósito de reducir las reacciones secundarias y mejorar el rendimiento de la reacción se adicionó $ZnCl_2$ buscando que se favoreciera el ataque nucleofílico de la amina al anillo de oxirano, que al conjugarse con el oxígeno de este anillo, debilitara el enlace C-O.

La continuidad de las reacciones con los dos diferentes nucleófilos se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (TLC). En ambas reacciones, alrededor de las 20 horas de reacción era posible observar no solo una, sino una serie de manchas, siendo una de ellas mayoritaria y presentando un factor de retención similar al del epóxido de menadiona.

Como parte de la purificación se llevó a cabo una cromatografía en columna para cada reacción con una fase estacionaria de sílica-gel y una fase móvil de AcOEt: nHex al 2%. El progreso de la separación se siguió mediante TLC con fase móvil de AcOEt: n-Hex al 15%.



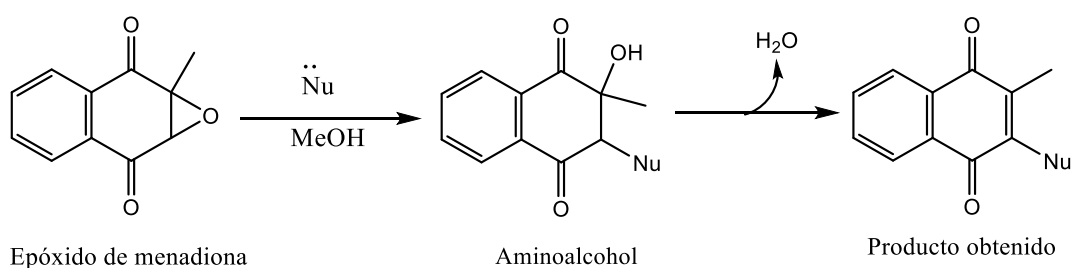
Figura 19. Cromatografía en columna del crudo de reacción de la apertura del epóxido con propilamina.

Las fracciones obtenidas que poseían la misma composición se juntaron y se evaporaron a presión reducida. Se llevó a cabo el análisis de las reacciones mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se determinó cuales contenían al producto de interés y posteriormente se agruparon.

El producto de cada reacción se purificó por recristalización. Se disolvieron (por separado) en el mínimo volumen posible de diclorometano y se llevó a cabo la adición de dos partes de hexano por cada parte de diclorometano. Se dejó evaporar la mezcla de solventes a temperatura ambiente y se obtuvieron cristales adheridos a las paredes del vaso de precipitados los cuales se recuperaron en un vial y se conservaron en atmósfera inerte (nitrógeno) hasta el momento de la caracterización de cada producto.

Después del análisis de toda la información espectroscópica y de espectrometría de masas, se determinaron las estructuras de los derivados aminados de menadiona obtenidos. De manera inicial se pensó que la metodología daría origen a aminoalcoholes, sin embargo, los productos obtenidos fueron amino-naftoquinonas.

Se propone que el $ZnCl_2$, además de favorecer la aminólisis, interaccionó con el grupo hidroxilo de los aminoalcoholes precursores, volviéndolo un mejor grupo saliente y facilitando una reacción E1, que puede ser comparada con una deshidratación, con la consiguiente formación de la insaturación en posición 2,3 del esqueleto la naftoquinona. Además, es probable que las condiciones de reacción tales como la temperatura y el considerable tiempo favorecieran este proceso.



Esquema 10. Propuesta de reacción de formación y deshidratación del aminoalcohol.

En la apertura con propilamina, se obtuvo la molécula 2-metil-3-(propilamino)naftaleno-1,4-diona (3) (**Figura 21**) con la fórmula condensada $C_{14}H_{15}NO_2$, la cual presentó en espectrometría de masas (**Anexo 6**) un ión molecular de 229.22 m/z y fragmentos de 200.17 m/z (**Figura 20.a**), 76.09 m/z (**Figura 20.b**), entre otros.

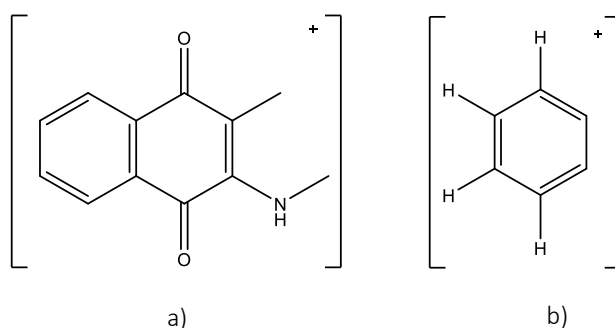


Figura 20. Propuesta de estructura de fragmentos en espectrometría de masas.

En el espectro de RMN- 1H (**Anexo 8**) se observaron las siguientes señales importantes: un singulete en 2.16 ppm que integra para 3 asignable a los hidrógenos equivalentes del metilo de la posición 15, dos dobles de dobles en 8.0 y 7.91 ppm ($J_1=8$ Hz, $J_2=1$ Hz) correspondientes a los hidrógenos aromáticos 6 y 9 respectivamente y dos dobles de

dobles de dobles a 7.49 y 7.59 ppm ($J_1=8$ Hz, $J_2=8$ Hz, $J_3=1$ Hz) asignables a los hidrógenos aromáticos en posición 7 y 8 respectivamente, los elementos anteriormente mencionados se mantienen del reactivo de inicio (menadiona). Un triplete en 0.93 ppm que integra para 3 correspondiente a los hidrógenos del metilo en la posición 14, un multiplete en 1.59 ppm que integra para dos asignable a los hidrógenos del metileno en posición 13, un cuarteto en 3.44 ppm que integra para 2 propio de los hidrógenos del metileno en posición 12 y un singulete ancho en 5.66 ppm asignable al protón no acoplado directamente unido al nitrógeno en posición 11 corroboran la unión de la propilamina con el esqueleto de naftoquinona. Las señales anteriormente mencionadas se encuentran resumidas en la **Tabla 3**.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 9**) se observan 14 señales asignables a los 14 carbonos de la estructura. Las señales a 11.17, 24.17 y 47.21 ppm se asignan a los carbonos 14, 13 y 12 respectivamente confirman nuevamente la unión de la amina al esqueleto de naftoquinona. Las señales más desplazadas a campo bajo del espectro a 183.55 y 182.51 ppm se asignan a los carbonos carbonílicos 4 y 1 respectivamente. Las señales a 134.25, 133.55, 131.74, 130.32, 126.17 y 125.92 ppm se asignan a los carbonos del anillo aromático en posición 7, 5, 8, 10, 6 y 9 respectivamente. Las señales a 146.2 y 112.04 ppm se asignan a los carbonos 3 y 2 respectivamente cuyo desplazamiento permite determinar que se encuentran formando parte de un doble enlace, lo que confirma que la insaturación volvió a formarse después de la apertura del epóxido.

Las asignaciones fueron corroboradas mediante experimentos de correlación bidimensional homonuclear: COSY ^1H - ^1H (**Anexo 10**) y heteronuclear: HSQC (**Anexo 11**) y HMBC (**Anexo 12**). Mediante el experimento HMBC se confirmó de nueva cuenta la unión de la propilamina al esqueleto de naftoquinona determinándose correlación a tres enlaces entre los hidrógenos del metileno en posición 12 y el carbono en posición 3. Las demás correlaciones encontradas se encuentran indicadas en la **Tabla 3**.

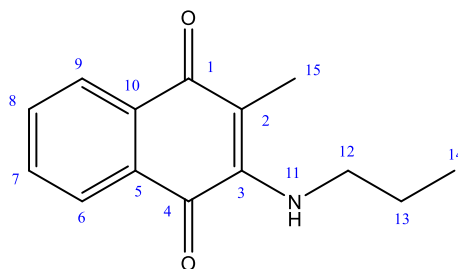


Figura 21. Estructura del compuesto (3).

Tabla 3. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones de HMBC del compuesto (3).

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC
1	-	182.54	-
2	-	112.12	-
3	-	146.20	-
4	-	183.55	-
5	-	133.56	-
6	8.00 dd ($J_1=8, J_2=1$)	126.17	4, 8
7	7.59 ddd ($J_1=8, J_2=8, J_3=1$)	134.25	5, 6*, 10
8	7.49 ddd ($J_1=8, J_2=8, J_3=1$)	131.74	5, 9, 10
9	7.91 dd ($J_1=8, J_2=1$)	125.93	1, 5
10	-	130.32	-
11	5.66 (s, ancho)	-	-
12	3.44 (c)	47.21	3, 13*, 14,
13	1.59 (m)	24.17	12*, 14*, 15
14	0.93 (t)	11.17	12, 13
15	2.16(s)	11.18	1, 2*,3,

^a Desplazamiento en ppm, valores de J en Hz; ^b Desplazamiento en ppm.

* Correlación a dos enlaces.

En el espectro IR (**Anexo 7**) es posible observar una señal en 3330 cm^{-1} correspondiente con el estiramiento del enlace N-H; señales en $2958, 2928$ y 2869 cm^{-1} atribuibles a los estiramientos de los enlaces C-H de la cadena alifática de la amina; una señal en 1519 cm^{-1} correspondiente a la flexión del enlace N-H y una señal en 1085 cm^{-1} atribuible a un estiramiento C-N respectivamente.

En la apertura del epóxido de menadiona con butilamina, se obtuvo la molécula 2-metil-3-(butilamino)naftaleno-1,4-diona (4) (**Figura 22**) con la fórmula condensada $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, la cual presentó en espectrometría de masas (**Anexo 13**) un ión molecular de 243.25 m/z , con un patrón de fragmentación muy similar al del compuesto (3).

En el espectro de RMN ^1H (**Anexo 15**) se observaron las siguientes señales de elementos estructurales que se mantienen del reactivo de partida (menadiona): un singulete en 2.24 ppm que integra para 3 asignable a los hidrógenos del metilo de la posición 16, dos dobles de dobles en 8.08 y 7.99 ppm ($J_1=8\text{ Hz}, J_2=1\text{ Hz}$) correspondientes a los hidrógenos aromáticos 6 y 9 respectivamente y dos dobles de dobles de dobles a 7.67 y 7.56 ppm ($J_1=8\text{ Hz}, J_2=8\text{ Hz}, J_3=1\text{ Hz}$) atribuibles los hidrógenos aromáticos en posición 7 y 8

respectivamente. Las siguientes señales corroboran la unión de la butilamina con el esqueleto de 1,4-naftoquinona: un triplete en 0.97 ppm que integra para 3 asignable a los hidrógenos del metilo en la posición 15, un multiplete en 1.43 ppm que integra para dos atribuible a los hidrógenos del metileno en posición 14, un quintuplete en 1.63 ppm que integra para dos correspondiente a los hidrógenos del metileno en posición 13, un cuarteto en 3.55 ppm que integra para 2 asignable a los hidrógenos del metileno en posición 12 y un singulete ancho en 5.71 ppm correspondiente al protón no acoplado directamente unido al nitrógeno en posición 11. Las señales anteriormente mencionadas se encuentran resumidas en la **Tabla 4**.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 16**) se observan señales a 13.73, 19.87, 32.97 y 45.21 ppm correspondientes a los carbonos 15, 14, 13 y 12 respectivamente que también confirman la unión de la amina al esqueleto de naftoquinona. Las señales más desplazadas a campo bajo del espectro a 183.50 y 182.51 ppm son atribuibles a los carbonos carbonílicos 4 y 1 respectivamente. Las señales a 134.23, 133.55, 131.72, 130.32, 126.15 y 125.92 ppm son asignables a los carbonos del anillo aromático en posición 7, 5, 8, 10, 6 y 9 respectivamente. Las señales a 146.19 y 112.04 ppm son asignables a los carbonos 3 y 2 respectivamente cuyo desplazamiento permite determinar que se encuentran formando parte de un doble enlace, lo que confirma que la instauración volvió a formarse después de la apertura del epóxido, al igual que en el caso de la reacción con propilamina.

Las asignaciones fueron corroboradas mediante experimentos de correlación bidimensional homonuclear: COSY ^1H - ^1H (**Anexo 17**) y heteronuclear: HSQC (**Anexo 18**) y HMBC (**Anexo 19**). Mediante el experimento HMBC se confirmó de nueva cuenta la unión de la butilamina al esqueleto de naftoquinona determinándose correlación a tres enlaces entre los hidrógenos del metileno en posición 12 y el carbono en posición 3. Las correlaciones encontradas se encuentran indicadas en la **Tabla 4**.

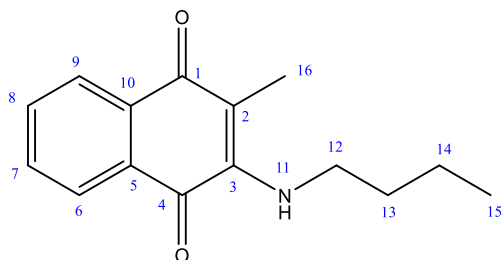


Figura 22. Estructura del compuesto (4).

Tabla 4. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones de HMBC del compuesto (4).

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC
1	-	182.51	-
2	-	112.04	-
3	-	146.19	-
4	-	183.50	-
5	-	133.55	-
6	8.08 dd ($J_1=8, J_2=1$)	126.15	4, 7*, 8, 9
7	7.67 ddd ($J_1=8, J_2=8, J_3=1$)	134.23	5, 6*, 10
8	7.56 ddd ($J_1=8, J_2=8, J_3=1$)	131.72	5, 9*, 10
9	7.99 dd ($J_1=8, J_2=1$)	125.92	1, 6, 7, 8*
10	-	130.31	-
11	5.71 (s, ancho)	-	-
12	3.55 (c)	45.21	3, 13*, 14
13	1.63 (q)	32.97	12*14*, 15
14	1.43 (m)	19.87	12, 13, 15*
15	0.97 (t)	13.73	13, 14*
16	2.24 (s)	11.18	1, 2*, 3

^a Desplazamiento en ppm, valores de J en Hz;. ^b Desplazamiento en ppm.

* Correlación a dos enlaces.

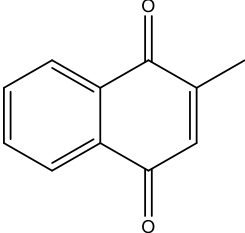
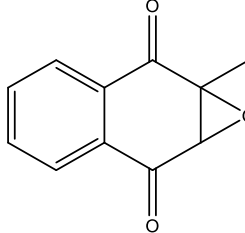
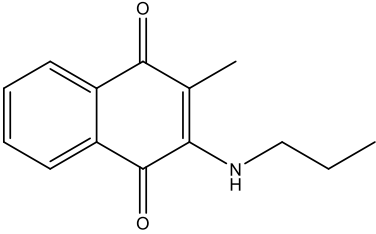
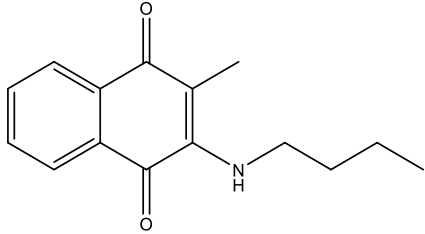
En el espectro IR (**Anexo 14**) es posible observar una señal en 3326 cm^{-1} correspondiente con el estiramiento del enlace N-H; señales en $2960, 2931, 2873\text{ cm}^{-1}$ atribuibles a los estiramientos de los enlaces C-H de la cadena alifática de la amina; una señal en 1517 cm^{-1} asignable a la flexión del enlace N-H y una señal en 1085 cm^{-1} correspondiente con el estiramiento C-N respectivamente.

6.2 Evaluación *in silico* (Docking molecular)

El docking molecular nos permite modelar la interacción entre moléculas pequeñas y proteínas a nivel atómico. Como se mencionó anteriormente, se compone de dos pasos: el algoritmo de muestreo y la función de puntuación. El primero de ellos hace uso de métodos de muestreo para predecir las “poses del ligando”, es decir, sus posibles conformaciones, posiciones y orientaciones con respecto al receptor. Y el segundo se encarga de la estimación de la energía libre de la unión del complejo ligando-receptor para cada una de las poses del ligando generadas expresándola como “score o puntaje”, donde un valor menor significa una interacción más favorable o espontánea (Trott & Olson, 2010). Lo anterior permite discriminar entre las poses con mayor afinidad de las de menor afinidad y comparar la afinidad que presentan distintos ligandos con el mismo blanco. Además, es posible determinar que tanta variación existe entre las poses generadas de un mismo ligando mediante el cálculo de la raíz de la desviación cuadrática media o RMSD (por sus siglas en inglés), la cual es una medida de la distancia promedio entre los átomos de una misma molécula en distintas poses.

En este trabajo se llevó a cabo la comparación entre los puntajes obtenidos del docking molecular (mediante Autodock Vina) entre la enzima synVKOR, homóloga a la VKOR humana, y los siguientes ligandos (**Tabla 5**): los materiales de partida menadiona (1) y epóxido de menadiona (2) y los 2 productos 2-metil- 3-amino-naftoquinona sintetizados (3) y (4).

Tabla 5. Ligandos con los que se realizó el docking molecular y la posterior comparación entre los *scores*.

Materiales de partida	 Menadiona (1)	 Epóxido de menadiona (2)
Compuestos sintetizados	 (3)	 (4)

En el docking con Autodock Vina, los receptores son tratados como estructuras rígidas y los ligandos como estructuras flexibles, siendo posible designar un total de enlaces rotables de 0- 32 (Trott & Olson, 2010). Debido a la alta conjugación de los ligandos utilizados, los únicos enlaces rotables corresponden con los de la cadena alifática del grupo amino para las estructuras (3) y (4), mientras que la menadiona y el epóxido de menadiona no los poseen.

El receptor, la enzima SynVKOR, posee 5 DTM y un dominio tipo Trx del lado periplásmico el cual no es tomado en cuenta en este estudio debido a que no se encuentra presente en la enzima hVKOR. El sitio catalítico (C₁₃₀XXC₁₃₃) se localiza en el DTM4 en una región mayormente hidrófoba.

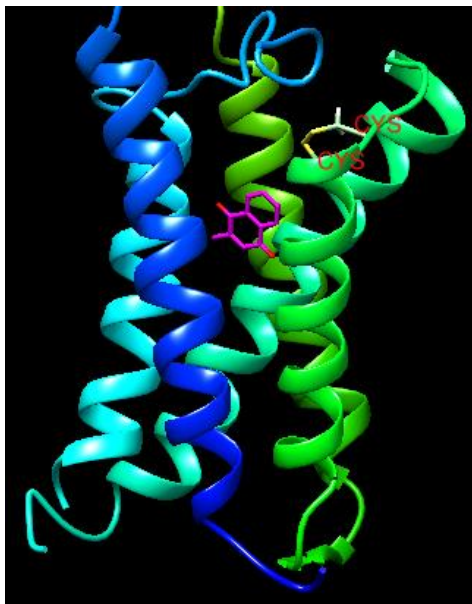
El programa requiere de la especificación del espacio de búsqueda en el receptor, es decir, el espacio dentro del cual se harán variar las poses del ligando. El espacio de búsqueda se delimita mediante una “caja” y debe ser lo suficientemente amplio para que el ligando sea capaz de rotar. Trott & Olson recomiendan una longitud aproximada de 22.5Å en todos los ejes. El espacio de búsqueda utilizado para este estudio, que delimita una región de la enzima que contiene al sitio catalítico, presentaba una longitud en X de 19.7705 Å, en Y de 20.9395 Å y en Z de 27.8564 Å y se mantuvo sin cambios para todos los ligandos analizados permitiendo así la comparación de los resultados obtenidos.

El docking molecular se llevó a cabo por triplicado para cada ligando. Se pidió al programa que arrojará los 10 mejores scores en cada análisis, pertenecientes a las 10 poses del ligando con mejor afinidad por el receptor según los criterios de la función de puntuación. Los 10 mejores scores de cada repetición con cada ligando y el RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas se muestran en los **Anexos 21- 24**. Es destacable que de manera global los productos presentan RMSD's menores que sus precursores, lo que indica una afinidad más selectiva por el sitio de unión.

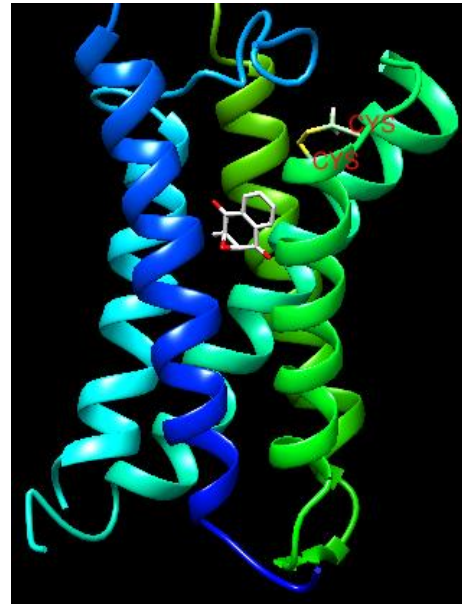
De los puntajes obtenidos se tomó el mejor de cada repetición para hacer un promedio. El resultado se muestra a continuación.

Tabla 6. Mejores puntajes para cada ligando analizado

Ligandos	Puntajes o scores (kcal/mol)
(1)	-7.7
(2)	-7.5
(3)	-7.6
(4)	-7.8



a) Menadiona (1)



b) Epóxido de menadiona (2)



c) (3)



d) (4)

Figura 23.

Localización del ligando en su mejor pose en relación al sitio catalítico de synVKOR. Los DTM 1-5 se encuentran coloreados de tonos verdes y azules para facilitar su distinción, se omitió el dominio tipo Trx. Los residuos de cisteína C130 y C133 del sitio catalítico de la enzima se encuentran etiquetados.

Se evaluó a detalle la pose con la mejor puntuación de cada ligando y su cercanía con la región catalítica CXXC (**Figura 23**). Se estableció un “centroide” para el ligando y para el sitio catalítico y se determinó la distancia entre ellos. Para el ligando menadiona la distancia calculada fue de 10.1 Å, para el ligando (2) fue de 10.3 Å, para el ligando (3) de 7.4 Å y para el ligando (4) de 8.1 Å. Es notable que los precursores (1) y (2) se encuentran poco más alejados del sitio catalítico que los productos (3) y (4). De igual manera, puede observarse que la orientación de los ligandos con respecto a la enzima varía y más entre precursores y productos.

Al analizar los puntajes presentados en la **Tabla 5** es destacable que:

La molécula epóxido de menadiona (2) mostró el mayor puntaje, inclusive mayor que el de la menadiona, es decir, su interacción con la enzima es menos favorable que la de los demás compuestos. El hecho de que el compuesto (2) presente una interacción menos favorable que su precursor (1) parece indicar que la presencia del anillo oxirano, el cual se encuentra fuera del plano en relación con el resto de la molécula, dificulta la interacción con la enzima, por lo menos en la conformación en la que se encuentra cristalizada.

El producto (3) presentó un puntaje mayor que la menadiona, volviendo cuestionable el papel del grupo amino en la interacción con la enzima por lo menos de manera preliminar con los ligandos utilizados. Por otro lado, el producto (4) exhibió un puntaje menor que el de la menadiona y el compuesto (3). La elongación de la cadena hidrocarbonada unida al grupo amino parece favorecer la interacción con la enzima. Sin embargo, tomando en cuenta el resultado del producto (3), parece ser necesaria determinada longitud de cadena para que esta interacción pueda darse de la mejor manera. Lo anterior resulta razonable tomando en cuenta que los ligandos naturales de las enzimas VKOR presentan una larga cadena hidrocarbonada en su estructura.

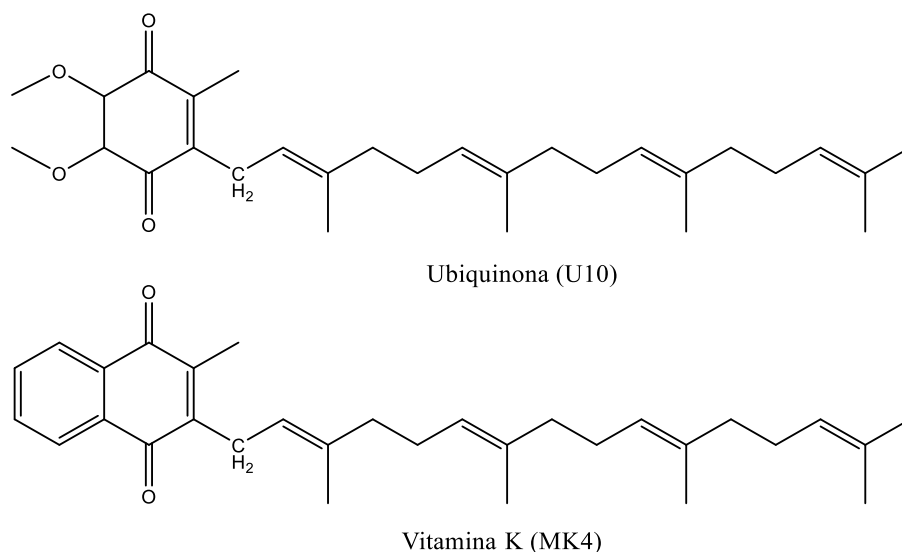


Figura 24. Estructura química de los ligandos naturales ubiquinona y vitamina K de las enzimas synVKOR y hVKOR respectivamente

La Vitamina K, y los ligandos (3) y (4) pueden considerarse bioisómeros si no se toma en cuenta la longitud de la cadena en posición 3 de su estructura. Según la ley de desplazamiento de hidruro de Grimm, los átomos NH son comparables a un CH₂, sin embargo, el grupo NH le confiere la capacidad a la molécula de formar puentes de hidrógeno.

Según el análisis con UCSF Chimera ni el ligando (3) ni el ligando (4) en todas las poses generadas forman puentes de hidrógeno con la enzima. Al analizar la hidrofobicidad de los residuos que circundan a los ligandos (mediante un código de colores en el programa UCSF Chimera) puede apreciarse que son en su mayoría hidrófobos. Las distancias entre el grupo NH del ligando y los residuos capaces de generar esta interacción son mayores a los 3.5 Å., por lo que de forma preliminar en este estudio no fue posible comprobar su aportación en la interacción con la enzima.

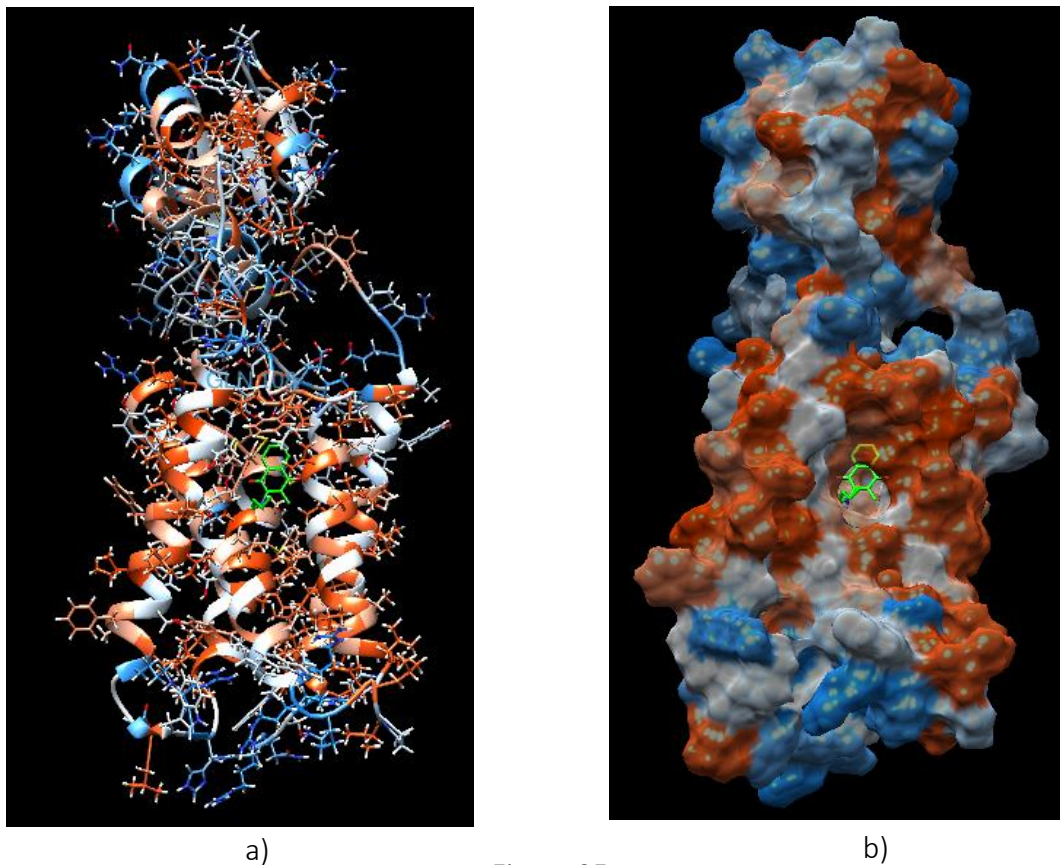


Figura 25.

Interacción entre ligando (4) (estructura color verde) y la enzima synVKOR que muestra mediante un código de colores las zonas hidrófobas e hidrófilas en su estructura: Azul residuos polares, blanco residuos polaridad media, rojo-naranja para residuos apolares. a) Representación de átomos. B) Representación de superficie.

Analizando la **Figura 25**, es posible notar que aquellos residuos que se encuentran en la zona periplásmica y citoplásmica de la enzima, como aquellos que conforman al dominio tipo Trx, son mayoritariamente hidrófilos, al contrario de los de la región transmembranal en donde se lleva cabo la interacción del ligando con la enzima. Seguramente las fuerzas de atracción débiles como las de Van der Waals, e hidrófobas son los principales contribuyentes en la interacción entre ligandos y receptor. Algunos de los enlaces hidrófobos involucrados se encuentran representados en la **Figura 26**.

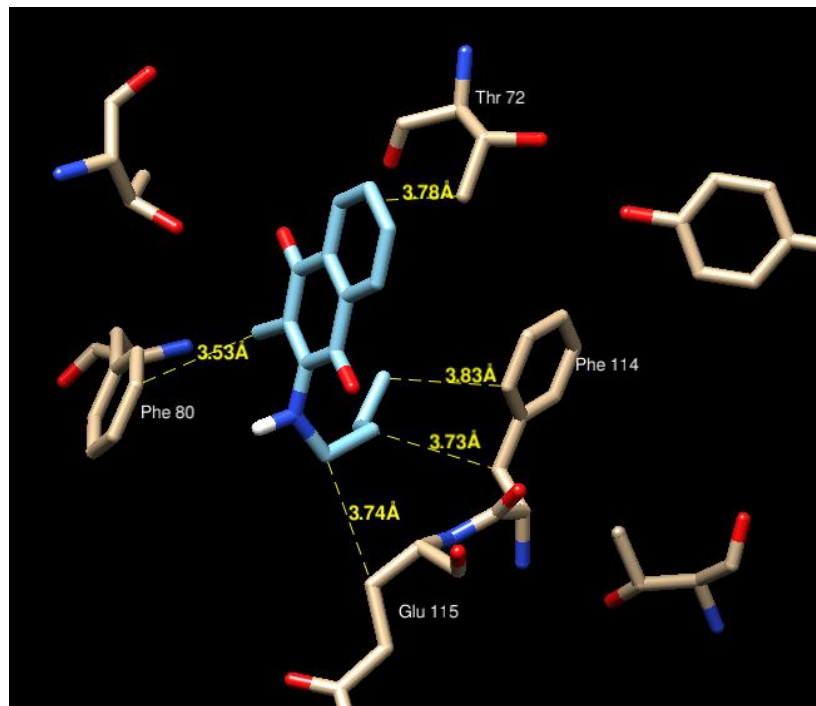


Figura 26. Enlaces hidrófobos involucrados en la interacción entre el ligando (4) y el receptor.

Además, se llevó a cabo una comparación entre los *scores* de las moléculas evaluadas en este trabajo con los de la 2-(propilamino)naftaleno-1,4-diona (5) y la 2-(butilamino)naftaleno-1,4-diona (6) (Figura 27), sintetizadas en un trabajo previo del mismo grupo de investigación.

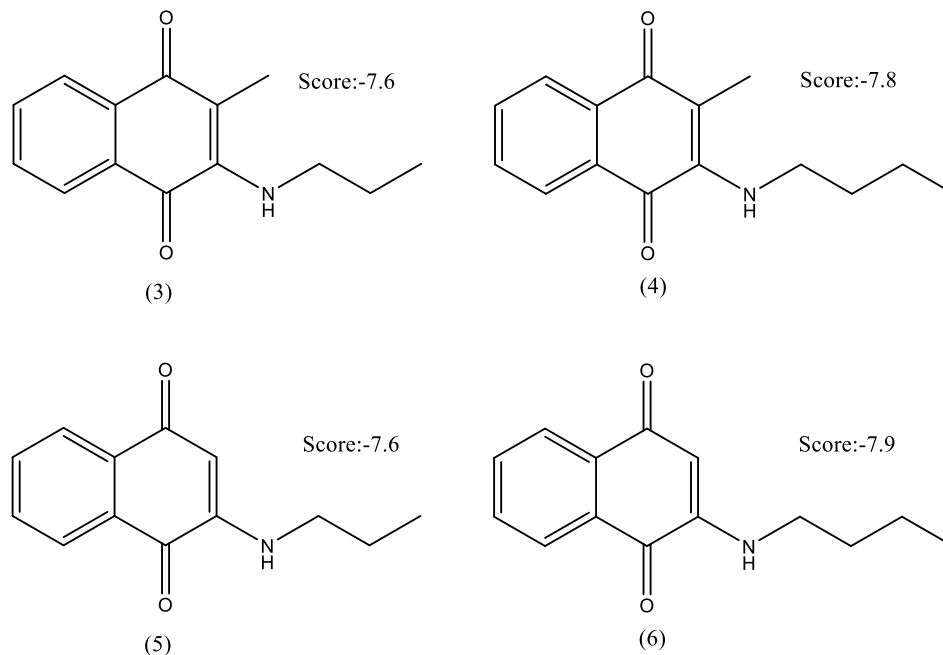


Figura 27. Compuestos sintetizados en un trabajo de investigación previo con estructura relacionada.

Comparando las estructuras de los compuestos (3) y (5) y de los compuestos (4) y (6), es posible notar que la única diferencia entre ellas es la presencia del grupo metilo en posición dos en los compuestos sintetizados.

En cuando a los *scores*, puede observarse que no existe diferencia alguna entre el puntaje de los compuestos (3) y (5). Entre los compuestos (4) y (6), el compuesto (6) es el que presenta mejor interacción con la enzima.

Mediante la adición de un grupo metilo en el programa UCSF Chimera a las estructuras (5) y (6) (para igualar su número de átomos al de las moléculas (3) y (4) respectivamente) fue posible determinar el RMSD de los compuestos (3) y (5) y de los compuestos (4) y (6) en sus mejores poses, encontrándose un valor de 5.984 Å y 6.868 Å respectivamente.

Aunque los *scores* no varían significativamente, el valor de RMSD observado nos permite determinar que existe una diferencia considerable entre las poses de los ligandos comparados, esto muy probablemente asociado a la presencia del grupo metilo en las moléculas (3) y (4).

7. CONCLUSIONES

En la primera etapa propuesta de la ruta de síntesis de este trabajo, se llevó a cabo una reacción de oxidación del compuesto Menadiona (1), que generó un producto intermedio de tipo epóxido (2) caracterizado por técnicas espectroscópicas y de espectrometría de masas.

La aminólisis del epóxido de menadiona (2) con los agentes nucleofílicos propilamina y butilamina, condujo a los productos 2-metil-3-(propilamino)naftaleno-1,4-diona (3) y 2-metil-3-(butilamino)naftaleno-1,4-diona (4). Sus estructuras fueron confirmadas por experimentos de resonancia magnética nuclear de correlación homonuclear COSY ^1H - ^1H , y heteronuclear HSQC y HMBC.

De la evaluación *in silico* mediante el docking molecular entre la enzima synVKOR, los productos obtenidos (3) y (4) y los materiales de partida, el epóxido de menadiona (2) fue el que mostró menor afinidad con la enzima seguido por el compuesto (3).

Al comparar los puntajes de los productos sintetizados y los compuestos (5) y (6) descritos en un trabajo previo, no se encontraron diferencias entre los puntajes de los compuestos (3) y (5). Las diferencias entre los puntajes de (4) y (6) fue mínima, presentando el compuesto (6) un mejor puntaje.

TRABAJO FUTURO

Se sugiere desarrollar una metodología sintética que permita la obtención eficiente de compuestos aminoalcoholes derivados de menadiona, para establecer si estas funciones químicas repercuten en la actividad *in silico* y biológica de estos compuestos frente a la enzima VKOR.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Betts, R., Murphy, S., & Johnson, C. (2004). Enzymatic desymmetrization/resolution of epoxydiols derived from 1,4-naphthoquinone, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone and 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2853-2860.
- Bonollo, S., Lanari, D., & Vaccaro, L. (2011). Ring-Opening of Epoxides in Water. *European Journal of Organic Chemistry*, 2587-2598.
- Cantú, R., Palomo, L., Nery, S., López, L., & Barajas, L. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *DES Ciencias Biológicas Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo*, 48-56.
- Chougala, B., Samundeeswari, S., Holiyachi, M., Shastri, L., Dodamani, S., Jalalpure, S., . . . Sunagar, V. (2017). Synthesis, characterization and molecular docking studies of substituted 4-coumarinylpyrano[2,3-c]pyrazole derivatives as potent antibacterial and anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101-116.
- Delgado, A., Minguillón, C., & Joglar, J. (2013). *Introducción a la química terapéutica*. Barcelona: Diaz de Santos.
- Dhirajlal, D. (2006). Medicinal Chemistry. In *Studies on clinically important heterocyclic compounds* (pp. 7-20). Gujarat: Bhavnagar University.
- Dias de Rezende, L., Fumagalli, F., Schiavon Bortolin, M., Garcia de Oliveira, M., Helder de Paula, M., Ferrerira de Andrade-Neto, V., & Silva Emery, F. (2013). In vivo antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 4583-4586.
- Durán, L., Gamez, P., van Brussel, J., & Reedijk, J. (2003). Zinc-catalyzed aminolysis of epoxides. *Tetrahedron Letters*, 6025-6027.
- El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R., Vuorela, P., Urtti, A., & Vuorela, H. (2011). The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, 353-370.
- Fina, B., Lobarte, M., & Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones en Osteología*, 283-288.

- Francisco, A., Casellato, A., & Vargas, M. (2008). New Synthetic Routes for the Preparation of 2-Amino-3-hidroxi-1,4-naftoquinona. *Organic Preparations and Procedures International*, 323-326.
- Garcia-Frade, L., & Cuellar-Gamboa, L. (2015). Actualidades en trombosis. *Medicina interna de México*, 103-114.
- Hassan, G. (2013). Menadione. In *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 38* (pp. 227-313). Elsevier.
- Huang, L.-J., Chang, F.-C., Lee, K.-H., Wang, J.-P., Teng, C.-M., & Kuo, S.-C. (1998). Synthesis and Antiplatelet, Antiinflammatory, and Antiallergic Activities of Substituted 3-Chloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and Related Compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2261-2269.
- Husu, B., Kafka, S., Kadune, Z., & Tisler, M. (1988). Amination of Naphtoquinones with Azidotrimethylsilane. *Monatshefte fiir Chemie*, 215-222.
- Koshland, D. (1994). The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie International Edition*, 2375-2378.
- Leyva, E., Loredó-Carrillo, S., López, L., Escobedo-Avellaneda, E., & Navarro-Tovar, G. (2016). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. *Revista de química teórica y aplicada*, 36-50.
- Mahapatra, A., Tshikalange, T., Meyer, J., & Lall, N. (2012). Synthesis and HIV-1 Reverse transcriptase inhibition activity of 1,4-naphthoquinone derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*, 883-887.
- Marmor, S. (1962). The epoxidation of certain α,β -unsaturated ketones with sodium hypochlorite. *Notes*, 250-251.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 146-157.
- Morris, G., & Lim-Wilby, M. (n.d.). Chapter 19: Molecular Docking. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 365-382). Totowa, NJ: Human Press.
- Nam, S. (2005). *The mechanism of Lewis acid catalysed epoxide rearrangement to aldehyde*. University of Canterbury.

- O'Brien, P. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 1-41.
- Oldenburg, J., Watzka, M., Rost, S., & Muller, C. (2007). VKORC1: molecular target of coumarins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1-6.
- Olson, R. (1984). The function and metabolism of vitamin K. *Annual reviews*, 281-337.
- Parker, R., & Isaacs, N. (1959). Mechanisms of epoxide reactions. *National Research Council*, 737-799.
- Rodak, B. (2004). *Hematología- Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Buenos Aires: Médica panamericana.
- Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., & Lensink, M. (2016). Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 1-11.
- Sainsbury. (1995). *Second Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Salmon-Chemin, L., Buisine, E., Yardley, V., Kohler, S., Debreu, M.-A., Landry, V., . . . Davioud-Charvet, E. (2001). 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 548-565.
- Shinde, S., Said, M., Surwase, T., & Kumar, P. (2015). Mild regioselective alcoholysis and aminolysis of epoxides catalyzed by zirconium(IV) oxynitrate. *Tetrahedron Letters*, 5916-5919.
- Sousa, S., Fernandes, P., & Ramos, M. (2006). Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 15-26.
- Stafford, D. (2005). The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1873-1878.
- Tandon, V., Chhor, R., Singh, R., Rai, S., & Yadav, D. (2004). Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1079-1083.

- Tandon, V., Yadav, D., Singh, R., Vaish, M., Chaturvedi, A., & Shukla, P. (2005). Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3463-3466.
- Tichler, M. (1960). Impact of research on the growth of medicinal chemistry. *Merck Sharp & Dohme Research Laboratories*, 195-201.
- Tie, J.-K., & Stafford, D. (2016). Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 236-247.
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational Chemistry*, 455-461.
- Van Horn, W. (2013). Structural and functional insights into human vitamin K epoxide reductase and vitamin K epoxide reductase-like1. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 357- 372.

9. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

9.1 Instrumentación

9.1.1 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 CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s=singulete; bs=singulete ancho; d=doblete; t=triplete; c=cuarteto; q=quintuplete; dd=doble de doblete; td=triple de doblete; m=multiplete.

9.1.2 Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific modelo Nicolet is5. Al ser un equipo ATR (reflectancia total atenuada), la muestra se colocó directamente sobre el equipo, sin utilizar ningún tipo de celda. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

9.1.3 Espectrometría de Masas

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

9.2 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.

9.3 Técnicas cromatográficas

9.3.1 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 así como p-anisaldehído y óleum como reveladores químicos.

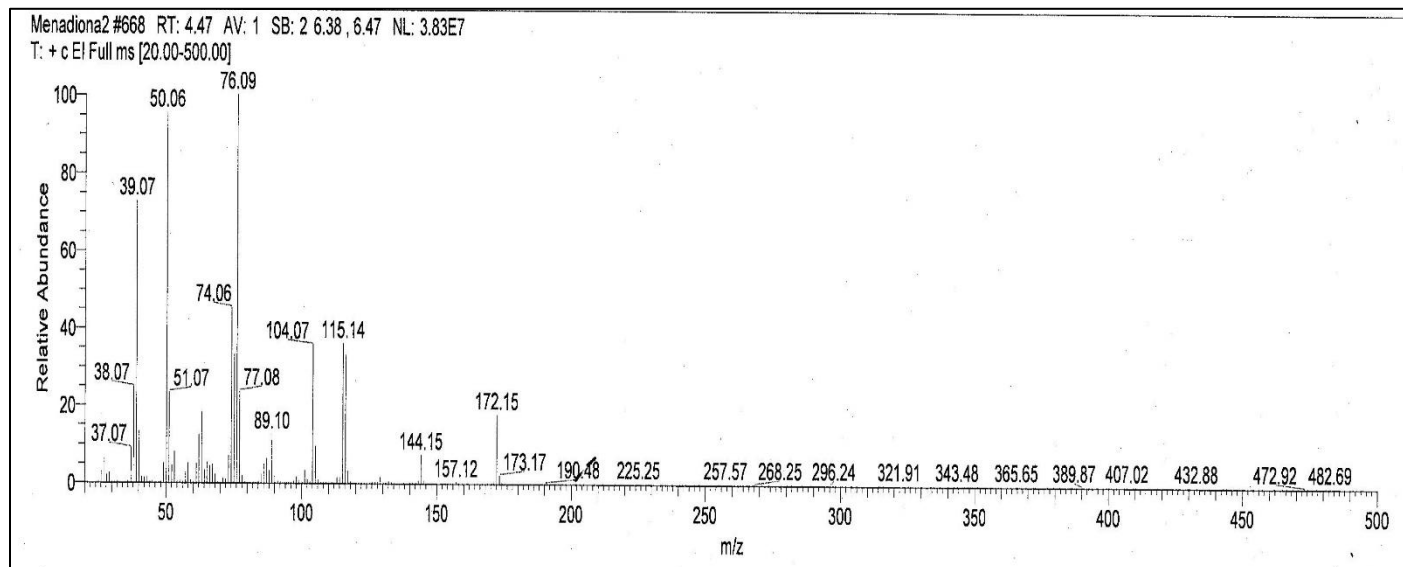
9.3.2 Cromatografía de columna

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

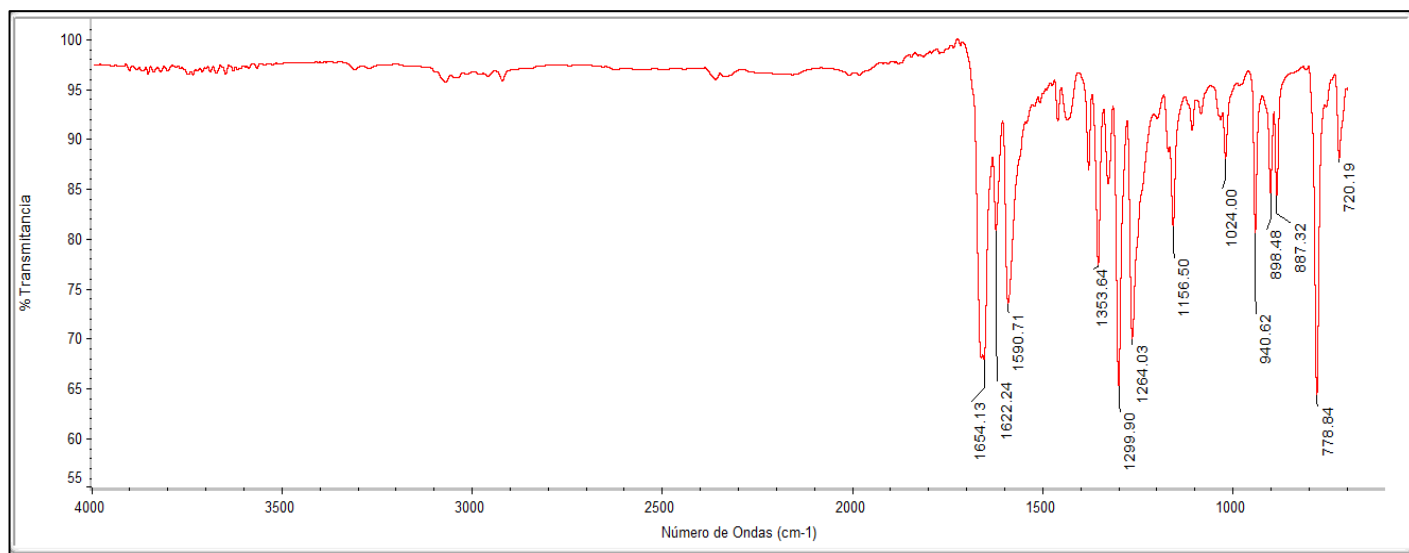
9.3 Programas informáticos

Se empleó el programa ChemBioDraw Ultra de Perkin Elmer para otorgarle los nombres sistemáticos a los productos sintetizados. Para los experimentos de docking y la respectiva preparación de ligandos y receptor se emplearon los programas UCSF Chimera 1.11.2 de University of California, San Francisco; AutoDock Tools 1.5.6 de The Scripps Research Institute; y Vega ZZ 3.1.1.42.

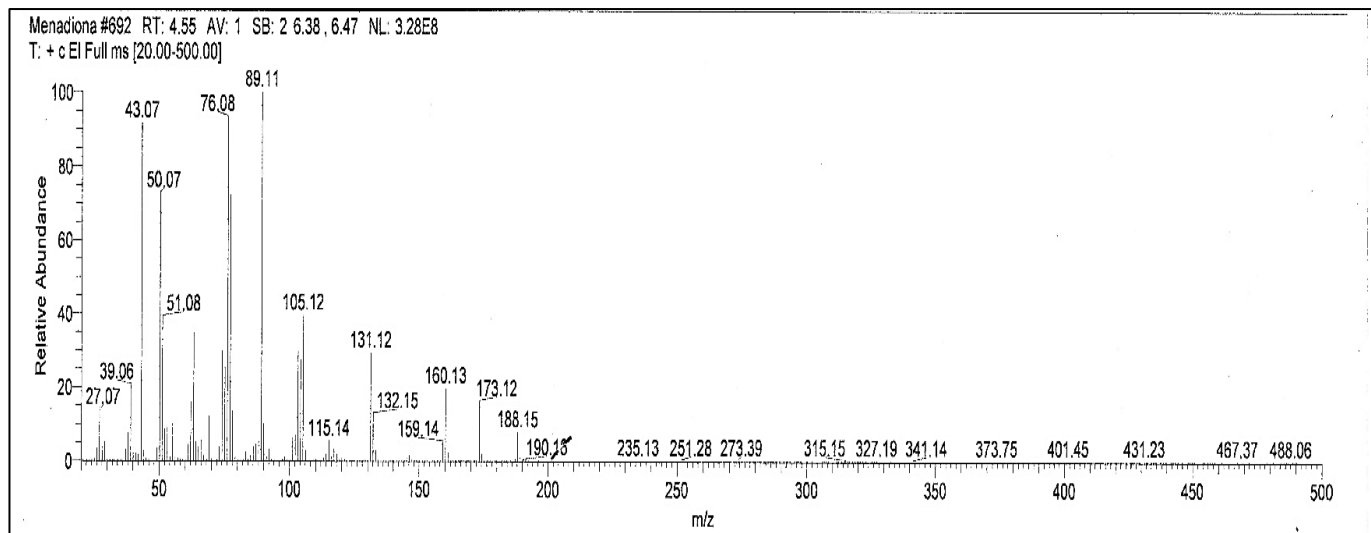
10. ANEXOS



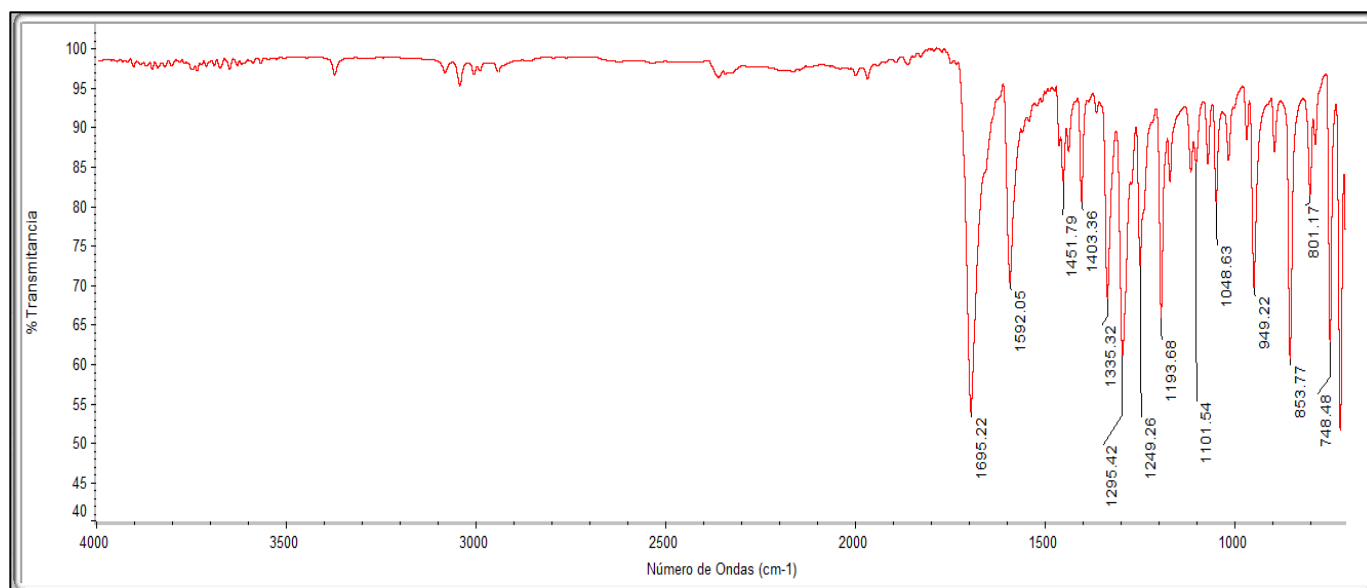
Anexo 1. Espectro de masas del compuesto menadiona (1).



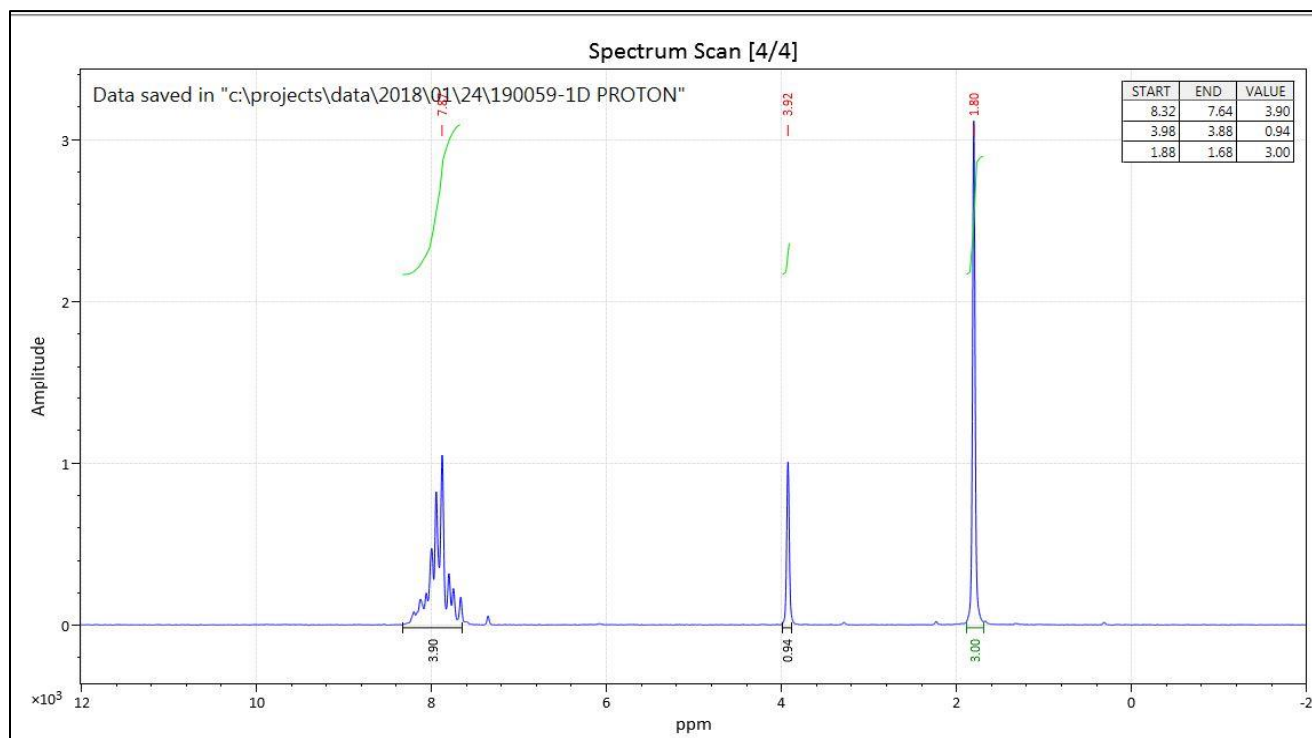
Anexo 2. Espectro de IR del compuesto menadiona (1).



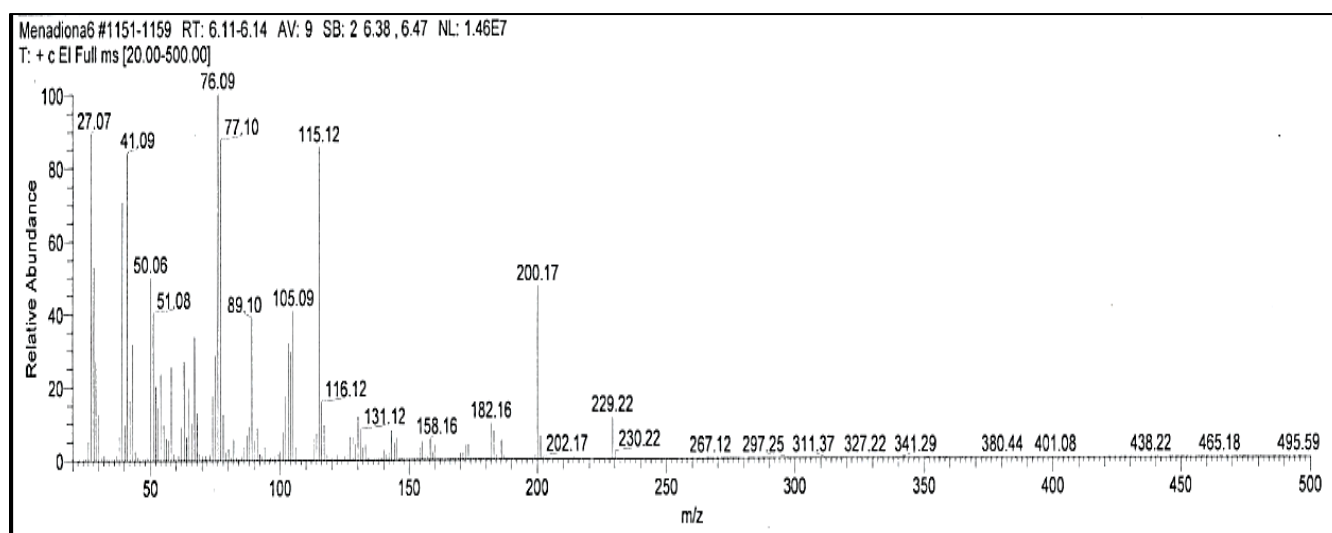
Anexo 3. Espectro de masas del epóxido de menadiona (2).



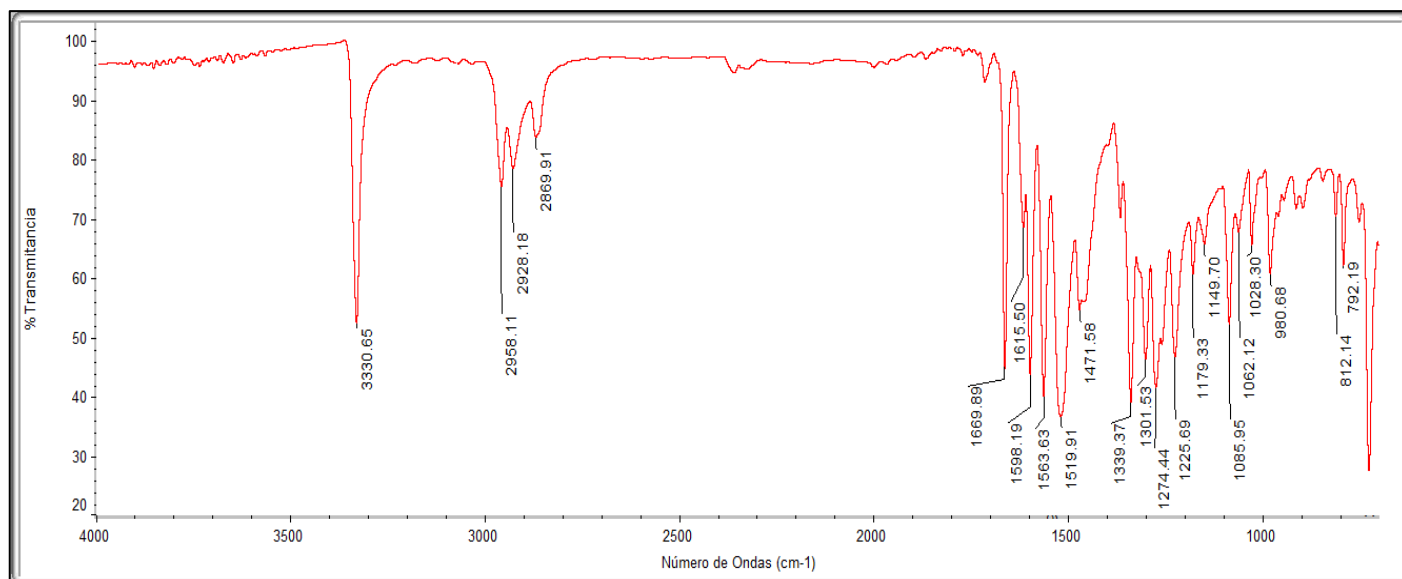
Anexo 4. Espectro de IR del epóxido de menadiona (2).



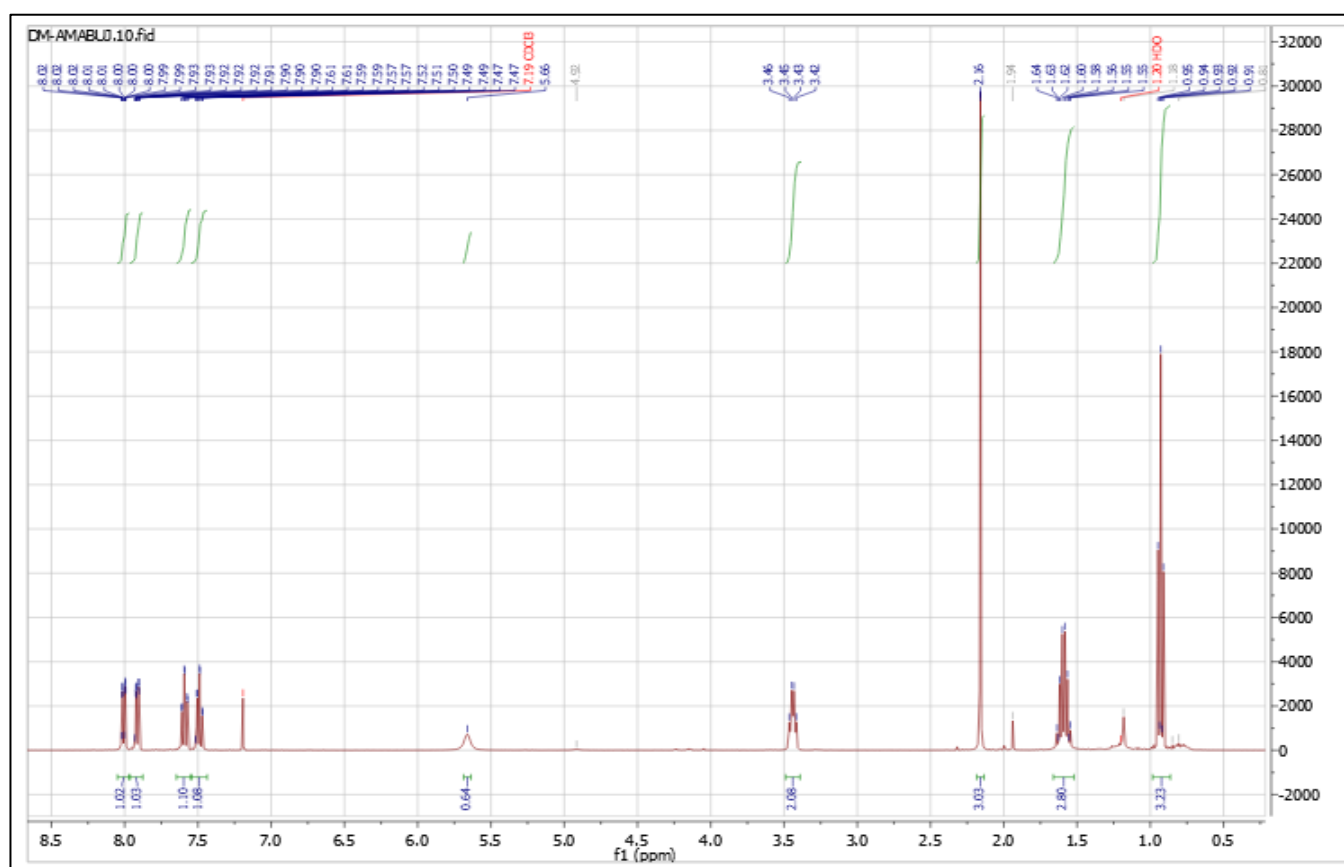
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H de 60 MHz del epóxido de menadiona (2).

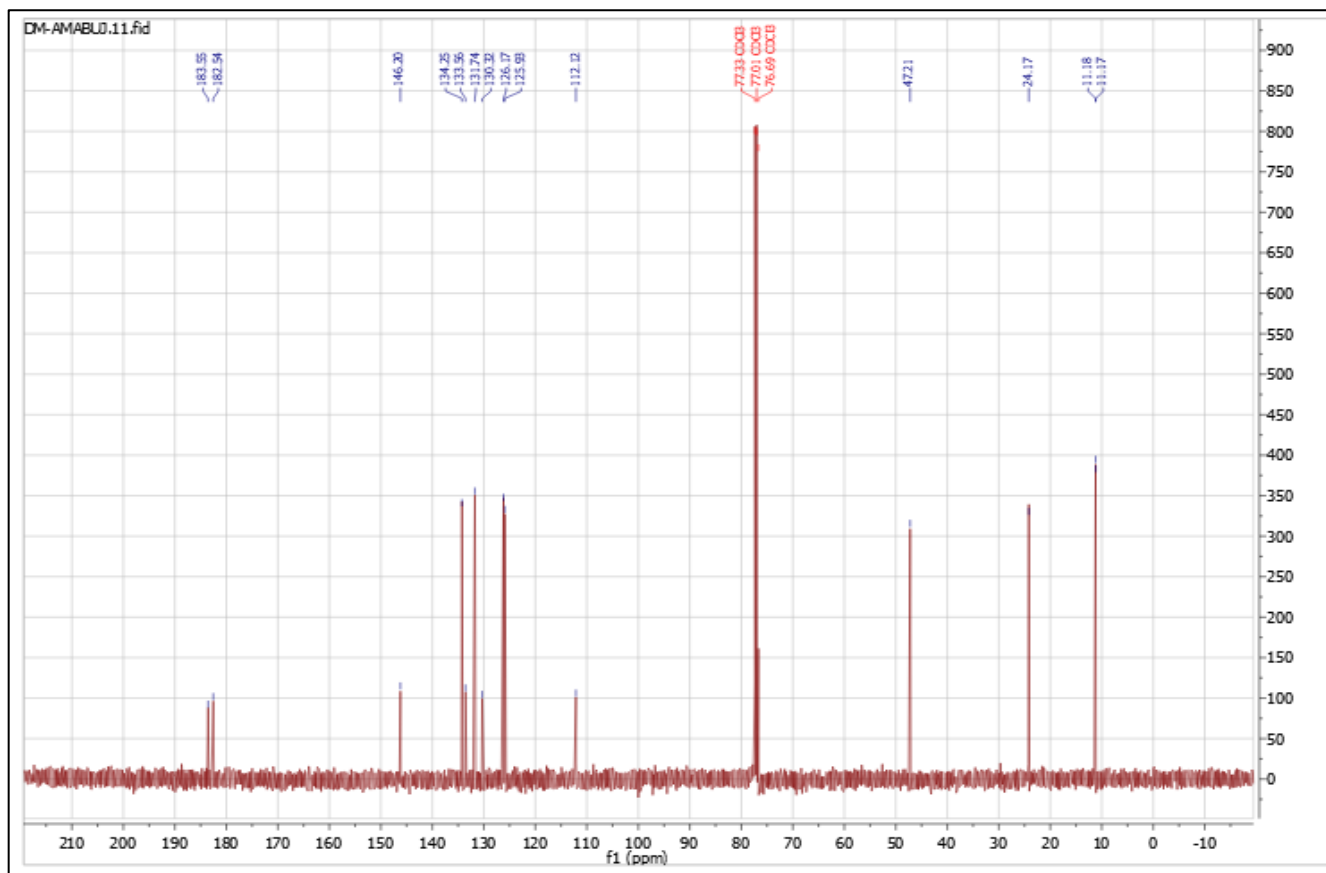


Anexo 6. Espectro de masas del compuesto (3).

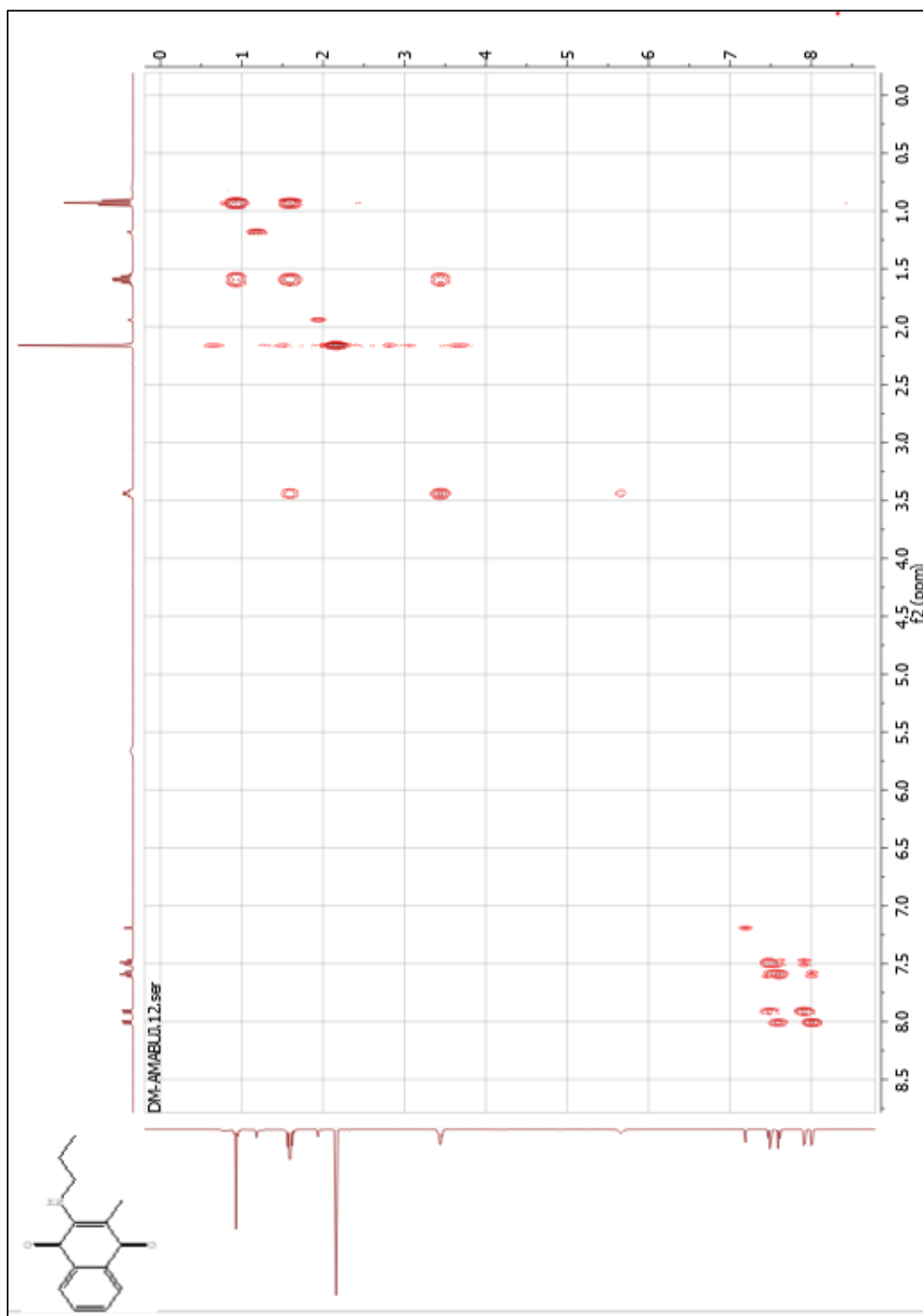


Anexo 7. Espectro de IR del compuesto (3)

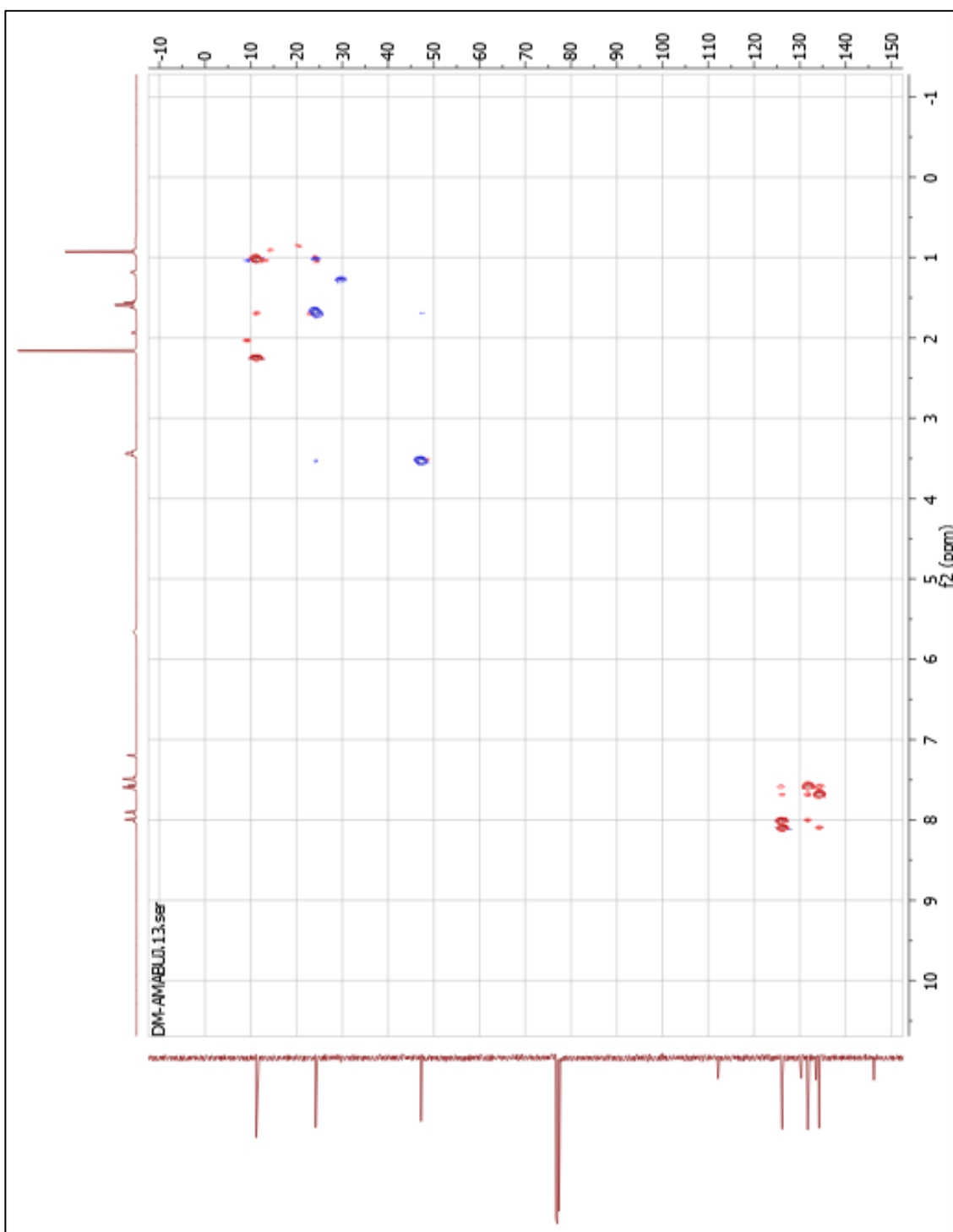
Anexo 8. Espectro de RMN ¹H de 400 MHz del compuesto (3).



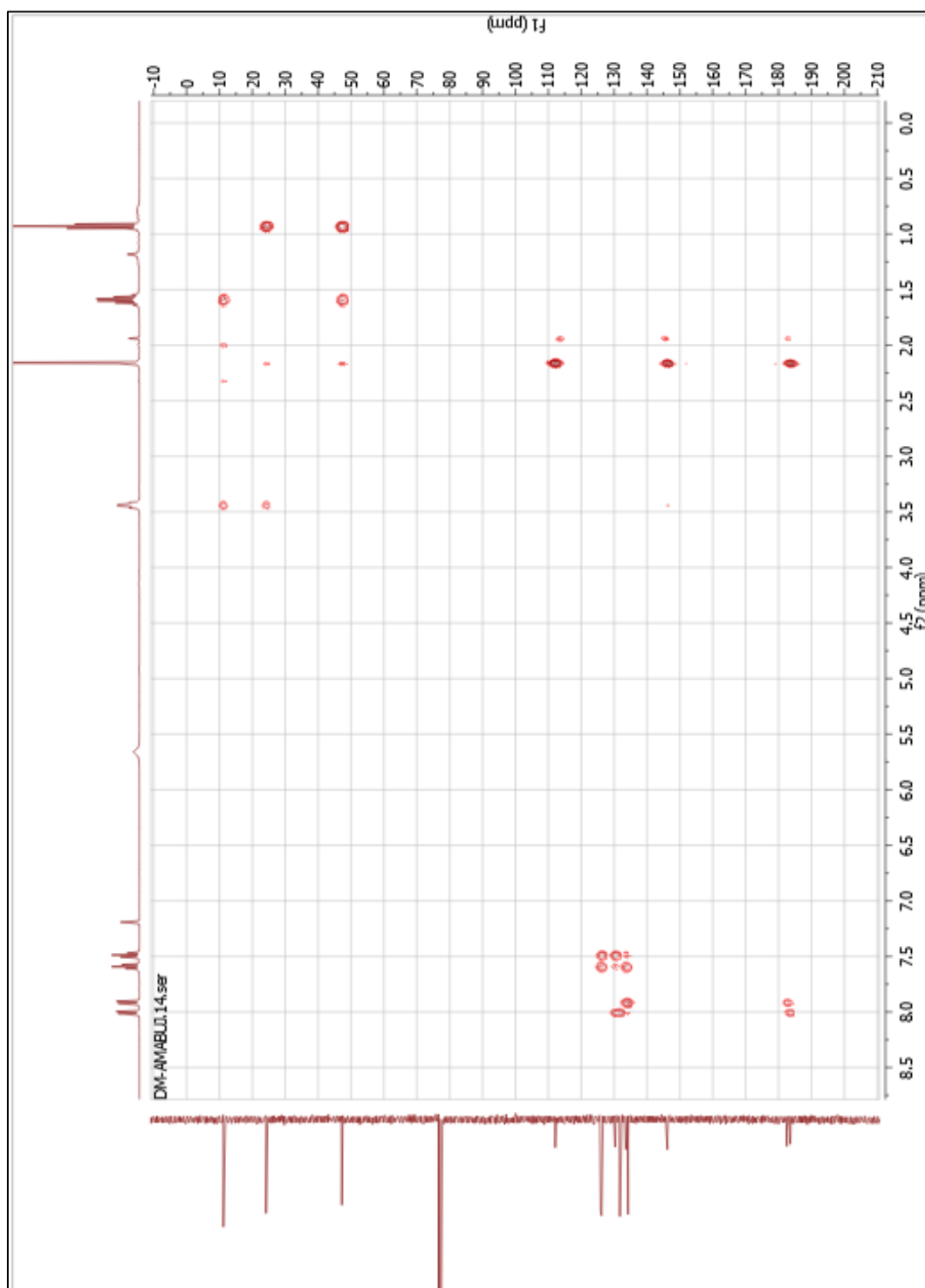
Anexo 9. Espectro de RMN -¹³C de 400 MHz del compuesto (3).



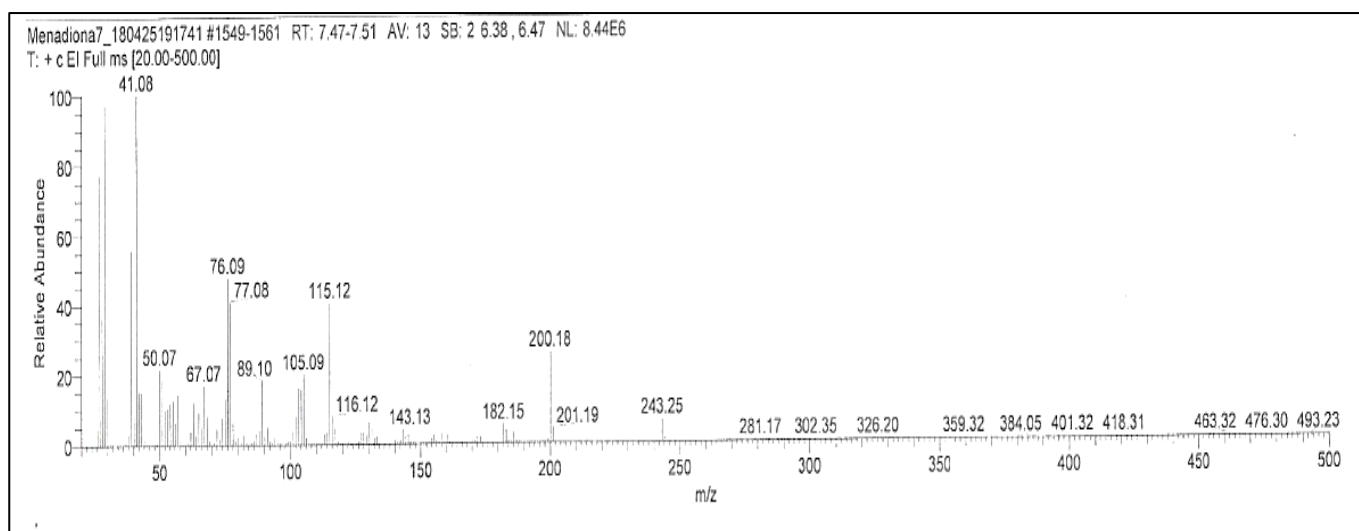
Anexo 10. Espectro de RMN bidimensional COSY del compuesto (3).



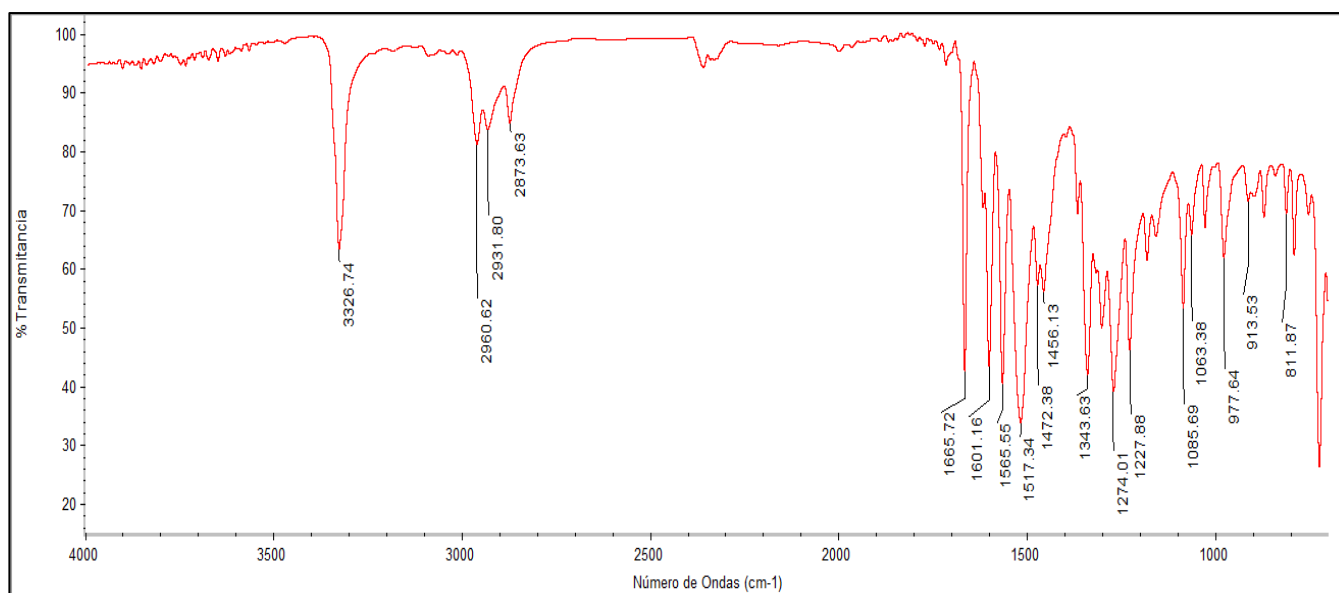
Anexo 11. Espectro de RMN bidimensional HSQC del compuesto (3).



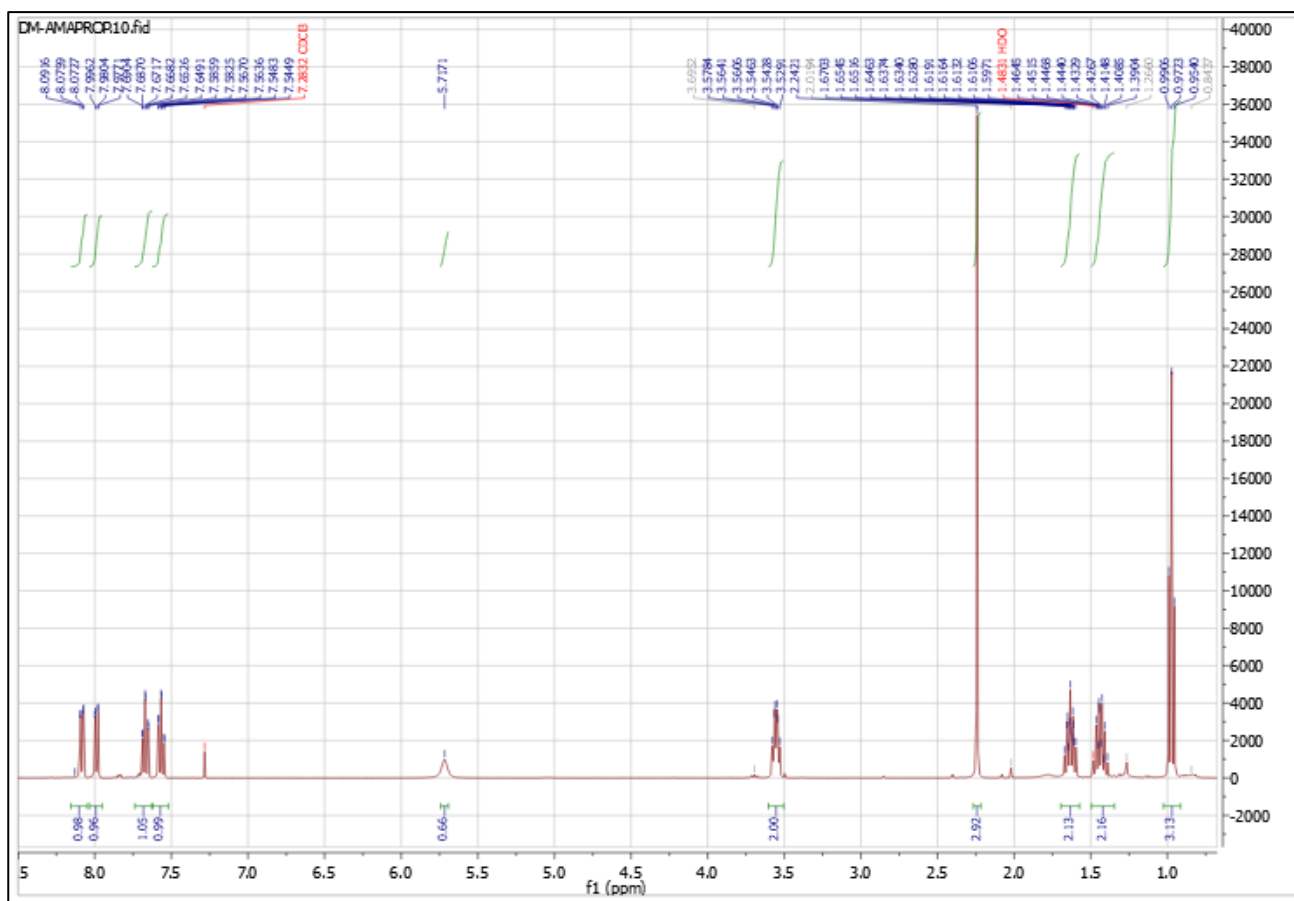
Anexo 12. Espectro de RMN bidimensional HMBC del compuesto (3).



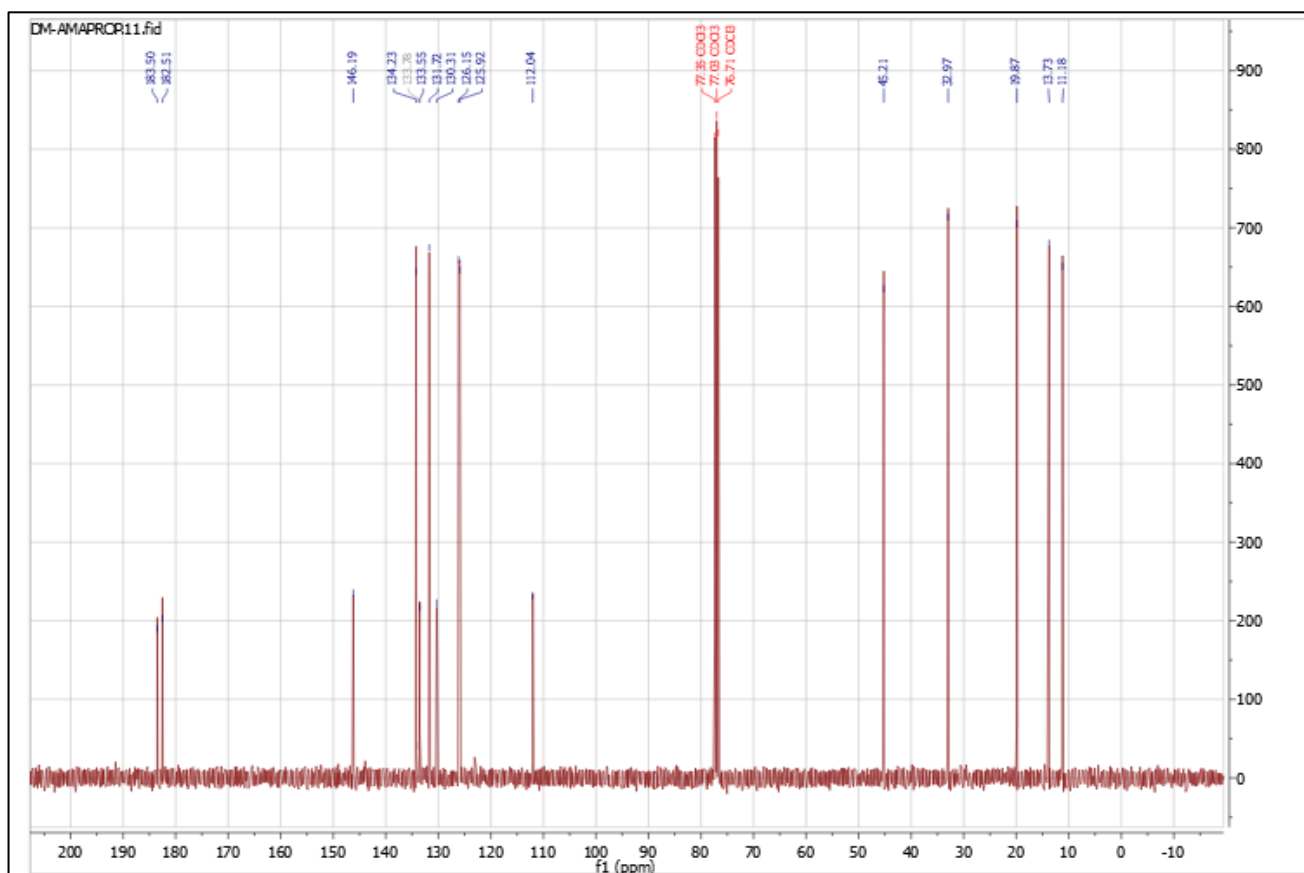
Anexo 13. Espectro de masas del compuesto (4).



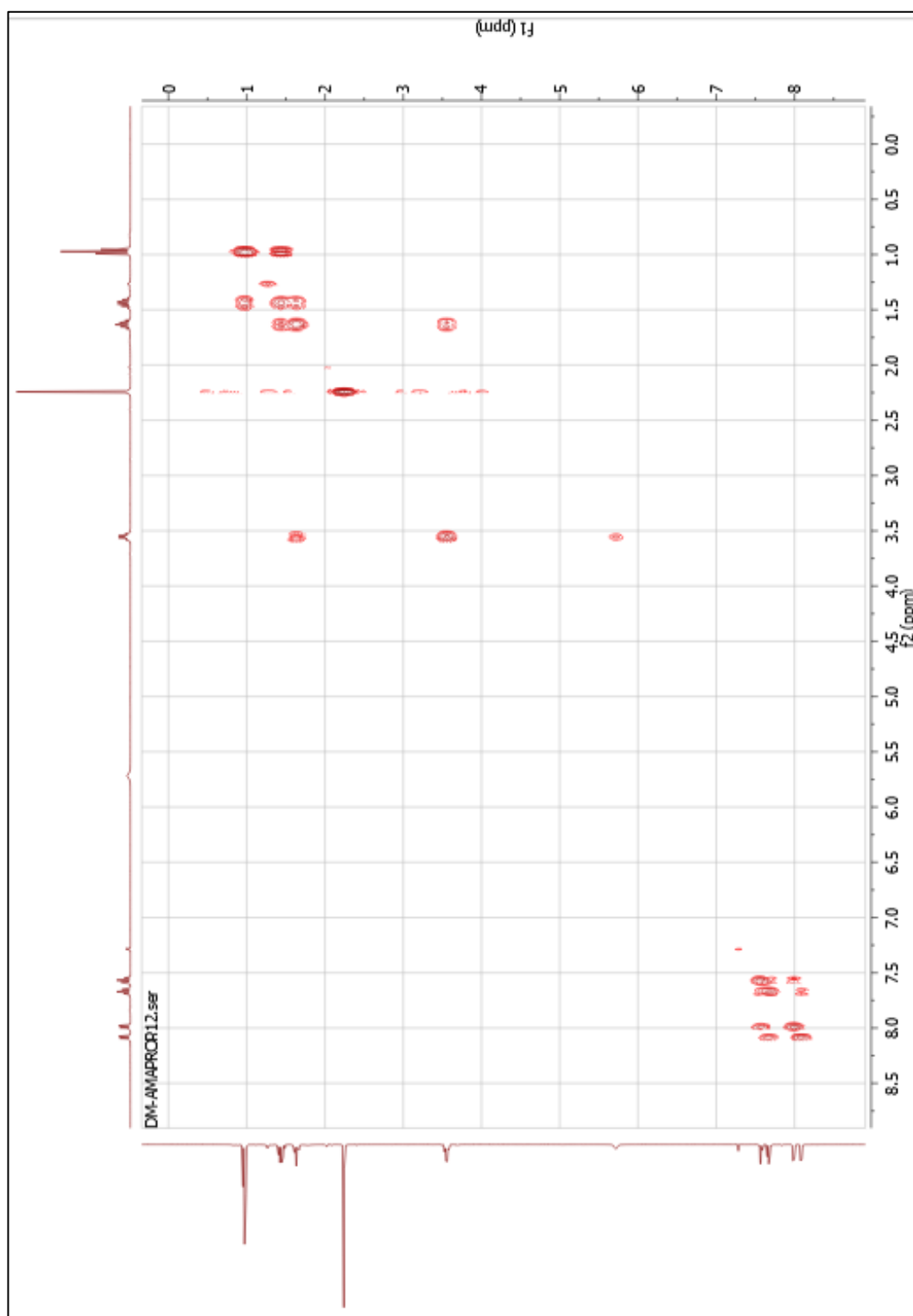
Anexo 14. Espectro de IR del compuesto (4).



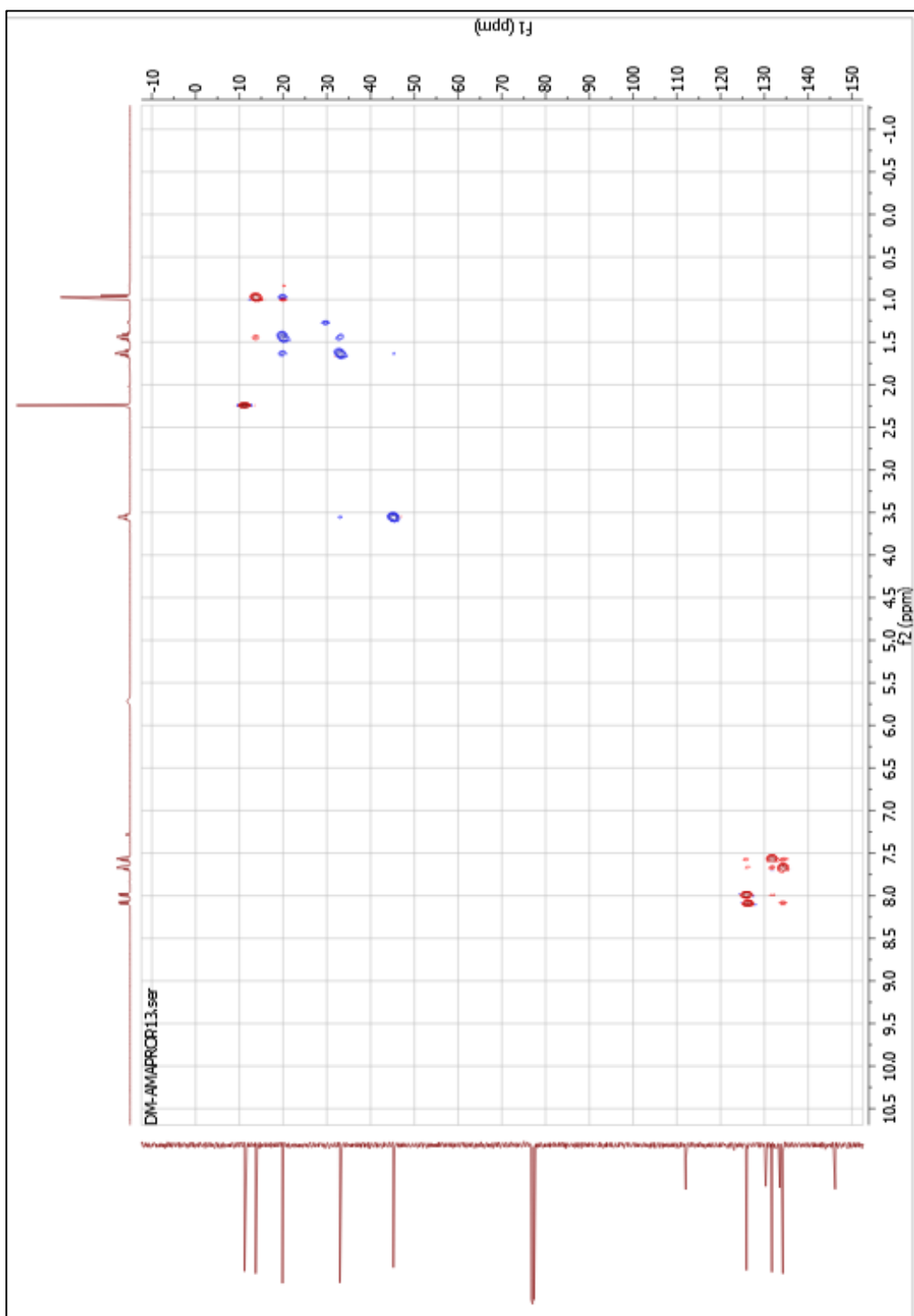
Anexo 15. Espectro de RMN ^1H de 400 MHz del compuesto (4).



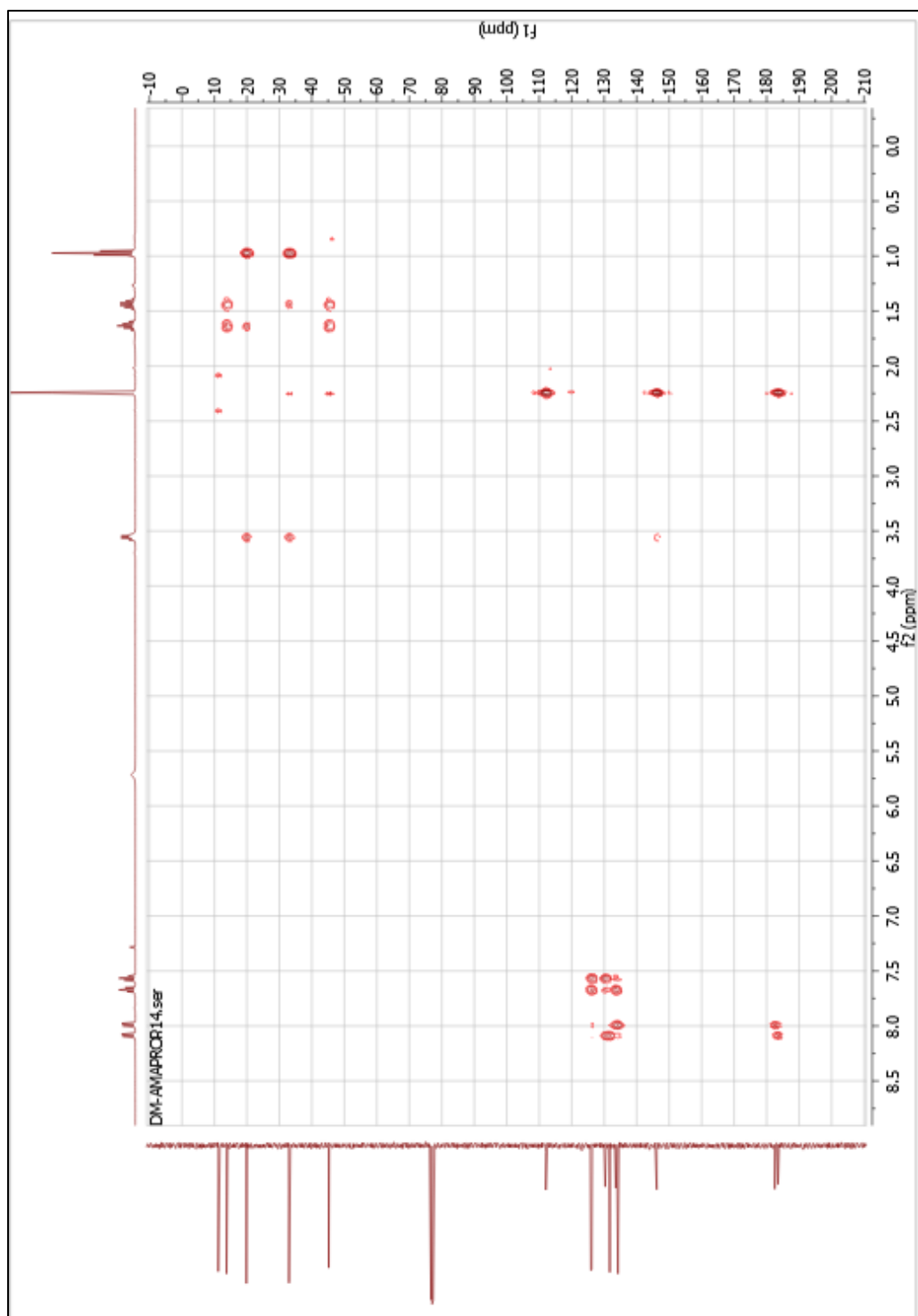
Anexo 16. Espectro de RMN ¹³C de 400 MHz del compuesto (4).



Anexo 17. Espectro de RMN bidimensional COSY del compuesto (4).



Anexo 18. Espectro de RMN bidimensional HSQC del compuesto (4).



Anexo 19. Espectro de RMN bidimensional HMBC del compuesto (4).

Anexo 20. Energía potencial inicial y final de los ligandos después del minimizado de energía y RMSD de la molécula inicial contra la final.

Ligando	Energía potencial		RMSD*
	Inicial (kJ/mol)	Final (kJ/mol)	
Menadiona	99.745	43.0758	0.008246
(2)	230.345	146.151	0.095059
(3)	242.984	139.118	0.157009
(4)	228.771	144.540	0.036591

Anexo 21. Mejores scores del ligando menadiona (1) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.

Repetición #1		Repetición #2		Repetición #3	
Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD
-7.7	0	-7.7	0	-7.7	0
-7.5	1.115	-7.5	1.14	-7.5	1.153
-7.4	1.339	-7.4	1.363	-7.4	1.328
-7.3	6.501	-7.2	6.439	-7.2	6.395
-7.2	6.402	-7.2	1.171	-7.1	3.023
-7.1	3.158	-7.2	1.206	-7	5.935
-7.1	3.039	-7.1	3.151	-7	5.863
-7	6.107	-7.1	3.013	-6.9	4.342
-7	5.846	-7	2.976	-6.9	5.252
-6.9	4.384	-7	5.955	-6.9	2.512

Anexo 22. Mejores scores del ligando epóxido de menadiona (2) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.

#1		#2		#3	
Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD
-7.5	0	-7.5	0	-7.5	0
-7.5	6.693	-7.5	6.705	-7.5	6.7
-7.3	5.65	-7.3	3.211	-7.2	3.139
-7.2	3.146	-7.3	1.154	-7.2	1.437
-7.2	1.461	-7.3	5.623	-7.1	2.167
-7.2	5.59	-7.1	5.59	-7.1	3.229
-7.1	5.883	-7.1	3.221	-7	2.664
-7.1	3.199	-7.1	2.203	-7	5.164
-7.1	2.171	-7.1	3.154	-7	1.714
-7	2.669	-7.1	5.217	-7	4.05

Anexo 23. Mejores scores del ligando (3) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.

#2		#3		#4	
Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD
-7.7	0	-7.6	0	-7.6	0
-7.7	2.429	-7.6	1.638	-7.6	1.614
-7.7	3.049	-7.6	1.232	-7.6	3.454
-7.6	3.345	-7.5	1.675	-7.6	1.234
-7.6	2.765	-7.5	1.354	-7.5	1.689
-7.6	2.038	-7.5	1.832	-7.5	2.356
-7.6	2.801	-7.4	2.248	-7.5	1.501
-7.5	4.042	-7.4	3.307	-7.5	1.287
-7.4	3.181	-7.3	2.505	-7.4	2.977
-7.4	1.877	-7.3	3.181	-7.4	2.776

Anexo 24. Mejores scores del ligando (4) y RMSD de las distintas poses en relación con la mejor de ellas.

#1		#2		#3	
Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD	Puntajes (kcal/mol)	RMSD
-7.8	0	-7.8	0	-7.8	0
-7.7	1.078	-7.7	3.217	-7.7	1.069
-7.7	1.498	-7.7	1.155	-7.7	3.187
-7.7	2.163	-7.6	2.158	-7.7	1.499
-7.6	1.399	-7.6	1.504	-7.6	2.148
-7.6	1.952	-7.5	2.03	-7.6	1.95
-7.6	1.939	-7.5	1.831	-7.6	1.928
-7.6	1.97	-7.4	1.757	-7.5	2.629
-7.5	2.849	-7.4	3.119	-7.5	1.98
-7.4	1.87	-7.3	3.099	-7.4	1.675